

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670851

研究課題名(和文) Wnt/  $\beta$ -カテニン経路の幹細胞性維持・分化誘導機能に関するゲノムワイド研究研究課題名(英文) Genome-wide study of Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated differentiation and maintenance of stemness

研究代表者

大庭 伸介 (Ohba, Shinsuke)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20466733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の幹細胞性維持と分化誘導という相反する作用の機序をマウス多能性幹細胞において明らかにすることが本研究の目的である。標識ペプチドが付加された  $\beta$ -カテニンをもつマウスES細胞において、 $\beta$ -カテニンに対するクロマチン免疫沈降-シーケンス法とWnt/ $\beta$ -カテニン経路反応性遺伝子の発現プロファイリングを行った。これらのデータを解析した結果、Wnt/ $\beta$ -カテニン経路による多能性制御はTcf3と多能性転写因子群を、分化制御はTcf3とMEK経路下流で働くEtsとの協調を介するものと考えられた。これらの知見は高品質な幹細胞の安定的供給と効率的な分化誘導法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify mechanisms underlying the effect of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway on the maintenance of stemness and differentiation in mouse embryonic stem cells (mESCs). We performed chromatin immunoprecipitation followed by massively parallel sequencing (ChIP-seq) for  $\beta$ -catenin and expression profiling for Wnt/ $\beta$ -catenin pathway-responsive genes in mESCs that carried epitope-tagged  $\beta$ -catenin. Obtained data suggest that Wnt/ $\beta$ -catenin pathway utilizes Tcf3 and pluripotency-related transcription factors for the regulation of pluripotency. In contrast, cooperative actions of Tcf3 and Ets, which acts downstream of MEK pathway, are likely to underlie the regulation of differentiation by Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. These findings may lead to the development of methods for stable supply of high-quality stem cells and efficient differentiation of stem cells.

研究分野：骨軟骨生物学・再生医学

キーワード：胚性幹細胞 Wnt 多能性 分化  $\beta$ -カテニン

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) といった多能性幹細胞の骨再生医療への応用を目指し、骨形成機序の解明と ES 細胞の骨分化誘導法に関する検討を行ってきた (FASEB J 21:1777, 2007; Biochem Biophys Res Commun 357:854, 2007; Dev Cell 14:689, 2008)。しかし、多能性幹細胞から骨芽細胞への分化効率をさらに上げるためには、幹細胞性と分化のスイッチングに関する基礎的知見を集積する必要があるという考えに至った。

後述する2i培養系の発見に端を発し、多能性幹細胞におけるWnt/ カテニン経路の役割が近年特に注目を集め、Sox2/Oct4/Nanogといった転写因子群による幹細胞性転写ネットワークとの関係が盛んに研究されている (Development 138:4341, 2011; Nat Cell Biol 13:753, 762, 838, 2011)。2i培養系とはGSK3 阻害剤とMEK阻害剤を用いた培養系であり、これら二つの阻害剤によるWnt/ カテニン経路の活性化とMEK経路の抑制が、無血清培地・無フィーダーでのマウス多能性幹細胞の培養を可能にする (Nature 453:519, 2008)。Wnt/ カテニン経路の活性化はiPS細胞の作製効率を上げることも報告されている (Cell Stem Cell 3:132, 2008)。これらは、Wnt/ カテニン経路がマウス多能性幹細胞の幹細胞性の維持や体細胞の初期化に関わることを示している。Wnt/ カテニン経路は骨格形成をはじめとした種々の器官の形成にも必須であり、特に多能性幹細胞では、幹細胞性の維持に加えて間葉系細胞への分化も誘導する (Development 138:4341, 2011)。実際、カテニンのノックアウトマウスES細胞は幹細胞性と分化能の両方に異常を呈する (FEBS Lett 581:5247, 2007)。

Wnt/ カテニン経路の幹細胞性維持と分化誘導という二つの相反する作用は、発生学におけるパラドックスの一つであるが、詳細な

分子機序は未だ不明である。多能性幹細胞においてこの点を明らかにすることは、幹細胞性と分化のスイッチング機構や体細胞の初期化のメカニズムのさらなる理解へとつながり、再生医療へと展開する基礎的知見となる可能性を多いに秘めている。

多能性幹細胞におけるWnt/ カテニン経路の従来の機能解析は、下流の転写抑制因子 Tcf3に関するものがほとんどであった。転写活性化因子である カテニンに着目し、シグナル応答性の細胞内挙動をゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームワイドで解析し、この経路の機能を解明しようとする試みはこれまでに報告されていない。その成果は高品質な幹細胞の安定的供給と効率的な分化誘導法の開発に直結し、骨再生を含む再生医療界全体に大きなインパクトを与えることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、Wnt/ カテニン経路の転写活性化因子である カテニンに対するクロマチン免疫沈降-シーケンス法 (ChIP-seq)・プロテオーム解析、および Wnt/ カテニン経路反応性遺伝子を検索するための遺伝子発現プロファイリングを行い、パイオインフォマティックスの手法によりそれらのデータの統合的解析を行う。これにより、カテニンがゲノム上で転写を制御する領域とその標的遺伝子、さらには相互作用因子を一元化して明らかにし、幹細胞性と分化のスイッチングの観点から、多能性幹細胞における Wnt/ カテニン経路の作用機序を解明することで、再生医療へと展開する基礎的知見を収集することが最終目標である。

## 3. 研究の方法

(1) catenin-Biotin-3xFLAG ノックイン ES 細胞の作出

カテニンに対するクロマチン免疫沈降

と転写複合体のアフィニティー精製を効率的かつ高精度に行うために、Biotin-3xFLAG タグが カテニン (Ctnnb1) C 末にノックインされた ES 細胞 (Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup> ES 細胞) を遺伝子ターゲティングにより作出する。Biotin タグのビオチン化には BirA リガーゼが必要なたため、Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup> ES を樹立後に pCAGGS-BirA- Hyg の導入とハイグロマイシンを用いた選択により恒常的に BirA を発現する Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup> ES 細胞を作出する (Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup>-BirA ES 細胞)。

#### (2) Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup>-BirA ES 細胞における カテニンに対する ChIP-seq

Ying らの方法に従い (Nature 453:519, 2008) MEK 阻害剤と GSK3 阻害剤を用いた 2i 培養系で Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup>-BirA ES 細胞を増幅・維持する。その後、GSK3 阻害剤処理による Wnt/ カテニン経路活性化群と未処理群 (コントロール群) に分け、ChIP サンプルの調整を行う。続いて、カテニンに対する ChIP を抗 FLAG 抗体及びストレプトアビジンビーズを用いて行い、Solexa Genome Analyzer によるシーケンシングから得られた ChIP DNA の配列データを Eland software を用いてゲノム上へマッピングしたのち、CisGenome software (Nat Biotech 26:1290, 2008) 上で有意に取得された領域を結合領域として検出し、一次データを取得する。

また、エピジェネティクスの観点からエンハンサー活性や転写状態を検討するために、ヒストン修飾 (H3K4me2・H3K4me3・K3H27ac・H3K27me3) RNA pol II、p300 の ChIP-seq データをデータベースから取得する。

H3K4me2・me3・K3H27ac・p300 は転写開始点やエンハンサーを、H3K27me3 は転写抑制領域を反映することが知られている。これらは、

カテニン結合領域と転写を制御するクロマチン修飾とを関連づける基礎データとなる。

#### (3) Wnt/ カテニン経路反応性遺伝子の発現プロファイリング

MEK 阻害剤処理をコントロールとし、野生型 ES 細胞を MEK 阻害剤+GSK3 阻害剤 (2i 培養系、Wnt/ カテニン経路活性化群) あるいは MEK 阻害剤+XAV939 (Wnt/ カテニン経路抑制群) で 24 時間処理し、回収した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行う。発現変動遺伝子とその変動量に関する一次データを取得する。XAV939 は Axin を安定化し、Wnt/ カテニン経路を抑制することが報告されている (Nature 461:614, 2006)。

#### (4) カテニン転写複合体のプロテオーム解析

複合タグがノックインされている利点を生かし、3xFLAG タグとビオチンタグを用いた 2 段階精製により、Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup>-BirA ES 細胞の核抽出液から カテニンの転写複合体のアフィニティー精製を行う。精製物を酵素消化によりペプチドに断片化し、質量分析計により質量データセットを取得する。質量データをもとに、精製物に含まれるたんぱく質のリストを一次データとして取得する。MEK 阻害剤処理群 (コントロール) 2i 処理群 (Wnt/ カテニン経路活性化群) に分け、Wnt/ カテニン経路応答性に形成される転写複合体の構成要素の同定を試みる。

#### (5) バイオインフォマティクスによるデータの統合的解析とその検証

##### 一次データの統合的解析

Galaxy software (Genome Res 17: 960, 2007) 上で、ChIP-seq と発現プロファイリングから得られる一次データ (カテニン結合領域と Wnt/ カテニン経路反応性発現変動遺伝子リスト) を統合し、カテニン結合領域とその標的遺伝子を明らかにする。さらに DAVID software (Nat Protocols 4: 44, 2009)

を用い、標的遺伝子を Gene ontology term により選別し、Wnt/ カテニン経路の標的遺伝子とその機能及び転写調節領域（結合領域）が一元化されたリストを作成する。また、各ピークの中心から +/-75 bp の領域に存在する転写因子モチーフの解析も行い（de novo モチーフ検索）、プロテオーム解析の一次データと照合することで、カテニンの転写協働因子の候補を得る。

#### 検証と機能解析

上記のデータを基に、幹細胞性と分化におけるカテニンを中心とした転写ネットワークの解析・回路図の描出を Cytoscape software (Genome Res 13:2504, 2003) により行う。また、ChIP-seq より明らかとなった転写調節領域については、レポーターアッセイによる機能検証と併せて、ゲルシフトアッセイによる転写調節領域への結合力や結合特異性の検証・結合領域の絞り込みを行う。

カテニン転写協働因子の候補については共免疫沈降にて検証する。新規標的遺伝子の同定においては、発現解析と in vitro および in vivo における機能解析を行う

#### 4. 研究成果

まず、標識ペプチドが付加された  $\beta$ -カテニンをもつマウス ES 細胞 (Ctnnb1<sup>BioFL/+</sup> ES 細胞) を遺伝子ターゲティングにより作出した。この細胞において、抗 FLAG 抗体及びストレプトアビジンビーズを用いた ChIP-seq により、マウスゲノム DNA 上で  $\beta$ -カテニンが結合している約 10,000 領域を同定した。

次に、ES 細胞で重要な働きをもつ 19 種類の転写関連因子 (Oct4、Sox2、Nanog、Tcf3、Smad1、Stat3、Tcfcp2l1、Tbx3、Klf4、C-myc、N-myc、Zfx、Ring1b、Ezh2、Suz12、Esrrb、Nr5a2、E2f1、CTCF) の ChIP-seq データと、本研究で取得した  $\beta$ -カテニンの ChIP-seq データの比較解析を行った。その結果、特に多能性に重要な 5 種類の転写因子と  $\beta$ -カテニ

ンの結合領域が、ゲノム DNA 上で高頻度に重複することを見出した。さらに詳細に解析を進めると、 $\beta$ -カテニン結合領域は、「Oct4、Sox2、Nanog、Tcf3 と共に結合する領域（領域 A）」と「Tcf3 のみと結合する領域（領域 B）」の二つに大きく分けられ、領域 A は多能性に関連する遺伝子の周囲に、領域 B は分化に関連する遺伝子の周囲に多く分布していた。またこれらの領域はマウス ES 細胞において、活性型エンハンサーの指標となるヒストン修飾を受けていた。

次に、領域 A と領域 B に対して、de novo モチーフ解析を行った。その結果、領域 A では Oct と Sox の認識配列が、領域 B では Tcf の認識配列が有意に存在することが分かった。以上の知見は、Wnt/ カテニン経路が、多能性を制御する際には Oct4、Sox2、Nanog、Tcf3 を介した遺伝子ネットワークと協調して働き、分化を制御する際には主に Tcf3 を介することを示唆するものと考えられた。

以上の所見を支持するように、マウス ES 細胞における共免疫沈降により、 $\beta$ -カテニンは Tcf3 のみならず上記の多能性転写因子群と結合することを見出した。さらに、領域 A に存在する Oct と Sox の複合認識配列に対して、Sox2 と Tcf3 が競合的に結合することをゲルシフトアッセイで確認した。

次に、クロマチン免疫沈降とマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を組み合わせ、2i 培養（前述）におけるゲノム DNA 上の  $\beta$ -カテニンの分布と遺伝子発現の関係を解析した。CHIR99021 処理による Wnt/ カテニン経路の活性化に応じて、 $\beta$ -カテニンの多能性関連遺伝子と分化関連遺伝子周辺への誘導が確認された。一方 2i 処理では、 $\beta$ -カテニンはその両方の遺伝子周辺に誘導されるものの、分化関連遺伝子の発現が有意に抑制されることが判明した。さらに、 $\beta$ -カテニン結合領域を詳細に調べると、MEK 経路に反応して働く Ets という転写因子の認識配列が

存在することを見出した。これらの結果は、Wnt/ カテニン経路の分化誘導作用が Tcf3 及び MEK 経路下流で働く Ets との協調作用によることを示唆する。さらに、2i 培養においては、Wnt/ カテニン経路の活性化と MEK の抑制を併用することで、Wnt/ カテニン経路の多能性維持作用のみが効率的に引き出されていると考えられた。

以上の一連のデータは、Stem Cells 誌上で発表された(5.雑誌論文3)。現在、Ets の関与を調べるため、マウス ES 細胞において、Ets の機能喪失が多能性に与える影響を調査している。

最後に、これまでに得られたデータを転写複合体の観点から理解するための、プロテオーム解析に着手した。カテニンの転写複合体のアフィニティー精製を行うためのカラム洗浄と溶出条件の最適化までが終了した。プロテオーム解析については、今後も継続して行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Hojo H, Ohba S, Chung UI: Signaling pathways regulating the specification and differentiation of the osteoblast lineage. *Regenerative Therapy* 1:57-62, 2015
2. Ohba S, Chung UI: PTHrP action on skeletal development: a key for the controlled growth of endochondral bones. *Clin Rev Bone Miner Metab* 12:130-141, 2014
3. Zhang X, Peterson KA, Liu XS, McMahon AP, Ohba S (co-first): Gene regulatory networks mediating canonical Wnt signal directed control of pluripotency and differentiation in embryo stem cells. *Stem Cells* 31:2667-2679, 2013

doi: 10.1002/stem.1371.

4. Saito T, Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H: Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS ONE* 8(9):e74137, 2013  
doi: 10.1371/journal.pone.0074137.
5. Komiyama Y, Ohba S, Shimohata N, Nakajima K, Hojo H, Yano F, Takato T, Docheva D, Shukunami C, Hiraki Y, Chung UI: Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. *PLoS ONE* 8(4): e60203, 2013  
doi: 10.1371/journal.pone.0060203.

〔学会発表〕(計2件)

1. 大庭伸介: 骨格発生メカニズムの理解と骨・軟骨再生医療. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウム 生体ネットワークによる調和を目指した再生医療, 2013.9.20, 岡山コンベンションセンター(岡山)
2. 大庭伸介: 骨芽細胞と軟骨細胞における転写ネットワークとエピジェネティクス. 日本補綴歯科学会第122回学術大会シンポジウム3 個別化医療で補綴歯科治療は変わるか:EBMから個別化医療へ, 2013.5.19, 福岡国際会議場(福岡)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp/med/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大庭 伸介 (OHBA, Shinsuke)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号 : 20466733

### (2)研究分担者

鄭 雄一 (TEI, Yuichi)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号 : 30345053

小宮山 雄介 (KOMIYAMA, Yusuke)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 90586471

### (3)連携研究者

なし