

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11037

研究課題名(和文) -cateninを標的とした未分化性制御による新規多能性幹細胞の作製法の開発

研究課題名(英文) Acquisition of novel naive pluripotent stem cells by activation and regulation of post-transcriptional modification on beta catenin

研究代表者

竹原 俊幸 (TAKEHARA, Toshiyuki)

近畿大学・大学病院・助教

研究者番号：60580561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を臨床応用するには、より能力が高くまた安定した基底状態へ導く必要がある。本研究では、catenin分子に着目し、その修飾状態を変化させることで遺伝子組換えを経ず、また単一の因子の制御によって基底状態ヒトiPS細胞の獲得が可能であった。本研究結果は、多能性ネットワークの理解およびiPS細胞のさらなる利用価値を高める結果となる。また、cateninは細胞の癌化や細胞死に強く関連することから、本研究により得られた新しいcateninの機能は未知の細胞現象における一つの重要な知見となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幅広い領域への再生医療の適用には、高い能力を持つ多能性幹細胞の利用は必須である。しかしながら、現状のヒト多能性幹細胞は増殖能力の低さ、ゲノム不安定性、分化能力の低さを示すことから、これらの問題を解決する必要がある。本研究では、遺伝子組換えを必要とせず、1因子の制御によって非常に能力の高いヒト多能性幹細胞の獲得が可能であった。これはcateninと多能性ネットワークの新しい関係性を示すと同時に、臨床応用に適したヒト多能性幹細胞を準備することが可能な技術であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The clinical application for regenerative medicine of human iPS cells should be achieved to naive state which shows a more high differentiation potential, self-renewal and genome stability. In this study, we focused on the catenin molecule and found that the acquisition of naive human iPS cells was possible without genetic intervention and by altering its post-transcription modification state. These results will refinement the understanding of the pluripotency network and the value of using iPS cells further. In addition, since catenin is robustly associated with oncogenic transformation and cell death, the novel function of catenin obtained in this study may be an important insight in an unknown cellular phenomenon.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：catenin naive型とprimed型 多能性幹細胞 iPS細胞 基底状態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞は、生殖細胞を含む三胚葉へと分化できる高い分化能および、半永久的に分裂することができる自己複製能を有していることから組織発生学の体外モデルとしてあるいは、再生医療の移植材料の供給源として注目されている。特に、最近のヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS 細胞)に関連する技術の進展により、再生医療の幅広い展開が期待されている。しかしながら、ヒト iPS 細胞は当初から言われていたがん化以外にも、細胞株差による品質の不均一性、目的の細胞への誘導効率の低さとばらつき、および長期間培養によるゲノム不安定性といった多くの問題を抱えている。これらは臨床応用を目指す上で早期に解決すべき重要な課題である。この問題は多能性幹細胞の性質に起因しており、ヒト iPS 細胞が「真の未分化性=発生学的な基底状態」に達しておらず、「穏やかに分化した状態=分化傾倒状態」であることがわかってきた。当初マウスとヒト多能性幹細胞の違いは種差からくるものと考えられていたが最近の研究成果より発生段階が異なる由来が原因であることが示された。そこで多くの研究者が primed 型のヒト多能性幹細胞を naïve 型へと誘導できないか試みており、いつかの方法が報告されている。ところが、それらの方法は外来遺伝子の導入や過剰な阻害剤による遺伝子変異など多くの問題が示されており、未だに完全な基底状態を有するヒト多能性幹細胞の獲得には至っていない。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞を再生医療として臨床応用するためには、多能性幹細胞を適切に扱い安全に使用する必要がある。ところが、現在示されているヒト iPS 細胞は分化傾倒状態であり、その不安定性が問題となっている。そこでこれらの問題を解決するため、より分化・増殖能力が高く、安定した基底状態に達したヒト iPS 細胞を確立・維持する必要がある。したがって基底状態と分化傾倒状態を分ける分子を特定し、それらを適切に制御する必要があると考える。従来型の研究ではマウス多能性幹細胞(ES 細胞(Embryonic stem cell)および EpiS 細胞(Epiblast stem cell))モデルを用いて発見された多くの基底状態関連分子経路は「進化的にげっ歯類に特徴的となった分子・経路」であり、必ずしもヒトでは保存されていない、あるいは有効性が低いのではないかという仮説を立てた。本研究では、「種保存性が高く」かつ「多能性に強く関連」する分子として catenin 経路に着目した。Wnt/ catenin 経路は、線虫からヒトにいたるまで広く保存されたシグナル伝達経路であり、その存在は細胞膜、細胞質、核と様々な場所に存在しており、発生、形態形成における細胞の運命決定に重要な役割を果たしている。また、これらの変異は細胞の癌化といった細胞性質の転換においても重要な分子となると知られている。さらに、 β -catenin 経路と多能性幹細胞の関係について詳細にみると、どちらにおいても catenin の発現は認められているが、その機能は基底状態と分化傾倒状態において大きく異なることが報告されている。しかしながら、なぜそれらの機能が異なるのかなど正確な catenin の機能は明らかとなっていない。本研究では、細胞状態依存的な catenin の機能として、修飾状態の違いにおける catenin と多能性、特に基底状態と分化傾倒状態を分ける分子基盤を明らかにすることを目的とし、マウスおよびヒト多能性幹細胞を中心とした解析を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、多能性幹細胞における catenin の新たな機能とその分子基盤を明らかにし、基底状態に達したヒト多能性幹細胞の獲得を試みた。

本研究では、大きく2つの実験 基底状態と分化傾倒状態において catenin がどのような分子と相互作用し、遺伝子発現に影響を与えているのか、そしてそれらはどういった制御(修飾)によって引き起こされているのか、catenin の操作による新たな基底状態ヒト iPS 細胞の作出を試みた。

の実験では、基底状態と分化傾倒状態を有する2つのマウス多能性幹細胞:ES 細胞および EpiS 細胞をモデルとした。catenin の活性化には、2つの方法を用いた。一つは低分子化合物を用いて、もう一つはアミノ酸変異を用いた擬似修飾状態を作り出す過剰発現系システムを構築した。また、細胞状態依存的な catenin の遺伝子発現制御を正しく理解するため、microarray、*in silico* ChIP、RNAseq などを用いた網羅的な解析を実施した。

の実験では、得られた知見を生かし、基底状態特異的な catenin を誘導することがで

きる低分子化合物を用いて分化傾倒状態であるマウス EpiS 細胞およびヒト iPS 細胞から基底状態へ誘導することを試みた。得られた細胞は、通常の遺伝子発現、タンパク質発現解析に加えて、microarray や RNAseq による網羅的な遺伝子発現比較による性質評価を実施した。

以上の研究を実施することで、多能性幹細胞における β catenin の新たな分子基盤の解明について検討した。

4. 研究成果

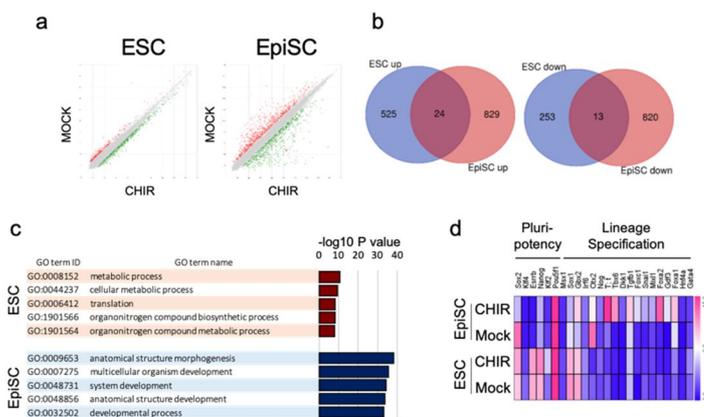


図1. ES細胞とEpiS細胞における β cateninの機能は異なる

a. マイクロアレイ解析によるES細胞とEpiS細胞における β catenin活性化による遺伝子発現変化、b. ES細胞とEpiS細胞における変動遺伝子の比較、c. 変動遺伝子におけるGO解析、d. β catenin活性化による多能性関連遺伝子および分化傾倒遺伝子の発現解析

catenin を活性化によって ES 細胞と EpiS 細胞における変動遺伝子の違いを観察したところ、発現上昇および減少する遺伝子は共通するものが少なく、大きく異なることが認められた(図 1b)。そこで、各細胞において変動遺伝子、特に β catenin 活性化によって発現上昇した上位 200 遺伝子を抽出し、g:Profiler(<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>)を用いた Gene Ontology 解析を実施した。その結果、ES 細胞では、metabolic process を中心とした代謝システムに関連していることが示された。一方、EpiS 細胞では multicellular organism development や system development など、発生や形態形成に関連した遺伝子群が存在が示された(図 1c)。この結果は、ES 細胞と異なり、EpiS 細胞では β catenin の活性化はさらなる分化を引き起こすのではないかと考え、多能性関連遺伝子と分化傾倒(細胞系譜)遺伝子のいくつかを抽出し、再解析を実施した。すると興味深いことに、ES 細胞では未分化性に変化は認められないが、EpiS 細胞では分化関連遺伝子群が活性化することが示された(図 1d)。以上のことは、 β catenin は多能性状態に依存し、その機能が一方では未分化性に、もう一方では分化を誘導することを意味する。

次に、これらの機能の違い、特に EpiS 細胞において β catenin が分化関連遺伝子を活性化するメカニズムの解明を試みた。 β catenin は転写因子として核内に移行し、遺伝子発現制御をおこなうことは知られているが、 β catenin 自身に DNA 結合領域はないとされている。したがって、 β catenin は何かしらの分子と相互作用することで遺伝子発現を制御していると考えられる。そこで、図 1 で示された変動遺伝子の発現制御に関連している遺伝子を推測するため、活性化された遺伝子について *in silico* ChIP 解析として Enrichr(<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>)を用いた解析を実施した。その結果、 β catenin と主な相互作用分子である TCF3 以外に、多能性関連遺伝子(Pou5F1、Nanog、Klf4、Sox2)が認められた(図 2a)。さらにこれらの遺伝子のうちもっとも発現制御に関与している遺伝子を絞り込むため、ChIP-Atlas(<http://chip-atlas.org>)を用いて上位 200 の変動遺伝子の発現制御に関与しているか解析を実施した。解析条件は、転写調節であることから変動遺伝子の TSS 領域 ± 2.5 kbp への結合の有無とした。その結果、興味深いことに Nanog において 50%以上の遺伝子の TSS 領域 ± 2.5 kbp への結合が予測された(図 2b)。以上の結果から、Nanog と β catenin が相互作用することで遺伝子発現制御を引き起こしているのではないかと考え、実際に相互作用しているか評価するため共免疫沈降解析を行なった。まず初めに ES 細胞と EpiS 細胞において β catenin は Nanog と相互作用しているか解析したとこ

本研究では、多能性幹細胞の状態変化：基底状態と分化傾倒状態と β catenin の役割を解明し、均一で質の高い「真の基底状態ヒト多能性幹細胞」の獲得を試みた。

まず、異なる多能性状態における β catenin の機能を明らかにすることを目的にマウス ES 細胞および EpiS 細胞を材料に、GSK3 阻害剤(CHIR99021)を用いた β catenin 活性化がそれらの細胞状態に及ぼす影響を明らかにするためマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を実施した(図 1a)。次に

る、ES 細胞では認められなかった結合が EpiS 細胞において強いシグナルが観察された(図 2c)。そこで、基底状態から脱して分化傾倒状態になることでこれらの機能が切り替わるのではないかと考え、未分化な ES 細胞と分化した ES 細胞において catenin と Nanog の相互作用を調べたところ、分化した ES 細胞において結合が認められた(図 2d)。以上のことから、基底状態あるいは分化傾倒依存的に catenin のパートナー分子として多能性関連遺伝子である Nanog との相互作用が変化することで、その後の遺伝子発現制御に関わっていることが示唆される。最後に、これらの変化は catenin の何が引き起こしているのかを検討するため、修飾状態特に、アセチル化に着目しこれらの変化を観察した。その結果、未分化な ES 細胞と分化した ES 細胞、あるいは EpiS 細胞では catenin の発現量および活性化型 catenin の量において変化は認められなかった(図 2e)。しかしながら、アセチル化 catenin は ES 細胞でのみ観察された(図 2e)。このことから、アセチル化修飾の有無による catenin の機能変化が多能性状態に大きく関与していると考えられる。

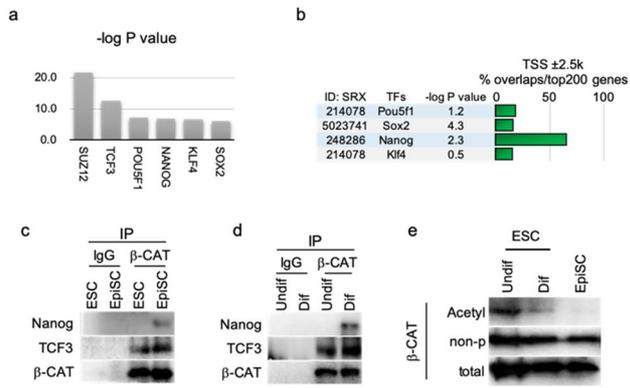


図2. 細胞状態依存的にβcateninはパートナー分子が切り替わる

a. Enrich解析によるβcatenin活性化遺伝子に影響を与える転写因子の抽出。b. ChIP-Atlas解析による多能性関連遺伝子が発現を制御すると考えられる変動遺伝子の割合。c. Co-IPによるES細胞とEpiS細胞におけるβcateninとNanogの相互作用解析。d. Co-IPによる未分化および分化ES細胞におけるβcateninとNanogの相互作用解析。e. 未分化および分化ES細胞、EpiS細胞におけるβcateninの修飾および発現解析

の遺伝子発現制御に関わっていることが示唆される。最後に、これらの変化は catenin の何が引き起こしているのかを検討するため、修飾状態特に、アセチル化に着目しこれらの変化を観察した。その結果、未分化な ES 細胞と分化した ES 細胞、あるいは EpiS 細胞では catenin の発現量および活性化型 catenin の量において変化は認められなかった(図 2e)。しかしながら、アセチル化 catenin は ES 細胞でのみ観察された(図 2e)。このことから、アセチル化修飾の有無による catenin の機能変化が多能性状態に大きく関与していると考えられる。

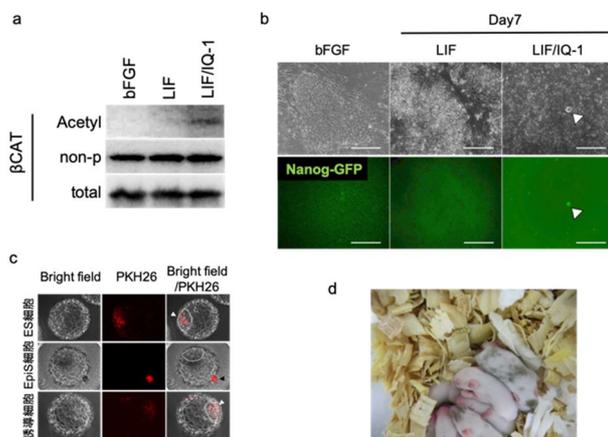


図3. EpiS細胞におけるアセチル化βcateninの活性化は基底状態へ誘導する

a. IQ1処理によるアセチル化βcateninの量的変化解析。b. Nanogプロモーター-GFP EpiS細胞におけるIQ1処理による影響。c. 胚盤胞期胚インジェクションにおける胚取り込み解析。d. 誘導細胞におけるキメラ形成能解析

が認められた(図 3b)。この細胞は、Nanog プロモーター-GFP の強い活性を示しており、ES 細胞様の細胞であると考えられる。そこで、出現した細胞の性質を評価するために、基底状態である ES 細胞の最大の特徴であるキメラ個体形成能を検討した。通常、EpiS 細胞は胚盤胞期胚の内部細胞塊には取り込まれず、キメラ寄与しないことが知られている。しかしながら、驚くべきことに得られた細胞は胚盤胞期胚の内部細胞塊に取り込まれることが可能であり(図 3c)、さらには個体にて非常に高いキメラズムを示した(図 3d)。これらの結果は、catenin のアセチル化状態を制御することで分化傾倒状態である EpiS 細胞から基底状態である ES 細胞へ転換させることが可能であることが示された。

catenin の特徴のひとつである種保存性を活用するため、上記実験で得られた知見をヒト iPS 細胞に応用できないか検討した。その結果、基底状態で特徴的なコンパクトなコロニーを示めず細胞の出現が認められた。またこれらの細胞は 15 代以上継代することが可能であり、未分化性を示す ALP 活性は陽性であった。また、これらの細胞の遺伝子発現解析を実施したところ、基底状態のマーカー遺伝子である NANOG や KLF2, ZFP42, STELLA などの発現が上昇していることが観察された。一方で、分化傾倒状態を示す FGF 5 や DNMT1, DNMT3A, DNMT3B の発現が低下していることが認められた。さらに、ヒト多能性幹細胞の基底状態を示すマーカーの一つである EOS-GFP の活性化状態を観察したところ、IQ1 処理した細胞において GFP 陽性集団の出現が蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリー解析によって明らかとなった(図 4d)。最後に、得られた細胞が、す

以上の結果から、catenin のアセチル化を制御することで基底状態に適した catenin の活性化およびその後の遺伝子発現制御が引き起こされるのではないかと考え、低分子化合物によるアセチル化 catenin の活性化を行なった。catenin のアセチル化には Crebbp と Ep300 という転写コファクターが関わっており、これらを制御することでアセチル化を誘起することが可能である。そこで、本実験では IQ1 と呼ばれる Ep300 と catenin の相互作用を抑制する阻害剤で EpiS 細胞を処理したところ、アセチル化 catenin の量が上昇することを確認した(図 3a)。そこで、IQ1 を含む mLIF 培養液中で EpiS 細胞を培養したところ、培養 7 日目において基底状態を示す ES 細胞様のコンパクトなコロニーの出現

で報告されている基底状態ヒト多能性幹細胞との間に違いがあるのか観察した。RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析の結果から、非常に似た性質であることが示された。

以上のことから、cateninは多能性ネットワークにおいて重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、本研究成果は遺伝子組換えを必要とせず、また1因子の阻害による培養環境の変化によって基底状態ヒト多能性幹細胞を得ることができる新たな方法である。また、cateninの新しい機能の発見は、多能性幹細胞の制御のみならず、がんや炎症などcateninと深い関与が知られる現象や疾患についての重要な知見となりうる。

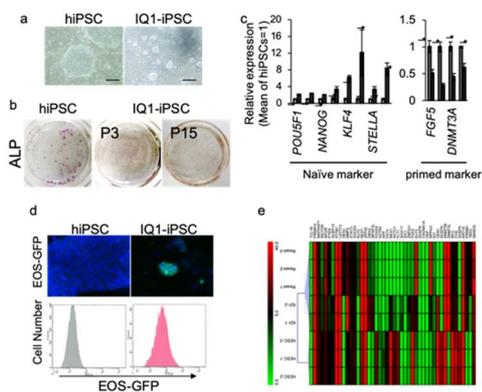


図4. 新規基底状態ヒトIPS細胞の獲得

a. IQ1処理によるヒトIPS細胞の変化、b. ヒトIPS細胞およびIQ1-iPSC細胞におけるALP活性評価、c. ヒトIPS細胞およびIQ1-iPSC細胞における遺伝子発現解析、d. 蛍光顕微鏡およびFACSによるEOS-GFP陽性細胞の出現解析、e. RNAseq解析による従来法との比較解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takatoshi Tsujimoto , Tatsufumi Mori , Kei Houri , Yuta Onodera , Toshiyuki Takehara , Kanae Shigi , Shinichi Nakao , Takeshi Teramura , Kanji Fukuda	4. 巻 523
2. 論文標題 miR-155 Inhibits Mitophagy Through Suppression of BAG5, a Partner Protein of PINK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 707~712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kei Houri , Tatsufumi Mori , Yuta Onodera , Takatoshi Tsujimoto , Toshiyuki Takehara , Shinichi Nakao , Takeshi Teramura , kanji Fukuda	4. 巻 10
2. 論文標題 miR-142 induces accumulation of reactive oxygen species (ROS) by inhibiting pexophagy in aged bone marrow mesenchymal stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 3735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60346-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yuta Onodera , Takeshi Teramura , Toshiyuki Takehara , Kanji Fukuda	4. 巻 37
2. 論文標題 Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1 Regulates Mesenchymal Stem Cell Proliferation Through Stabilization of Yap1/Taz Proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem cells	6. 最初と最後の頁 1595~1605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3083.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Teramura Takeshi, Matsuda Koichi, Takehara Toshiyuki, Shinohara Kenji, Miyashita Yuji, Mieno Yasumichi, Mori Tatsufumi, Fukuda Kanji, Suzuki Koichi, Suemori Hirofumi	4. 巻 503
2. 論文標題 Laser-assisted cell removing (LACR) technology contributes to the purification process of the undifferentiated cell fraction during pluripotent stem cell culture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 3114 ~ 3120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Onodera Yuta, Teramura Takeshi, Takehara Toshiyuki, Itokazu Maki, Mori Tatsufumi, Fukuda Kanji	4. 巻 13
2. 論文標題 Inflammation-associated miR-155 activates differentiation of muscular satellite cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0204860 ~ 0204860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0204860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onodera Yuta, Teramura Takeshi, Takehara Toshiyuki, Obora Kayoko, Mori Tatsufumi, Fukuda Kanji	4. 巻 16
2. 論文標題 miR-155 induces ROS generation through downregulation of antioxidation-related genes in mesenchymal stem cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 1369 ~ 1380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ace.12680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹原俊幸、小野寺勇太、福田寛二、寺村岳士
2. 発表標題 -cateninを標的とした未分化性制御による基底状態多能性幹細胞獲得の試み
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹原俊幸、小野寺勇太、寺村岳士、福田寛二
2. 発表標題 多能性状態に着目したマウスES細胞からの生殖細胞誘導の試み
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹原俊幸、小野寺勇太、福田寛二、寺村岳士
2. 発表標題 異なる多能性状態:Naive型及びPrimed型に対する β -cateninの役割
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹原俊幸、小野寺勇太、福田寛二、寺村岳士
2. 発表標題 第15回日本生殖発生医学会学術集会
3. 学会等名 β -cateninを標的とした新たなヒトNaive型多能性幹細胞獲得の試み
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹原俊幸、平野牧人、江良拓実、寺村岳士、小野寺勇太、楠進、福田寛二
2. 発表標題 p62変異型筋萎縮性側索硬化症iPS細胞を用いた疾患機序解明の試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹原俊幸、小野寺勇太、寺村岳士、福田寛二
2. 発表標題 N-cadherin supports FGFR1 stability and subsequent activation of MEK/ERK dependent pluripotency on mouse epiblast stem cell
3. 学会等名 第70回日本細胞生物発生生物合同大会2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 カテニンコファクター阻害剤によるNaive型多能性幹細胞の作製法	発明者 竹原俊幸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-031040	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ホームページ等 近畿大学病院 高度先端総合医療センター 再生医療部 https://www.med.kindai.ac.jp/stemcell/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺村 岳士 (TERAMURA Takeshi) (40460901)	近畿大学・大学病院・講師 (34419)	
研究分担者	福田 寛二 (FUKUDA Kanji) (50201744)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	
研究分担者	末盛 博文 (SUEMORI Hirofumi) (90261198)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授 (14301)	