

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615001

研究課題名(和文)酸化ストレスシグナルによる幹細胞分化促進と脱分化抑制機構の解明

研究課題名(英文)differentiation and reprogramming regulated by oxidative stress

研究代表者

守田 匡伸 (Morita, Masanobu)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10519094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスが未分化細胞の増殖や分化の制御にも深く関与していることが近年の研究により明らかになってきた。本研究では酸化・抗酸化のバランス調節において中心的な役割を果たしているKeap1-Nrf2システムがリプログラミング時において重要な役割を担っていることを明らかにした。Nrf2の活性化により細胞周期を停止させる因子が誘導され、iPS形成を抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Keap1-Nrf2 system plays pivotal roles in response to oxidative stress. Nrf2 induces anti-oxidant enzymes then reduces oxidative stress in cells, tissues and body. In this study we examined Nrf2 functions in reprogramming process of differentiated cells, in other words, iPS formation. We transfected reprogramming factors Oct3, Sox2, KLF4 and c-Myc into Nrf2 KO MEF and Keap1 KO MEF then counted iPS colonies to judge reprogramming efficiency. Keap1 KO MEF induced less iPS colonies than wild and Nrf2 KO MEF. Gene expression analysis revealed that Nrf2 activated cell cycle arrest factors then induced repression of iPS formation.

研究分野：分子生物学

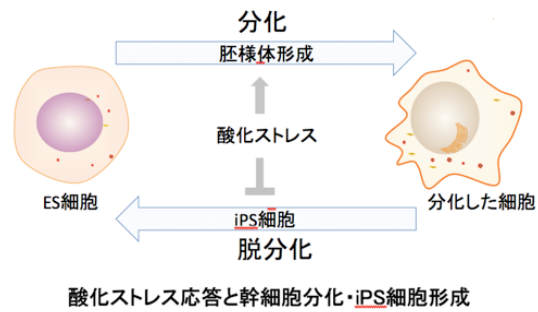
キーワード：幹細胞 リプログラミング iPS

1. 研究開始当初の背景

ROS などの酸化ストレスや外来異物に対しての応答系の破綻は、様々な疾患の発症と密接に関わっている。このような疾患を未然に防ぐ目的で、細胞はストレスに対して素早い応答で対応し、恒常性を維持している。これまでの研究から転写因子 Nrf2 が酸化ストレス・異物代謝応答系に関わる酵素遺伝子の一群を統一的に制御していることが明らかになっている。本研究では iPS 細胞樹立により、細胞脱分化機構における Keap1-Nrf2 システムの機能を明らかにする。

2. 研究の目的

in vivo でのさまざまな電子伝達反応の間に産生される活性酸素種 (ROS) は、一般的に細胞に対して有害であると考えられている。幹細胞やがん幹細胞では ROS が低く保たれているという観察結果から酸化ストレスが未分化細胞の増殖や分化の制御にも深く関与していることが近年の研究により明らかになってきた。本研究では酸化-抗酸化のバランス調節において中心的な役割を果たしている Keap1-Nrf2 システムがこの酸化ストレスを感知し、酸化-抗酸化のバランスを調節するいわゆるレドックスのホメオスタシスにおいて Keap1-Nrf2 は重要な役割を果たしている。最近になって外来からの親電子性物質だけでなく生体内で合成される内在性の活性酸素種などの存在が明らかになったことから Keap1-Nrf2 システムは単に外来からの酸化ストレス応答だけでなく、細胞内のシグナル伝達の役目を担っていることがわかった。また幹細胞分化・iPS 細胞作製過程において ROS の発生が観察されることが報告されており、ROS 濃度が幹細胞分化および iPS 細胞作製効率に深く関与していることが示唆されている。本研究では幹細胞分化および iPS 細胞形成における ROS を介した Keap1-Nrf2 システムの役割を解明することを目的とする。



3. 研究の方法

酸化ストレス応答に関わる Keap1, Nrf2 の遺伝子を欠損させて樹立したノックアウト ES 細胞を用いて Nrf2 欠損/過剰発現による幹細胞分化能の変化を解析する。また Keap1, Nrf2 ノックアウトマウスから得られる Keap1, Nrf2 ノックアウト繊維芽細胞 (MEF) から iPS 細胞を作製し、iPS 作製効率の変化・幹細胞マーカー遺伝子発現の変化を解析する。これらの解析により Keap1-Nrf2 を介した酸化ストレスが iPS 細胞形成時および幹細胞の自己複製・分化能に与えるメカニズムの解明を目的とした。当研究室で既に作製されている Keap1, Nrf2 の遺伝子破壊マウスを交配することによりホモ接合の胚盤胞を得、これらからノックアウト ES 細胞を樹立することができる。文科省科学研究費補助金・若手研究 B (腫瘍分野) 平成 22-23 年度「Keap1-Nrf2 を介した酸化ストレスシグナルの幹細胞における役割」において申請者は Keap1, Nrf2 ノックアウト ES 細胞を樹立し、幹細胞における Keap1-Nrf2 を介した酸化ストレス応答を解析した。本研究ではこれらのノックアウト ES 細胞を使用する。ES 細胞を浮遊培養することにより胚葉を形成させ、その後改めて付着培養することにより胚葉を三胚葉系に分化させる。外胚葉、中胚葉、内胚葉それぞれのマーカーで定量的 PCR もしくは免疫染色によりノックアウト ES 細胞の分化能を調べる。この研究計

画により幹細胞未分化維持および幹細胞分化における酸化ストレスと Keap1-Nrf2 系の役割の解明が期待できる。本研究では新たにノックアウト iPS 細胞を樹立する。Keap1、Nrf2 遺伝子破壊マウスを交配することにより野生型繊維芽細胞 (MEF)、ノックアウト MEF をそれぞれ得る。得られた MEF について山中 4 因子をレトロウイルスを用いて導入することにより iPS 細胞を樹立する。得られた iPS 細胞に対して iPS 作製効率および iPS 細胞における幹細胞遺伝子発現解析をマイクロアレイ、qPCR を組み合わせて解析を行う。

4. 研究成果

胚盤胞から樹立した Keap1、Nrf2 ノックアウト ES について幹細胞マーカーである Oct3、Nanog、KLF5、Sox2 について qPCR を用いて発現解析を行ったところ、Nrf2KO ES は野生型と比べて特に変化なかったが Keap1 KO ES において Nanog の発現が低い傾向が見られた。ES 細胞は自己複製能と多分化能を併せ持つが多分化能の程度を確認するために ES 細胞をヌードマウスに移植してテラトーマ形成を行い、テラトーマの成育度およびテラトーマの分化能を解析した。Nrf2KO ES から発生したテラトーマは野生型と同程度の三胚葉分化を示していたことが病理標本解析から確認されたがテラトーマの成育が著しく低下していた。Keap1、Nrf2 ノックアウト MEF から iPS 細胞を作製したところ、Keap1 KO MEF からの iPS 細胞作製効率が野生型や Nrf2KO MEF と比べて低下していた (図 1)。

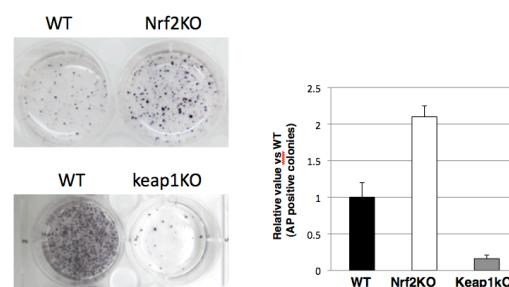


図 1 Nrf2 の活性化は iPS 形成を抑える

この Nrf2 活性化による iPS 形成抑制のメカニズムを探るために細胞増殖、アポトーシス活性および遺伝子発現の解析等を行った。iPS 形成時すなわちリプログラミングの際には細胞老化やアポトーシスが誘導されて細胞増殖が一時的に低下することが知られているがこのリプログラミング時において、野生型や Nrf2KO に比べて Keap1KO MEF での細胞増殖が著しく減少していた。この細胞増殖の低下が何に起因しているか原因を明らかにするために細胞周期、およびアポトーシス活性を測定した。FACS を用いて iPS 形成途中の細胞を解析したところ、アポトーシスの程度は変化なかったが細胞周期における S 期の細胞集団が Nrf2 KO MEF で大きく増加し、Keap1 KO MEF では減少していたことから Keap1 KO で見られた細胞数の減少はアポトーシスによるものではなく細胞周期の低下によるものであることがわかった (図 2)。

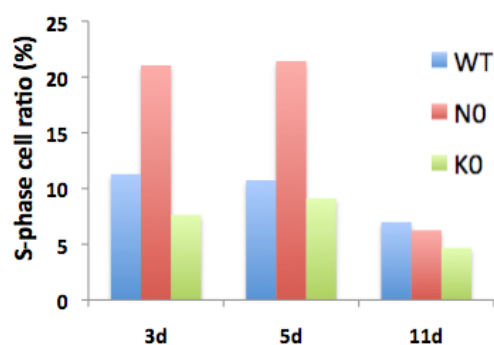


図 2 Keap1-Nrf2 システムはリプログラ

ミング時の細胞周期に寄与する

次にリプログラミング時における Nrf2 による転写制御を調べるために iPS 形成時のタイムコースをとり、野生型、Nrf2 KO、Keap1 KO それぞれの MEF について幹細胞マーカーや細胞周期関連因子の発現を qPCR で経時的に測定した。細胞周期関連因子では p16 の発現が Keap1 KO で上昇し Nrf2KO では抑えられていた。P16 は細胞周期のブレーキをかける役割をしているのでこの発現解析の結果とリプログラミング過程において Nrf2 KO で細胞増殖が亢進し Keap1 KO で抑制されたという表現型はよく一致していた。

実際に酸化ストレスが iPS 形成に及ぼす影響を明らかにするために NAC および BSO 添加による iPS 形成を試みた。NAC 投与は若干 iPS 形成効率を抑えるが、ES-like /EF-like iPS の比をあげた。逆に BSO 添加により、形態のよくない iPS の比率が増加した。ROS 濃度の多少は iPS 形成そのものには大きな影響は与えなかったが、形成された iPS の質に寄与していることがわかった。NAC/BSO 添加の実験は Nrf2KO iPS では ES-like /EF-like iPS 比が下がり、Keap1 KO iPS では上昇したという実験結果とよく一致していた (図 3)。

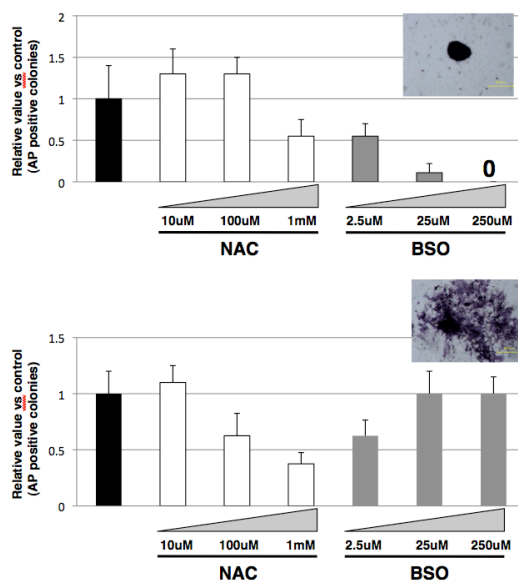


図 3 NAC/BSO 添加による iPS 形成

以上の結果から Nrf2 は iPS 形成時の初期段階においては細胞周期因子を誘導することで細胞増殖を抑制し、iPS 形成後期においては何らかのメカニズムにより良い iPS 形成をもたらしていることが明らかになった。この結果は Nrf2 誘導剤の開発が品質のよい iPS 作製に結びつくことを示唆するものである。今後は iPS から任意の細胞に分化させた際の分化能や分化した細胞を移植させた時の生着における Nrf2 の作用を解析することで Keap1-Nrf2 の細胞脱分化および分化におけるより詳細な機能を明らかにし、再生医療における Keap1-Nrf2 システムの応用を目指す。

5. 主な論文発表等 [雑誌論文] (計 1 件)

①Ainoya K, Moriguchi T, Ohmori S, Souma T, Takai J, Morita M, Chandler KJ, Mortlock DP, Shimizu R, Engel JD, Lim KC, Yamamoto M.. (2012). UG4 enhancer-driven GATA-2 and bone morphogenetic protein 4 complementation remedies the CAKUT phenotype in Gata2 hypomorphic mutant mice. *Molecular and cellular biology*, 32(12), 2312-2322. 査読有り
DOI: 10.1128/MCB.06699-11

6. 研究組織

(1) 研究代表者
守田 匡伸 (Morita Masanobu)
東北大学・大学院医学研究科 助教

研究者番号 : 10519094