

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23246142

研究課題名(和文)ES細胞における未分化状態の動的制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of dynamic control mechanism of undifferentiated state in ES cells

研究代表者

松岡 英明(Matsuoka, Hideaki)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10143653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,400,000円

研究成果の概要(和文)：胚性幹細胞(ES細胞)における未分化維持機構の解明は、再生医療や細胞医療に関する最重要課題の一つである。本研究は、マウスES細胞のOct3/4, Sox2, Cdx2, Nanogの4遺伝子に着目し、その発現動態のリアルタイム単一生細胞解析を目的として実施した。各遺伝子の発現制御ベクター、遺伝子産物タンパク質、発現可視化細胞等を開発した。ベクターやタンパク質をフェムトインジェクション法で単一ES細胞に導入後、タイムラプス・イメージング等によって、例えばNanogとCdx2の発現の関係、Oct3/4タンパク質量とOct3/4遺伝子の発現の関係、等の結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the mechanism of undifferentiated state maintenance is one of the most important research subjects for regenerative therapy and cell medicine. This study was aimed at the real time analysis of dynamic expression of 4 genes; Oct3/4, Sox2, Cdx2, and Nanog, in living single-cells of mouse ES cell. The gene expression regulating vectors, gene product proteins, and gene expression visualized cell lines were developed for the study. Vectors and proteins were introduced into single ES cells of novel cell lines by femtoinjection and their gene expressions were analyzed by time-lapse imaging. Typical experimental results were the relationship between Nanog and Cdx2 expressions and the relationship between Oct3/4 protein quantity and Oct3/4 gene expression.

研究分野：生物機能工学

キーワード：生物機能・バイオプロセス ゲノム工学 胚性幹細胞 未分化状態 遺伝子発現動的制御 フェムトインジェクション

1. 研究開始当初の背景

(1) 胚性幹細胞 (ES 細胞) を利用する再生医療、細胞医薬などに対する社会の期待が高まっている。それに比例して研究報告も急速に増えているが、依然として未解決の難問の一つが「未分化状態とは何か」である。この問題は iPS 細胞が開発されても何ら解決するわけではない。むしろ、iPS 細胞よりも基本的な細胞である ES 細胞で、詳細に調べることが一層重要になっている。

(2) ES 細胞内では、未分化維持に関係している遺伝子群が、相互に制御関係にあるネットワークを形成していると理解されている。厄介なことに、その制御は、単にオン-オフの関係ではなく、定量的な制御になっている点である。各遺伝子の発現強度は、絶えず変動していて、相互作用しながら、全体としてはある幅の中で定常状態を保っている、と想像される。

(3) 本研究は、このような“動的な定常状態”をリアルタイムで捉えようとする意欲的な試みである。具体的には、既に報告されている多数の未分化維持関連遺伝子の中から、特に主要な 4 遺伝子 *Oct3/4*, *Sox2*, *Cdx2*, *Nanog* に的を絞った。これらの遺伝子に関わる制御ネットワークの概要を図 1 に示す。

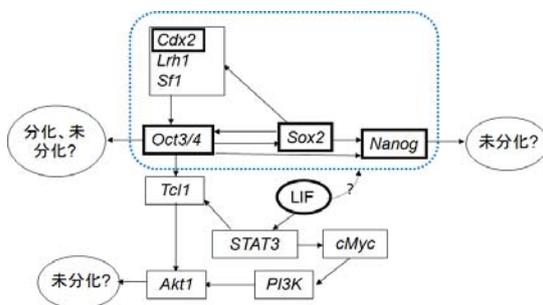


図 1. ES 細胞の未分化維持関連因子間にあると推定されている制御ネットワーク

2. 研究の目的

(1) 本研究は、マウス ES 細胞における 4 遺伝子間の関係について網羅的に解析するためのプラットフォームを構築することを究極の目的として、企画され、そのためのベクターや細胞を種々開発してきた。それらを組み合わせて取組んだ動的解析の実例の中から、特に以下に示す 4 命題に対する取り組みを中心に述べる。①前提：ES 細胞を未分化に維持するための、実用的方法は、培地に白血病阻害因子 (LIF) と呼ばれるサイトカインを加えておくことで、既に良く知られているが、今問題にしているのは、そういう外的因子によって、何故、ES 細胞内が未分化状態を維持して

いられるのか、という点である。

②命題 1：未分化状態で高発現する *Nanog* を、人工的に細胞内で強制発現させたら LIF 無しでも未分化状態を維持させることができるか？

③命題 2：*Cdx2* を強制発現させたら、*Oct3/4*, *Sox2*, *Nanog* の発現強度はどのように変動するか？

④命題 3：*Oct3/4* の発現抑制因子を細胞内に導入すると、正のフィードバックによって、やがて *Oct3/4* の発現が低下するはずであるが、そのような動的応答が検出できるか？

⑤命題 4：*Oct3/4* は、その生産物である *Oct3/4* タンパク質自身が自らの転写因子の一つである。実際に *Oct3/4* タンパク質を細胞内に導入したら、*Oct3/4* 遺伝子の増強が起こるか？

(2) 細胞内の諸反応は、一般的には、多数の細胞で同調しているわけではないので、細胞集団の平均値を調べる通常の実験法では捉えられない。そこで、申請者が従来から開発研究を行ってきたフェムトインジェクションを利用した単一細胞実験法によって実施する。研究の発想のみならず、その方法論についても独創的な所以である。

3. 研究の方法

(1) 4 遺伝子間の関係について網羅的に解析するためのプラットフォーム構築

①EGFP と DsRed の生合成：ES 細胞内における蛍光レポータータンパクとしての定量性と安定性を検証するために、大腸菌を用いて各タンパク質を生合成した。

②遺伝子発現可視化細胞株の樹立：各遺伝子の発現に伴って蛍光を発する細胞株を開発した。各遺伝子のプロモーターをマウス ES 細胞からクローニングし、これに蛍光タンパク (EGFP, DsRed, あるいは Venus) の遺伝子を結合したベクターを作製し、これを ES 細胞に導入した。

③ルシフェラーゼ発現ベクター及び細胞株：遺伝子発現強度の早い変化に応答するレポーター遺伝子として、計画にはなかったが、新たにルシフェラーゼを導入した。

④強制発現ベクターの作製：CAG または CMV のプロモーターに、各遺伝子の構造遺伝子、IRES、蛍光タンパク遺伝子、を結合して構築した。

⑤各遺伝子タンパク質の生合成：蛍光タンパクと同様、大腸菌を用いて、転写因子のタンパク質を生合成した。

⑥shRNA 発現ベクターの開発：各遺伝子に有効な siRNA を開発し、それに基づく shRNA 発現ベクターを作製した。

(2) 単一細胞遺伝子発現解析
ES 細胞に半定量的に遺伝子を直接導入し

リアルタイム解析する方法は、申請者らのフェムトインジェクション法において他に無い。また、タイムラプスによるイメージング解析法に関しても、専ら申請者らによって開発されたシステムを利用した。

4. 研究成果

(1)プラットフォーム構築のためのベクター、タンパク質、及び細胞株の開発結果

①EGFP および DsRed を合成できた。これを ES 細胞内に導入し 72h 連続測定した。その結果、EGFP、DsRed の蛍光強度は、ES 細胞内で各々半減期 2~4 h、1~3 h で減衰することが分かった。したがって、外来タンパク質は半減期 1~4 時間で減衰する人が多いと推論した。

②4種の標的遺伝子のプロモーター活性を可視化した細胞株、及び4種の標的遺伝子の発現に伴って標的タンパクと可視化タンパクが同時に生成する細胞株を樹立することができた。前者に関しては Cre-loxP 相同組み換えにより作製したところ *Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog* については作製できたが、*Cdx2* については良好な結果が得られなかった。原因は不明であったが、再度ベクターを作り直すと同時に、レポーター遺伝子も新たにルシフェラーゼに変えることにした(下記③)。また、*Nanog* に関しては、新たに Venus をレポーターとする可視化ベクターを作製した。すなわち、骨格ベクターとして pCS2-Venus を用い、これに元々入っている CMV プロモーターを各転写因子のプロモーターと *Sall*-*BamHI* サイトで入れ替え、これを導入して細胞株を樹立することができた。

③ *Cdx2* プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合したベクター proCdx2-Luc を新たに作製し、ES 細胞に導入して *Cdx2* 発現可視化細胞を樹立した。その結果、分化誘導培地中で、*Cdx2* の発現に伴うと思われる発光が計測された。

④各遺伝子の強制発現ベクターが設計通り作製できた。

⑤ *Oct3/4*、*Sox2* の遺伝子産物であるタンパクを合成した。元々 *Oct3/4* を発現していない細胞株 MIN6 に *Oct3/4* プロモーター活性可視化ベクター (pP-*Oct3/4*-EGFP) と共に *Oct3/4* タンパクを同時導入したところ発光が観察され、機能が確認された(図2)。しかし、*Sox2* タンパク質については機能を確認するには至らなかった。

⑥ *Oct3/4* に対してのみ、有効な配列が得られた。すなわち、4種類の候補配列から、コントロールに対して 50%以下にノックダウンできる最適配列を選び、これを EGFP と共に組み込んだベクターを作製した。



図2. 生合成した Oct3/4 タンパク質が機能することを確認した実験結果

(2) 単一細胞遺伝子発現の動的解析

①命題1: *Nanog* 強制発現ベクター pCAG-*Nanog*-IRES-EGFP を ES 細胞にフェムトインジェクションで導入し、導入量と蛍光強度の間に相関が得られた。さらに 500 ng/µl で導入したところ、LIF 無しで 72 時間後まで未分化状態を維持させることができた。

②命題2: *Cdx2*-EGFP 強制発現ベクターを *Nanog*-Venus 細胞へ導入した。51 個中、EGFP を発現した細胞は 1 個のみであったが、その細胞では Venus 蛍光強度は弱く 72 時間でコロニー形状も不定形の分化した状態になった。

③命題3: *Oct3/4* 発現可視化 (Venus) 細胞に sh*Oct3/4*-EGFP 強制発現ベクターを導入したところ、24 h までは Venus 蛍光強度が増大し続けたが、その後、72 h までに蛍光が減少した(図3)。

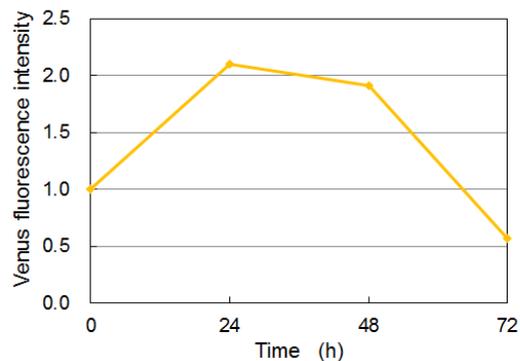


図3. sh*Oct3/4* 強制発現ベクターを導入した細胞における *Oct3/4* の発現強度変化

④命題4: 図2で機能確認した *Oct3/4* タン

パク質を *Oct3/4* 発現可視化 (Venus) 細胞に導入したところ、Venus 蛍光強度は 3 h にわたって減少し続けた (図 4)。低濃度の *Oct3/4* タンパクであれば、Venus 蛍光は増強すると予想されたが、高濃度だったので、逆にフィードバック阻害により *Oct3/4* の発現が抑制されたのではないかと推察した。

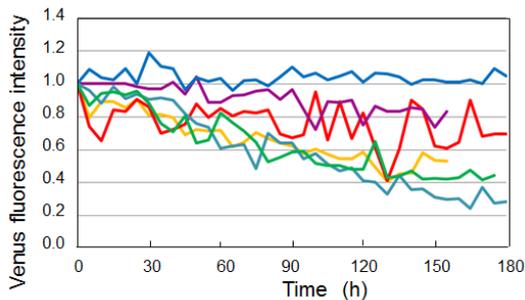


図 4. *Oct3/4* タンパクを導入した細胞における *Oct3/4* 発現強度変化

(3) 細胞内及び細胞間の分子移動解析

単一細胞レベルでの定量的解析では、細胞ごとのバラツキや、細胞内での分子の空間的局在を考慮して、解析精度を上げる必要があると考察された。そこで、蛍光色素を用いて、細胞内移動解析(細胞質から核へ)、及び細胞間の非対称的移動解析を行った。

①細胞内移動解析：EGFP と類似の蛍光タンパク AcGFP を用いて、これとグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の融合タンパク質 GST-AcGFP、及びこれに核移行シグナルペプチド (Nuc) を結語したタンパク質 GST-AcGFP-Nuc を、それぞれ ES 細胞にインジェクションで導入した。その結果、Nuc が付いている場合の方が、核移行が促進されることが示され、細胞内での分子移動を制御できることがわかった。

②細胞間移動解析：ES 細胞をディッシュに播種し、2~5 個程度の細胞塊を形成するまで培養した。その後、顕微鏡にて、ディッシュの底面に対して水平方向と垂直方向の両方に分裂している細胞塊を選択し、そのうちの 1 つにフェムトインジェクションで蛍光色素を導入した。その結果、統計的に有意な差を得るには至らなかったが、平面で接している細胞間の方が、垂直に接している細胞間よりも、色素の透過量が多いように見受けられた。

(4) 結論

当初開発を予定していたベクター、タンパク質、細胞を全て完成させることはできなかったが、典型的な事例について動的解析するためのツールは作製できたので、命題 1~4 について実行することができた。ただ、何れも試行数が少なく、統計的な議論は不

十分なままに終わった。それでも、例えば *Nanog* と *Cdx2* の発現の関係、*Oct3/4* タンパク量と *Oct3/4* 遺伝子発現強度の関係、などに関する有用な知見が得られた。プラットフォーム構築の観点からは大きな成果が得られたと判断している。さらに今後は、網羅的な解析を進める前に、細胞内での空間的局在や、個々の細胞間での分子移動の非対称性についても十分考慮し、解析精度を上げることが重要である、との結論を得た。

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 11 件)

- ① M. Saito, T. Kaeriyama, M. Koyama, H. Matsuoka: Injectoassay for functional activity of *Nanog* to maintain the undifferentiated state of embryonic stem cell. *Sensors and Materials* (accepted on March 5, 2015) 査読有
- ② M. Saito, A. Kaneda, H. Shigeto, N. Hanata, K. Otokuni, H. Matsuoka: Development of an optimized 5-stage protocol for the in vitro preparation of insulin-secreting cells from mouse ES cells. *Cytotechnology*, (2015) doi: 10.1007/s10616-015-9853-1. 査読有
- ③ H. Ogawa, S. Nasu, M. Takeshige, M. Saito, H. Matsuoka: Rapid and retrievable recording of big data of time-lapse 3D shadow images of microbial colonies. *Sci. Rep.* **5** (in press 2015) doi:10.1038/srep10061 査読有
- ④ T. Takami, Y. Ojio, Y. Ogawa, S. Ogawa, Y. Takakuwa, M. Saito, H. Matsuoka, S. Tate: Coating the outer surface of glass nanopipette with chlorobenzene-terminated polysiloxane. *eJSSNT* (e-Journal of Surface Science and Nanotechnology) **13**, 79-84 (2015). 査読有
- ⑤ H. Funabashi, S. Oura, M. Saito, H. Matsuoka: Targeted delivery of a decoy oligodeoxynucleotide to a single ES cell by femtoinjection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **9**, 855-863 (2013). doi: 10.1016/j.nano.2013.03.003 査読有
- ⑥ M. Saito, A. Hayakawa, N. Inagaki, H. Matsuoka: Development of novel cell lines of diabetic dysfunction model fit for cell-based screening tests of medicinal materials. *Cytotechnology* **65**(1), 105-118 (2013). doi: org/10.1007/s10616-012-9466-x 査読有
- ⑦ 舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明: 単一

ES細胞の分子制御. *未来材料*, 13(2), 14-20 (2013). 査読無

- ⑧ H. Funabashi, Y. Sugimoto, M. Saito, H. Matsuoka: A femtoinjection technique for dynamic analysis of protein function in living ES cells. *Biotech. Lett.* **34**, 1257-1262 (2012). doi: 10.1007/s10529-012-0922-7 査読有
- ⑨ H. Funabashi, S. Ogino, M. Saito, H. Matsuoka: Utilization of fluorescent glucose analog as a metabolic indicator during differentiation. *Electrochemistry* **80** (5), 299-301 (2012). 査読有
- ⑩ 斉藤美佳子: iPS 細胞研究の実用化に向けた取り組み. *生物工学会誌*, 90(6), 349-349 (2012) 査読無
- ⑪ H. Matsuoka, M. Saito, H. Funabashi: Functional control of target single cells in ES cell clusters and their differentiated cells by femtoinjection. in "Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering" (M.S. Kallos, Ed.), InTech (2011) 490(pp149-170). doi: 10.5772/23766 査読有

[学会発表] (計 22 件)

- ① 小川佳英, 落合恵理, 松岡英明, 斉藤美佳子: 未分化維持関連遺伝子の動的発現解析のためのレポーター ES 細胞の樹立. 電気化学会第 82 回大会、横浜国立大学、2015.3.17.
- ② 小山真人, 落合恵理, 斉藤美佳子, 松岡英明: フェムトインジェクションによる単一 ES 細胞の細胞分裂の可逆的制御. 電気化学会第 82 回大会、横浜国立大学、2015.3.17.
- ③ 高見知秀, 上脇隼一, 落合 博, 小山真人, 小川佳英, 斉藤美佳子, 松岡英明, 楯 真一: HeLa 細胞への GFP および GFP 付加ヌクレオソームシャペロンのフェムトインジェクションと細胞内動態. 第 8 回分子科学討論会、広島大学東広島キャンパス 2014.9.21-24,
- ④ T. Takami, S. Uewaki, H. Ochiai, M. Koyama, Y. Ogawa, M. Saito, H. Matsuoka, S. Tate: Live dynamics on femtoinjection of GFP-tagged nucleosome chaperones into HeLa cell. 日本応用物理学会-アメリカ光学学会合同シンポジウム、北海道大学、2014.9.17-20.
- ⑤ H. Matsuoka: Made-to-order SMVM prepared in situ applicable to broad spectrum of strains. 128th AOAC International Annual Meeting & Exposition, Boca Raton, USA, 2014.9.10. (招待)
- ⑥ M. Saito, Y. Asai, K. Imai, S. Hiratoko, E. Ochiai, H. Matsuoka: Novel functions of Cx26 and Cx30.3 in mouse ES cells. ISSCR 12th Annual Meeting, Vancouver

Convention Centre, Vancouver, Canada, 2014.6.18-21.

- ⑦ 松岡英明: 高品質の細胞を確保するための戦略. 生命動態システム科学推進拠点事業「核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点」(広島大学東広島キャンパス) 2014.5.9. (招待)
- ⑧ 松岡英明: 細胞電気化学の新機軸. 2013 電気化学秋季大会、東京工業大学大岡山キャンパス、2013.9.27. (招待)
- ⑨ T. Tanaka, H. Funabashi, M. Saito, H. Matsuoka: Production of a differentiation regulating protein to be femtoinjected into ES single-cells, PRiME 2012, Hawaii Convention Center, Honolulu, USA, 2012.10.9.
- ⑩ H. Koike, H. Funabashi, M. Saito, H. Matsuoka: Feasibility study of dual-FRET molecular beacon for the dynamic analysis of Oct3/4 mRNA in ES cells. PRiME 2012, Hawaii Convention Center, Honolulu, USA, 2012.10.9.
- ⑪ S. Oura, H. Funabashi, M. Saito, H. Matsuoka: Suppression of an Oct3/4 transcription activity in ES cells by decoy DNA femtoinjection. PRiME 2012, Hawaii Convention Center, Honolulu, USA, 2012.10.9.
- ⑫ S. Hisatomi, H. Funabashi, M. Saito, H. Matsuoka: Dynamic properties of Fluorescent reporter proteins femtoinjected into ES single-cells. PRiME 2012, Hawaii Convention Center, Honolulu, USA, 2012.10.9.
- ⑬ 斉藤美佳子: フェムトインジェクションによる単一細胞解析. 若手活性化講演会、創価大学、八王子、2012.6.22 (招待)
- ⑭ 大浦誠太郎, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明: decoy DNA インジェクション法による ES 細胞内の Oct3/4 遺伝子の転写活性抑制. 電気化学会第 79 回大会、アクトシティ浜松、浜松、2012.3.29.
- ⑮ 小池秀樹, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明: Oct3/4 発現系の ES 細胞内環境を考慮した動的挙動解析. 電気化学会第 79 回大会、アクトシティ浜松、浜松、2012.3.29.
- ⑯ 田中利明, 杉元侑樹, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明: 単一 ES 細胞内への分化制御関連タンパク質の導入. 日本化学会第 92 春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2012.3.28.
- ⑰ 久富祥太, 舟橋久景, 斉藤美佳子, 松岡英明: 蛍光レポータータンパク質の単一 ES 細胞内における動的特性評価. 日本化学会第 92 春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス、2012.3.28.
- ⑱ H. Funabashi: Femtoinjection technique for the analysis and regulation of

target-single-living ES cells. 5th IEEE International Conference on Nano/Molecular Medicine and Engineering. International Convention Center, International Convention Center, Jeju, Korea, 2011.11.10. (招待)

⑱ H. Matsuoka: Correlation analysis of multiple genes in embryonic stem cells in vivo. The 3rd Asian Biomaterials Congress, BEXCO, Busan, Korea, 2011.9.16. (招待)

⑳ 大浦誠太郎、舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明: Decoy DNA 法による単一生 ES 細胞の特異的転写調節. 2011 電気化学秋季大会、朱鷺メッセ、新潟、2011.9.11.

㉑ 小池秀樹、舟橋久景、斉藤美佳子、松岡英明: FRET 型 Molecular beacon の単一生 ES 細胞内の標的 mRNA 挙動解析への応用. 2011 電気化学秋季大会、朱鷺メッセ、新潟、2011.9.11.

㉒ M. Saito: Intercellular network analysis in multilayer muscle fiber formation using femtoinjection. 219th The Electrochemical Society Meeting, Montreal Convention Center, Montreal, Canada, 2011.5.3. (招待)

[図書] (計 4 件)

① 松岡英明: 18.4.6 節 細胞センサ.“電気化学便覧 第 6 版”(電気化学会編)、丸善 (2013) 852(pp704-705).

② 松岡英明、西澤松彦(章編集): 11 章 生命科学と電気化学 “電気化学便覧 第 6 版”(電気化学会編)、丸善 (2013) 852 (pp397-423).

③ 松岡英明、三浦則雄(章編集): 18 章 センサ “電気化学便覧 第 6 版”(電気化学会編)、丸善 (2013) 852(pp675-712).

④ 斉藤美佳子: 11.3 節 生体膜の電気化学. “電気化学便覧 第 6 版”(電気化学会編)、丸善 (2013) 852(pp405-416).

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 4 件)

① 名称: 微小物質移送方法
発明者: 山田洋平、松橋一男、斉藤美佳子、松岡英明

権利者: 東京農工大学、中央精機

種類: 特許

番号: 特許第 4828933 号

出願年月日: 2005.12.22

取得年月日: 2011.9.22

国内外の別: 国内

② 名称: Cell incubator for single cell operation supporting robot

発明者: 山田洋平、斉藤美佳子、松岡英明

権利者: 東京農工大学、中央精機

種類: 特許

番号: EP1818390

出願年月日: 2005.8.2

取得年月日: 2011.9.14

国内外の別: 外国

③ 名称: 単一細胞操作支援ロボット

発明者: 松岡英明、斉藤美佳子

権利者: 東京農工大学

種類: 特許

番号: 特許第 4802319 号

出願年月日: 2002.8.8

取得年月日: 2011.8.19

国内外の別: 国内

④ 名称: 単一細胞操作支援ロボット用細胞培養器具

発明者: 山田洋平、斉藤美佳子、松岡英明

権利者: 東京農工大学、中央精機

種類: 特許

番号: 特許第 4801839 号

出願年月日: 2004.10.12

取得年月日: 2011.8.12

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.tuat.ac.jp/~msaito/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡英明 (MATSUOKA, Hideaki)

東京農工大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 1 0 1 4 3 6 5 3

(2) 研究分担者

斉藤美佳子 (SAITO, Mikako)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 2 0 2 9 1 3 4 6

(2011 年度のみ)

舟橋久景 (FUNABASHI, Hisakage)

東京農工大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 6 0 5 5 2 4 2 9

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし