

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390113

研究課題名（和文） 幹細胞システム制御機構におけるリン酸化シグナルの機能解析

研究課題名（英文） Roles of phosphorylation signals in regulation of stem cell systems.

研究代表者

木村 透（KIMURA TOHRU）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50280962

研究成果の概要：リン酸化シグナル PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) /Akt シグナルが、毛包幹細胞の休止・活性化や軟骨の最終分化を制御すること、Akt による癌抑制遺伝子 p53 の機能抑制が生殖細胞の脱分化を促進すること、GSK3 (glycogen synthase kinase 3) シグナルの阻害は ES 細胞の樹立効率を上昇させることなどを明らかにした。各幹細胞システムにおけるリン酸化シグナルの機能の特異性・共通性を解明し、応用研究への基盤を整えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：幹細胞システム、リン酸化酵素、シグナル伝達、組織幹細胞、胚性幹細胞、生殖細胞、脱分化、初期化

1. 研究開始当初の背景

幹細胞システムは、分化多能性をもつ幹細胞を頂点とし、そこから様々な分化細胞を産生する、というヒエラルキー構造をもつ生体システムである。そのシステムを構築するために、幹細胞は、自身を再生産する「自己複製能」と、機能的な分化細胞を産生する「分化能」を備えもつ。

PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) /Akt シグナルは、細胞の増殖や生存などを制御するリン酸化酵素シグナルとして盛んに研究されてきた。我々は、この PI3K/Akt シグナルが、マウスや霊長類の胚性幹細胞

(embryonic stem cell: ES 細胞) の未分化性を支持すること、始原生殖細胞が ES 細胞と同等の分化多能性をもつ幹細胞である胚性生殖細胞 (embryonic germ cell: EG 細胞) へと脱分化する効率を促進すること、を明らかにしていた。

一方、海外の研究グループにより、PI3K/Akt シグナルは、神経幹細胞などの組織幹細胞において、自己複製能を亢進する機能をもつことが明らかになりつつあった。さらに、PI3K/Akt シグナルは、GSK3 (glycogen synthase kinase 3)、Wnt、Notch といった他の幹細胞制御シグナルとの関連も注目を浴び

ており、様々な幹細胞システムにおける PI3K/Akt シグナルの機能の解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上で述べた ES 細胞、EG 細胞で得られた成果を、様々な幹細胞システムにおける PI3K/Akt シグナルの機能解析に発展させる、すなわち、各々の幹細胞システムの特異性・共通性を PI3K/Akt シグナルという切り口から解明していくことにある。さらには、GSK3 シグナルなどの幹細胞における機能を明らかにし、リン酸化酵素シグナルによる幹細胞システム制御機構を包括的に理解することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 組織幹細胞における PI3K/Akt シグナルの解析

Akt-Mer は、活性化型 Akt と変異型エストロゲン受容体 (modified estrogen receptor: Mer) からなる融合タンパクである。Akt-Mer のもつリン酸化酵素活性は、Mer のリガンドである 4OHT (4-hydroxy tamoxifen) により活性化される。したがって、4OHT の添加/除去により、そのリン酸化酵素活性をコンディショナルに on/off することが可能となる。

まず、全身の細胞で、Akt-Mer 融合タンパクを発現するトランスジェニックマウス (Akt-Mer マウス) を作製した。このマウスに、4OHT (4-hydroxy tamoxifen) を投与し、Akt シグナルを一過性に活性化させた。この系を用いて、Akt シグナルの活性化が、組織幹細胞の挙動、幹細胞の癌化や老化を、解析した。

Akt-Mer マウスの皮膚に、4OHT を塗布し、Akt シグナルの活性化が、皮膚や毛包の幹細胞システムに与える影響を調べた。まず、皮膚の切片を作製し、組織学的な解析をおこない、さらに、様々なマーカーを用いて免疫組織染色をおこなった。また、皮膚から細胞を調整し、細胞表面マーカーで染色し、FACS (fluorescent activated cell sorter) 解析をおこなうことで、幹細胞、前駆細胞の動態を調べた。さらに、幹細胞、前駆細胞をソートし、その後培養することにより、幹細胞由来のホロクローンの形成効率を調べた。

軟骨細胞分化における Akt シグナル活性化の影響を調べるために、Akt-Mer マウスの腕の骨を、4OHT 存在下で器官培養をおこなった。軟骨の分化を、様々なマーカーを用いて、組織学的に解析した。また、同様の解析を、PI3K 阻害剤の存在下でおこない、

PI3K/Akt シグナル抑制の効果を解析した。さらに、ヒトの間葉系幹細胞から軟骨細胞を誘導する系を用いて、PI3K/Akt シグナルの活性化/不活性化の影響を、遺伝子発現様式や組織学的解析により調べた。

(2) Akt シグナルによる幹細胞制御機構の解析

胎仔期の生殖細胞である始原生殖細胞を、LIF (leukemia inhibitory factor)、SCF (stem cell factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor) の存在下で培養すると、EG 細胞を樹立することができる。

この培養系で Akt-Mer マウス由来の始原生殖細胞を培養することで、Akt の作用様式や Akt の下流分子の挙動を解析した。下流分子の機能は、阻害剤やノックアウトマウスなどを用いて解析した。

Akt-Mer を発現する ES 細胞を用いて、ES 細胞と体細胞を細胞融合したときにおこる体細胞核の初期化に、Akt シグナル与える影響を調べた。初期化が可視化できるように、Oct4 プロモーターの支配化に緑色蛍光タンパク EGFP (enhanced green fluorescent protein) を発現するトランスジェニックマウス由来の胸腺細胞、繊維芽細胞を用いた。Akt の下流分子の解析は、阻害剤や遺伝子の強制発現によりおこなった。

(3) GSK3 シグナルによる未分化性制御機構の解析

Akt-Mer マウスの受精卵、胚盤胞を、4OHT の存在下/非存在下で培養し、内部細胞塊を免疫手術により取り出した。次に、内部細胞塊を 4OHT 存在下/非存在下で、繊維芽細胞をフィーダー細胞として用いて培養し、ES 細胞を樹立する。同様に、野生型マウスの胚盤胞において、GSK3 の酵素活性を薬剤により阻害することにより、ES 細胞の樹立効率を調べた。

樹立した ES 細胞の分化能は、embryoid body 形成過程のマーカー遺伝子の発現変化、nude マウスの皮下に移植したときに形成されるテラトーマ (奇形腫) の組織学的解析、胚盤胞に注入したときのキメラマウス形成効率および生殖系列への寄与率、により判定した。

4. 研究成果

(1) 組織幹細胞における PI3K/Akt シグナルの解析

Akt-Mer マウスの皮膚に、4OHT を塗布すると、休止期の毛包幹細胞が活性化し、発毛が誘導された。このとき、幹細胞が活性化するだけでなく、前駆細胞が増幅し、毛

をつくる様々な分化細胞が産生された。この結果は、PI3K/Akt シグナルは、組織幹細胞においては、幹細胞の休止/活性化という新たな機能をもつこと、さらには、幹細胞の増殖だけではなく分化も促進するとう2面性を有することが明らかとなった。

また、Akt シグナルの活性化により、皮膚、毛包の増殖が亢進し、過形成が誘導されたので、幹細胞の癌化における機能も示唆された。

軟骨細胞の分化過程において、最終分化に入るときに、PI3K/Akt シグナルが抑制されることを示した。そこで、軟骨細胞分化におけるPI3K/Akt シグナルの機能を調べるために、Akt-Mer マウスを用いて、軟骨細胞分化において、PI3K/Akt シグナルを活性化させた。その結果、最終分化前の未分化軟骨細胞の増殖などが活性化し、最終分化に入るのが阻害された。逆に、阻害剤を用いてPI3K/Akt シグナルを不活性化させると、速やかに最終分化段階へと分化することを明らかにした。このように、軟骨の発生過程においては、最終分化過程でPI3K/Akt シグナルが抑制されることで、最終分化段階に入ることが示された。

同様に、ヒトの間葉系幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導系においても、PI3K/Akt シグナルの活性化は、未分化軟骨細胞を増幅し、最終分化を疎外すること、逆に、PI3K/Akt シグナルの不活性化は、最終分化を促進することが明らかとなった。この結果から、PI3K 阻害剤を用いることにより、ヒトの軟骨細胞の最終分化誘導を人為的に制御できる可能性が示された。

(2) Akt シグナルによる幹細胞制御機構の解析

bFGF は、EG 細胞の樹立に必須の増殖因子である。始原生殖細胞を、bFGF で刺激すると、Akt シグナルの顕著な活性化が認められた。そこで、Akt-Mer マウス由来の始原生殖細胞を、LIF、SCF、bFGF の存在下で培養すると、EG 細胞の樹立効率が上昇した。さらに、bFGF 非存在下では、野生型マウス由来の始原生殖細胞からは、EG 細胞は樹立することができない。しかし、Akt-Mer マウスの始原生殖細胞からは、bFGF 非存在下でも、40HT 存在下では、EG 細胞を樹立することができた。このように、Akt シグナルの活性化は、EG 細胞の樹立に必須な bFGF の機能を代替することができた。

Akt の下流分子の探索をおこなった。始原生殖細胞において、Akt シグナルを活性化させると、下流の GSK3 の機能を抑制するリン酸化が亢進していた。そこで、野生型マウスの始原生殖細胞を、GSK3 阻害剤の

存在下で培養したが、EG 細胞の樹立効率に影響は認められなかった。

Akt シグナルが活性化した始原生殖細胞では、下流分子の癌陽性遺伝子 p53 の機能が抑制されていることが示された。p53 欠損マウス由来の始原生殖細胞を、bFGF 存在下で培養すると、EG 細胞の樹立効率が上昇した。さらに、bFGF 非存在下でも、p53 欠損マウスからは、効率よく EG 細胞を樹立することができた。以上の結果から、Akt シグナルによる p53 の機能抑制が、EG 細胞の樹立を促進することが明らかとなった。

生体内において、PI3K/Akt シグナルの活性化(PI3K に拮抗する脱リン酸化酵素 PTEN の欠損)により、始原生殖細胞から、未分化細胞の腫瘍であるテラトーマが発症する。しかし、p53 欠損マウスでは、始原生殖細胞に由来するテラトーマの発症率は低い。このことから、少なくとも、生体内においては、p53 以外の別の標的分子が存在すると考えられる。

Akt-Mer を発現する ES 細胞を、マウスの胸腺細胞と細胞融合すると、ES 細胞様の細胞へと初期化される。このとき、初期化された細胞では、体細胞核中の Oct4 プロモーターが活性化し、EGFP が発現するようになる。この融合細胞を、初期化された細胞だけが生存できるような条件下で培養し、初期化されたコロニーの数を、40HT 存在下/非存在下で比較した。その結果、初期化コロニーの数は、Akt 活性化により有意に上昇した。同様の結果は、繊維芽細胞と細胞融合をおこなったときも認められた。一方、ES 細胞同士の細胞融合ではコロニー数に変化はなかったため、Akt 活性化は、細胞融合後の生存率や細胞接着を亢進させているのではなく、初期化を亢進させていることが示された。このように、Akt シグナルの活性化は、ES 細胞の未分化性の支持、始原生殖細胞から EG 細胞への脱分化、体細胞核の初期化、といふように、多能性幹細胞の様々な局面を制御するシグナルであることが明らかとなった。

(2) GSK3 シグナルによる未分化性制御機構の解析

ES 細胞は、胚盤胞中の内部細胞塊から樹立した多能性幹細胞株である。Akt-Mer マウスの受精卵、胚盤胞を 40HT 存在下で培養し ES 細胞の樹立をおこなったが、ES 細胞の樹立効率に変化は認められなかった。

一方、GSK3 の酵素活性を薬剤により阻害すると、樹立効率は有意に上昇した。樹立した ES 細胞は、正常な染色体数を持ち、様々な分化誘導系において分化多能性を示し、キメラマウスにおいて生殖系列にも寄与し

た。さらに、GSK3 阻害剤により、ES 細胞の樹立が困難であったマウス系統からも効率よく ES 細胞を樹立できることを明らかにした。

ES 細胞が樹立できるマウス系統や種は限られていることが知られている。GSK3 阻害剤を用いることで、今まで ES 細胞を樹立できなかった種からも ES 細胞を樹立できる可能性が示された。

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 8 件)

Nakamura T, Inoue K, Ogawa S, Umehara H, Ogonuki N, Miki H, Kimura T, Ogura A, and Nakano T. Effects of Akt signaling on nuclear reprogramming. *Genes Cells*. 13(12): 1269-1277, 2008. 査読有

Kita K, Kimura T, Nakamura N, Yoshikawa H, and Nakano T. PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. *Genes Cells*. 13(8): 839-850, 2008. 査読有

Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri T, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, and Nakano T. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MIL1 and MIL2 in murine fetal testes. *Genes Dev*. 22(7): 908-917, 2008. 査読有

Kimura T, Tomooka M, Yamano N, Murayama K, Matoba S, Umehara H, Kanai Y, and Nakano T. AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development* 135(5): 869-879, 2008. 査読有

Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, Nakamura T, Kitajima K, Ikawa M, Okabe M, Niwa H, and Nakano T. Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase 3. *Stem Cells* 25(11): 2705-2711, 2007. 査読有

Lee J, Shinohara-Kanatsu M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Kimura T, Nakano T, Ogura A, and Shinohara T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development* 134(10): 1853-1859, 2007. 査読有

Murayama K, Kimura T, Tarutani M, Tomooka M, Hayashi R, Okabe M, Nishida K,

Itami S, Katayama I, and Nakano T. Akt activation induces epidermal hyperplasia and proliferation of epidermal progenitors. *Oncogene* 26(33): 4882-4888, 2007. 査読有

Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K, and Nakano T. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nature Cell Biol*. 9(1): 64-71, 2007. 査読有

[学会発表](計 5 件)

木村 透、中村肇伸、山野範子、山本敏之、鈴木 聡、仲野 徹、PI3K/Aktシグナルによる多能性幹細胞システムの制御、第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会合同学会、2008. 12. 9-12、神戸国際会議場)

Kimura T, Yamano N, Yamamoto T, and Nakano T. Regulation of Pluripotency in Mouse Primordial Germ Cells. Cold Spring Harbor Symposium Germ Cell Meeting, 2008. 10. 1-5, Cold Spring Harbor Laboratory)

木村 透、中村肇伸、山野範子、鈴木 聡、仲野 徹、分化多能性の獲得と維持におけるPI3K/Aktシグナルの機能、第6回幹細胞シンポジウム、2008. 5. 16-17、学術総合センター

木村 透、鈴木 聡、仲野 徹、PI3K-Aktシグナルによる幹細胞システム制御、第40回日本発生生物学会、第59回日本細胞生物学会合同大会、2007.5. 28-30、福岡国際会議場

木村 透、村山一茂、樽谷勝仁、林 竜平、岡部 勝、板見 智、片山一朗、仲野 徹、Aktシグナルによる表皮幹細胞の活性化と前駆細胞の増幅、第5回幹細胞シンポジウム、2007. 5. 17-19、淡路夢舞台国際会議場

[図書](計 1 件)

Kimura T, and Nakano T. Humana Press, Regulation of stem cell systems by PI3K/Akt signaling. p309-317, 2009.

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 透 (KIMURA TOHRU)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50280962

(2)研究分担者

北島 健二 (KITAJIMA KENJI)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授 (常

勤)

研究者番号：10346132

(3)連携研究者

樽谷 勝仁 (TARUTANI MASAHIRO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30301261