

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20407

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた低酸素培養による基礎的研究

研究課題名(英文) The study of the hypoxia culture using human induced pluripotent stem cells

研究代表者

杉本 浩司 (SUGIMOTO, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：40646113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞の多能性の制御とStat3の関係性について検討したところ、低酸素環境下でStat3を阻害することで、HIF-2 α の発現が抑制され、未分化マーカーの発現が減少した。このことから、ヒトiPS細胞は低酸素環境下ではJAK/Stat3経路を介して、HIF-2 α の発現を促進し、未分化状態を維持しているのではないかと推察される。マウスES細胞、マウスiPS細胞においてもHIF-2 α によるstemnessの調節が報告されており、ヒトiPS細胞も同様の傾向を示したと言える。

研究成果の概要(英文)：This study indicates that the HIF-2 α expression in human iPS cells was activated under hypoxic conditions, similarly to that in murine iPS cells, and that HIF-2 α among HIFs is the most effective compound for maintaining the pluripotency of human iPS cells. Furthermore, the STAT3 signal pathway regulates the expression of HIF-2 α .

研究分野：歯内療法学

キーワード：Hypoxia Stat3 ヒトiPS細胞 HIF

1. 研究開始当初の背景

我々は以前の研究で、マウス iPS 細胞を低酸素環境下で培養すると 20%O₂ 下で培養した場合よりも未分化状態を維持していることを報告した。さらにマウス iPS 細胞の未分化状態の維持には HIF-2 が関与していることも示唆された(Sugimoto et al.,2013)。マウス iPS 細胞と同様にヒト iPS 細胞においても低酸素培養により未分化状態を維持できる可能性を考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

幹細胞形質の維持や分化の制御などにおいても HIF が重要な役割を担っていることが明らかとなりつつあるが、ヒト iPS 細胞における HIFs の働きについては十分に解明されていない。また、ヒト iPS 細胞はマウス iPS 細胞に比べ、培養、分化誘導、凍結保存などの操作に熟練を要することが、研究を進めていくうえでのマイナス要因となっている。ヒト iPS 細胞において低酸素環境がマウス iPS 細胞と同様に未分化状態の維持を促し、低酸素下での HIFs の役割がわかれば、多能性を維持したヒト iPS 細胞の培養の手助けとなり得る。我々は Stat3 による HIFs の活性化がヒト iPS 細胞の Stemness の維持に関与しているのではないかと考えた。本研究では低酸素培養がヒト iPS 細胞に与える影響および、Stat3 を介した HIF の活性化と stemness 維持における働きについて検討を加えた。

3. 研究の方法

実験には理研 CELL BANK より購入した 4 遺伝子導入ヒト iPS 細胞(201B7)を用いた。酸素濃度 20%を通常酸素濃度、酸素濃度 5%を低酸素条件に設定した。

(1) Cell Proliferation

MEF を播種した Dish 上に、201B7 ヒト iPS 細胞を 6well 皿に 5 コロニーずつ播種し、5% および 20%O₂ の条件下で 14 日間、bFGF 添加 Repro Stem 培地で培養した。形態学的観察に加え、未分化状態を維持しているコロニーを測定するため、ALP 染色後(Alkaline Phosphatase Staining Kit, Stemgent)に染色されたコロニー数を 5、14 日目に測定した。

(2) Real-time PCR

201B7 ヒト iPS 細胞を 5% および 20%O₂ の条件下で 14 日間培養し、未分化マーカー遺伝子 Nanog、Sox2、Oct4 の発現量を Real-time PCR にて測定した。

(3) siRNA Analysis

siRNA をトランスフェクションした 201B7 ヒト iPS 細胞を播種し、5%O₂ 下で 7 日間培養した。

siRNA(Mm_Hif1a_4flexiTube, siRNA, Mm_Epas1_5FlexiTube, siRNA, Mm_Hif3a_5FlexiTube siRNA: Qiagen)に HiPerfect transfection reagent(Qiagen)を添加し混和してコンプレックスを作製し、培養皿に 1 滴ずつ添加。siRNA 導入 7 日後に細胞を回収し、HIF-1, HIF-2, HIF-3 をノックダウンした場合の Nanog, Sox2, Oct4 の mRNA 発現量を Real-time P

CR にて、ならびにタンパク発現量を Western blotting にて比較した。

対照群として、AllStars Negative Controls(Qiagen)をトランスフェクションしたものを用いた。

(4) Stat3 inhibition

細胞質 Stat3 阻害物質である S31 201(AXN) および非ペプチド性低分子 Stat3 阻害物質である Stattic(AXN)による Stat3 抑制下でのヒト iPS 細胞の形態観察と HIF-2 の発現量を Real-time PCR にて調べた。

阻害剤未添加群、DMSO 添加群、S31 201 添加群、Stattic 添加群としてヒト iPS 細胞を 5% O₂ で培養。培養 3 日目に Trizol reagent(Life Technologies, CA)にて細胞を回収した。5% O₂ での Stat3 の発現量ならびに Stat3 阻害剤添加時の Stat3 発現量を Real-time PCR にて確認した。さらに Stattic および S31 201 添加による Stat3 抑制時の HIF-2 の発現量を確認した

4. 研究成果

(1) Effects of the HIF Expression on iPS Cell Morphology

201B7 ヒト iPS 細胞において、低酸素条件下では 20%O₂ 下より 14 日目での ALP 染色された未分化状態のコロニー数は有意に多かった。(Fig1)

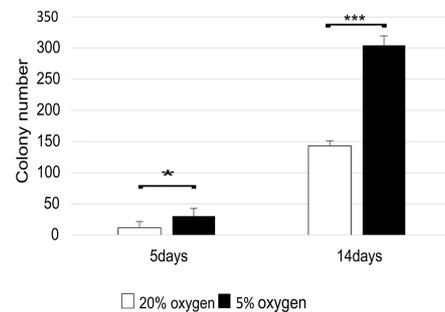


Fig1

(2) Real-time PCR

201B7 ヒト iPS 細胞での Nanog, Sox2, Oct4 の未分化マーカーの発現について Real-timePCR にて比較したところ、培養 14 日目では 5% O₂ 下の方が未分化マーカー mRNA 発現量が高かった(Fig2)。

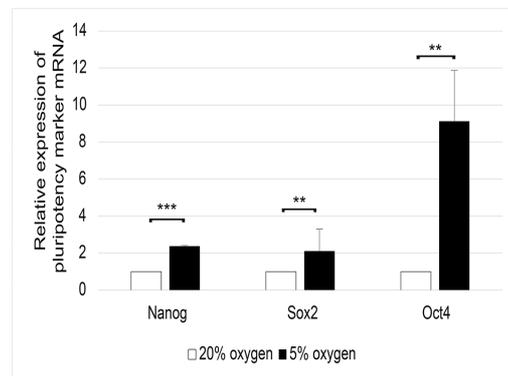


Fig2

(3) siRNA Analysis

siRNAを導入後、HIF-1をノックダウンした群では、201B7ヒトiPS細胞において対照群と同様にiPS細胞のコロニーを形成した(Fig3B)。HIF-2をノックダウンした群で、コロニーは形成するもののコロニー内の細胞密度が疎なものが多く見られた(Fig3C)。HIF-3をノックダウンした群では、HIF-1をノックダウンしたときと同様に、対照群と同じようにiPS細胞様のコロニーを形成した(Fig3D)。

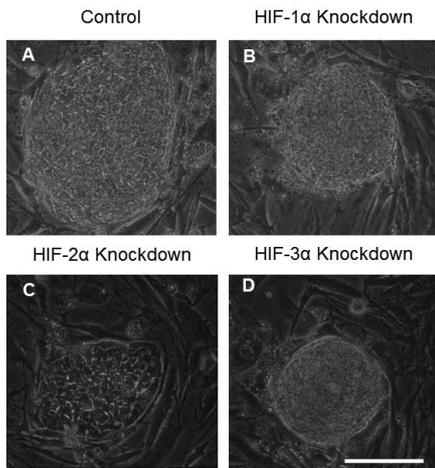


Fig3

培養7日目の201B7ヒトiPS細胞において、HIF-2をノックダウンしたものでは、対照群と比較して、Nanog、Sox2、Oct4の発現量は有意に減少していた。HIF-3をノックダウンした群ではSox2、Oct4の発現量は有意に減少していた。Nanogの発現量は減少傾向ではあったが、対照群と有意差は認めなかった。HIF-1をノックダウンしたものでは201B7細胞と対照群で、未分化マーカーの発現量に有意差は認めなかった(Fig4)。

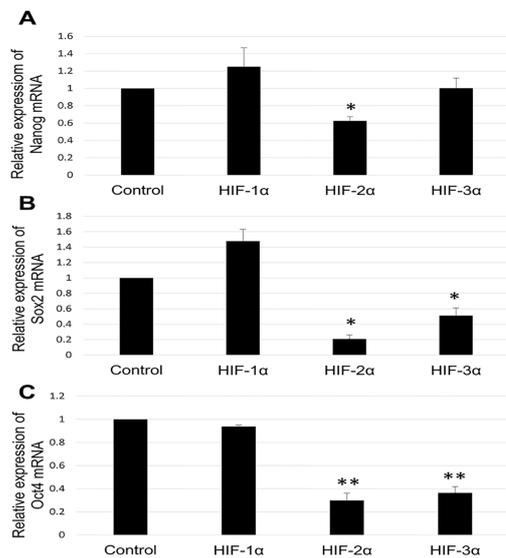


Fig4

(4) Stat3 inhibition

Stat3阻害剤添加時のStat3発現量を確認した。201B7細胞では、Stattic添加群で15%、S31 201添加群で20%に発現量は減少していた(Fig5A)。さらにStatticおよびS31 201を添加し、Stat3抑制時のHIF-2の発現量を確認した。すると、201B7細胞ではStattic添加群で7%、S31 201添加群で57%に発現量は減少していた(Fig5B)。

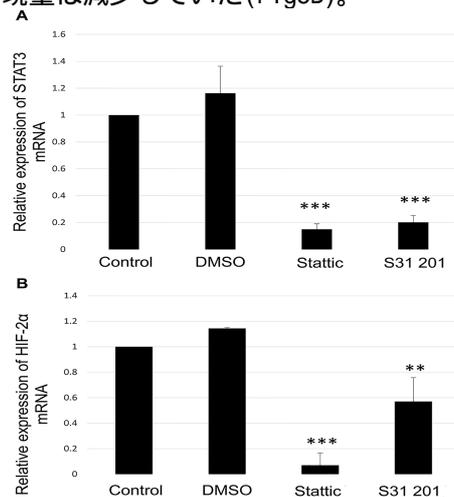


Fig5

StatticおよびS31 201を用いて、Stat3抑制時のヒトiPS細胞のコロニーの形態観察を行った。Stattic添加群では、201B7ヒトiPS細胞においてコロニー形成は見られず、細胞は凝集していなかった。S31 201添加群ではコロニーの形成は認められたが、阻害剤未添加群およびDMSO添加群のiPS細胞コロニーと比較してコロニーサイズは小さかった(Fig6A)。StatticおよびS31 201添加し、Stat3抑制時に未分化マーカーである未分化マーカーの発現量をReal-time PCRを用いて確認した。201B7ヒトiPS細胞において、Stattic添加群ではコントロール群と比べて、有意にNanog、Sox2、Oct4の未分化マーカーの発現量は減少していた。S31 201添加群でも同様にNanog、Sox2、Oct4の未分化マーカーの発現量は減少していた(Fig6B,C,D)。

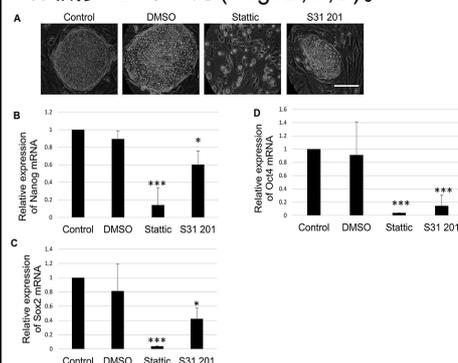


Fig6

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)

Sugimoto K, Matsuura T, Nakazono A, Igawa K, Yamada S, Hayashi Y.
Effects of hypoxia inducible factors on pluripotency in human iPS cells, Microsc Res Tech. 2018 Apr 6. doi: 10.1002/jemt.23032. (査読有)

[学会発表](計 1 件)

杉本浩司, 吉澤 祐, 林 善彦, ヒト iPS 細胞の培養初期における低酸素および HIF (Hypoxia Inducible Factor) の働き,
日本歯科保存学会 2016 年秋季学術大会 (第 145 回), 2016 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 浩司 (SUGIMOTO, Koji)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号:
40646113

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()