

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15059

研究課題名(和文)新規ヒト多能性維持機構の解明と、それを利用した分化誘導方法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of a novel mechanism for maintenance of multipotency in adult multipotent stem cells

研究代表者

明石 英雄 (Akashi, Hideo)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10431785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：成体多能性幹細胞は、胚性多能性幹細胞と異なる多能性維持機構を有すると考えられるが、詳細は明らかでなかった。我々は、多能性維持と分化方向決定に關与する一つの遺伝子領域を同定し、さらに、その因子が神経細胞特異的な遺伝子発現制御とスプライシング制御に關与することをつきとめた。この研究結果に基づいた、新たな多能性制御モデルによる神経細胞の新規分化誘導方法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Maintenance of Multipotency in adult stem cells is regulated by a mechanism different from that of embryonic stem cells. We identified a gene region involved in maintenance of multipotency and direction of differentiation. Furthermore, we indicated the genes induced neuron-specific expression and splicing. These results might lead to development of a novel method to produce neurons from adult stem cells.

研究分野：遺伝子工学

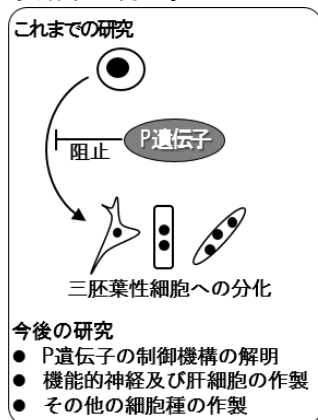
キーワード：成体幹細胞 分化誘導 神経細胞 スプライシング

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト成体多能性幹細胞は、三胚葉への分化能を維持する細胞である。初期胚由来の胚性幹細胞 (ES 細胞や、それを模した iPS 細胞など) では、主に Oct3/4、Sox2 等の転写因子群により多能性が維持されるが (Cahan and Daley Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 14; 357-68, 2013)、成体多能性幹細胞ではこれらの転写因子群の発現は顕著ではない。そのため、その多能性は初期胚由来の幹細胞とは異なる分子機構により制御されていると推測されるが、詳細は全く不明であった。

そこで、申請者らは、成体多能性幹細胞において、下等生物からヒトまで進化的に保存された多能性制御機構が存在するという仮説を立て、研究を進めていた。

免疫沈降実験、質量分析解析実験から、再生のモデル生物であるプラナリアの成体多能性幹細胞 (ネオプラスト) とヒト細胞とに共通して発現する因子 (以下、「Pluripotency 因子; P 因子」と呼ぶ) を同定し、8 種の P 因子バリエントが存在することを明らかにするとともに、P 因子のエキソン 4、6、又は 7 をノックダウンすると、それぞれ神経前駆体細胞様、肝細胞様、骨格筋細胞様に分化するという結果を得た。



これらの結果から、P 因子は多能性維持と、三胚葉への分化方向決定のマスター因子である可能性が示唆されるが、P 因子の機能についてはほとんど報告がなく、どのようなメカニズムを介して多能性を維持 / 制御しているかは全く分かっていない。

本研究は、解明が進んでいる胚性の多能性幹細胞に対し、殆ど研究されていない成体期の多能性幹細胞に着目し、未知の多能性制御機構の解明を試みる。

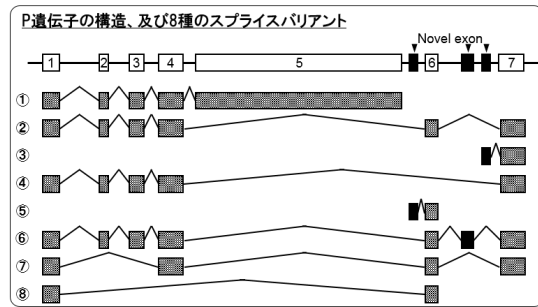
本研究により、P 因子による新規な多能性制御の分子機構が明らかとなるものと予想される。この結果は、成体における再生と損傷修復を担う成体多能性幹細胞に、胚性の幹細胞とは異なる多能性制御機構が存在すること示すものであり、これまで初期発生過程と類似したものと考えられていた「再生・損傷修復」の原理を、新たな視点から捉えなおす最初の一步となるものである。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト成体多能性幹細胞の多能性維持 / 制御機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、多能性に関与していると考えられる 8 種の P 因子バリエントのうち、どのバリエント (群) が、どのようなメカニズムを介して三胚葉性細胞への分化を制御しているかを明らかにする。



研究 1. 各細胞への分化に関わる P 因子バリエント (群) の特定

研究 2. 分化プロセスの解明

研究 3. P 因子の標的遺伝子 / シグナル系の同定

研究 4. P 因子が選択的スプライシング制御に及ぼす影響の検討

(1) 分化に関わる P 因子バリエント (群) の特定

エキソン 4、6、又は 7 のノックダウン効果の確認: エキソン 4、6、又は 7 のノックダウン後の細胞から mRNA 及びタンパク質を抽出し、各 P 因子バリエントの発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 及び western blot により調べる。

(2) 分化プロセスの解明

各胚葉及び細胞分化マーカーの発現の確認

研究(1)で同定された分化阻止バリエントをノックダウンした細胞から、経時的に mRNA を抽出し (ノックダウンから 2 日後、5 日後、8 日後) 各胚葉及び細胞分化マーカーの遺伝子発現を RT-PCR 法より調べる。

分化制御因子のスプライシングの変化の確認

さらに、分化制御因子については、複数のエキソンにまたがる複数のプライマーセットを作製して RT-PCR 法を行い、分化阻止バリエントのノックダウンによるスプライシングの変化の有無を調べる。

(3) P 因子の標的遺伝子 / シグナル系の同定

遺伝子プロファイルの比較: 分化阻止バリエントのノックダウン前後の細胞から mRNA を抽出し、それぞれの遺伝子プロファイルを次世代シーケンスにより調べ、GSEA 法又は David 法を用いて比較検討することにより、

分化阻止バリエーションの標的遺伝子(群)を特定する。

(4)P 因子が選択的スプライシング制御に及ぼす影響の検討

ノックダウン前後のスプライシングの変化：(3)で得られた遺伝子プロファイルを解析し、分化阻止バリエーションのノックダウン前後において、スプライシングパターンの変化を確認する。

#### 4. 研究成果

成体多能性幹細胞は、胚性多能性幹細胞と異なる多能性維持機構を有すると考えられるが、詳細は明らかでなかった。我々は、その機構が、再生能力の高い下等生物からヒトまで進化的に保存されているのではないかという仮説を立て、プラナリアの成体多能性幹細胞(ネオプラスト)とヒト多能性幹細胞とに共通する因子を探索し、多能性維持と分化方向決定に関与する一つの遺伝子領域(P 因子)を同定した。

実際にヒト細胞で P 因子を抑制すると、P 因子抑制前後で中胚葉および内胚葉に属する遺伝子の発現が減少し、外胚葉に属する遺伝子、中でも、神経細胞特異的な遺伝子発現が上昇することが明らかとなった。さらに、P 因子抑制前後で多数の遺伝子スプライシングフォームが変化し、神経細胞特異的なスプライシング産物が新規に発現してくることが明らかになった。以上の結果は、P 因子抑制によってスプライシングが制御され、神経関連遺伝子が非機能型から機能型に変化することにより神経細胞への分化が開始するという、新たな多能性制御モデルが存在する可能性を示唆するものである。

一方で、P 因子は成体多能性幹細胞に特異的なものではなく、正常ヒト線維芽細胞においても、P 因子を抑制すると、成体多能性幹細胞と同様に短期間のうちに神経細胞様細胞への形態変化が起こることがわかった。これは、マウス細胞においても同様であった。このことは、P 因子が分化多能性において当初予期していたより普遍的な機能を担っていることを示唆する。今後、P 因子ノックアウトマウスを用いた、詳細な制御機構の解析を計画している。

本研究に関連し、マウスに異種移植したヒト多能性幹細胞を高感度に検出する方法を開発したが、調査の結果、既存の方法より鋭敏な系を開発できたことが分かった。これは予定外の産物ではあったが、並行して論文執筆、学会発表、特許出願を行った。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Funakoshi, K., Bagheri, M., Zhou, M.,

Suzuki, R., Abe, H., Akashi, H. (2017) Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. Sci. Rep. 7, 13202. 査読有  
DOI: 10.1038/s41598-017-13402-3.

[学会発表](計6件)

明石英雄、船越広大、周明、鈴木良地、阿部寛、安達登。Alu 配列を標的とした定量 PCR 法による古人骨由来ヒトゲノム DNA の高感度検出法の開発。第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会。日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学。2018 年 3 月 28 ~ 30 日。口頭発表。

明石英雄、船越広大、鈴木良地、阿部寛、安達登。定量 PCR 法による陳旧試料中ヒトゲノム検出のためのプライマー・プローブ設計クライテリア。第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会。長崎大学坂本キャンパス。2017 年 3 月 28 ~ 30 日。ポスター発表。

船越広大、明石英雄、鈴木良地、阿部寛、安達登。陳旧試料における高感度ヒトゲノム検出法の開発。第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会。長崎大学坂本キャンパス。2017 年 3 月 28 ~ 30 日。ポスター発表。

船越広大、Mozhdeh Bagheri、出澤真理、明石英雄。定量 PCR 法によるヒト Alu 配列の特異的検出のためのプライマー・プローブ設計クライテリア。日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会。東京大学大気海洋研究所。2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日。ポスター発表。

船越広大、Mozhdeh Bagheri、出澤真理、明石英雄。Alu 配列を標的とした高感度ヒト細胞検出法の開発。日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会。東京大学大気海洋研究所。2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日。口頭発表。

明石英雄、Mozhdeh Bagheri、若尾昌平、黒田康勝、柴田典人、北田容章、藤吉好則、田岡万悟、磯辺俊明、阿形清和、出澤真理。ヒト成体多能性幹細胞における新規多能性制御因子とその機能。日本解剖学会第 61 回東北・北海道連合支部学術集会。盛岡市観光文化交流センタープラザおでつて。2015 年 8 月 29 ~ 30 日。口頭発表。

[産業財産権]

出願状況（計2件）

名称：ヒトゲノムDNA検出法  
発明者：明石英雄、船越広大  
権利者：国立大学法人秋田大学  
種類：特許権  
番号：PCT/JP2017/42943  
出願年月日：平成29年11月30日  
国内外の別：国外

名称：ヒトゲノムDNA検出法  
発明者：明石英雄、船越広大  
権利者：国立大学法人秋田大学  
種類：特許権  
番号：特願2016-233119  
出願年月日：平成28年11月30日  
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明石 英雄 (AKASHI, Hideo)  
秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10431785