

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：34204

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20663

研究課題名（和文）脂肪滴を指標とした真の全能性細胞の同定と長期培養法の確立

研究課題名（英文）Identification of bona fide totipotent cells using lipid droplets as markers and establishment of a long-term culture method

研究代表者

古田 明日香（Furuta, Asuka）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助手

研究者番号：10906647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：ES細胞およびiPS細胞は、多能性幹細胞であり、全ての体細胞および生殖細胞に分化する能力を有しているが、胎盤などの胚体外の細胞には分化できないと考えられてきた。しかし、近年ES細胞には低率ではあるが体細胞や生殖細胞だけではなく胚体外組織にも分化できる全能性細胞（2細胞期様細胞）が含まれることが明らかにされている。また、研究代表者らは、2細胞期細胞には、脂肪滴を有する細胞集団が存在することを明らかにしている。本研究では、脂肪滴を持つ2細胞期様細胞と脂肪滴を持たない2細胞期様細胞では、遺伝子発現が大きく異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、全能性を有するMuERV-L陽性細胞（2細胞期様細胞）には、脂肪滴を有する細胞と脂肪滴を持たない細胞が存在することを明らかにした。また、これらの細胞では、明確に遺伝子発現が異なることを明らかにした。今後、これらの細胞の分化能を検討することにより、脂肪滴の有無と分化能の関係が明らかになることが期待できる。また、最近ヒトにおいても全能性細胞が同定されたことから、本研究の成果は、ヒトの全能性細胞の研究にも展開できる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：ES and iPS cells are pluripotent stem cells that have the ability to differentiate into all somatic and germ cells, but it has been believed that they cannot differentiate into extra-embryonic cells, such as the placenta. However, it has recently been revealed that ES cells contain totipotent cells (2-cell-like cells) that can differentiate not only into somatic cells and germ cells but also into extraembryonic tissues, although at a low rate. In addition, we previously have shown that 2-cell-like cells contain a cell population with lipid droplets. In this study, we found that gene expression differs significantly between 2-cell-like cells with fat droplets and 2-cell-like cells without fat droplets.

研究分野：幹細胞

キーワード：ES細胞 iPS細胞 MuERV-L陽性細胞 Zscan4陽性細胞 全能性細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞は、胚盤胞期の将来胚体を形成する内部細胞塊から樹立された細胞であり、胎盤などの胚体外組織への分化能を失った多能性細胞であると信じられてきた。しかし、近年 ES 細胞には非常に低い割合で内在性のレトロウイルスである MuERV-L (murine endogenous retrovirus with leucine tRNA primer) を発現する亜集団が存在することが報告され、この細胞集団は、初期の着床前胚に移植した場合に、内部細胞塊だけではなく、栄養外胚葉にも寄与することから、全能性を有すると結論されている。しかし、研究代表者は一部の MuERV-L 陽性細胞において、卵子や着床前胚に特有の脂肪滴 (LD: lipid droplet) が形成されることを明らかにしており、MuERV-L 陽性細胞が遺伝子発現だけではなく、細胞内小器官の形成においてもヘテロな細胞集団であるという結果を得ている。

2. 研究の目的

ES 細胞および iPS 細胞は、全ての体細胞および生殖細胞へと分化する能力を有しているが胎盤の細胞に分化することはできない。その「多能性」に対して、発生初期における着床前胚の細胞は、胎盤の細胞を含む全ての細胞へと分化できる「全能性」を有している。しかし、ES 細胞には、低率であるが、全能性を有する亜集団が存在することが明らかにされている。本研究では、研究代表者がこれまでに明らかにしてきた ES 細胞に含まれる亜集団の特徴や特性を手がかりに、ES 細胞に含まれる真の全能性細胞を同定・可視化する方法を確立し、全能性を保持したまま増殖させることが可能な“全能性幹細胞”を樹立することを目的とする。

3. 研究の方法

脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞の誘導には、Triacsin C (Tc) を用いた。また、MuERV-L 陽性細胞に含まれる脂肪滴を形成した亜集団を BODIPY により可視化し、BODIPY 陽性細胞をセルソーターで分取した後、RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

まず、図 1A に示す方法で Tc が脂肪滴の形成に及ぼす影響について検討を行った。その結果、KSR を含む培地に Tc を添加することにより、脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞を誘導できることを明らかにした (図 1B、C)。また、Tc の添加するタイミングを検討したところ、Tc を培養 4 日目に添加することにより培養 5 日目

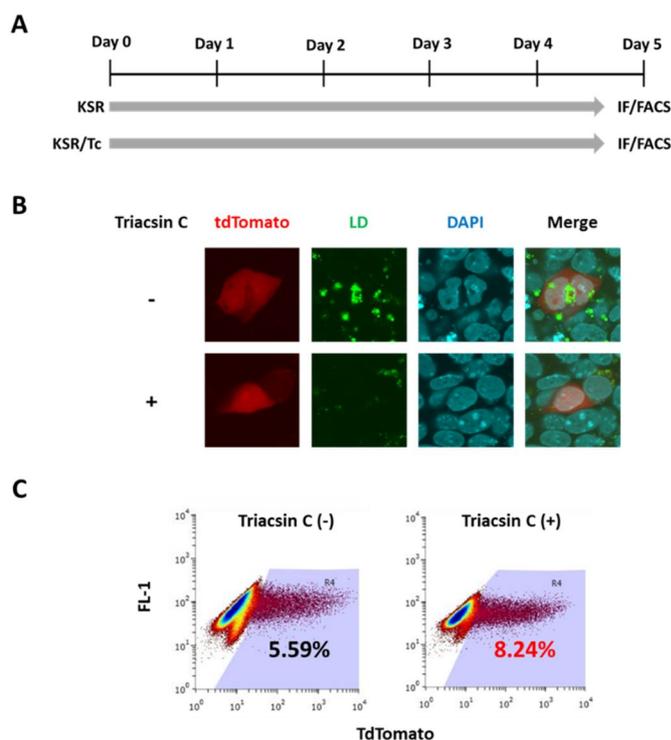


図1. Triacsin Cによる脂肪滴を持たないMuERV-L陽性細胞の誘導

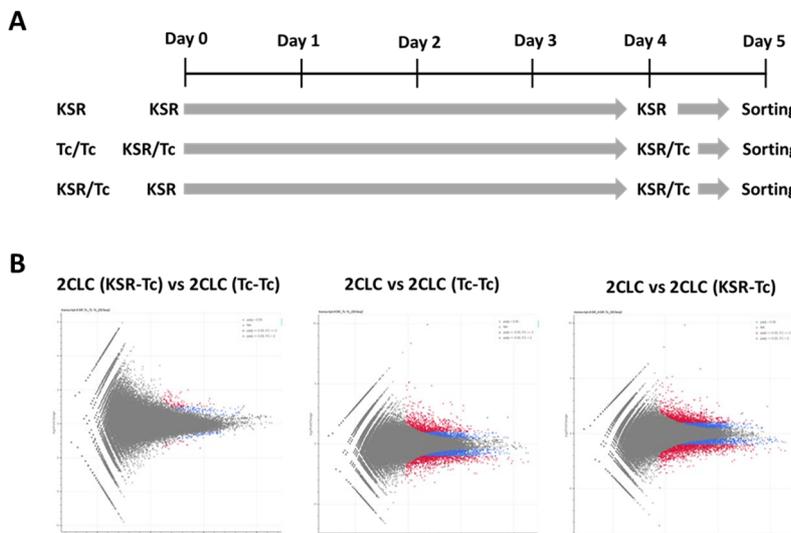


図2. 脂肪滴を持つMuERV-L陽性細胞と脂肪滴を持たないMuERV-L陽性細胞の遺伝子発現解析

には脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞を誘導できることを明らかにした。そこで、RNA-seq を行う際には、Tc を 5 日間添加することにより誘導した脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞と、培養 4 日目までは Tc を添加せず、1 日だけ Tc を添加することにより誘導した MuERV-L 陽性細胞を用いた (図 2A)。その結果、Tc を 5 日間添加することにより誘導した MuERV-L 陽性細胞 (Tc-Tc) と培養 4 日目から 5 日目までの 1 日間 Tc を添加することにより誘導した MuERV-L 陽性細胞 (KSR-Tc) の遺伝子発現は非常に似ていることが明らかとなった (図 2B、左図)。次に、脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞 (2CLC) と Tc を 5 日間添加することにより誘導した MuERV-L 陽性細胞 (Tc-Tc) の遺伝子発現を比較したところ、両者の間に大きな差があることが明らかとなった。(図 2B 中央)。同様に、脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞 (2CLC) と培養 4 日目から 5 日目までの 1 日間 Tc を添加することにより誘導した MuERV-L 陽性細胞 (KSR-Tc) の遺伝子発現を比較したところ、両者の間に大きな差があることが明らかとなった (図 2B 右図)。

次に、脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞 (2CLC) と培養 4 日目から 5 日目までの 1 日間 Tc を添加することにより誘導した MuERV-L 陽性細胞 (KSR-Tc) の間で発現が異なる遺伝子 (Differentially Expressed Gene) を用いて GO 解析を行ったところ、脂肪滴が存在しない MuERV-L 陽性細胞において、リボヌクレオタンパク質の生合成、複合体形成、サブユニットの形成等に関わる遺伝子の発現が上昇し、ヌクレオソームの集合、DNA のパッケージ、タンパク質-DNA 複合体の集合等に関わる遺伝子の発現が低下することが明らかとなった (図 3)。

Up in 2CLC (KSR-Tc)		Down in 2CLC (KSR-Tc)	
ID	Description	ID	Description
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	GO:0006334	nucleosome assembly
GO:0006397	mRNA processing	GO:0034723	DNA replication-dependent nucleosome organization
GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	GO:0006323	DNA packaging
GO:0071826	ribonucleoprotein complex subunit organization	GO:0065004	protein-DNA complex assembly
GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	GO:0051290	protein heterotetramerization
GO:0006417	regulation of translation	GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization
GO:0034248	regulation of cellular amide metabolic process	GO:0007276	gamete generation
GO:0031647	regulation of protein stability	GO:0045653	negative regulation of megakaryocyte differentiation
GO:0016126	sterol biosynthetic process	GO:0030198	extracellular matrix organization
GO:0006403	RNA localization	GO:0022412	cellular process involved in reproduction in multicellular organism
GO:0016569	covalent chromatin modification	GO:0031936	negative regulation of chromatin silencing
GO:0016570	histone modification	GO:0032868	response to insulin
GO:0007004	telomere maintenance via telomerase	GO:0018105	peptidyl-serine phosphorylation
GO:0044403	symbiotic process	GO:0030155	regulation of cell adhesion
GO:0007005	mitochondrion organization	GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
GO:1990823	response to leukemia inhibitory factor	GO:0050673	epithelial cell proliferation
GO:1990830	cellular response to leukemia inhibitory factor	GO:0048514	blood vessel morphogenesis
GO:0006281	DNA repair	GO:0032869	cellular response to insulin stimulus
GO:0050657	nucleic acid transport	GO:0036003	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
GO:0050658	RNA transport	GO:0051272	positive regulation of cellular component movement
GO:0033044	regulation of chromosome organization	GO:0034764	positive regulation of transmembrane transport
GO:0032200	telomere organization	GO:0002335	mature B cell differentiation
GO:0016032	viral process	GO:0040017	positive regulation of locomotion
GO:0072594	establishment of protein localization to organelle	GO:0002227	innate immune response in mucosa
GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	GO:0051347	positive regulation of transferase activity

図3. 脂肪滴を持つ MuERV-L 陽性細胞と脂肪滴を持たない MuERV-L 陽性細胞の GO 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村 穂乃香、古田 明日香、中村 肇伸
2. 発表標題 AktシグナルがES細胞から2細胞期様細胞への変換に及ぼす影響
3. 学会等名 第68回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022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
---------	---------