

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650430

研究課題名(和文) 幹細胞の未分化性を物理的刺激により維持する試み

研究課題名(英文) Effect of mechanical stress on stemness of embryonic stem cells

研究代表者

秋本 崇之 (Akimoto, Takayuki)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00323460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：物理的刺激が様々な細胞の増殖や分化に影響を与える事が知られているが、幹細胞に対する影響についてはほとんど分かっていない、そこで本研究では、物理的刺激が胚性幹細胞の未分化性に影響を与えるか検討した。

フィーダー細胞フリーで維持培養可能なマウスES細胞を底面がシリコンの培養プレートに培養し、LIF(Leukemia Inhibitory Factor)非存在下で10%、0.16Hzの引張り応力を負荷しながらの培養条件が幹細胞の未分化マーカーであるNanogの発現を維持させた。一方、物理的刺激によってPI3K-Aktシグナルの活性化が見られ、これがNanog発現と関連すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mechanical strain has been reported to affect the proliferation/differentiation of many cell types. however, the effects of mechanotransduction on embryonic stem (ES) cells remains unknown. To investigate the effects of mechanical strain on ES cell fate, we examined the expression of Nanog as well as Nanog-associated intracellular signaling during uniaxial cyclic stretch. The mouse ES cell was plated onto elastic membranes, and we applied 10% strain at 0.16 Hz. The expression of Nanog was reduced during ES cell differentiation in response to the withdrawal of leukemia inhibitory factor (LIF); however, two days of mechanical strain attenuated this reduction of Nanog expression. On the other hand, the mechanical strain promoted PI3K-Akt signaling, which is reported as an upstream of Nanog transcription. These findings imply that mechanical force plays a role in regulating Nanog expression in ES cells through the actin cytoskeleton-PI3K-Akt signaling.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：胚性幹細胞 iPS細胞 ES細胞 メカノトランスダクション 未分化性 物理刺激 力学刺激 メカニカルストレス

### 1. 研究開始当初の背景

発生途中の受精卵の内部細胞塊から樹立された ES 細胞 (embryonic stem cell) と、体細胞に転写因子を導入して誘導された iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) は、どちらも自己複製能と全能性をあわせ持ち、再生医療における細胞ソースとして期待されている。将来的に iPS 細胞等幹細胞を臨床応用するためには、これら幹細胞を安全かつ簡便、安価に未分化性を維持した状態で効率良く増殖させることが必要である。

通常ヒト ES 細胞・iPS 細胞の培養はマウス胚性線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) をフィーダー細胞として使用し、ウシ血清を含む培地で培養する。これら異種由来成分を含む培養系では、病原体による感染や免疫源性的な問題が指摘されている。このようにヒト ES 細胞・iPS 細胞の培養には安全面、技術面、コスト面から、再生医療の細胞ソースとしての実用化には少なからず問題がある。

これらの問題を解決するため、生体内において幹細胞の未分化性維持や分化・増殖制御が行われている幹細胞ニッチを、人工フィーダーやバイオマテリアル等を用いて人工的に再現した培養系をつくる試みが行われている。一方で幹細胞ニッチにおいては、幹細胞と分化した近傍の細胞による相互作用も幹細胞の未分化性維持における重要な要素であると考えられている。また、これまでに細胞への物理的刺激が様々な細胞において、細胞の分化や増殖に影響を与える事が報告されている。しかしながら、物理的刺激が ES 細胞等の幹細胞にあたえる影響についてはほとんど分かっていない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では物理的刺激が、幹細胞の未分化性にあたえる影響を検討し、物理刺激を用いて ES 細胞の未分化性を維持する培養法の開発を試みた。

本研究によって、MEF、成長因子等の外来成分を排除しても単相培養で幹細胞の未分化性を維持できれば、幹細胞の大量培養も容易になり、かつ現状に比べ安全性も確保できると考えられるため、iPS 細胞等幹細胞を用いた再生医療の実用化までの課題の一部を解決できる可能性があると考えられる。

### 3. 研究の方法

まず、MEF (mouse embryonic fibroblast) などのフィーダー細胞フリーで維持培養可能なマウス ES 細胞 (CCE) を用いて、未分化性を維持するための物理的刺激の最適化を行った。

具体的にはマウス ES 細胞を底面がシリコンの培養プレート (Flexcell plate) に培養し、マウス ES 細胞を未分化に増殖させるために

必須な LIF (Leukemia Inhibitory Factor) の存在下/非存在下で 10%, 0.1Hz の引張り応力を負荷し、3 日間培養後に細胞を回収した。未分化マーカーとして、Nanog, Oct-4, Sox-2, CD34 遺伝子を RT-PCR で評価した。この条件を基準として、引張りの程度を 0%, 5%, 20%, 引張り周期を 0.01Hz, 0.5Hz, 1Hz で同様の評価を行い、未分化性を維持するための物理的刺激の最適化を行った。

さらに、引張り応力による未分化性維持に関わる細胞内シグナル経路を特定するための解析を行った。

具体的には、まず最適化された物理的刺激条件下でマウス ES 細胞を培養し、ウェスタ

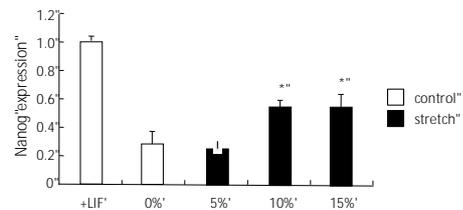


図1. 引張り刺激によるNanog mRNA発現  
マウスES細胞に様々なひずみ条件で引張り刺激を負荷した。LIF非存在下ではNanog mRNAの発現は低下するが、10%以上の引張り刺激負荷によってNanogの発現が維持された。

ンプロットングにより、TGF-シグナルに関するリン酸化 Smad2/3, Activin, PI3K シグナルに関する PI3K, Akt, リン酸化 Akt などの変化を定量した。また TGF- や PI3K のインヒビター等を用いてシグナルを修飾し、その表現型を解析した。

### 4. 研究成果

マウス ES 細胞を未分化に増殖させるために必須な LIF 非存在下において、幹細胞の未分化性のマーカーである Nanog, Oct-4, Sox-2 を指標として用いて、未分化性を維持するための物理的刺激の最適化を行った (図1)。

その結果、ひずみ 10%, 刺激頻度 0.16 Hz の条件で、最も Nanog mRNA の発現が維持されることが分かった (図2)。Oct-4, Sox-2 についてはほとんどの条件で、変動を認めなかった。

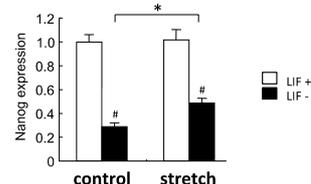


図2. 引張り刺激によるNanog mRNA発現の維持  
マウスES細胞に10%、0.16Hzの条件で引張り刺激を負荷した。LIF非存在下ではNanog mRNAの発現は低下するが、引張り刺激負荷によってNanogの発現が維持された。

引張り刺激 10% , 0.16 Hz の条件で , Nanog タンパク発現を定量したところ , Nanog mRNA 同様に , 物理的刺激により Nanog タンパクの発現も維持されていた ( 図 3 ) .

つぎに , 引張り応力による未分化性維持に関わる細胞内シグナル経路を特定するため , ウェスタンブロッティングにより , TGF- $\beta$  シグナルと PI3K シグナルを定量した . その結果 , PI3K-Akt シグナルが物理的刺激にตอบสนองして活性化されている事が分かった . またアクチン重合阻害剤や PI3K インヒビターにより , 物理的刺激誘導性の PI3K-Akt シグナルが阻害された ( 図 4 ) .

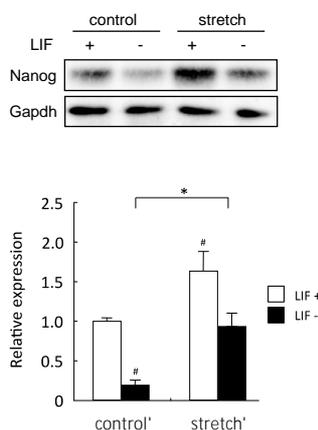


図3. 引張り刺激によるNanogタンパク発現の維持  
マウスES細胞に10% , 0.16Hzの条件で引張り刺激を負荷した . LIF非存在下ではNanogタンパクの発現は低下するが , 引張り刺激負荷によってNanogの発現が維持された .

Horiuchi et al., ExpCellRes, 2012

以上のことから , 引張り刺激は , マウス ES 細胞の Nanog の発現を亢進させる事が分かった . しかしながら , 引張り刺激は Nanog 以外の幹細胞未分化マーカーの発現には影響を与えなかった . このことは , LIF 非存在下において引張り刺激のみではマウス ES 細胞の未分化性を維持する事は困難である事を示唆していると考えられた .

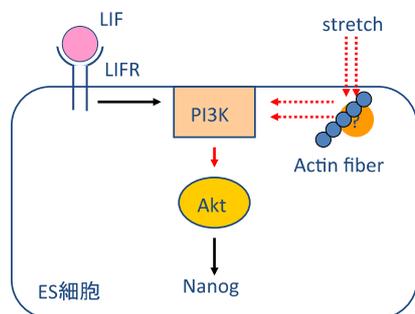


図4. 引張り刺激によるNanog 発現の維持  
物理的刺激はアクチンを介してPI3K-Aktを活性化させ , Nanogの発現維持に関わっていると考えられた

## 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 2 件 )

1. J. H. Park, T. Ushida, T. Akimoto. Control of cell differentiation by mechanical stress. J Sports Med Phys Fit, 2(1), 49-62, 2013 ( 査読なし )
2. R. Horiuchi, T. Akimoto, Z. Hong, T. Ushida. Mechanical stretch maintains Nanog expression through PI3K/Akt signals in mouse embryonic stem cells. Exp Cell Res, 318(14), 1726-1732, 2012 ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

1. R. Horiuchi, T. Akimoto, Z. Hong, T. Ushida. Mechanical stretch maintains Nanog expression through PI3K/Akt signals in mouse embryonic stem cells. International Symposium on Mechanobiology 2014, Okayama, 2014.5
2. T. Akimoto, T. Ushida. Mechanical stretch maintains Nanog expression through PI3K/Akt signals in mouse embryonic stem cells. 第 68 回日本体力医学会学術総会, 東京, 2013.9
3. 秋本崇之. メカニカルストレスと細胞分化. 第 21 回日本運動生理学学会, 川越, 2013.7

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 ( 計 0 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

秋本崇之 (AKIMOTO, Takayuki)  
東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：00323460

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：