

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390119

研究課題名（和文） 幹細胞システム制御におけるリン酸化シグナルの機能解析

研究課題名（英文） Analysis of phosphorylation signals in regulation of stem cell system

研究代表者

木村 透（KIMURA TOHRU）

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：50280962

研究成果の概要（和文）：幹細胞システムは、組織の恒常性維持に加え、がん化や老化などの病態にも関与する。また、多能性幹細胞は、細胞移植治療のソースとして注目を浴びている。本研究では、Akt を中心としたリン酸化シグナルが、組織のがん化、生殖細胞における多能性獲得、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の誘導、などに関与することを明らかにした。さらに、リン酸化シグナルを人為的に制御することにより、試験管内において、多能性幹細胞から生殖細胞を分化誘導する系の構築を行った。

研究成果の概要（英文）：Stem cell system is involved in pathological aspects of tissues, such as tumorigenesis and aging, as well as in regulation of tissue homeostasis. In addition, pluripotent stem cells hold great promise in cell transplantation therapy. In this study, we have shown that the phosphorylation signals including Akt signal regulate tumorigenesis of tissues, acquisition of pluripotency in germline cells and induction of iPS (induced pluripotent stem) cells. By manipulation of phosphorylation signals, we also developed *in vitro* differentiation system of germ cells from pluripotent stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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、多能性、リン酸化シグナル、生殖細胞、再生医学

## 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ヒエラルキー構造をとっている。その構築のために、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」を備えている。胚性幹細胞

（ES細胞：embryonic stem cell）は、内部細胞塊がもつ分化多能性を維持した幹細胞株であり、生殖細胞とすべての体細胞に分化することができる。一方、始原生殖細胞（PGC：primordial germ cell）は、生殖系列に運命付けられた細胞であるが、特殊な培養条件下において、ES細胞と同等の分化多能

性をもつ胚性生殖細胞 (EG 細胞: embryonic germ cell) に「脱分化」する。また、成体の組織幹細胞では、神経幹細胞は神経系細胞を、上皮幹細胞は上皮細胞を、など、それぞれの組織に必要な細胞を供給することで、個体の恒常性を維持している。

様々な増殖因子や接着因子により活性化される PI3K は、phosphatidylinositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>) をリン酸化し phosphatidylinositol triphosphate (PIP<sub>3</sub>) を産生する酵素である。PIP<sub>3</sub> は、下流分子のリン酸化酵素 Akt を活性化することにより、シグナルを下流に伝達する。一方、癌抑制遺伝子 PTEN は、PIP<sub>3</sub> を PIP<sub>2</sub> に脱リン酸化する脂質ホスファターゼであり、PI3K の作用に拮抗する。

以下にまとめるように、我々は、PI3K/Akt シグナルが様々な幹細胞システムにおいて担う機能を明らかにしていた。

(1) 皮膚や毛包の幹細胞システムにおいては、休止期の幹細胞を活性化し、前駆細胞を産生させるシグナルである。

(2) PGC 特異的に PTEN を欠損するマウス、および、Akt のリン酸化酵素活性をコンディショナルに on/off できる 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の解析から、PI3K/Akt シグナルの活性化が、PGC から EG 細胞への脱分化を促進する。

(3) Akt シグナルは、マウスおよび霊長類の ES 細胞において、分化多能性を支持する。

このように、PI3K/Akt シグナルは、EG 細胞・ES 細胞という多能性幹細胞システムでは未分化状態を支持するシグナルであること、組織の幹細胞システムにおいて、幹細胞の休止・活性化の制御という新しい機能をもつこと、を明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

上で述べた組織幹細胞、EG 細胞、ES 細胞の研究で得られた成果をもとにして、本研究では、幹細胞の生理的機能の解析だけでなく、がん化や老化など幹細胞システムの破綻により引き起こされる病態における PI3K/Akt シグナルの解析を行う。また、PI3K/Akt シグナルを制御することにより幹細胞システム的人為的制御を試みる。

さらに、GSK3 (glycogen synthase kinase 3)、MAPK (mitogen activated protein kinase) シグナルといった他のリン酸化シグナルの機能を平行して解析することで、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) 幹細胞のがん化および老化における PI3K/Akt シグナルの機能解析

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) に、Mer のリガンドである 4OHT (4-hydroxy tamoxifen) を投与することにより Akt シグナルを一過性に活性化させ、組織幹細胞の挙動を解析する。Akt-Mer マウスは、すでに、表皮や毛包の幹細胞、PGC の脱分化過程の解析に用い、このシステムの有用性を示している。このトランスジェニックマウスを用いて Akt シグナルを一過性に活性化させたときの、組織幹細胞のがん化や老化に与える影響を解析する。

さらに、組織特異的に Akt シグナルを高いレベルで活性化させたときの効果を解析するために、テトラサイクリン処理により、恒常的に活性化型の Akt を組織特異的に発現誘導できるトランスジェニックマウスの作製を試みる。

(2) PI3K/Akt シグナルによる幹細胞制御メカニズムの解析

PI3K/Akt シグナルは、PGC から EG 細胞への脱分化を促進し、ES 細胞の未分化状態を支持する。そこで、体細胞核の初期化に与える PI3K/Akt シグナルの影響を、iPS 細胞を誘導する実験系を用いて調べる。Oct4 プロモーターの支配化に蛍光タンパク GFP (green fluorescent protein) を発現するトランスジェニックマウスから線維芽細胞を調整し、初期化因子を導入する。このとき、Akt シグナルを活性化させ、iPS 細胞の誘導効率を調べる。

(3) PI3K/Akt シグナルによる幹細胞システム的人為的制御

生体内において、最初の生殖系列の細胞である PGC は、分化多能性をもつエピブラストから分化誘導される。このとき、PGC の周囲の細胞は中胚葉へと分化するが、PGC 前駆細胞においては、中胚葉分化が抑制され生殖細胞へと分化する。

そこで、試験管内における ES 細胞からの中胚葉分化システムにおいて、中胚葉分化を阻害すると、PGC を分化誘導できるのではないかと、という仮説を立てた。そのために、まず、ES 細胞の分化誘導システムとして、OP9 フィーダー細胞との共培養系を用いた。次に、Akt シグナルを活性化させることで、細胞分化を阻害した。このとき、ES 細胞が PGC 様細胞へ分化するかどうかを調べた。

(4) 幹細胞システム制御における他のリン酸化シグナルの機能解析

① ES 細胞から PGC 様細胞への分化に与える影響

(3) で述べた仮説を検証するために、Akt シグナル以外のリン酸化シグナルの機能を解

析した。中胚葉分化誘導システムは、OP9 フィーダー細胞システムを用いた。次に、様々なリン酸化酵素の阻害剤を用いて、ES 細胞からの PGC 様細胞の分化誘導を試みた。

② PGC から多能性幹細胞への脱分化に与える影響

我々は、PI3K/Akt シグナルが、様々な多能性幹細胞システムで未分化性を促進することを明らかにしてきたが、発端は、PGC の脱分化の研究であった。そこで、様々なリン酸化酵素の阻害剤が、PGC からの多能性幹細胞の誘導に与える効果を調べた。通常、EG 細胞は、bFGF (basic fibroblast growth factor)、SCF (stem cell factor)、LIF (leukemia inhibitory factor) といった増殖因子で刺激することで、誘導することができる。本研究では、こういった増殖因子の効果をできるだけ排除するために、bFGF や SCF を用いず、LIF と線維芽細胞のみという、ES 細胞の培養条件下において、PGC から多能性幹細胞の誘導を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 幹細胞のがん化および老化における PI3K/Akt シグナルの機能解析

Akt-Mer トランスジェニックマウスに、40HT を塗布すると、休止期の毛包を活性化し、発毛を誘導することができた。また、この処理は、顕著な表皮の肥厚を誘導した。そこで、数ヶ月にわたり 40HT を塗布し、Akt を活性化させ続け、その後、40HT の塗布を中止した。その結果、皮膚の肥厚は改善され、皮膚がんの発症も認められなかった。この結果は、Akt シグナルの活性化は、皮膚の過剰増殖を誘導するが、がん化には不十分であることを示唆している。また、このマウスは、40HT 塗布中止後も、発毛を継続したことから、毛包幹細胞の活性化により老化が促進されなかった。一方、このマウスは、血管腫を発症したことから、Akt シグナルは、血管の動態を制御することが示された。

この研究と平行して、テトラサイクリン応答配列に活性化型 Akt を連結したトランスジーンを用いて、トランスジェニックマウスを作製した。複数のトランスジェニックマウスのラインから線維芽細胞を調整し、テトラサイクリン応答性の転写因子を遺伝子導入した後、テトラサイクリン誘導体である Doxycycline への応答を調べたが、効率よくトランスジーンを発現するマウスを得ることはできなかった。

(2) PI3K/Akt シグナルによる幹細胞制御メカニズムの解析

Oct4-GFP トランスジェニックマウスの線維芽細胞に、Oct-3/4, Sox2, Klf-4 と、Akt-Mer を発現するレトロウイルスベクター

を感染させ、iPS 細胞の誘導効率を調べた。その結果、40HT 処理したときに、iPS 細胞の誘導が有意に上昇した。この結果は、Akt シグナルは、生殖細胞だけでなく、体細胞の核の初期化も促進することを示している。

一方で、Oct-3/4, Sox2, Klf-4 のいずれか一つを除くと、Akt シグナルを活性化しても、iPS 細胞は誘導することができなかった。このように、Akt シグナルは、Oct-3/4, Sox2, Klf-4 と協調してはたらくが、この 3 因子の代替はできないことが示された。

(3) PI3K/Akt シグナルによる幹細胞システムの人為的制御

ES 細胞を、LIF を除いて、OP9 フィーダー細胞上に播種すると、5 日目までに中胚葉コロニーを形成し、その後血液細胞などへ分化する。この分化誘導系において、Akt-Mer を発現する ES 細胞を 40HT 存在下で培養したところ、中胚葉コロニーの形成が阻害された。それに代わり、分化誘導 7 日目くらいから浮遊細胞塊が出現し、この浮遊細胞塊は、40HT と OP9 の存在下で長期間にわたり維持することができた。また、一つの細胞塊から、新たな細胞塊が生じることから、自己複製能をもつことが示された。我々は、この細胞塊を、Akt-sphere と名づけて、以下の解析を行った。

まず、遺伝子発現パターンを解析したところ、Blimp-1, Prdm14 といった PGC への運命付けに必須の転写因子の発現が認められ、その下流の PGC 特異的な遺伝子群 (Stella/PGC7/Dppa3, Dnd1, Nanos3 など) の発現も誘導されていた。一方、生殖巣に到着すると発現誘導される Mvh などの発現は認められないことから、PGC によく似た遺伝子発現を示すことが示された。また、免疫染色を行うと、すべての細胞が、Stella/PGC7/Dppa3 を発現しており、均一な細胞集団であることが分かった。

次に、Akt-sphere の分化能を調べるために、W/W 変異をもつ不妊マウスの精巣に移植を行った、3 ヶ月後、一部の精細管に減数分裂のマーカーが陽性の細胞を認めたが、精子は認められなかった。一方、ほとんどの精巣でテラトーマが形成され、様々な分化組織像が認められた。このことは、Akt-sphere は PGC 様の遺伝子発現パターンを示すが、分化多能性を保持していることを示している。

次に、Akt-sphere を、ES 細胞の培養条件下に移したところ、ほとんどが ES 細胞様のコロニーを形成した。このように、Akt-sphere の分化状態は、ES 細胞と PGC の中間の、"metastable" (準安定) 状態にある。

ES 細胞とエピブラスト幹細胞 (EpiSC : epiblast stem cell) は、それぞれ内部細胞

塊とエピプラストに由来する。ES細胞の分化状態はLIF刺激により安定化され、EpiSCの分化状態はbFGFとActivin刺激により安定化される。しかし、ES細胞は、bFGF/Activin刺激によりEpiSCの分化状態へと変換でき、逆に、EpiSCは、LIF刺激とERK/GSK3阻害剤処理によりES細胞の分化状態へと変換可能である。すなわち、この二つの分化状態は、相互に変換しうる。

細胞分化における”metastability”は、ES細胞の亜集団間でおこる相互転換を説明するために用いられてきた。例えば、ES細胞には、Nanog陽性と陰性の亜集団があり、この亜集団は絶えず相互変換しながら平衡状態をつくっている。現在、”metastability”という用語は、ES細胞・EpiSC間の転換のような、安定化した分化状態の間でおこる相互転換にも用いられている。

この観点からみると、PGCは、適度な刺激によりエピプラストから誘導され、逆に、増殖因子刺激によりEG細胞へと変換できることから、PGCの分化状態は”metastable”である。また、Akt-sphereも、ES細胞と相互転換可能な”metastable”な分化状態にある。このように、Akt-sphereは分化状態の相互転換を研究する上でもユニークな系であると考えられる。

(4) 幹細胞システム制御における他のリン酸化シグナルの機能解析

① ES細胞からPGC様細胞への分化に与える影響

Aktシグナルの活性化では、ES細胞とPGCの中間の分化段階にある細胞が誘導された。これは、AktのもつPGC脱分化作用によると考えられる。そこで、Akt以外のリン酸化シグナルを操作することにした。様々なシグナルを検討したところ、MAPKシグナルの操作により、OP9フィーダー細胞上で、PGC様細胞を誘導することができた。

この細胞も、PGC様の遺伝子発現パターンを示した。しかし、Akt-sphereとは異なり、ES細胞の培養条件下でES細胞に変換することがなく、さらに、移植実験でテラトーマも形成しなかった。このように、MAPKの操作により誘導されたPGC様細胞は、Akt-sphereよりPGCに近いと考えられる。

このシグナルが、生体においてPGCへの運命付けに関与するかどうか、関与するとすればどのような制御がなされているか、今後の解析が待たれる。

② PGCから多能性幹細胞への脱分化に与える影響

bFGFやSCFを用いなくて、LIFと線維芽細胞のみの培養条件下において、PGCから多能性幹細胞の誘導を試みた。様々な薬剤を試みた結果、二つのリン酸化酵素阻害剤により、

PGCからES細胞様コロニーを誘導することができた。このES細胞様細胞は、ヌードマウスに移植するとテラトーマを形成し三胚葉の組織へと分化したことから、分化多能性を有していることが示された。これら薬剤に対する反応性は、PGCの分化段階より異なることも明らかとなった。

今後、これらのリン酸化シグナルの作用機序、PGCの発生や多能性維持における機能、といった展開が期待できる。

## 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 Hayashi H, Kohno T, Yasui K, Murota H, Kimura T, Duncan GS, Nakashima T, Yamamoto K, Katayama I, Ma Y, Chua KJ, Suematsu T, Himokawa I, Akira S, Kubo Y, Mak TW, and Matsuyama T. Characterization of dsRNA-induced pancreatitis model reveals the regulatory role of *IFN regulatory factor 2 (Irf2)* in trypsinogen5 gene transcription. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 108(46):18766-18771, 2011. 査読有
- ② Kimura T, and Nakano T. Induction of pluripotency in primordial germ cells. Histol. Histopathol. 26(5):643-650, 2011. 査読有
- ③ Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, and Nakano T. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. Genes Dev. 24(9): 887-892, 2010. 査読有
- ④ Yamano N, Kimura T, Watanabe-Kushima S, Shinohara T, and Nakano T. Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 392(3): 311-316, 2010. 査読有
- ⑤ Kojima K, Kuramochi-Miyagawa S, Chuma S, Tanaka T, Nakatsuji N, Kimura T, and Nakano T. Associations between PIWI Proteins and TDRD1/MTR-1 are critical for integrated subcellular localization in murine male germ cells. Genes Cells. 14(10): 1155- 1165, 2009. 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 木村 透、リン酸化シグナルによる生殖細胞と多能性幹細胞の相互転換、第12回長崎障害者支援再生医療研究会、2011.8.2、長崎大学

- ② Kimura T, Saitou M, Shinohara T, and Nakano T. Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by manipulation of signaling pathways. The 9<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium 2011. 5. 13-14、東京都 泉ガーデンギャラリー
- ③ 木村 透、李 坤鵬、山野範子、仲野 徹、多能性幹細胞と始原生殖細胞の相互転換機構、第10回日本再生医療学会 シンポジウム「iPS・ES 細胞の万能性と維持機構の解明 ～Pluripotency の正体とは～」、2011. 3. 1-2、京王プラザホテル
- ④ Kimura T, Yamano N, Li K-P, Saitou M, Shinohara T, and Nakano T. Induction of the primordial germ cell-like states from mouse embryonic stem cells by manipulation of signaling pathways. 特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」による国際シンポジウム International symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells” 2010. 11. 22-24、九州大学
- ⑤ Kimura T, Yamano N, Shinohara T, and Nakano T. Metastable primordial germ cell-like state induced from mouse embryonic stem cells by Akt activation. The 8<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium 2010. 5. 13-15、淡路夢舞台国際会議場
- ⑥ Kimura T, Yamano N, and Nakano T. An Akt-signal dependent metastable pluripotency state showing primordial germ cell-like gene expression. Cold Spring Harbor Symposium Stem Cell Biology Meeting 2009. 9. 22-26、Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- ⑦ 木村 透、PI3K/Akt シグナルによる生殖細胞分化と幹細胞システムの制御、国立成育医療センター研究所セミナー、2009. 9. 4、国立成育医療センター研究所
- ⑧ 木村 透、山野範子、仲野 徹、マウス始原生殖細胞とその幹細胞性の制御、第27回日本受精着床学会総会・学術講演会 シンポジウム「生殖医療における stem cell biology とその可能性」、2009. 8. 6-7、国立京都国際会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 透 (KIMURA TOHRU)  
大阪大学・生命機能研究科・准教授  
研究者番号：50280962

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

名田 茂之 (NADA SHIGEYUKI)  
大阪大学・微生物病研究所・准教授  
研究者番号：50291448