

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18570201

研究課題名 (和文) 未分化性幹細胞の可能性 (Potency) と未分化性維持機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of regulatory mechanism on potency and maintenance of undifferentiated state in undifferentiated stem cells.

研究代表者

白吉 安昭 (Shirayoshi Yasuaki)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90249946

研究成果の概要：テラトカルシノーマ F9 細胞、P19 細胞、PCC3 細胞は、いずれも ES 細胞の分化を抑制し、未分化性を維持する細胞外因子を分泌していること、そしてそれらの因子は、既存のシグナル伝達系とは別の経路を利用して作用していることを明らかにした。また、ES 細胞と比較して、F9 細胞で特異的に発現が減少しているタンパク質として、14-3-3 σ 、HP1 γ の 2 つを見いだした。このうち HP1 γ の強制発現によって F9 細胞の分化能が部分的に回復することがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：幹細胞、細胞分化、多能性、未分化性、クロマチン、ES 細胞

1. 研究開始当初の背景

EC 細胞は、細胞の形態、多能性マーカー (Nanog、OCT3/4 など) の発現、キメラマウス作成能、in vitro 分化誘導系での分化能、未分化性維持におけるフィーダー細胞の必要性など、ES 細胞とほぼ同等の特性を持った細胞である。ところが、EC 細胞のなかでも F9 細胞と P19 細胞は、ES 細胞と同じ多能性マーカーを発現しながら、未分化性維持に LIF ある

いはフィーダー細胞を必要とせず、胚様体を形成させても分化せずに増殖する。また、F9 細胞は、レチノイン酸処理によって、Primitive endoderm などの胚体外内胚葉へは分化できるが、さまざまな分化誘導系を駆使しても胚体組織の細胞へは分化せず、いわゆる “nullipotent” な細胞として知られている。一方、P19 細胞についてみてみると、レチノイン酸処理によって神経系細胞へ、DMSO 処理によつ

て筋肉などの中胚葉組織へと分化する。つまり、F9 細胞のように胚体組織への分化能が失われているわけではないが、その分化能は限定されている。このように F9 細胞、P19 細胞、そして ES 細胞は、未分化性維持機構と分化能力に違いがみられる(表参照)。これらの違いを生む分子基盤を明らかにできれば、ES 細胞の特長である全能性と未分化性維持機構、さらには可能性(potency)の分子基盤について多くの知見を得られると期待している。

2. 研究の目的

発生の過程には、複数の細胞に分化できる能力(多分化能)と未分化な状態で自己複製できる能力を備わった多くの細胞集団が存在している。細胞集団の可能性(分化能力: potency)には階層性があり、全能性(totipotent)を示す集団から、より運命が拘束された多能性(pluripotent)集団、下位に位置する単能性(unipotent)集団まで、実に多様である。申請者は、これらの細胞集団が示す多分化能・未分化性維持機構について共通の分子基盤はあるのか、また、全能性、多能性、単能性の違いは、どのような分子基盤に基づいているのか、を明らかにしたいと考えている。そのために、本研究課題では、未分化性幹細胞の一種である胚性がん(EC)細胞(=テラトカルシノーマ細胞)と胚性幹(ES)細胞を対象に、全能性と未分化性維持機構の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

具体的には、以下の4通りの研究を行った。

- (1) 細胞融合を用いた全能性、未分化性維持に関わる因子の染色体マッピング
- (2) F9 細胞と ES 細胞で発現の異なるタンパク質の同定
- (3) F9 細胞由来分化抑制因子(FDIA)の同定とクローニング
- (4) HP1 ファミリーの機能解析

3. 研究の方法

- (1) 細胞融合を用いた全能性、未分化性維持に関わる因子の染色体マッピング
細胞融合時には、親株の染色体がラン

ダムに脱落することが知られている。つまり、得られる雑種細胞株は異なった染色体構成を持つ。よって、複数の雑種細胞を樹立し、多分化能の有無、未分化状態の維持に必要な条件を明らかにし、続いて、どちらの親株のどの染色体が含まれているかを明らかにすれば、可能性あるいは未分化性維持機構と相関関係を示す染色体を同定できると考えられる。雑種細胞株の染色体解析ため、親株は異なった系統のマウスに由来する細胞を用いて細胞融合を行う。

- (2) F9 細胞と ES 細胞で発現の異なるタンパク質の同定

2次元電気泳動による網羅的解析を行い、ES 細胞と F9 細胞の間で異なった発現を示すタンパク質を同定する。また、この時に、F9 細胞と同様に分化能が制限されているテラトカルシノーマ P19 細胞、PCC3 細胞などを比較対象として、また多能性幹細胞として mGS 細胞、EG 細胞なども取り上げ、候補タンパク質についてその発現量を比較する。

機能解析としては、強制発現実験を行い、F9 細胞などの分化能に違いが見られるかどうか検討する。

- (3) F9 細胞由来分化抑制因子(FDIA)の同定とクローニング

①まず、ES 細胞の未分化性マーカーである Rex1 のプロモーターに GFP(Green Fluorescent Protein)をつないだベクターを作成する(Rex1-ES 細胞)。この Rex1-ES 細胞は、未分化状態で GFP を発現し、分化誘導をかけると4日目には GFP の発現が消失する。

続いて、F9 細胞から cDNA ライブラリーを作り ES 細胞へ導入する(F9-ES 細胞)。この細胞と Rex1-ES 細胞とで混合胚様体を作る。もし、FDIA 関連分子の cDNA が導入された F9-ES 細胞が胚様体に含まれていれば、その F9-ES 細胞に隣接する Rex1-ES 細胞で GFP の発現が持続するはずである。そこで F9-ES 細胞と Rex1-ES 細胞との混合胚様体を形成した時に、分化融合後も GFP の発現が認められる胚様体から F9-cDNA を回収す

る。この F9-cDNA を再び ES 細胞への導入し、GFP を指標とした選択を繰り返すことによって、FDIA に関わる cDNA をクローニングする。

②F9 細胞、PCC3 細胞の培養上清を回収し、Rex1-ES 細胞を培養上清中で培養し、GFP を指標に含まれる因子の活性を検討する。続いて、培養上清をさまざまなカラムを用いて、GFP を指標に、ES 細胞に対する未分化性維持活性を持つ分画を同定し、未分化性維持活性物質の精製を進める。

(4) HP1 ファミリーの機能解析

まず、F9 細胞と ES 細胞における HP1 ファミリーの発現パターンを、未分化状態、分化誘導過程において検討する。続いて、HP1 α および HP1 γ を安定に発現する F9 細胞株を樹立し、形態、分化能、未分化性維持などについて解析する。そして、ヒストン修飾に関連するヒストンのメチル化などエピジェネティクスについても検討する。

4. 研究成果

(1) 細胞融合を用いた全能性、未分化性維持に関わる因子の染色体マッピング

可能性あるいは未分化性維持機構と相関関係を示す染色体を同定するために、F9 細胞と P19 細胞の間に複数の雑種細胞を樹立した。F9 細胞、P19 細胞ともその分化能は限定されており、ES 細胞のように分化することはない。しかし、本研究で樹立した雑種細胞株の中には、ES 細胞とほぼ同等の分化能を示す細胞株があり、それらの染色体構成を解析した。

現時点では、可能性、全能性と相関関係を示す染色体の同定にはいたっていないが、F9 細胞側の 6 番染色体と 12 番染色体を失った雑種細胞株で、分化能が回復する傾向が見られた。これらの結果は、マウス 6 番染色体あるいは 12 番染色体に、分化能をつかさどる遺伝子が乗っている可能性を示唆している。

(2) F9 細胞と ES 細胞で発現の異なるタ

ンパク質の同定 (14-3-3 σ の発見)

F9 細胞と ES 細胞との間で発現の異なるタンパク質 14-3-3 σ を見いだした。さらに各種テラトカルシノーマ細胞、EG 細胞など多能性幹細胞における 14-3-3 σ のタンパク質の発現を比較したところ、多能性を示す ES 細胞、mGS 細胞、EG 細胞では、発現していたが、分化能が制限されている F9 細胞、PCC3 細胞、P19 細胞などのテラトカルシノーマ細胞では、タンパク質の発現量がほとんど無いか、著しく減少していた。このように 14-3-3 σ の発現と分化能との間には相関関係が見られた。この結果は、14-3-3 σ が、多能性を制御している可能性と、テラトーマの腫瘍形成能を反映している可能性が考えられる。

また、14-3-3 σ の mRNA は、F9 細胞と ES 細胞との間で発現量に違いが見られず、転写後調節によって、タンパク質の発現に違いが諸ずることを明らかにした。また、14-3-3 σ の強制発現 ES 細胞株では、Oct3/4 の発現が速やかに消失するという予備的な実験結果を得ており、転写後調節の可能性とともに、今後、さらに解析を続ける予定である。

(3) F9 細胞由来分化抑制因子 (FDIA) の同定とクローニング

我々は、これまでの研究からテラトカルシノーマ F9 細胞の培養上清中には、ES 細胞の未分化性維持に効果のある物質が含まれていることを明らかにしてきた。この因子を FDIA と命名し、遺伝子クローニングを進めてきた。まず Rex1 遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインした ES 細胞株の樹立に成功し、その株を用いて発現クローニング、分泌因子の解析を行った。

その結果、①HP1 β のクローニングおよび HP1 ファミリーが F9 細胞や ES 細胞の分化能に影響を与えること (次項(4)を参照のこと)、②F9 細胞や PCC3 細胞などのテラトカルシノーマ細胞が、ES 細胞に対する分化抑制因子を細胞外に分泌することを明らかにすることができた。

テラトカルシノーマ細胞 F9 細胞と PCC3 細胞の上清には、未分化性維持活性が含ま

れていることを明らかにした。①これら F9 細胞あるいは PCC3 細胞由来の分化抑制活性は、共に ES 細胞の未分化性を LIF-STAT3 シグナルとは無関係に維持できる。しかし、②分子量など異なった特性を示すこと、そして③Wnt シグナルなど既知のシグナル伝達系とは異なったシグナル系を利用して機能していることを明らかにした

(Kawazoe et al. DGD 2009: 51, 81-93)。

これらの成果は、ES 細胞に対する新規な未分化性維持因子の存在を示唆し、ES 細胞をはじめとする多能性幹細胞の分子基盤の解明につながると考えている。また、F9 細胞や PCC3 細胞は、その未分化性維持に LIF-STAT3 系を必要としないが、その原因の一端は、これらの細胞が分泌する分化抑制因子が、ホウケラインに働いているためである可能性を示唆する。今後、これらの活性を担う分子を同定あるいは精製できれば、ES 細胞に対する新規未分化性維持因子の発見に津軽のみならず、多能性維持に働く新しいシグナル伝達経路の発見にもつながるのではないかと考えている。

現在、PCC3 細胞に由来する未分化性維持因子を中心に、精製を進めている。

(4) HP1 ファミリーの機能解析

F9 細胞は、分化能を失っており、ES 細胞とほぼ同様の転写ネットワークを持っているにもかかわらず、胚胎の細胞へは分化できない。この F9 細胞から ES 細胞の分化能に影響を与えられる遺伝子として、HP1 β と γ の同定に成功した(池田ほか、第 45 回日本発生生物学学会年会)。

このうち HP1 γ を F9 細胞で強制的に発現させると、①F9 細胞の分化能は一部回復し、レチノイン酸などの刺激がなくても、 α -fetoprotein、tPA などの胚体外内胚葉マーカーのみならず、FGF5、Flk1 など各種マーカーの発現を確認することができた。このように HP1 γ の強制発現によって、F9 細胞に分化能を付与することができることがわかった。また、②F9 細胞では、HP1 γ タンパク質の発現量が減少していた。これらの結果は、HP1 γ タンパク質の発現量によって、F9 細胞の分化能が制御されていること示しており、F9 細胞が

分化能を失っている原因は、HP1 γ にある可能性がある。この結果から推測すると、HP1 ファミリーが、ES 細胞など多能性肝細胞の分化能を制御している可能性も考えられ、今後、ES 細胞における HP1 γ の機能解析などを進めて生きたいと考えている。

HP1 ファミリーは、染色体のクロマチン構造を調節することが知られている。また、③予備的な段階ではあるが、HP1 γ 強制発現 F9 細胞では、ヒストン H3 のリジン 4 番目のメチル化が減少しており、ヒストン修飾を介して細胞の分化能を制御している可能性がある。このように、本研究の成果は、広く細胞分化のメカニズム、特にクロマチン構造と細胞分化との関連を探る上で、大きな意味を持っていると考えている。

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 5 件)

- (1) Kawazoe S. et al., Extrinsic factors from mouse embryonic carcinoma cell lines maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells through a novel signal pathway. *Dev. Growth Differ.* (査読有) **51** (2009) p81. (9 人中 9 番目) .
- (2) Kai Y. et al., Enhanced apoptosis during early differentiation in mouse ES cells with autosomal imbalance. *Cell Res.* (査読有) . **19** (2009) p247. (10 人中 8 番目) .
- (3) Yano S. et al., Changes of HCN gene expression and I(f) currents in Nkx2.5-positive cardiomyocytes derived from murine embryonic stem cells during differentiation. *Biomed Res.* (査読有) . **29** (2008) p195. (19 人中 18 番目) .
- (4) Kazuki Y. et al., Correction of a genetic defect in multipotent germline stem cells using a human artificial chromosome. *Gene Ther.* (査読有) . **15** (2007) p617. (17 人中 13 番目) .
- (5) 白吉安昭、久留一郎. ES 細胞から心筋細胞への分化の分子機序。アニテックス (査読無) . **19** (2007) p14.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 伊藤真一、ES 細胞由来心臓ペースメーカー

- 一細胞の分取と機能解析。第31回日本分子生物学会、2008年12月12日、神戸ポートアイランド（神戸）。
- (2) 白吉安昭、イオンチャンネルを可視化選別マーカーとした ES 細胞由来生物学的ペースメーカー細胞の樹立とその特性の検討。第 25 回日本心電学会学術集会、2008年11月1日、朱鷺メッセ（新潟）。
 - (3) Ikeda N. Functional expression cloning of HPI beta, a modulator of differentiation in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. 第 41 回日本発生生物学会、2008年5月29日、徳島郷土文化会館（徳島）。
 - (4) 池田信人、Heterochromatin Protein 1 β による ES 細胞の分化促進。第6回幹細胞シンポジウム、2008年5月16日、学術総合センター（東京）。
 - (5) 川添真史郎、マウスEC細胞由来細胞外因子はマウス ES 細胞の多能性を新規シグナル経路を介して維持する。第30回日本分子生物学会、2007年12月12日、横浜。
 - (6) Shibuya M. Identification and analysis of 14-3-3 sigma specifically expressed in pluripotent stem cells. 第40回日本発生生物学会、2007年5月30日、福岡国際会議場（福岡）。

[その他]

<http://www.tottori-u.ac.jp/p/igaku/daigakuin/kinou/identshi/saisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白吉 安昭 (SHIRAYOSHI YASUAKI)
鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90249946

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし