

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570233

研究課題名(和文)着床による幹細胞の性質転換とNodalシグナルの多能性維持機能の獲得

研究課題名(英文)Epiblast pluripotency regulated by Nodal signal

研究代表者

角 智行(sumi, tomoyuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90378894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：初期胚における内部細胞塊としてES細胞を、原始外胚葉としてエピブラスト幹細胞(EpiSCs)をモデルとし、幹細胞の分化転換機構の解明に取り組んだ。E5.5原始外胚葉とEpiSCsの遺伝子発現を比較した結果、EpiSCsでは古典的Wntシグナル下流の中胚葉マーカーの発現が亢進していた。Wntシグナルの役割を調べるため、これを活性化するCHIR99021でEpiSCsを処理した結果、未分化を維持出来ず中胚葉への分化が認められた。逆に、これを抑制するXAV939処理では自発的分化が抑制され、未分化状態を維持できた。この様に、WntシグナルはEpiSCsの多能性維持に必須ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Epiblast stem cells (EpiSCs) are primed pluripotent stem cells and can be derived from postimplantation mouse embryos. We now show that the absence of canonical Wnt/beta-catenin signaling is essential for maintenance of the undifferentiated state in mouse EpiSCs and in the epiblast of mouse embryos. Attenuation of Wnt signaling with the small-molecule inhibitor XAV939 or deletion of the beta-catenin gene blocked spontaneous differentiation of EpiSCs toward mesoderm and enhanced the expression of pluripotency factor genes, allowing propagation of EpiSCs as a homogeneous population. EpiSCs were efficiently established and propagated in the presence of both XAV939. Such an improvement in the homogeneity of pluripotency achieved with the use of a Wnt inhibitor should prove advantageous for manipulation of primed pluripotent stem cells.

研究分野：生物学

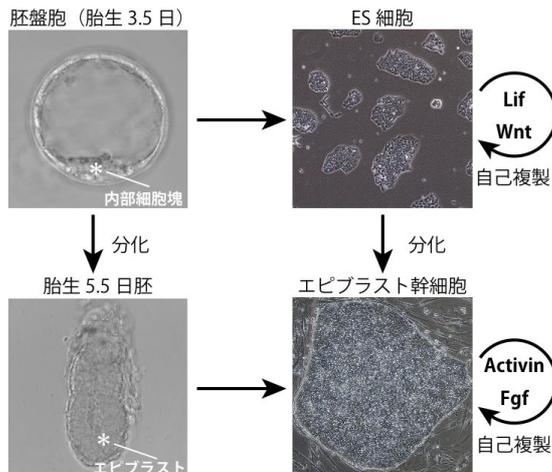
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：幹細胞 エピブラスト Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞(embryonic stem cells; ES 細胞)は、私達の体を構成する全ての細胞に分化する多能性と、無限の増殖性のために生物学、再生医学分野において精力的に研究されている。しかし、ES 細胞の自己複製(未分化性維持・増殖)過程は未だ不明な点が多く残されており、ES 細胞の特性と初期胚発生との関連性を明らかにしていくことは細胞生物学や発生生物学、再生医学分野において重要な課題の一つである。

これまでにマウスの初期胚から、内部細胞塊からは ES 細胞、着床後の原始外胚葉からは胚盤葉上層由来幹細胞(epiblast stem cells; エピプラスト幹細胞)の二つの多能性幹細胞が樹立されている。興味深いことにエピプラスト幹細胞はヒト ES 細胞と性質が類似している一方、着床前の性質を持つ ES 細胞とは異なることである。マウス ES 細胞とヒト ES 細胞は、その増殖能の違いや増殖因子の要求性、未分化維持のシグナル等大きく異なることが知られていた。しかし、マウスエピプラスト幹細胞が樹立されたことによって、これまで種間の違いあると考えられてきたこれら幹細胞間での性質の違いは、発生段階の違いに由来することが明らかになってきた(下図)。



例えば Nodal/Smad2 シグナルは、着床前胚に既に発現しているにも関わらず内部細胞塊に対してはほとんど機能していない。しかし、着床後胚においては原始外胚葉の多能性維持機能を担い、また更に発生が進むと原条形成。中胚葉誘導における責任因子として機能する。同じことが発生段階の異なる細胞から樹立された ES 細胞、エピプラスト幹細胞それぞれに対する応答性の違いとして認められている。このような異なる発生段階によって何故その様な幹細胞の性質の違いが生じるのか、胚発生において何故その様な質的変化が必然的に起きるのか未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本計画研究では、初期胚発生過程の内部細胞塊として ES 細胞株を、原始外胚葉としてエピプラスト幹細胞株をモデル系とし、生体において着床前後に生じる幹細胞の性質転換、胚体外・胚体内組織由来のシグナル因子に対する応答性の変化がどのような分子機構によって成立するのか、そのメカニズムを分子・細胞レベルで明らかにすることを目的とした。特に、初期胚発生において中心的な役割を担っている Nodal/Smad2, Wnt/ β -catenin シグナルに焦点を当て、着床前後の幹細胞未分化性維持に対するシグナル経路の役割、幹細胞の質的変換の実体を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、以下に示すサブテーマを遂行することで、着床前後の幹細胞において Nodal/Smad2, Wnt/ β -catenin シグナルがどのような機構で多能性維持の責任因子として機能変換するのかを、異なる発生段階から樹立された ES 細胞、エピプラスト幹細胞をモデルとして解明する。

- (1) FoxH1(Smad2 の DNA 結合パートナー), β -catenin それぞれの野生型および変異型 ES 細胞株の樹立およびエピプラスト幹細胞の樹立とその性状解析。ES 細胞の樹立は E3.5 胚盤葉より、またエピプラスト幹細胞は E5.5, E6.5 の原始外胚葉より樹立を行った。
- (2) 胎生 5.5 日胚およびエピプラスト幹細胞株の遺伝子発現プロファイル。次世代シーケンサーにより遺伝子発現を網羅的に解析し、両者における遺伝子発現を比較検討した。
- (3) 着床前後の幹細胞における Nodal/Smad2, Wnt/ β -catenin 下流遺伝子の同定とその機能解析。

4. 研究成果

- (1) ES 細胞、エピプラスト幹細胞の樹立とその性状解析。

ES 細胞樹立に関しては、既存の方法により E3.5 胚盤葉より樹立した。エピプラスト幹細胞に関しては、既存の方法では樹立・維持が困難(自発的細胞分化により幹細胞の性状を維持出来ず)であり当初の計画が大幅に遅れた。

そこでエピプラスト幹細胞の樹立・維持を容易にしていいため、マウス胎生 6.5

日よりもより未分化である胎生 5 . 5 日胚の原始外胚葉とエピプラスト幹細胞の遺伝子発現プロファイルの比較を行い、多能性維持・細胞分化と関連する因子を模索した。その結果、5 . 5 日胚と比較してエピプラスト幹細胞では中胚葉・内胚葉マーカーの発現が高く、特に古典的 Wnt シグナルおよびこれに調節される遺伝子群が多く発現していることを見出した。

古典的 Wnt シグナルはマウス ES 細胞においてはその多能性維持に必須であることが知られているが、マウス初期胚発生過程においては原条形成・中胚葉誘導を担う重要なシグナル経路である。そこで、エピプラスト幹細胞における古典的 Wnt シグナルの機能を明らかにするため、このシグナルの活性化あるいは阻害する低分子化合物を用いて詳細な解析を行った。エピプラスト幹細胞を Wnt シグナルの活性化剤である CHIR99021 で処理すると、未分化マーカーの発現が低下すると共に中胚葉への分化誘導が確認された。これに対して、Wnt シグナルを抑制する XAV939 の処理では、エピプラスト幹細胞はその自発的分化が抑制され、均一な細胞集団として維持できることが確認された。

エピプラスト幹細胞における Wnt シグナルの必要性を明確にするため、その下流の β -catenin を欠損したエピプラスト幹細胞を樹立し解析した。その結果、 β -catenin を欠損したエピプラスト幹細胞は、中胚葉・内胚葉で発現する分化マーカーの発現が消失し、より均一な状態で未分化性が維持されていることが確認された。次に、エピプラスト幹細胞株の樹立時における Wnt シグナル抑制の効果を検討した。これまでの方法では、胎生 6 . 5 日胚の原始外胚葉からエピプラスト幹細胞を樹立する際、Activin, Fgf2 だけでは自発的分化が抑えきれず樹立は困難だった。しかし、Activin, Fgf2 と共に XAV939 を加えることにより樹立効率が飛躍的に改善した。更に XAV939 存在下で樹立・維持されたエピプラスト幹細胞は、胎生 6 . 5 日胚に移植すると三胚葉に由来する細胞種に分化可能であり多能性を維持していることが確認された。

この様に古典的 Wnt/ β -catenin シグナルは、エピプラスト幹細胞の多能性維持に必要ではなく、むしろこれを阻害することによって自発的な分化が抑えられ、より未分化で均一な細胞集団として樹立・維持することが可能となった。この様な古典的 Wnt シグナルを阻害する低分子化合物を用いることで、今後、エピプラスト幹細胞と同じプライム型であるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞の樹立や維持においてもその効果が期待される。

(2) Nodal/Smad2, Wnt/ β -catenin 標的遺伝子の同定とその機能解析。

Smad2, β -catenin 標的遺伝子に関しては、既存の ChIP-seq データを解析することで、幾つかの候補遺伝子を抽出した。その中には、既に報告のある Nanog や Foxd3, Fgf 遺伝子に加え、未だ関連性が明らかにされていない遺伝子を複数得ることができた。現在、これら遺伝子の着床前後における機能を明らかにするため、遺伝子破壊や抑制、過剰発現等の方法で解析中である。

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 5 件)

- (1) Keiko Kitajima, Shinya Oki, Yasuyuki Ohkawa, Tomoyuki Sumi, Chikara Meno: Wnt signaling regulates left-right axis formation in the node of mouse embryos. *Developmental biology* 380, 222-232 (2013), 査読有り, doi: 10.1016/j.ydbio.2013.05.011.
- (2) Tomoyuki Sumi, Shinya Oki, Keiko Kitajima, Chikara Meno: Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/ β -catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. *Plos One* 8, e63378 (2013), 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0063378
- (3) Norihiro Tsuneyoshi, Ee Kim Tan, Akila Sadasivam, Yogavalli Poobalan, Tomoyuki Sumi, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori and N. Ray Dunn: The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells. *Genes & Development* 26, 2471-2476 (2012), 査読有り, doi: 10.1101/gad.201772.112
- (4) Rie Tatsumi, Yutaka Suzuki, Tomoyuki Sumi, Masakatsu Sone, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji: Simple and highly efficient method for production of endothelial cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplantation* 20, 1423-1430 (2011), 査読有り, doi: 10.3727/096368910X547444
- (5) Akira Saito, Naoko Miyauchi, Takeko Hashimoto, Tamaki Karasawa, Gi Dong Han, Mutsumi Kayaba, Tomoyuki Sumi, Masayuki Tomita, Yohei Ikezumi, Kenji Suzuki, Yasushi Koitabashi, Fujio

Shimizu, and Hiroshi Kawachi:
Neurexin-1, a presynaptic adhesion
molecule, localizes at the slit
diaphragm of the glomerular podocytes
in kidneys. *Am J Physiol Regul Integr
Comp Physiol.* 300, R340-R348 (2011),
査読有り, doi:
10.1152/ajpregu.00640.2009

〔学会発表〕(計 0件)

〔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
<http://www.dev.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角 智行 (SUMI, TOMOYUKI)
九州大学大学院医学研究院・特任助教
研究者番号: 90378894

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: