

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：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659133

 研究課題名（和文） 細胞の初期化と未分化状態の維持における IKK/NF- κ B シグナル伝達系の機能解明

 研究課題名（英文） Investigating the role of IKK/NF- κ B signaling axis on the cellular reprogramming

研究代表者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)

京都大学・再生医科学研究所・講師

研究者番号：50301247

研究成果の概要（和文）：

申請者は、IKK/NF- κ B シグナル伝達系を中心としたシグナル伝達系の機能解析に従事してきた経験と iPS 細胞研究所教員兼務という機会を得たことを機に細胞初期化における IKK-NF κ B シグナル伝達系の関与に関する研究を展開した。その結果、IKK β が山中 4 因子によって ATM キナーゼ依存的に活性化され、細胞初期化の効率を亢進することを見出した。このシグナル機軸の機能の分子機序に関しては、所謂、oncogenic stress に対する生体反応であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We have investigated the role, if any, of IKK/NF- κ B signaling axis in cellular reprogramming into iPS cells. We found that ectopic expression of Yamanaka 4 factors induced the IKK β kinase activity depending on ATM. Moreover, disruption of *Ikk β* gene reduced the reprogramming efficiency, whereas co-expression of IKK $\beta^{(EE)}$, a constitutive active form of IKK β , with Yamanaka 4 factors promoted the efficiency. We found disruption of *Ikk β* elevated the number of senescent cells during the reprogramming. Collectively, our results indicate that IKK β potentiates cellular reprogramming by antagonizing the cellular senescence evoked by the ectopic expression of Yamanaka factors in an ATM-dependent manner.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学、医科学一般

キーワード：細胞初期化、iPS 細胞、シグナル伝達、IKK、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

山中等による人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作出技術の開発 (Takahashi and Yamanaka, 2006, *Cell*; Takahashi *et al.*, 2007, *Cell*) は、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた場合に避けられなかった倫理的問題や個体間の免疫学的適合性の問題を回避させ、幹細胞を用い

た再生医療の進展に大きく寄与するものとして大きな期待が寄せられていた。それと同時に特定の転写因子の導入と強制発現という、極めて単純な操作により、遺伝子発現プログラムを人為的に改変 (リプログラム) し、かつその状態を維持するという事実は、細胞生物学のみならず生命科学全

体に対して極めて大きなインパクトを与えた。しかしながら、細胞初期化及びそれに引き続く未分化状態維持の分子機構に関しては、いまだ未解明な部分が多く存在していた。マウス ES 細胞の未分化状態維持に STAT3 系が重要であることを端緒に、様々なシグナル伝達系の関与が報告され、かつそれらの間に極めて複雑なクロストークが存在していると想定されていた。

一方、転写因子 NF- κ B を中心とする IKK/NF- κ B シグナル伝達系は、様々な生命現象に関与していることが示されている。NF- κ B は転写因子として自律的に細胞の分化、生存といった細胞の運命を決定する遺伝子の発現を制御することに加えて、サイトカイン産生の制御、免疫あるいは炎症反応の惹起を介して細胞の外的環境を制御することにより、他の細胞の動態をも制御することが知られていた。

前述したように、細胞の初期化は細胞自律的な遺伝子発現プログラムの変換によって成し得ることは山中等によって示されたが、その効率は非常に低くまた不安定であることが生物学的にどのような意味合いを持つのか不明のままであった。幹細胞の維持には様々なシグナル伝達系に支配される遺伝子発現調節機構が大事であり、細胞内のシグナル伝達系は細胞の外的環境からの刺激によって活性化するシグナルとの相互作用によることが、少なくとも、効率の不安定性を説明できると考えるに至った。IKK/NF- κ B シグナル伝達系は細胞の内と外での機能が明らかにされており、細胞のがん化において細胞内外両方のシグナルがそれぞれ作用することがエレガントな実験系により示されており、本研究では幹細胞においてもシグナル伝達系を細胞の内と外の二方向からアプローチすることを計画するに至った。

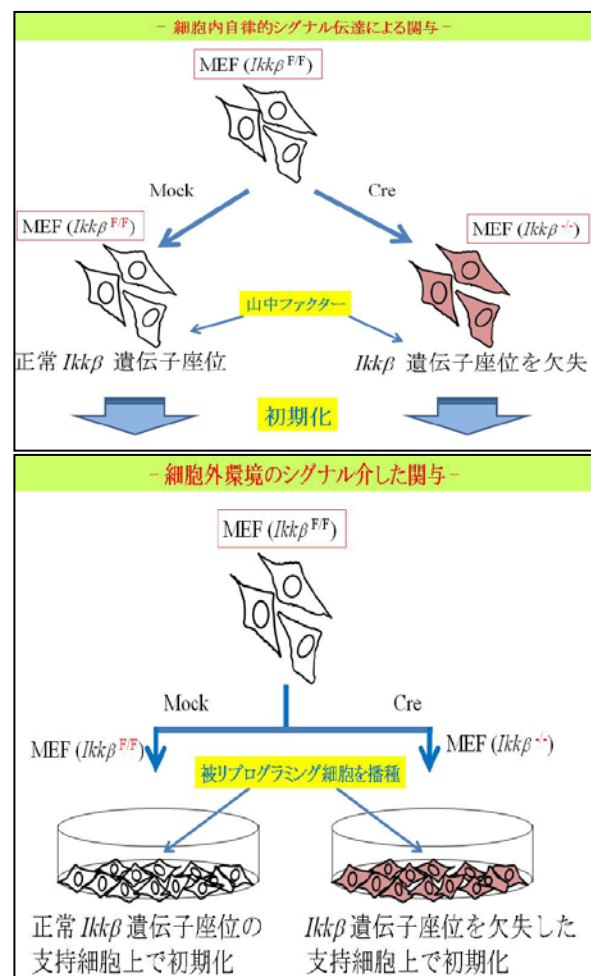
申請者は、2000年から3年間、IKK/NF- κ B シグナル伝達系分野で先駆的研究を展開している Michael Karin 博士のもとで IKK/NF- κ B シグナル伝達系の解析を行い、NF- κ B と p38 MAPK のシグナル伝達系との間のクロストークを見出した (Kato *et al.*, 2003, *Molecular Cell*)。更に、帰国後もこの仕事を発展させ、UV 応答における IKK のキナーゼ活性非依存的な役割について明らかにした (Tsuchiya *et al.*, 2010, *Molecular Cell*)。2010年より現所属において幹細胞研究に従事しており、更に、2011年より iPS 細胞研究所にて研究活動の場を有して (兼務) iPS 細胞に関する研究に従事していた。このような背景より、上述した斬新で先駆性にチャレンジする本研究課題を提案するに至った。

2. 研究の目的

iPS 細胞作製時における細胞内のシグナル伝達系の制御機構の解明は、初期化効率の向上および高品質な iPS 細胞の作製といった再生医療への応用を目指す上で必要であるばかりでなく、幹細胞の未分化状態の維持機構の解明につながる点で生命科学上においても非常に重要である。一方、近年、生体内における細胞はその細胞外微小環境の影響を無視できないことが明らかとなっており、その制御は新規の未分化状態維持培養法の開発への開発にもつながる。本研究においては、様々な生命現象に関与することが知られている IKK/NF- κ B シグナル伝達系に着目し、当該シグナルが細胞自律的に機能するばかりでなく、サイトカインの制御等を介して細胞に影響を及ぼすことに着目して、細胞の内と外の二面性から幹細胞制御の理解を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、先ず、IKK/NF- κ B シグナル伝達系が有する細胞自律的制御系と細胞外環境制御系の二面性に分けて iPS 細胞あるいは ES 細胞の初期化、維持における役割を解明することを目指した (図 1)。



(図1) 同じ遺伝的バックグラウンドを持つ細胞を用いて(上) IKK/NF- κ B シグナル伝達系が被初期化細胞内で自律的シグナルとして細胞の初期化に対してどのような働きをするかを明らかにする実験系(下) 初期化あるいは iPS 細胞の未分化能維持に対する IKK/NF- κ B シグナル伝達系の働きを明らかにする実験系の模式図。

(1) 被リプログラミング細胞における NF- κ B シグナルの意義の解析

被リプログラミング細胞における IKK/NF- κ B シグナル伝達系の役割に関して、申請者は、既に下記の点について明らかにしていた。

- ① *Nanog* 遺伝子の 5' 上流制御領域を含む BAC に GFP を繋いだレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (Tg(*Nanog*-GFP); Okita *et al.*, 2007, *Nature*) と *Ikk β ^{F/F}* マウスを交配し、*Nanog*-GFP;*Ikk β ^{F/F}* マウスを作製し、このマウスの胎児由来細胞へ CreER を作用させて *Ikk β* 遺伝子座を欠失した細胞では初期化の効率が低下する。
- ② 細胞初期化の過程で IKK/NF- κ B シグナル伝達系が活性化される。
- ③ 初期化過程における IKK/NF- κ B シグナル伝達系の活性化に関わる分子を同定。

これらに加えて、以下の研究を行うことを計画した。

- ④ リプログラミング過程における IKK/NF- κ B シグナル伝達系活性化の生物学的意義の解明: 具体的には下記の事象について検討する。
 - a) 初期化過程における細胞死への関与
 - b) 初期化過程における細胞老化経路活性化への関与
- ⑤ ヒト体細胞の初期化時に IKK β を抑制した場合の初期化効率の検討
 - a) ヒト IKK β mRNA に対する shRNA 発現ベクターを構築し、ヒト体細胞の初期化時に IKK β を抑制した場合の初期化効率への影響を検討する。
 - b) IKK β 阻害剤を用いて初期化への IKK β キナーゼ活性の影響を検討する。

(2) リプログラミング支持細胞における NF- κ B シグナルの意義

フィーダー細胞における NF- κ B シグナルの意義について下記の実験を行う。

- ① *Ikk β ^{F/F}* MEF に 4 因子を導入、細胞初期化を行う。フィーダー細胞として、*Ikk β ^{F/F}* MEF 及び *Ikk β ^{-/-}* MEF の 2 種類を用いて行い、GFP を指標として初期化効率を比較検討する。
- ② 同様の実験を *Ikk β ^{F/F}* MEF を被リ

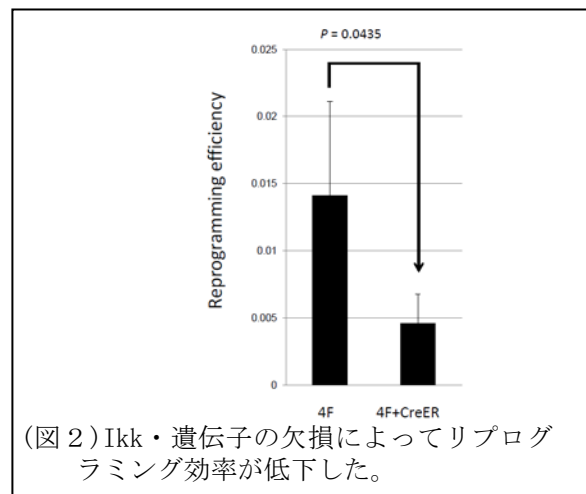
プログラミング細胞として用いて行う。

- ③ 以上の 4 種類の実験のデータを比較検討する。

4. 研究成果

(1) 被リプログラミング細胞における IKK/NF- κ B シグナル伝達系の役割

- ① 山中 4 因子の強制発現による IKK β の活性化: 山中 4 因子によって細胞を初期化する際、内在性の IKK β が活性化されることを IKK β のリン酸化、I κ B α の分解及び NF- κ B の転写活性の亢進によって示した。
- ② 初期化時の IKK β の活性化は ATM キナーゼに依存する: 上述の IKK β の活性化はストレス応答性キナーゼである ATM に依存することを ATM に対する shRNA を用いて示した。すなわち、ATM を特異的 shRNA でノックダウンすると山中 4 因子による細胞初期化時の IKK β の活性化が抑制されることを見出した。
- ③ *Ikk β* 遺伝子の欠失によってリプログラミング効率が低下する: *Ikk β* 遺伝子を欠失させた *Ikk β ^{-/-}* MEF ではコントロール細胞 (*Ikk β ^{F/F}* MEF) に比べて初期化の効率の低下がみられた (図2)。

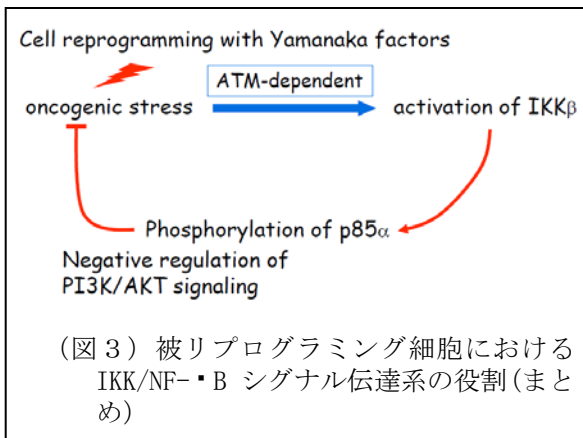


- ④ 構成的活性化型 IKK β はリプログラミング効率を亢進する: 山中 4 因子とともに、構成的活性化型 IKK β 、IKK β ^{EE}、を発現させると、リプログラミングの効率が亢進した。
- ⑤ *Ikk β* の欠失によって細胞初期化時の老化細胞の数が增加する: *Ikk β* 遺伝子の欠失によるリプログラミング効率の低下の原因について究明すべく、細胞老化について検討した。*Ikk β* 遺伝子を欠失させた *Ikk β ^{-/-}* MEF ではコントロール細胞 (*Ikk β ^{F/F}* MEF) に比べて初

期化の際にみられる老化細胞の指標である SA-βgal (senescence associated β-galactosidase) 陽性の細胞の数が増加していた。

⑥ 細胞初期化に寄与する IKKβ の標的因子の探索: IKKβ の標的として有名な IκBα の dominant negative 型である IκBα^(AA) を用いた実験から、IKKβ の初期化効率亢進は IκBα 以外の標的因子によると考えられたので、IκBα 以外の標的を探索したところ PI3K の制御サブユニットの p85α が候補として同定できた。p85α の IKKβ によるリン酸化部位を変異させた p85α (S690A) を山中 4 因子とともに細胞に導入するとリプログラミング効率が低下した。このことから、IKKβ による細胞初期化の亢進は IKKβ-p85α というシグナルの伝達経路を介していることが示唆された。

以上の結果より、IKKβ は山中 4 因子によって ATM キナーゼ依存的に活性化され、細胞初期化において、p85α のリン酸化を介して PI3K の活性を抑制することでリプログラミング効率を亢進すると考えられる (図 3)。



(2) リプログラミング支持細胞における NF-κB シグナルの意義

まず、予備実験としてマウスの ES 細胞を *Ikkβ*^{F/F} MEF 及び *Ikkβ*^{-/-} MEF 上で数回経代し遺伝子発現レベルで変化が生じるかを検討した。その結果、予備的ではあるが、非常に興味深い結果を得た。現在、詳細な解析を行っている。

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 4 件)

1. Nasu, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Watanabe, A., Jin, Y., Matsumoto, Y., Hayakawa, K., Amano, N., Sato, S., Osafune, K., Aoyama, T., Nakamura, T., Kato, T. and Toguchida, J. (2013) Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. *PLoS ONE*; 8: e53771. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0053771.
2. Hayakawa, K., Ikeya, M., Fukuta, M., Woltjen, K., Tamaki, S., Takahara, N., Kato, Jr., T., Sato, S., Otsuka, T and Toguchida, J. (2013) Identification of target genes of synovial sarcoma-associated fusion oncoprotein using human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*; **432**: 713-719. 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.003.
3. Kajita, Y., Kato, Jr., T., Tamaki, S., Furu, M., Takahashi R., Nagayama, S., Aoyama, T., Nishiyama, H., Nakamura, E., Katagiri, T., Nakamura, Y., Ogawa, O. and Toguchida, J. (2013) The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS ONE*; **8**: e49709. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0049709.
4. Kajiwaru, M., Aoi, T., Okita, K., Takahashi, R., Inoue, H., Takayama, N., Endo, H., Eto, K., Toguchida, J., Uemoto S, Yamanaka S. (2012) Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; **109**:12538-12543. 査読有, doi: 10.1073/pnas.1209979109.

[学会発表] (計 4 件)

1. 玉置さくら他、「滑膜肉腫の発生機構に関して」、第 45 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 (招待講演)、東京国際フォーラム (東京都) 2012 年 7 月 14 日
2. Sakura Tamaki *et al.* “Cell context is an important factor for the role of SYT-SSX”, 17th Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting, The Hilton Prague Hotel (Czech Republic) 2012 年 11 月 16 日
3. 玉置さくら他、「Cell context is important for SYT-SSX oncoprotein in epigenetic regulation of synovial sarcoma」、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場 (福岡市) 2012 年 12 月 12 日

4. 加藤友久他 「Identification of interactors of fusion oncoprotein SYT-SSX delineates the mechanism underlying the epigenetic dysregulation in synovial sarcoma」、第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場（福岡市）2012年12月12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)
京都大学・再生医科学研究所・講師
研究者番号：50301247

(2) 研究分担者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502

(3) 連携研究者

青井 貴之 (AOI TAKASHI)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：00546997
高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：80432326