

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07395

研究課題名（和文）ヒト多能性幹細胞維持における細胞間コミュニケーションの役割と新規情報伝達機構解析

研究課題名（英文）Exploring role of cell-cell communication in human embryonic stem cells

研究代表者

大串 雅俊（Ohgushi, Masatoshi）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：00462664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトES細胞におけるセマフォリンシグナルの役割を解析するプラットフォームとして、Crispr-cas9システムを用いたconditionalノックアウト（KO）系の構築を試みた。

先行研究のストラテジーを適宜改良し、SEMA6A遺伝子の2ndエクソンをloxP配列で挟んだゲノム編集株を調製し、Cre発現プラスミドの導入によるSemaphrin-6Aのconditional KOに成功した。SEMA6A KOはヒトES細胞の維持培養に異常をきたすことを示唆するデータを得ており、引き続きこの実験系をベースとして、多能性幹細胞におけるセマフォリンシグナルの役割の解析を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES/iPS細胞を用いた新たな医療・創薬への期待を背景として、様々な細胞を分化誘導する研究が世界中で活発に行われている。しかしながら、それらの学術成果の実用化を見据えた場合、分化誘導手法の再現性、細胞株間での性質のばらつき、そして原材料である多能性幹細胞培養の不安定さ（頻繁な細胞死や自発分化）など、品質と汎用性を担保した大規模細胞調製を達成するための課題は山積している。幹細胞研究の成果を多くの国民に届けるために、セマフォリンシグナルを介した細胞間コミュニケーションの実体解明を進め、多能性幹細胞の高品質化を達成したい。

研究成果の概要（英文）：In this research, I aim to explore roles of semaphori-6A, a signaling molecule implicated in axon guidance, in human embryonic stem cell (hESC) biology. For this end, I try to develop a conditional gene knockout system using a Crispr-cas9 genome editing tool. Following the improved strategy, I established some hESC lines in which 2nd exon of SEME6A gene were flowed. I confirmed that lentivirus-mediated introduction of Cre recombinase induced deletion of 2nd exon and the expression semaphoring-6A protein decreased to the undetectable level. Preliminary data suggested that SAMA6A gene-disrupted hESCs show some abnormal phenotypes. This experimental platform allows us to genetically explore the function of a given gene that plays essential role in hESCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒトES細胞 多能性 細胞間接着 セマフォリン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) は、初期胚内の多能性組織を培養して得られる幹細胞である。無限増殖能と多分化能を併せもつため、機能性細胞の試験管内調製の原材料として期待されている。しかしながら、本来多能性とは初期胚にのみ現れる形質である。特に霊長類では、長期間の未分化性維持を伴う生体现象が認められていない。そのため、ヒト ES 細胞における多能性の長期的維持を支える分子機構には未だ謎が多い。一方、各組織に存在する体性幹細胞に関しては、モデル生物を用いた *in vivo* 解析が強力なツールとして利用できることもあり、各々の未分化性維持機構が明らかとなりつつある。多くの組織幹細胞は、特殊な微小環境下 (ニッチ) で幹細胞性が維持されており、環境パラメーターの変化を感知して増殖や分化などの運命を選択する。様々なモルフォゲンや細胞外基質がニッチ因子として同定されているが、細胞表面分子を介した細胞間コミュニケーションが決定因子となるケースも知られている。

我々は、細胞自発的な相互コミュニケーションがヒト多能性幹細胞の運命選択に関与することを見だし、その詳細に関して研究を行ってきた。これまでに、細胞間接着がヒト ES 細胞の生存維持に必須であること⁽²⁾、そして分散に伴う細胞死の詳細な分子カスケードを解明している^(3,4)。その後、隣接細胞同士の生存シグナルコミュニケーションを仮定し、その実体解明を試みってきた。これまでの研究経過を踏まえ、(i) ヒト ES 細胞で高発現している細胞表面分子、(ii) 細胞骨格や細胞運動に関与する分子、(iii) プライム型多能性幹細胞特異性を示す分子、を中心に検討を進めてきたところ、セマフォリン分子の一つである SEMA6A が有力なターゲットとして浮上してきた。

2. 研究の目的

本研究では、プライム型幹細胞であるヒト ES 細胞の特性維持における隣接細胞間の直接的コミュニケーションの重要性に着目し、神経ガイダンス因子として知られるセマフォリンを有力な候補分子として遺伝学的に機能解析することを目指す。そのために、近年発展著しいゲノム編集技術を駆使して操作性の高い遺伝子欠損誘導系を構築し、セマフォリンシグナルのヒト ES 細胞における役割解明に向けた研究を実施する。

3. 研究の方法

本研究では、以下の実験項目に沿って研究を行った。

- (1) SEMA6A 遺伝子をコンディショナルにノックアウトできるモデル細胞株を樹立し、ヒト ES 細胞の生存や分化における SEMA6A の必要性を明らかとする。
- (2) ES 細胞における SEMA6A 受容体を同定する。

4. 研究成果

- (1) SEMA6A 遺伝子をコンディショナルにノックアウトできるモデル細胞株の作製

ヒト SEMA6A 遺伝子 2nd エクソン (開始コドンを含む) 欠損株の調製を行ったところ、片アレルを欠損するヘテロ変異株は多数取得できたものの、ホモ欠損株を得ることができなかった。このことは、SEMA6A 遺伝子 2nd エクソンのホモ欠損がヒト ES 細胞の特性維持に影響を及ぼす可能性を示唆したため、先行研究 (1) を参考に、コンディショナルに遺伝子欠損の誘導が可能な細胞株樹立を試みた。

当初は上記先行研究に従ってゲノム編集株の調製を進めていたものの、得られた改変株は培養を続ける中で突発的なりコンビネーションを起こしてしまい、そのため安定的に維持培養可能な株を得ることが難しいことがわかった。そこで、ドナーベクターの構成やコンビネーション誘導のストラテジーを再検討し SEMA6A 遺伝子の 2nd エクソン 2 を loxP で挟んだ改変株を得ることに成功した (図 1)。両アレルに loxp-2nd エクソン-loxp がノックインされたホモ flox 株を 4 株

(SEMA6A^{Flox/flox})、片アレルが 2nd エクソン欠損のヘテロ flox 株 (SEMA6A^{Δex2/flox}) を 3 株、合計で 7 株の樹立した (図 2b)。各株に Flipase 発現ベクターを導入し、pgk-puroR カセットが切り出された株を再度サブクローニングした (図 2c)。ゲノム改変を PCR とシークエンスにより確認し、この後は両アレル改変株 (SEMA6A^{Flox/flox}、#37-5) を用いて検討することとした。

この改変株をベースに、薬剤依存的 Cre 活性化システムの導入を試みた。タモキシフェンにより活性化が可能な ERT2-Cre-ERT2 の発現カセットを、トランスポゾンシステムにより導入したところ、薬剤なしの状態でもコンビネーションが起こってしまうトラブルに見舞われた。マウス ES 細胞では問題なく機能することを確認しているのだが、理由は不明だがヒト ES 細胞では

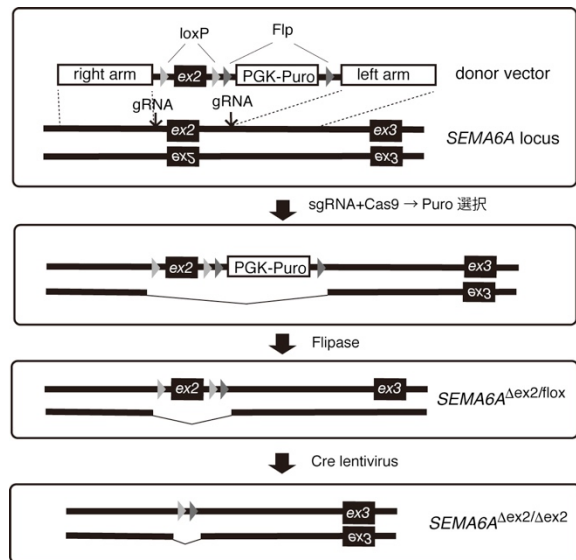


図 1. SEMA6A conditional knockout のためのゲノム改変

ERT2 による核外アンカリングからの漏れが大きいことが予想された。プロモーターなどを複数検討して低発現を試みるなど色々と工夫はしてみたものの、このトラブルは未だ克服できていない。

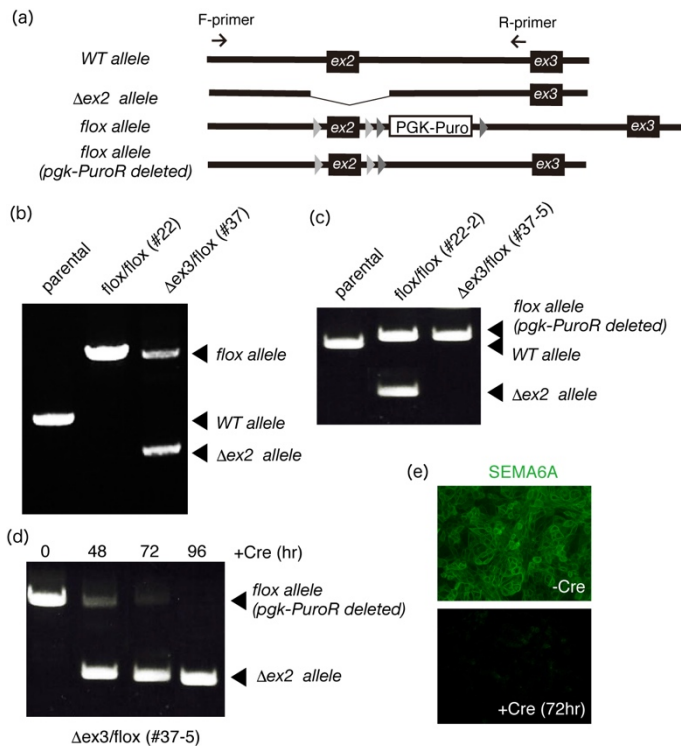


図 2. SEMA6A 遺伝子改変株の調整

そこで、当初の計画を変更して、レンチウイルスを用いた Cre の導入を検討した。EF1a プロモーター下に Cre を発現するウイルスベクターを調製し、293T 細胞にて産生したリコンビナントウイルスを *SEMA6A*^{Flox/flox} ES 細胞株 (#37-5) に感染させた。ゲノム PCR の結果からは、レンチウイルス感染後 72 時間には 2nd エクソンの喪失が認められ、SEMA6A タンパクの発現低下も免疫染色により確認できた (図 2 d, e)。フローサイトメータによる定量解析からは、>90%の細胞は SEMA6A 陰性になることが分かった。感染効率の問題から 100%のノックアウトはまだ難しいもの、Cre 遺伝子の導入によりコンディショナルノックアウトを達成できた。またプレリミナリーな観察結果として、Cre 発現細胞の一週間後にはコロニー数が減少すること、未分化マーカーの発現が減少することが認められ、SEMA6A がヒト ES 細胞の増殖・生存や自己複製に関与することが示唆された。

(2) ES 細胞における SEMA6A 受容体の探索

クラス 6 型セマフォリンは、A 型プレキシンを受容体することが知られている。A 型プレキシンには A1~A4 の 4 つのサブタイプが存在するが、SEMA6A の場合は PLEXIN-A2 または PLEXIN-A4 を介して細胞骨格の再編成を誘起することが、神経細胞などを用いた研究から明らかとなっている。これらの PLEXIN の発現をヒト ES 細胞と分化誘導した神経組織で比較したところ、PLEXIN-A2、A4 とも ES 細胞では発現がほとんど認められなかった (図 3)。このことは、ES 細胞に置いて SEMA6A は PLEXIN-A2/A4 とは異なる受容体を介して機能する可能性が考えられる。

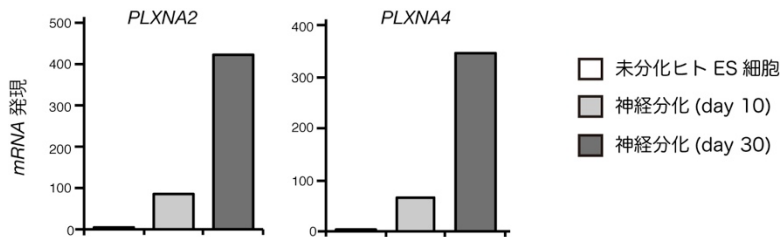


図 3. ヒト ES 細胞および ES 由来神経外胚葉における PLXNA2/A4 の発現比較

(研究の意義)

本研究では、SEMA6A 遺伝子をモデルとして、ヒト ES 細胞におけるコンディショナルな遺伝子ノックアウトを行うための技術開発を行った。先行研究のストラテジーでは良好な結果を得ることができなかったが、種々の工夫を加えることで、オン・オフ感度の高い遺伝子ノックアウトを達成することができた。本手法は様々な遺伝子に対して適応可能であり、個体での逆遺伝的解析が不可能なヒトにおける有力な遺伝学的分子機能解析法として、今後の広い範囲での活用が期待できる。

一方で、遺伝子操作手技の最適化に大きく時間がかかってしまったため、肝心のセマフォリンシグナルに関する分子的解析を進めることができなかった。ただし、SEMA6A ノックアウトによる細胞異常は認められていることから、引き続きこのシステムをプラットフォームとした信頼性の高い分子機能解析を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohgushi Masatoshi	4. 巻 1821
2. 論文標題 A Practical Protocol for the Conditional Depletion of Rho Isoforms in Human Embryonic Stem Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 283-295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8612-5_20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohgushi Masatoshi, Minaguchi Maki, Eiraku Mototsugu, Sasai Yoshiki	4. 巻 9
2. 論文標題 A RHO Small GTPase Regulator ABR Secures Mitotic Fidelity in Human Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 58 ~ 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2017.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masatoshi Ohgushi
2. 発表標題 Characterization of the progenitor cell state during ESC-to-trophoblast differentiation
3. 学会等名 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Ohgushi
2. 発表標題 A RHO Small GTPase Regulator ABR Secures Mitotic Fidelity in Human Embryonic Stem Cells.
3. 学会等名 ISSCR 2018 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masatoshi Ohgushi
2. 発表標題 Intrinsic genetic program that drives trophoblast differentiation from human ES cells
3. 学会等名 第16回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----