

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06454

研究課題名(和文) 多能性幹細胞の分化誘導における男女差

研究課題名(英文) Sex differences during differentiation of pluripotent stem cells

研究代表者

回測 修治 (Mawaribuchi, Shuuji)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：70554921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞の性質に影響を与える要素として男女差がある。女性由来多能性幹細胞のX染色体では不活性化が起きているが、長期継代によりX染色体の不活性化が不完全になることが知られている。その不完全なX染色体の不活性化によりX染色体上の遺伝子の発現量に男女差が生じ、女性由来多能性幹細胞は分化抵抗性を示す。長期継代を行なった女性由来多能性幹細胞によるRNAseq解析により、ある遺伝子の発現量が継代と共に上昇していた。この遺伝子は神経分化抑制に関与することが知られていることから、分化抵抗性を示す分子マーカーの可能性はある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療等製品では迅速かつ安全な治療のため、品質の高い様々な種類の多能性幹細胞(iPS/ES細胞)をバンク化し、他家移植することが進められている。その際、治療目的に沿った細胞の性質(分化効率の良さなど)を持つ細胞の選定が必要である。X染色体の不活性化が不完全になった女性由来多能性幹細胞は分化抵抗性を示す。この分化抵抗性を示す分子マーカーを探索することは、再生医療等製品の各製造プロセスにおける品質管理技術において重要である。

研究成果の概要(英文)：The sex difference influences the properties of pluripotent stem cells. X chromosome is inactivated in female pluripotent stem cells, but long-term passaging results in incomplete inactivation of the X chromosome. The incomplete inactivation induces sex differences in gene expression on the X chromosome, and female-derived pluripotent stem cells are resistant to differentiation. RNAseq analysis of long-term passage of female-derived pluripotent stem cells revealed that the expression level of a gene increased with passage. This gene is known to be involved in the inhibition of neuronal differentiation and may be a molecular marker for differentiation resistance.

研究分野：分子生物学

キーワード：多能性幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医療等製品では迅速かつ安全な治療のため、品質の高い様々な種類の多能性幹細胞(iPS/ES細胞)をバンク化し、他家移植することが進められている。その際、治療目的に沿う細胞の性質(分化効率の良さなど)を持つ細胞の選定が必要であり、申請者は多能性幹細胞の性質(品質)に影響を与える要素として男女差に注目している。女性のX染色体では、Xist RNAによりX染色体の不活性化が起きているが、そのXist RNAの発現が低い多能性幹細胞は分化抵抗性(三胚葉分化がしにくい)であることが知られている。多能性幹細胞が分化抵抗性を獲得すると、成長因子による分化誘導に必要な量が増える、あるいは誘導時間が長くなるといった再生医療等製品製造における問題となる。今後、再生医療等製品が普及するために各製造プロセスにおける多能性幹細胞の品質管理技術は重要である。

2. 研究の目的

女性由来の多能性幹細胞は長期継代によりX染色体の不活性化が不完全になり一部の遺伝子が発現するようになる。そのため多能性幹細胞の男女において、X染色体に座位する遺伝子の発現量に差が生じ、分化効率に違いが生じる。本研究の目的は、多能性幹細胞の男女で発現量が異なる遺伝子に着目し、バンク化で治療目的に沿う細胞を選定できる分子マーカーを探索することを目的とし、細胞生物学・分子生物学的手法を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1)既知のX染色体の不活性化が不完全である女性由来多能性幹細胞のRNAseqデータを解析することで、不活性化が不完全である際に、より優先的に発現量が上昇しやすいX染色体に座位する遺伝子群を同定した。それらの遺伝子群を用いることで、女性由来多能性幹細胞のどれくらいでX染色体の不活性化が不完全になっているのかを検討した。

(2)女性由来の多能性幹細胞は長期継代によりX染色体の不活性化が不完全になる。そこで女性由来多能性幹細胞の長期継代を行なった。その長期継代した多能性幹細胞の性情や形態観察、RNAseqによる網羅的発現解析を行なった。特に長期継代によりX染色体に座位する遺伝子の発現量の変化を検討した。

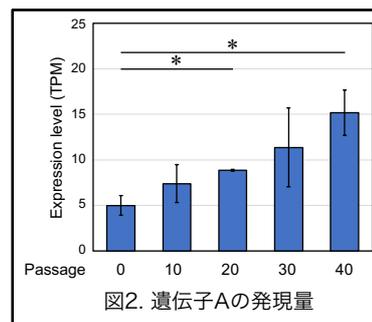
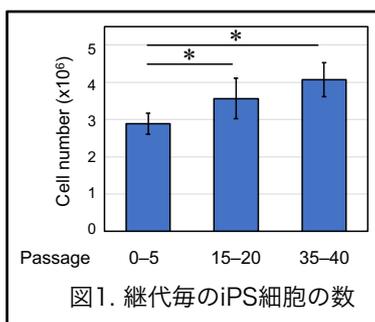
(3)女性由来多能性幹細胞で長期継代により発現量が上昇したX染色体上の遺伝子の免疫染色やsiRNAを用いたノックダウンによる機能解析を行なった。長期継代によって分化抵抗性を獲得するメカニズムの解明を行い、治療目的に沿う細胞を選定できる分子マーカーの探索を行なった。

4. 研究成果

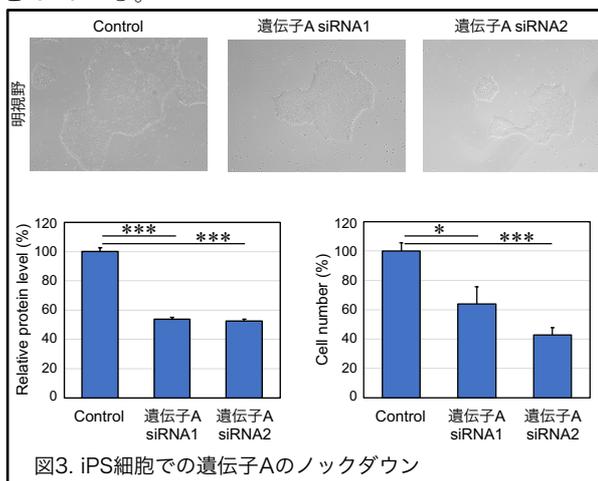
(1)既知のX染色体の不活性化が不完全であるRNAseqデータによる網羅的発現解析により、Xist発現と連動する遺伝子群やX染色体の不活性化から逸脱しやすい遺伝子群のスクリーニングを行った。Xistが低発現で高発現となる遺伝子群はGene ontology解析から転写、翻訳、小胞体、代謝の制御に関与することがわかった。また常染色体とX染色体の遺伝子発現比である

X/A ratio を用いることで、X 染色体の不活性化から逸脱しやすい遺伝子群 (122 個) を同定した。Xist 遺伝子は X 染色体の中間部位に座位している。X 染色体の不活性化から逸脱しやすい遺伝子群が X 染色体上のどこに位置するかを調べたところ、Xist 遺伝子から離れた染色体両端に多く集まっていることがわかった。このことは Xist 遺伝子から距離が離れている遺伝子の方が、不活性化から逸脱しやすいことを示唆している。また、この遺伝子群を用いて、無作為に集めた 300 以上の公開登録されている多能性幹細胞の RNAseq データを解析した。その結果、30%以上の女性由来多能性幹細胞で X 染色体の不活性化から逸脱が起きていることがわかった。このことから研究で用いられている女性由来多能性幹細胞では分化抵抗性を示すものが含まれている可能性が示唆された。

(2)多能性幹細胞の長期継代を行なった。長期継代した多能性幹細胞の見た目などは大きく変化しておらず正常に継代できたと考えられた。その一方で、分裂速度が亢進していた(図 1)。その長期継代を行った多能性幹細胞で RNAseq 解析を行なったところ、X 染色体上の遺伝子ではがん細胞などで細胞分裂に関与すると知られている遺伝子 A が継代により発現量の変動が一番大きかった。また継代とともに、遺伝子 A が発現上昇していることが判明した(図 2)。このことから、X 染色体の不活性化が不完全で分化抵抗性を示す多能性幹細胞は分裂速度が亢進しているため、より品質の悪い細胞が広がることが推測された。



(3)X 染色体上に座位する遺伝子 A は継代とともにその発現量を増加させていた。この遺伝子 A を siRNA でノックダウンしたところ、有意に細胞数が減少した。このことから遺伝子 A は多能製幹細胞の細胞分裂速度の亢進に関与していることが示唆された。また遺伝子 A は発生過程において神経に特異的な遺伝子の発現を負に制御する。そのため、X 染色体の不活性化が不完全な分化抵抗性の多能性幹細胞においては遺伝子 A が発現量を増すことによって外胚葉へ分化抵抗性を示している可能性がある。現在、多能性幹細胞の外胚葉分化における遺伝子 A の機能の解析をしている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miura Ikuo, Shams Foyez, Jeffries Daniel Lee, Katsura Yukako, Mawaribuchi Shuuji, Perrin Nicolas, Ito Michihiko, Ogata Mitsuaki, Ezaz Tariq	4. 巻 31
2. 論文標題 Identification of ancestral sex chromosomes in the frog <i>Glandirana rugosa</i> bearing XX XY and ZZ ZW sex determining systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Ecology	6. 最初と最後の頁 3859 ~ 3870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mec.16551	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 Katsumi Taito, Shams Foyez, Yanagi Hiroaki, Ohnishi Taku, Toda Mamoru, Lin Si Min, Mawaribuchi Shuuji, Shimizu Norio, Ezaz Tariq, Miura Ikuo	4. 巻 64
2. 論文標題 Highly rapid and diverse sex chromosome evolution in the <i>Odorrana</i> frog species complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 279 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12800	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 Mawaribuchi Shuuji, Ito Michihiko, Ogata Mitsuaki, Yoshimura Yuri, Miura Ikuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Parallel Evolution of Sex-Linked Genes across XX/XY and ZZ/ZW Sex Chromosome Systems in the Frog <i>Glandirana rugosa</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 257 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14020257	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 Mawaribuchi Shuuji, Shimomura Osamu, Oda Tatsuya, Hiemori Keiko, Shimizu Kayoko, Yamase Kenya, Date Mitsuhiro, Tateno Hiroaki	4. 巻 cwad009
2. 論文標題 rBC2LCN-reactive SERPINA3 is a glyco biomarker candidate for pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 cwad009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwad009	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 Mawaribuchi Shuuji, Haramoto Yoshikazu, Ikeda Nozomi, Ito Michihiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Evolutionary features of ligands and their receptors via protein-protein interactions and essentiality in primates	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 258 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13006	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 Yusaku Ogita, Kei Tamura, Shuuji Mawaribuchi, Nobuhiko Takamatsu, Michihiko Ito	4. 巻 21
2. 論文標題 Independent pseudogenizations and losses of sox15 during amniote diversification following asymmetric ohnolog evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC ecology and evolution	6. 最初と最後の頁 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12862-021-01864-z	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 Takuya Maeda, Haruna Hosaka, Yuki Nakamura, Shuuji Mawaribuchi, Takayuki Nagai, Mari Endo, Naoki Ito, Hiroaki Kiyohara	4. 巻 9
2. 論文標題 Fibroblastic reticular cells and type 3 innate lymphoid cells in Peyer's patches: Target cell candidates for inulooligosaccharides in hochuekkito formula containing Atractylodis rhizoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 32-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tkm2.1307	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 Mawaribuchi Shuuji, Haramoto Yoshikazu, Tateno Hiroaki, Onuma Yasuko, Aiki Yasuhiko, Ito Yuzuru	4. 巻 10
2. 論文標題 rBC2LCN lectin as a potential probe of early stage HER2 positive breast carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1056 ~ 1064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12852	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 Haramoto Yoshikazu, Onuma Yasuko, Mawaribuchi Shuuji, Nakajima Yoshiro, Aiki Yasuhiko, Higuchi Kumiko, Shimizu Madoka, Tateno Hiroaki, Hirabayashi Jun, Ito Yuzuru	4. 巻 14
2. 論文標題 A technique for removing tumourigenic pluripotent stem cells using rBC2LCN lectin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 306 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.03.017	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 Watanabe Tomoko, Saito Sayoko, Hiemori Keiko, Kiyoi Kayo, Mawaribuchi Shuuji, Haramoto Yoshikazu, Tateno Hiroaki	4. 巻 529
2. 論文標題 SSEA-1-positive fibronectin is secreted by cells deviated from the undifferentiated state of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 575 ~ 581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.074	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡邊 朋子, 回瀬 修治, 原本 悦和, 館野 浩章
2. 発表標題 iPS細胞から生じた低品質細胞の非破壊検出および除去技術の開発
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 回瀬修治
2. 発表標題 多能性幹細胞の個性(分化指向性と男女差)と品質管理
3. 学会等名 第19回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 朋子、角太 淳吾、回測 修治、原本 悦和、今井 俊夫、館野 浩章
2. 発表標題 ヒト人工多能性幹細胞の品質管理技術の開発
3. 学会等名 第19回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関