

平成 20 年 7 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770172
 研究課題名 (和文) ヒト ES 細胞の多能性：極性形成に基づく対称分裂から多能性を生み出す分子機構の解析
 研究課題名 (英文) Pluripotency of Human ES cells: Study of cell polarity and symmetric division regulating pluripotency
 研究代表者
 角 智行 (SUMI TOMOYUKI)
 京都大学・再生医科学研究所・助教
 研究者番号：90378894

研究成果の概要：本研究は、ヒト ES 細胞が密着結合有する上皮細胞様の頂端部-基底部に沿った非対称性を有していることに着目し、細胞極性と多能性維持・初期分化誘導の関連性に焦点を当て研究を開始した。ヒト ES 細胞において細胞極性に制御する β -catenin を特異的に活性化した結果、速やかに頂端部-基底部極性が消失し、哺乳類初期発生を模倣する一連の分化遺伝子の発現が誘導された。これらの結果は、ヒト ES 細胞の細胞極性の維持が多能性を維持する上で必須であることを示し、細胞極性の崩壊によって初期発生過程を模倣する遺伝子発現プログラムが惹起されることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	0	2,500,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	270,000	3,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内・細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) は長期にわたって自らを新たに作り代える自己複製能力を持つと同時に、体を構成するさまざまな細胞や組織を作り出す能力、多能性を併せ持つ。1998 年にヒト ES 細胞株が樹立されて以来、この多能性幹細胞の特性解析に加え、それを特定の機能や形質を持った固有の細胞へ分化誘導し、個々の分化細胞を移植する再生医療への応用を目指した研究が世界各国で進められている。このように再生医療への応用とい

う点で脚光を浴びているにも関わらず、ヒト ES 細胞の多能性と自己複製を維持する分子機構に関する基礎的な知見に関しては未解明な点が多く残されている。ヒト ES 細胞が持つ自己複製能力と多能性が、何故それほど重要なのであろうか。まず第一に、基礎研究目的にとって、ヒト ES 細胞が長期にわたって自らの複製を作り続けることを可能としている遺伝学的、分子生物学的基礎を理解することが重要であるからである。第二に、細胞移植治療によって各種疾患の根本治療を行うには、ES 細胞を人為的に操作・改変す

ることによって必要なタイプの細胞に分化させたいという細胞移植治療を行うことになるが、そのためには大量の ES 細胞が必要とされるからである。

2. 研究の目的

細胞極性は、細胞の形態、接着、細胞分裂を非対称化するだけでなく、細胞内蛋白質や mRNA 等を不均等に分布させることによって多様性・方向性を持った細胞の機能発現に欠かせない特質である。とりわけ多種多様な細胞を生じる個体発生の課程で、幹細胞から異なる娘細胞を生み出す非対称分裂や幹細胞自身の対称分裂（自己複製）にとって極性形成は重要なプロセスである。細胞極性は大きく分けて頂端部-基底部極性とそれに直行する平面細胞極性の二つに分けられる。それぞれの極性形成は特異的な情報伝達分子により制御されている一方、ショウジョウバエをモデル動物とした最近の研究から頂端部-基底部極性と平面細胞極性を制御する分子群が互いに協調していることが示されている。ヒト ES 細胞が頂端部-基底部に沿った非対称性を有していることから本計画研究では、頂端部-基底部極性形成に必須である aPKC-PAR 複合体シグナル伝達経路及び平面細胞極性の形成に重要とされる非古典的 Wnt 情報伝達経路、古典的 Wnt/ β -catenin 経路に焦点を当て、これらの経路のいずれかあるいは一方がヒト ES 細胞の多能性維持に重要であることを実証する。このような特定の極性形成関連分子群と多能性の関連性を解析する一方で、ヒト ES 細胞の細胞極性を崩壊した際に生じる遺伝子発現の変化をプロファイリングすることにより、多能性維持と極性維持に関連すると期待される因子を同定し、因子間の関係を包括的に理解する。これら計画研究によって、ヒト ES 細胞の自己複製、多能性を制御する細胞極性を総合的に理解し、ヒト ES 細胞の多能性を維持する上で対称分裂と頂端部-基底部の極性形成との関連性ならびにその分子機構を明確にし、ES 細胞の持つ多能性がどのような原理に基づいて形成されるのかその分子基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

極性形成関連因子群(平面極性(非古典的 Wnt 情報伝達経路), 頂端部-基底部極性(aPKC-PAR 複合体))それぞれの動態を生化学的(発現量・活性・リン酸化等の翻訳後修飾)及び細胞生物学的(免疫染色による局在変化の追跡)に観察し、各因子の量的・質的な動態変化を詳細に調べていくことでヒト ES 細胞の極性形成と多能性維持との関連性

を示唆する因子を包括的に把握する。極性形成関連遺伝子群の機能解析を行うにあたり、それぞれの遺伝子のクローニングあるいは他の研究者からの供与等により発現ベクターを構築する。この際、機能が明らかな分子に関しては各種変異体(ドミナントアクティブ・ネガティブ)を作成する。一方で RNA interference 法(RNAi)を用いた遺伝子ノックダウンの実験を行うため、各因子の遺伝子配列をもとに siRNA オリゴヌクレオチドのデザインや持続的なノックダウンを行う際には shRNA 発現ベクターの構築を行う。各遺伝子の強制発現を行う際の問題点として、ある特定遺伝子を強制的に発現したり抑制したりする場合、遺伝子によってはそれだけで分化を誘導したり細胞レベルの致死に至る場合が予想される。その様な遺伝子の機能を解析するため、下記に示す条件付き発現系を導入し機能解析を試みる。

(1). エストロジェン受容体との融合分子: 本法は解析したい因子をエストロジェン受容体(リガンド結合部位)との融合蛋白質として発現させ、エストロジェンの培養液への添加・非添加によってその融合蛋白質の機能を速やかに ON/OFF することが可能である。ただし、解析したい因子が融合蛋白質とした後も本来の機能を損なわないことが前提条件である。既に、c-Myc や p53, STAT3 などの数多くの転写因子において本法が有効であることが明らかになっている。

(2). テトラサイクリン誘導プロモーターシステム: 本法は、解析したい因子の遺伝子をテトラサイクリン誘導プロモーターの下流に連結し ES 細胞に導入することで、テトラサイクリンの培養液への添加によってその遺伝子の発現を ON/OFF することが可能である。既に申請者らは、サル ES 細胞において本法が有効であることを見出しており、ヒト ES 細胞においても系の確立を進めている。

(3). Cre/Lox-P 組み換えシステム: 本法は、適当なダミー遺伝子(例えば GFP, b-gal などの ES 細胞に影響を与えない遺伝子)と poly A シグナル配列の両側に Lox-P 配列を挿入したカセットの下流に解析したい遺伝子を挿入した発現ベクターを用いる。このベクターを導入された ES 細胞は、通常、蛍光遺伝子のみを発現しその下流の遺伝子は発現しないが、Cre 組み換え酵素を発現させることによって、Lox-P 配列に挿入された蛍光遺伝子が除去された後に次の下流遺伝子が新たに発現するシステムである。

4. 研究成果

本研究では、ヒト胚性幹細胞(ヒト ES 細胞)が密着結合有する上皮細胞様の頂端部-基底部に沿った非対称性を有していることから、

細胞極性と多能性維持・初期分化誘導の関連性に焦点を当て研究を開始した。極性形成に重要な役割を担っている古典的・非古典的 Wnt 情報伝達経路と多能性維持に関して、まず古典的 Wnt/ β -catenin 経路の役割を検討するためヒト ES 細胞株に条件付き活性化システムの導入を試みた。条件付き活性化システムとして、研究代表者等がこれまでに確立しているエストロゲン受容体との融合蛋白質を用いた発現システムを利用し、古典的 Wnt 経路において中心的役割を担う β -catenin とエストロゲン受容体とのキメラ蛋白質を発現するプラスミドベクターを作製、これを複数のヒト ES 細胞株に遺伝子導入後その安定形質株を樹立した。樹立した遺伝子導入株は、未刺激の状態では未分化マーカー発現を維持しており多能性を保持したまま長期間培養することが可能であった。

一方、樹立した細胞における β -catenin をタモキシフェン（エストロゲンアゴニスト）処理により特異的に活性化した結果、数日以内にヒト ES 細胞の形態に変化が認められ、通常の細胞コロニーから個々の細胞に分散し運動性の高い細胞へと変化することが確認された。免疫染色法によりこの過程を経時的に観察した結果、密着結合に関わる ZO-1、接着結合を担う E-cadherin 分子の発現が数日以内に消失する一方、通常未分化 ES 細胞では認められない間葉系細胞のマーカーである N-cadherin の発現が全ての細胞において確認された。このことは、ヒト ES 細胞における β -catenin の活性化は、密着結合・接着結合を速やかに崩壊し、頂端部-基底部に沿った細胞極性が消失したことを示している。この現象を詳細に解析するため、各種未分化・分化マーカー遺伝子の発現解析を行った結果、 β -catenin 活性化わずか数時間で未分化性維持に必須な遺伝子である OCT-4、NANOG、SOX2 といった遺伝子の発現に減少が認められ、また数日以内に初期発生過程の原条 (primitive streak) から中胚葉形成に関連する一連の遺伝子発現が誘導され、哺乳類初期発生プログラムを模倣した遺伝子発現がほぼ全ての細胞で生じていることが明らかになった。さらに β -catenin 活性化による極性崩壊と多能性の崩壊・細胞分化との関連性を詳細に解析するため、マイクロアレイによる遺伝子発現パターンの網羅的解析を行った。その結果、極性形成と多能性維持に関わることが期待される多くの遺伝子群の変動が観察された。

以上の結果から、ヒト ES 細胞における細胞極性の維持はその多能性を維持する上で必須であることを示すとともに、細胞極性の崩壊によって容易に初期発生過程を模倣する遺伝子発現プログラムが惹起されることが明らかになった。

研究代表者はこれまで、霊長類 ES 細胞の多能性維持の分子機構をマウス ES 細胞と比較検討してきた結果、ES 細胞を規定する根幹となる転写因子群（例えば Oct4, SOX2, Nanog）は霊長類・マウス ES 細胞ともに共通の機能を示すが、マウス ES 細胞において重要とされる LIF/STAT3/c-Myc 情報伝達経路は霊長類 ES 細胞において全く機能せず、とりわけ転写因子 c-Myc の恒常的活性化はマウス ES 細胞の場合に相反しヒト ES 細胞の分化を誘導することを明らかにしてきた。またこれ以外にも、ヒト ES 細胞の多能性を維持するとされる細胞外情報伝達因子（bFGF, TGF β /Activin, 神経栄養因子等）の多くはマウス ES 細胞に対して全く機能しないかあるいは分化を誘導するなど、ヒト・マウス ES 細胞は共に多能性を有する胚性幹細胞であるにもかかわらず、その多能性維持の分子機構は多くの点で異なっている。本研究は、ヒト ES 細胞における古典的 Wnt/ β -catenin シグナル経路による細胞極性の制御が ES 細胞エピゲノムに秘められた多能性を引き出すトリガーとして中心的役割を担っていることを分子レベルで示した世界で初めての成果である。また言い換えるとヒト ES 細胞の多能性を長期間 in vitro で培養・維持するうえで古典的 Wnt/ β -catenin 情報伝達経路を常に抑制することが重要であることを示した初めての成果である。この成果を基にして、今後ヒト ES 細胞の安定な長期培養技術の確立だけでなく、ヒトの初期発生過程の分子機構の解明やそれを応用した分化誘導系の確立など多くの研究が進展することが期待される。

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 3 件）

1. Tomoyuki Sumi, Norihiro Tsuneyoshi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori: Defining lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ β -catenin and BMP signaling. *Development* 135: 2969-2979 (2008). 査読有
2. Norihiro Tsuneyoshi, Tomoyuki Sumi, Hiroaki Onda, Hiroshi Nojima, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori: PRDM14 suppresses expression of differentiation marker genes in human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 899-905 (2008). 査読有

3. Tomoyuki Sumi, Norihiro Tsuneyoshi, Norio Nakatsuji and Hirofumi Suemori: Apoptosis and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Induced by Sustained Activation of c-Myc. *Oncogene* 26:5564-5576 (2007). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Tomoyuki Sumi, CANONICAL WNT/BETA-CATENIN-MEDIATED EARLY LINEAGE SPECIFICATION IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS. 6th ISSCR (International Society for Stem Cell Research) Annual Meeting -June 11-14, 2008, Philadelphia, USA
2. 角 智行, ヒトES細胞の多能性維持における古典的Wnt/beta-cateninシグナル伝達経路の役割, 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会・合同大会, 2007. 12. 12, パシフィコ横浜
3. Tomoyuki Sumi, SUSTAINED ACTIVATION OF C-MYC DISTURBS SELF-RENEWAL OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS. 5th ISSCR (International Society for Stem Cell Research) Annual Meeting -June 17-20, 2007, Cairns, Australia

[図書] (計 1 件)

1. 角 智行:「ヒトES細胞の現状と展望」, 分子細胞治療 第6巻 第3号, 111-116 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角 智行 (SUMI TOMOYUKI)
京都大学・再生医科学研究所・助教
研究者番号: 90378894

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし