

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21243

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞のFGF依存性機構の解明：Nodalシグナリングの多重制御

研究課題名(英文) FGF regulation of Nodal signaling in human iPS cells

研究代表者

脇谷 晶一 (Wakitani, Shoichi)

宮崎大学・農学部・講師

研究者番号：40621800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト人工多能性幹(iPS)細胞を維持培養するためには線維芽細胞増殖因子(FGF)を添加する必要がある。FGFの役割を明らかにするため、FGFシグナル阻害後のヒトiPS細胞の遺伝子発現動態を解析したところ、ヒトiPS細胞の維持に必須な因子Criptoの遺伝子発現が低下する以前からCriptoの機能消失を示す結果が認められ、FGFは転写後調節を介してCriptoの活性化を維持していることが示唆された。また、Criptoの遺伝子発現がDNAメチル化によって制御されていることを明らかにしたが、ヒトiPS細胞が分化した直後のCripto発現量の低下はDNAメチル化を介さないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Human induced pluripotent stem (iPS) cells requires fibroblast growth factor (FGF) to maintain its proliferation and stemness. To clarify the role of FGF, analysis of gene expression kinetics of human iPS cells after FGF signal inhibition was performed. The results showed that dysfunction of Cripto, which is essential for maintenance of human iPS cells, occurred before down-regulation of Cripto, suggesting that FGF maintains activation of Cripto via posttranscriptional regulation. We also revealed that Cripto gene expression is regulated by DNA methylation, but the down-regulation of Cripto after differentiation of human iPS cells did not involve DNA methylation.

研究分野：分子生物学

キーワード：多能性幹細胞 FGF Nodal Cripto

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)ヒト多能性幹細胞の FGF 依存性と Nodal シグナリング

iPS 細胞の樹立法が発見されて以降、幹細胞やそれを応用した再生医療に関する研究は著しく進展してきた。ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の樹立および増殖・維持には塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を培地へ添加することが必須であり、bFGF は Nodal/Activin シグナリングを介してヒト ES 細胞を維持することが示されている (Vallier et al., J Cell Sci 2005)。

Nodal/Activin シグナリングとは、アクチビン受容体の活性化による細胞内リン酸化カスケードであり、そのリガンドは Nodal 又はアクチビンである。アクチビンは単独でアクチビン受容体を活性化する一方、Nodal はアクチビン受容体の活性化に補助タンパク質 Cripto を必要とする。bFGF はヒト ES 細胞における Cripto の発現を促進でき、Nodal は自身を標的遺伝子としたポジティブフィードバックを引き起こすことができる。よって、ヒト多能性幹細胞では bFGF が Cripto の発現を支援し、Nodal シグナリングの増幅維持が可能となっていると考えられる。

ヒト多能性幹細胞を維持する bFGF の直接的な役割の 1 つはこの Cripto の発現誘導と考えられるが、Cripto の人為的な補充は bFGF の代用としてヒト ES 細胞を維持することができなかつたため (Vallier et al., J Cell Sci 2005)、bFGF には Cripto の発現誘導以外の未だ明らかにされていない役割もある。但し、アクチビン A は FGF シグナル阻害条件下でもヒト ES 細胞を維持することができるため、bFGF の作用は専ら Nodal/Activin シグナリングを介している。これらの知見を総合すると、bFGF 非添加条件下のヒト多能性幹細胞では Nodal-Cripto 選択的な阻害が起きている可能性が強く疑われる。

### (2)Cripto プロモーターの DNA メチル化による制御

FGF 受容体は多種多様な細胞に存在しているにも関わらず、FGF が Cripto の発現を制御できる細胞はヒト ES 細胞や胎児期の雄性生殖細胞に報告が限られている。よって、FGF が Cripto の発現を誘導するためには特定の条件が存在する可能性が高い。ヒト iPS 細胞の Cripto 遺伝子領域では、多能性遺伝子 Oct4 のプロモーター領域と同様に DNA メチル化が外されている (Nishino et al., PLoS One 2010)。加えて、Cripto が発現する時期の生殖細胞ではゲノムワイドに DNA 脱メチル化され、周囲の細胞が FGF9 を産生している。よって、FGF が Cripto の発現を誘導している細胞では DNA 脱メチル化が Cripto プロモーターを開放し、FGF シグナルによる Cripto の転写を可能にしていると推測され

る。しかし、Cripto プロモーターの DNA 低メチル化が本当に Cripto の発現や iPS 細胞の樹立・維持に本質的であるのかは分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞の Nodal-Cripto 干渉因子群に対する bFGF の関与を明らかにし、Cripto の発現誘導以外の bFGF の役割を把握することを第一の目的とする。

また、ヒト多能性幹細胞特異的な Cripto 関連ゲノム領域の DNA 低メチル化の意義を明らかにすることを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)FGF シグナル阻害条件下のヒト iPS 細胞における Nodal-Cripto 関連遺伝子の発現動態

ヒト iPS 細胞株 Tic (JCRB1331) を FGFR 阻害剤 PD173074 (終濃度 200nM) を含む培地を用いて培養し、経時的な遺伝子発現動態を調査した。遺伝子発現解析にはリアルタイム RT-PCR 法を用い、対象遺伝子は Nodal, Cripto, Inha, Inhba, Inhbb, Lefty1, Lefty2, Fst, Cer1, Nomo1, Nomo2, Nomo3, Ncln, Oct4, Nanog とした。また、アクチビン A (終濃度 10ng/ml)、Nodal/Activin 阻害剤 SB431542 (終濃度 1 $\mu$ M)、BMP 阻害剤 DMH1 (終濃度 1 $\mu$ M) または Wnt 阻害剤 IWR-1 (終濃度 2 $\mu$ M) を PD173074 と併用添加した実験も行った。

### (2)Cripto プロモーターの DNA メチル化と Cripto の遺伝子発現

Cripto プロモーター領域の DNA メチル化と Cripto 遺伝子の発現の関係を明らかにするため、CoBRA 法による DNA メチル化解析を行った。対象細胞としてはヒト iPS 細胞株 Tic、その親細胞株 MRC5 を用いた。

また、Cripto の発現に対する DNA メチル化の影響を明らかにするため、ヒトセミノーマ細胞株 TCam-2 に DNA 脱メチル化剤 5-aza-dC (終濃度 1 $\mu$ M) を添加し、3 日後の DNA メチル化率を CoBRA 法にて、Cripto の発現量をリアルタイム RT-PCR にて調査した。

## 4. 研究成果

### (1)FGF シグナル阻害剤による Nodal-Cripto 関連遺伝子の発現変動

フィーダー細胞 (マウス胎子線維芽細胞) 上に培養中のヒト iPS 細胞に PD173074 を添加したところ、6 時間後に Lefty1, Lefty2, Fst の発現が上昇し、Cripto, Nanog の発現が低下した。一方、Nodal, Inhba, Inhbb, Cer1, Nomo1, Nomo2, Nomo3, Ncln, Oct4 の発現に変動は認められなかった。Cripto と Nanog の発現は FGF の制御下にあることが報告されていることから、PD173074 によってヒト iPS 細胞の FGF シグナルが阻害されていた

ことが確かめられた。

次に無フィーダー条件で同じヒト iPS 細胞を培養し、PD173074 を添加したところ、先記の実験と同様に Nanog の発現低下と Fst の発現上昇が認められた。一方、驚くべきことに Lefty1 の発現は著しく低下し、Lefty2 の発現も有意差は示さなかったものの低下傾向を示した。また、Cripto の発現低下も認められず、Nodal の発現低下が認められた。

以上の実験より、FGF はヒト iPS 細胞の Fst の発現を抑制する作用をもつことが明らかになった。Fst はアクチビン阻害因子であるが、Nodal を阻害する作用は報告されていない。よって、FGF による Fst の発現抑制はヒト iPS 細胞の維持に必須とは考えにくい。また、FGF シグナル阻害による Lefty1 の発現変動のフィーダー細胞に依存した相反については、原因となるフィーダー細胞由来因子を特定する必要があるため後述の実験を行った。一方、Lefty は多能性幹細胞が未分化状態を脱したときに上昇する分化マーカーとされてきたが、ヒト多能性幹細胞の無フィーダー培養条件のように先述のフィーダー細胞由来因子が存在しない条件下では分化マーカーとして不適である可能性が示唆された。

#### (2) FGF シグナル阻害剤による Lefty1 発現変動の相反はアクチビンに依存する

FGF シグナル阻害による Lefty1 の発現変動の相反を生み出すフィーダー細胞由来因子の第一候補として、アクチビンを挙げた。ヒト iPS 細胞を無フィーダー条件でアクチビン A 含有培地を用いて培養し、PD173074 添加後の遺伝子発現動態を調査したところ、アクチビン A 非添加条件下では PD173074 により抑制されていた Lefty1, Lefty2, Nodal の発現がアクチビン A 添加条件下では上昇することが明らかになった。よって、FGF シグナル阻害による Lefty1 の発現変動の相反を生み出していたフィーダー細胞由来因子はアクチビンであることが明らかになった。

Lefty と Nodal は Nodal/Activin シグナリングの標的遺伝子であるため、アクチビン不在下では Nodal シグナリングの活性化に必要な何らかの因子が FGF シグナルの阻害によって不活化したと考えられる。一方、アクチビン A 存在下では FGF シグナルの阻害によってアクチビン作用が増強されたことから、この因子はアクチビンの作用を抑制する機能を有すると考えられる。この 2 つの条件を満たす因子は現段階では Cripto しか知られていない。しかしながら、無フィーダー条件で行った我々の実験では少なくとも Lefty1 の発現低下が認められた PD173074 添加 6 時間後の時点では Cripto の発現低下は認められなかった。よって、FGF は転写後調節を介して Cripto の活性化を維持している可能性が示唆された。

#### (3) FGF シグナル阻害剤による Lefty1 の発現低下は Cripto の発現低下より先行する

FGF シグナルの阻害による Lefty1 の発現低下が Cripto 遺伝子の発現制御に依らないことを確認するため、無フィーダー条件で培養されているヒト iPS 細胞に PD173074 を添加し、24 時間後までの遺伝子発現動態を経時的に調査した。すると、Lefty1 の発現低下は少なくとも添加 2 時間後から認められるのに対して、Cripto の発現低下は 24 時間後に初めて認められた。よって、Cripto 遺伝子の発現低下は FGF シグナルの阻害によってヒト iPS 細胞が未分化状態を脱した二次的な影響であることが示唆された。つまり、FGF シグナル阻害による Lefty の発現変動は Cripto の転写が抑制されたことによるものではないと考えられる。

#### (4) PD173074 の Lefty1 に対する作用は FGF シグナルと Nodal/Activin シグナルを介するが、BMP シグナルや Wnt シグナルを介さない

PD173074 が Lefty1 の発現変動を起こす際に FGF シグナルを介することを確認するため、ヒト iPS 細胞の培地から bFGF を除去し、その後の遺伝子発現動態を調査した。すると、bFGF 除去 24 時間後に Cripto の発現低下を伴わずに Lefty1 の発現低下を再現できたことから、PD173074 の Lefty1 の発現に対する作用は FGF シグナルを介することが明らかになった。

Nodal/Activin 阻害剤 SB431542 と PD173074 の併用添加実験では、SB431542 の添加によってヒト iPS 細胞の Lefty1, Lefty2, Nodal の発現が低下したが、PD173074 は相加的な発現抑制作用を示さなかった。よって、PD173074 の Lefty1 に対する作用は Nodal/Activin シグナルを介することが明らかになった。一方、BMP 阻害剤 DMH1 や Wnt 阻害剤 IWR-1 はヒト iPS 細胞の Lefty1 の発現に影響を及ぼさず、PD173074 はこれら阻害剤の有無にかかわらず同等に Lefty1 の発現抑制を起こしたことから、PD173074 の Lefty1 発現抑制作用は BMP シグナルや Wnt シグナルを介さないことが示唆された。

#### (5) Cripto プロモーターの DNA 低メチル化はヒト iPS 細胞特異的である

過去の研究で Cripto 遺伝子領域の DNA メチル化率はヒト iPS 細胞で特異的に低いことが明らかになってきたが、プロモーター領域の DNA メチル化状態については明らかにされていなかった。そこでヒト iPS 細胞株 Tic とその親細胞 MRC5 の Cripto 転写開始点上流 1kb 領域の DNA メチル化状態を調査したところ、MRC5 は 45% のメチル化率を示したのに対して Tic はメチル化を示さないことが明らかになった。よって、Cripto プロモーター領域においてもヒト iPS 細胞は特異的に

DNA 低メチル化を示すことがわかった。一方、ヒト iPS 細胞を分化培地で7日間培養し、DNA メチル化解析を行ったところ、Cripto プロモーターの DNA メチル化は認められなかった。この時点までに Cripto 遺伝子の発現低下は認められることから、ヒト iPS 細胞が未分化状態を脱した後の Cripto の発現低下は DNA メチル化が主要因ではないことが明らかになった。

(6)Cripto の遺伝子発現は DNA メチル化によって制御される

Cripto の遺伝子発現が DNA メチル化によって制御されることを確認するため、MRC5 に DNA 脱メチル化剤 5-aza-dC を添加し、DNA メチル化解析を行ったが、DNA メチル化の低下が認められなかった。ヒトセミノマ由来細胞株 TCam-2 に細胞を切り替えて同様の実験を行ったところ、DNA メチル化率の低下が認められ、更に Cripto mRNA 発現量の上昇が認められた。よって、Cripto の遺伝子発現は DNA メチル化によって制御されることが明らかになった。

#### <引用文献>

Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. J Cell Sci. 2005, 118:4495-4509

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. PLoS One. 2010, 5:e13017

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

脇谷 晶一、ヒト多能性幹細胞における Nodal/Activin 阻害タンパク質の線維芽細胞増殖因子による発現制御、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年

脇谷 晶一、Primed 型多能性幹細胞における Nodal 反応性遺伝子の FGF 作用阻害によるアクチビン依存性発現変動、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

脇谷 晶一 (WAKITANI, Shoichi)  
宮崎大学・農学部・講師  
研究者番号：40621800

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

西野 光一郎 (NISHINO, Koichiro)

保田 昌宏 (YASUDA, Masahiro)

Kate Loveland (LOVELAND, Kate)

新井 良和 (ARAI, Yoshikazu)

高澤 建 (TAKASAWA, Ken)