

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23770237

研究課題名（和文） ヒト多能性幹細胞の細胞死・生存をモデルとした細胞接着情報の細胞内伝達機序の解明

研究課題名（英文） Molecular analyses of cellular adhesion-dependent survival signal pathway in human pluripotent cells

研究代表者

大串 雅俊 (OHGUSHI MASATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・ヒト幹細胞研究支援ユニット・副ユニットリーダー

研究者番号：00462664

研究成果の概要（和文）：ヒト多能性幹細胞の生存は細胞間接着に厳密に依存し、細胞間接着の喪失、すなわち分散操作に伴うヒトES細胞死は、低分子量GTPase制御因子Abrの活性化が契機となる。そこで、Abrの機能解析を通じて、ヒト多能性幹細胞の生存を維持するシグナル伝達機能の解明を目指した。その結果、分散培養条件下とは異なり、細胞間接着を維持した状況ではAbrは細胞の生死に関与しないこと、一方で正常な細胞増殖に必須であることが判明した。現在はその詳しい分子機構の解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：The survival of human pluripotent stem cells is strictly dependent on the cell-cell interaction. We previously reported that the dissociation-induced cell death is mediated by the activation of a Rho-GEF/Rac-GAP dual factor Abr. The aim of this work is to understand how the cellular adhesion controls Abr activity and cell survival in human ES cells. Current results suggested that although Abr is required for apoptosis of dissociated cells, it is dispensable for cell survival under the clump culture condition. However, we identified the essential contribution of Abr in human ES cell proliferation. Further analyses will be required to totally understand of the Abr function in human ES cell survival or proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：多能性幹細胞、シグナル伝達、細胞間接着、細胞死

1. 研究開始当初の背景

ヒトES細胞は、試験管内で無限に増殖でき、また個体を構成する全ての細胞へ分化する能力を備えた多能性幹細胞である。その特性からヒトES細胞は、これまでまったく手

付かずであったヒト発生現象の *in vitro* モデルとして有用であると考えられており、また、特定の細胞へ分化させることにより薬剤スクリーニングや再生医療に必要な細胞のソースとしても期待されている。さらに最近

では体細胞を初期化することによって ES 細胞と同等の能力を備えた誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) が作製されたことにより、これらのヒト多能性幹細胞の産業的/医療的応用に対する期待は社会的にも高まっている。ところが、ヒト iPS 細胞がヒト ES 細胞に「よく似た細胞」という基準で作製されている現状に対し、ヒト ES 細胞そのものも細胞特性への理解は未だ不十分である。その理由の 1 つとして、ヒト ES 細胞は、研究が先行しているマウス ES 細胞とは多くの点で異なる性質を持つことが明らかとなっており、マウス ES 細胞研究の成果をそのままヒト ES 細胞に当てはめることができないという点が挙げられる。特に、現状のヒト ES 細胞の維持培養条件では未分化性維持、細胞生存率といった面から不安定であり、応用へ向けた大量培養や遺伝的操作技術の大きな障壁となってきた。

申請者らは以前に、ヒト ES 細胞の生存を制御するシグナル伝達経路を解析し、細胞間接着による細胞骨格制御シグナル Rho/ROCK/Myosin の活性抑制がヒト ES 細胞の生存に必須であることを報告した。このことは、細胞間接着や細胞骨格、細胞収縮力といった物性的パラメーターがヒト ES 細胞の特性維持に積極的に関わっていることを示している。興味深いことに、この生存維持システムは核内因子とはまったく独立に働いており、転写因子ネットワーク/エピジェネティック制御などの核内イベントの解析に重きが置かれてきたこれまでの ES/iPS 細胞研究とは異なる観点を提示していると考えられた。

2. 研究の目的

(1) ヒト ES 細胞がもつ接着状況認識能力の分子的基盤を解明する

これまでの研究から、細胞間接着情報を失

ったヒト ES 細胞では、Abr という分子の働きにより myosin 過剰活性化が誘起された結果、細胞死に至ることが明らかとなった。つまり、ヒト ES 細胞の維持培養において、細胞間接着は生存のために必須であり、個々のヒト ES 細胞には、自己の接着状況を正確に識別する能力が備わっているということを示唆している。

本研究では Abr を細胞生物学的解析の足掛りとして、ヒト ES 細胞の接着状況認識能力を支える分子的基盤を明らかにすることを目的とする。その成果は、ヒト発現現象における細胞間コミュニケーションの *in vitro* モデルとなるのに加え、より安定なヒト ES 細胞の維持培養、高率なヒト iPS 細胞の作製などへの応用が期待できる。

(2) 「場の情報」によるヒト ES 細胞の特性維持機構を理解する

ES 細胞は E-Cadherin 陽性コロニーを形成して未分化状態を維持したまま増殖するが、マウス ES 細胞とヒト ES 細胞ではコロニー形態が質的に異なることが知られている。マウス ES 細胞は個々の細胞が多層に積み重なった細胞塊の形態をもう一方で、ヒト ES 細胞は個々の細胞が頂端 - 測底極性 (apical-basal polarity) を持つ単層上皮形態をとる。最近では、このようなコロニー形態の違いは、各々の由来する胚性組織の性状に由来すると考えられており、つまりマウス ES 細胞は初期胚における内部細胞塊 (ICM) を、ヒト ES 細胞はより発生が進んだエピブラスト (epiblast) を反映していると考えられている。ヒト iPS 細胞ではコロニー形態が品質管理の 1 つの基準として用いられており、また前述のように、ヒト ES 細胞の生存に必須であることが明らかとなっている。また、ヒト ES 細胞の培養には、FGF 等の液性因子/細胞間接着に加え、細胞と細胞間マトリック

ス間の相互作用が必須であることがわかっている。このように、ヒト ES 細胞を安定的に培養するためには、それに見合った「場」を整えることが必須であるが、その条件を満たすための分子的基盤は未だ不明である。

本研究では、上記 (1)、(2) の解明を通じて、「分泌因子に依存しない細胞間コミュニケーションによるヒト ES 細胞の特性維持」という作業仮説をもとに、細胞接着状態や細胞形態の変動がヒト ES 細胞の培養安定性に及ぼす影響を検討し、「場」という物性情報とヒト ES 細胞の細胞特性(多能性や分化能、あるいは移動能) との間の関連性を明確にし、単層上皮構造というヒト ES 細胞の colony 形態の本質的意義を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Abr 結合分子の探索

Abr に関してはこれまでほとんど生化学的解析がなされていないが、前述の実験結果からは細胞接着関連因子との相互作用が想定される。そこで、Abr と相互作用する細胞間接着分子、あるいはその間を介在する分子の同定を目指す。まず Abr 発現ヒト ES 細胞の細胞溶解液から免疫沈降法により Abr タンパクを単離し、その沈降液中に含まれる分子を質量分析法により同定する。同定した Abr 結合分子に関する情報を集め、細胞間接着との関連性を整理する。複数の候補分子が同定された場合は、それぞれに関して、Abr 活性に対しどのように機能するのか(活性化因子? 活性阻害因子? スキャホールド分子?) を念頭におき、想定しうる分子機構モデルを構築する。細胞間接着情報を除去した場合の分子間結合や細胞内局在の変化という表現型から候補分子と細胞間接着装置の関連を検証し、過剰発現や機能阻害実験を通じて、細胞接着装置と Abr の間を結ぶシグナル伝達経路

を確立する。

(2) Abr の細胞内局在と細胞間接着との関連

現在のところ内在性 Abr を免疫染色できる抗体がないので、ヒト及びマウス Abr を認識できる免疫染色可能な抗 Abr 抗体を新たに作製する。ヒト ES 細胞における細胞内局在を明らかにし、細胞間接着情報をなくしたときに内在性 Abr の局在に変化があるかどうかを詳細に検討する。また、マウス ES 細胞および EpiStem 細胞、あるいはマウス ICM および epiblast における Abr の細胞内局在を調べ、ヒト ES 細胞との相関を検討する。

(3) レンチウイルスを用いた特定遺伝子発現抑制ヒト ES 細胞作製技術の確立

RNAi 法による特定遺伝子の特異的ノックダウン法は、その分子の機能解析のための強力かつ必須なツールである。実際、これまでに RNAi 法によるノックダウン実験により、Abr が分散ヒト ES 細胞における myosin 過剰活性化の介在分子であることを明らかにした。しかしながら、分化実験や形態維持における役割を理解するには、一過的なノックダウン実験系では不十分である。ES 細胞の場合は、特にクローン間のばらつきが生じやすいと想定されるので、ポリクローナルな安定発現細胞群を解析対象とすることが望ましい。そこで、レンチウイルスを用いた shRNA 発現法を応用して、ヒト ES 細胞における恒常的ノックダウン法を確立する。また、恒常的ノックダウンが及ぼす影響(生存や未分化維持の阻害)を避けることを目的に、誘導可能な shRNA 発現ヒト ES 細胞の作製技術の確立を目指す。

4. 研究成果

Flag-Abr を過剰発現させたヒト ES 細胞を材料に、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降を行

い、共沈してくる分子を質量分析法による同定を試みた。その結果得られた Abr 結合分子の中には、細胞間接着因子 Zo-1 や、頂端-測底極性因子 Kibra が含まれており、細胞間接着及び細胞極性による Abr 活性制御メカニズムの存在が示唆された。現在は、これらの結合分子と Abr の機能がヒト ES 細胞においてどのように関連しているのかどうかの検討を進めている。

また、薬剤誘導型 shRNA 発現による特異的遺伝子ノックダウン法の導入に成功し、Abr の発現を任意にコントロールできる実験系を構築した。この方法で、Abr のヒト ES 細胞での機能を検討したところ、通常培養条件下では Abr ノックダウンは細胞の生存に直接的な関与は認められなかった。このことは、Abr が細胞間接着による負の制御を受けているという主張を支持するものと考えられる。一方で、Abr をノックダウンすると細胞周期の M 期進行が障害されることを見出した。この予想外の表現型は、Abr がヒト ES 細胞の正常は増殖に必須であることを示している。また、新しく作成した Abr 抗体を用いた免疫染色により、通常培養条件下において Abr の一部が中心体に局在する可能性が示唆された。これらの結果は細胞分裂時に細胞間接着による負の制御から解放された Abr が中心体に移行し、M 期進行に関与するという新規の分子機構を示唆するもので興味深い。今後、Abr ノックダウンによる表現型、及び Abr 局在の時間的、空間的な詳細な解析により、細胞間接着、細胞生存シグナル、細胞分裂制御の相互作用メカニズムを解明していきたい。

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 1 件)

- ① 福角勇人、ほか 10 名 (研究代表者、8 番目) Feeder-free generation and long-term

culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix of decidua derived mesenchymal cells. PLoS One、査読有、8 巻、2013 年、DOI ; 10.1371/journal.pone.0055226、

[図書] (計 1 件)

- ① 大串雅俊、羊土社、実験医学増刊 再生医療を実現化するメディカルサイエンス、2012 年、89-94

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大串 雅俊 (OHGUSHI MASATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・ヒト幹細胞研究支援ユニット・副ユニットリーダー

研究者番号：00462664