

令和元年6月25日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20118

研究課題名(和文) 初期化と細胞分化に関わるストレス応答の生体イメージングとその再生医学への応用

研究課題名(英文) Live cell imaging to monitor stress-responsive signaling involved in cell reprogramming and differentiation

研究代表者

川村 晃久 (Kawamura, Teruhisa)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90393199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹(iPS)細胞を用いた再生医療などの実用化が期待されている。一方で、安全性や医療経済性を考慮すると、多能性の獲得・維持、細胞分化の分子機構を詳細に解明することが必要とされている。我々はこれまで、線維芽細胞からiPS細胞が形成される分子機構を解析し、細胞内代謝、DNA損傷などに対するストレス応答に関する知見を報告してきた。本研究では、iPS細胞形成過程で活性が変化するストレス応答性キナーゼとしてJNKを見出した。さらに、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理を利用したバイオセンサーを用いて、iPS細胞形成過程におけるJNK活性を一細胞レベルで時空間的に解析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性の獲得(=初期化)や未分化性の維持および細胞分化の分子機構を、ストレス応答シグナルに着目し、これを一細胞レベルで生きた状態で解析することは挑戦的であり、iPS細胞を臨床応用するうえで最大の課題である癌化回避に向けた有用かつ意義深い研究といえる。iPS細胞を用いた再生医療は、網膜で臨床試験が実施され、心不全に対する心筋シートへの応用も期待されているが、移植後の分化抵抗性細胞の検出や、移植細胞における癌化に関わるストレス応答シグナル伝達を生きた状態で経時的にモニターする評価系はいまだ確立されていない。このような背景からも、本研究の成果は再生医療の安全な実施に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：While it has been of great importance to establish regenerative medicine using induced pluripotent stem (iPS) cells, we need to consider safety and effectiveness of iPS cell-based therapy for clinical application. Thus, it remains an important issue to elucidate molecular mechanisms explaining how somatic cells are reprogrammed to iPS cells. We have been investigating stress-responsive signals involved in reprogramming, and have screened, in the present study, stress-responsive kinases of which activities are altered during the reprogramming process. Our results showed that one of the mitogen-activated protein kinases, JNK is less activated after reprogramming induction, compared to non-reprogrammed mouse embryonic fibroblasts. We performed time-laps living cell imaging using the biosensor based on fluorescence resonance energy transfer, and found that reprogrammed cells are less responsive to JNK signaling after DNA damage stimuli.

研究分野：再生医学

キーワード：幹細胞イメージング 蛍光共鳴エネルギー移動 再生医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体細胞は遺伝子導入により多能性が獲得されると初期化され、人工多能性幹(iPS)細胞が形成される。近年、iPS 細胞を用いた再生医療の実用化が期待される一方で、その安全性に関する検証は今後の重要課題となっている。iPS 細胞が誘導される効率は極めて低く、誘導過程では、多くの細胞が DNA 損傷、複製ストレス、活性化酸化などの様々なストレスに暴露されている。これらのストレスに対して細胞は多種多様な機構で応答し、その細胞内シグナルはがん化リスクや多分化能など iPS 細胞の品質に深く関与しているものと考えられる。研究代表者は、これまで、初期化過程で DNA 損傷シグナルを介してがん抑制遺伝子 p53 が活性化されること、これに伴い細胞増殖の停止や細胞死が誘導され iPS 細胞作製効率が低下することを報告した(Nature 2009;460:1140-1144)。さらに、初期化過程で生じる多様な細胞集団の中から、iPS 細胞形成効率の高い集団 (= 初期化成功群) と低い集団(初期化不成功群)を表面マーカーにより早期で選別することにも成功した。これにより、これまで困難とされた、初期化過程で将来的に iPS 細胞になる可能性の高い細胞に標的を絞った解析が可能となった。例えば、核内受容体を介した細胞内代謝の変化が iPS 細胞形成に必要であることなどが見出された(Cell Stem Cell 2015;16:547-555.)。しかしながら、体細胞初期化や iPS 細胞分化の過程で、ストレス応答シグナルの果たす役割は依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

ストレス応答を制御するシグナル経路は、リン酸化酵素活性を持つ分子(タンパク質キナーゼ)がリン酸化により活性を伝達していくカスケードを形成する。しかし、リン酸化を指標に 1 分子の活性を評価するには、免疫染色やウェスタンブロットによる方法が主流であり、生きた細胞でその活性を評価することは容易ではない。そこで、本研究の目的は、多能性の獲得や維持あるいは細胞分化に関与しているシグナル伝達分子であるタンパク質キナーゼを同定し、その活性を時空間的に一細胞レベルで評価することである。ここでは、同定したタンパク質キナーゼの活性を指標に、蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer; FRET)の原理に基づいたバイオセンサーを用いて、初期化と未分化性の維持および細胞分化の過程で、ストレス応答を一細胞レベルで時空間的に解析する。最終的には、iPS 細胞を用いた安全性の高い再生医療の実現に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

はじめに、ストレス応答シグナルの中で、初期化誘導前後で活性が変化するものをキナーゼを中心に、リン酸化抗体アレイを用いてスクリーニングを行う。マウス胎仔線維芽細胞(MEF)とマウス iPS 細胞に、ストレス刺激として紫外線(Ultra violet: UV)照射を行う。照射前後で変化するキナーゼ活性の変化率について、各細胞から回収したタンパク質を用いた抗体アレイにより網羅的に解析を行う。目的のストレス応答タンパク質キナーゼについては、MEF、ES 細胞、iPS 細胞など種々の細胞に紫外線(Ultra violet: UV)照射によるストレスを与えることで、キナーゼ活性をリン酸化レベルを指標に Western blot を用いて評価する。

次に、目的のタンパク質キナーゼが活性化されることで FRET を生じる一分子型のバイオセンサー(図 1)を用いた実験を行う。すなわち、このバイオセンサーを全身に発現するトランスジェニックマウス(JNK-FRET マウス)から線維芽細胞を採取して、これに初期化因子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、FRET 活性を一細胞レベルでリアルタイムに解析する。JNK 活性の程度が初期化にどのような相関関係があるかを評価する。

さらに、レトロウイルスによる遺伝子導入ではウイルス感染自体が DNA 損傷などのストレスを細胞へ及ぼすことが知られている。この影響を除外する目的で、ウイルスベクターを用いない初期化誘導法として、テトラサイクリン誘導性初期化因子発現カセットが組み込まれた遺伝子改変マウスと前述の FRET バイオセンサーを発現するマウスを交配した仔から採取した線維芽細胞を用いて上記と同様の実験も行う。

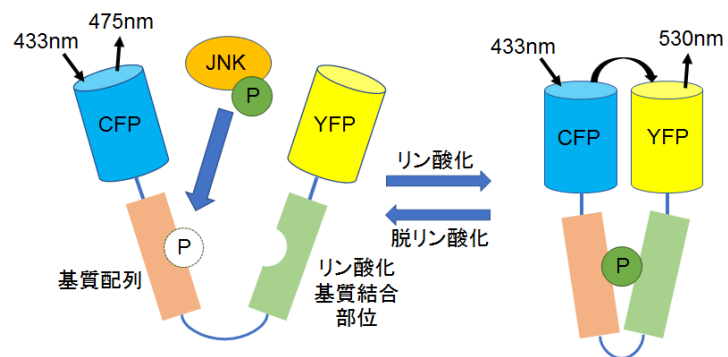


図 1. FRET を用いた JNK 活性化のイメージング

2 種類の蛍光タンパク質 CFP と YFP を両端に持つ一分子タンパク質が、タンパク質キナーゼの活性化により標的となる基質配列がリン酸化されることで立体構造が変化して FRET を生じる原理を利用したバイオセンサー。

4. 研究成果

(1) MEF、iPS 細胞における DNA 損傷ストレスに対するストレス応答の違い

MEF と未分化 iPS 細胞において UV 照射に対する種々のストレス応答キナーゼの活性化について、リン酸化抗体アレイ法により 45 個のタンパク質のリン酸化レベルの変化に着目してスクリーニングを行った (図 2)。また、UV 照射により引き起こされる特徴的な DNA 損傷の一つである、シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPDs) を、ELISA 法により定量解析した結果 (図 3) MEF、iPS 細胞ともに DNA 損傷の程度に大きな差は認められなかった。以上の結果から、MEF と比べて iPS 細胞では UV 照射によるストレスに対して JNK の活性化が著しく減弱していることが見出された。

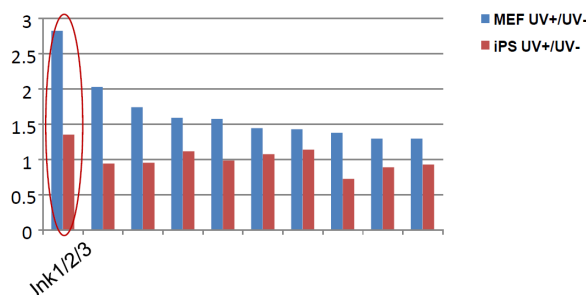


図 2. UV 照射による DNA 損傷ストレスに対する、リン酸化変化率が MEF で高く、iPS 細胞で低かったタンパク質キナーゼの網羅的解析 UVC ランプ 1 分照射 15 分後と UVC 非照射の各細胞から抽出したタンパク質を用いて、リン酸化抗体アレイを用いた解析を行った。抗体スポットのシグナル強度は画像解析ソフトを用いて定量化した。各タンパク質キナーゼに対する照射前後のシグナル比をグラフに示す。

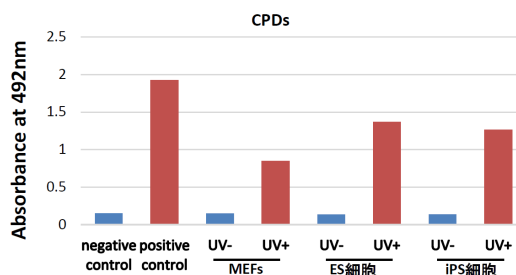
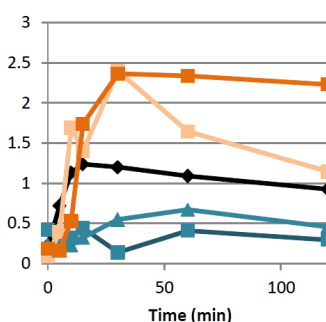


図 3. 線維芽細胞、ES/iPS 細胞における UV 刺激による CPDs の検出 UVC ランプ 1 分照射 15 分後と UVC 非照射の各細胞から抽出した genomic DNA 500ng を CPDs 検出用 ELISA kit のプロトコールに従って反応させてから吸光度 (492nm) を測定した。

(2) MEF、多能性幹細胞、不死化細胞株を用いた DNA 損傷ストレスに対する JNK シグナル応答の違い

DNA 損傷ストレスに対する JNK シグナル応答に関して、細胞種による違いを検証する目的で、MEF、多能性幹細胞 (iPS 細胞、ES 細胞)、不死化細胞 (NIH3T3 細胞、293T 細胞) を用いて、UV 照射後の JNK のリン酸化レベルの変化を Western blot 法を用いて経時的に解析した。シグナル強度については画像解析ソフトを用いて定量化を行った (図 4)。iPS 細胞と ES 細胞のリン酸化レベルはどの時間においても低く、この結果から、少なくとも UV による DNA 損傷に対するストレス応答として、MEF からの初期化誘導により JNK の活性化が生じにくくなる可能性が示唆された。

phospho-JNK1 / total JNK1



phospho-JNK2 / total JNK2

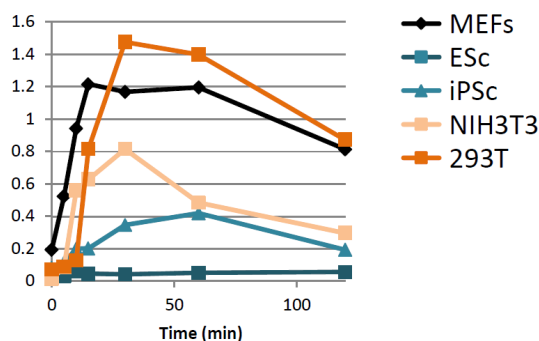


図 4. MEF、多能性幹細胞、不死化細胞における DNA 損傷ストレス後の JNK リン酸化の経時変化 MEF、ES/iPS 細胞、NIH3T3、293T 細胞において、UV 照射後の JNK 発現量およびリン酸化レベルの経時的な変化をウェスタンブロットにより解析した。シグナル強度は画像解析ソフトを用いて定量化し、JNK1 と JNK2 それぞれにおいて、総発現量に対するリン酸化レベルの割合をグラフに示す。

(3) バイオセンサーを全身に発現するトランスジェニックマウスを用いた解析

JNK によるストレス応答シグナルについて、一細胞ごとに生細胞で解析する目的で FRET バイオセンサーを全身に発現するトランスジェニックマウス Junko (B6-Tg (JNKEV) pT2A-3907NLS) から採取した MEF (Junko-MEF) を用いて実験を行った。はじめに、JNK を活性化されることが知られている翻訳阻害薬 Anisomycin を用いて Junko-MEF を刺激すると、刺激後 40 分以降 YFP 蛍光輝度が最大となり FRET を確認することが出来た (図 5)。

この Junko 由来線維芽細胞に初期化因子を導入することにより、iPS 細胞を誘導し樹立を行った。この初期化誘導過程の前~中期 (5~6 日目) と後期 (9~10 日目) において、FRET イメージングを行ない、ストレス応答の変化を生細胞において観察した。初期化誘導過程前~中期 (5~6 日目) と後期 (9~10 日目) 両方において、刺激を加えないものでは JNK の活性化は確認されなかったが anisomycin を添加すると JNK の活性化が確認された。しかし、興味深いことに、UV を照射したものにおいては、誘導過程前~中期 (5~6 日目) では JNK の活性化が確認されたが、誘導後期 (9~10 日目) では活性化は確認されなかった。

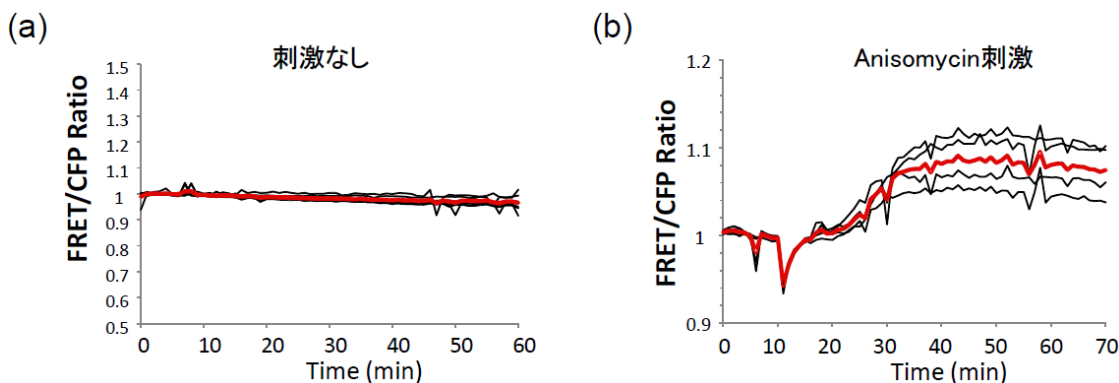
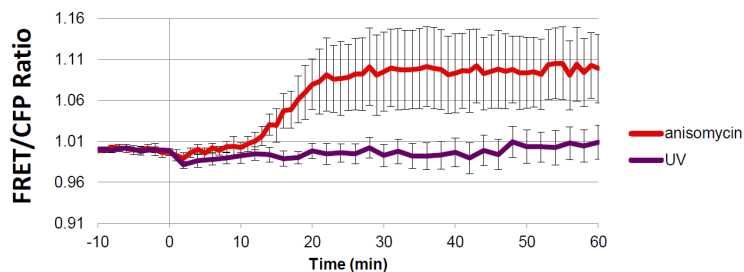


図 5. 核局在型 FRET バイオセンサーを安定発現するトランスジェニックマウスから採取した線維芽細胞における JNK 活性化
刺激なし(a)と比べ、翻訳阻害薬 anisomycin 刺激後(b)では、40~60 分をピークに FRET のシグナル上昇が観察された。

(4) Tet-ON システムを用いた初期化誘導過程における JNK のリン酸化解析

ウイルスベクターによって初期化因子を遺伝子導入する手法では、発現カセットのゲノム挿入に伴う DNA 損傷ストレスを考慮する必要がある。そこで、Tet-ON システムにより初期化因子が発現するカセットを組み込んだトランスジェニックマウスと FRET バイオセンサーを発現する Junko とを交配して得られた W トランスジェニックマウスから採取した MEF を用いて同様の実験を行った。未感染の MEF で FRET イメージングを行ったところ、UV 刺激および anisomycin 添加により JNK のリン酸化レベルは上昇した。しかし、初期化誘導後期 (9~10 日目) において FRET イメージングを行ったところ、anisomycin 添加により JNK は活性化されたが、UV 刺激では JNK のリン酸化レベルに変化は認められなかった (図 6)。以上の結果より、UV 照射のような DNA 損傷に代表されるストレスでは、多能性の獲得によりストレス応答シグナルの変化が生じることが見出された。Junko-MEF から iPS 細胞も樹立しており、多能性幹細胞の未分化状態と分化状態における JNK シグナルの変化についても一細胞レベルで時空間的な解析を行っている。移植後の分化抵抗性細胞の検出や、移植細胞におけるがん化



に関わるストレス応答シグナル伝達を生きた状態で経時的にモニターする評価系の構築に貢献するものと期待される。

図 6. 核局在型 FRET バイオセンサーを安定発現し、Tet-ON システムにより薬剤誘発性に初期化を誘導できる線維芽細胞を用いた JNK 活性化の解析

Doxycyclin 刺激による初期化誘導後期の細胞では、翻訳阻害薬 anisomycin 刺激後で FRET のシグナルの上昇が観察されるのに対して、UV 照射ではシグナルの上昇は認めなかった。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1) 石田智明、鳥居昇平、塚本 輔、植山萌恵、井原 大、原田恭弘、中川沙恵、赤木祐香、徳永千尋、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
iPS 細胞への初期化に必要な代謝シフトにおける低酸素誘導因子 HIF1 の果たす役割
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
- 2) 赤間友美、山崎基春、植山萌恵、井原 大、原田恭弘、鳥居昇平、中川沙恵、赤木祐香、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
iPS 細胞へのリプログラミングにおける細胞質およびミトコンドリアに局在する p53 の解析
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
- 3) 徳永千尋、有馬大貴、植山萌恵、井原 大、原田恭弘、鳥居昇平、中川沙恵、赤木祐香、赤間友美、石田智明、中尾 周、川村晃久
iPS 細胞へのリプログラミングにおける miR-X と低酸素応答因子 HIF1 の関わり
第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
- 4) Kawamura T. Dissecting the Process of Metabolic Shift during iPS Cell Reprogramming from Fibroblasts. 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy 2018 年 (招待シンポジスト)
- 5) Akama T , Tenghattakorn A , Yamasaki M , Harada Y , Ihara D , Ueyama T , Sogo T , Nakao S , Kawamura T. The role of p53 localized in cytosol and mitochondria during reprogramming to iPS cells. 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy 2018 年
- 6) Ishida T , Tsukamoto T , Torii S , Ueyama T , Ihara D , Harada Y , Tokunaga C , Sogo T , Nakao S , Kawamura T. The role of HIF1 α during reprogramming to iPS cells. 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy 2018 年
- 7) Tokunaga C , Ueyama T , Ihara D , Harada Y , Arima D , Nakagawa S , Ishida T , Sogo T , Nakao S , Kawamura T. miR-X enhances efficiency of reprogramming to iPS cells. 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy 2018 年
- 8) 山崎基春、植山萌恵、井原 大、中山宗哉、原田恭弘、TENGHATTAKORN Araya、赤木祐香、有馬大貴、鳥居昇平、中川沙恵、中尾 周、川村晃久
iPS 細胞形成過程における JNK 経路の解析
第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年度生命科学系学会合同年次大会) 2017 年
- 9) 鳥居昇平、植山萌恵、塚本 輔、中山宗哉、原田恭弘、井原 大、中川沙恵、赤木祐香、山崎基春、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
低酸素誘導因子 HIF1 が iPS 細胞形成に果たす役割に関する研究
第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年度生命科学系学会合同年次大会) 2017 年
- 10) 中川沙恵、植山萌恵、井原 大、高木智史、中山宗哉、原田恭弘、赤木祐香、有馬大貴、鳥居昇平、十河孝浩、中尾 周、川村晃久
iPS 細胞誘導過程における miR17-92 cluster の役割とその標的遺伝子に関する研究
第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年度生命科学系学会合同年次大会) 2017 年
- 11) 植山萌恵、井原 大、高木智史、中山宗哉、原田恭弘、中川沙恵、十河孝浩、川村晃久
cMyc により誘導される microRNA 17-92 cluster が iPS 細胞形成効率に与える影響
第 38 回日本炎症・再生医学会 2017 年
- 12) 中川沙恵、植山萌恵、井原 大、塚本 輔、原田 恭弘、赤木祐香、十河孝浩、長谷川浩二、中尾 周、川村晃久
iPS 細胞誘導過程における miR17-92 とその標的遺伝子に関する研究
第 3 回 J-ISCP 学術集会 2017 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。