

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19282

研究課題名（和文）特異的タンパク質分解を利用した幹細胞の効率的分化誘導プラットフォームの確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for improving the efficiency of stem cell differentiation using a protein knockdown strategy

研究代表者

清水 康平（Shimizu, Kouhei）

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70727073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、幹細胞の高効率な分化誘導法確立のための新たなプラットフォームの構築を目的とし、低分子化合物による特異的タンパク質分解を薬理作用として想定した細胞分化の表現型スクリーニング系を構築した。本スクリーニング系は、細胞分化を制御可能な化合物の同定に加え、その薬理作用機序から細胞分化制御の分子基盤解明に資する手法として一定の有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞を用いた再生医療において、目的とする組織に均一な細胞集団として必要とされる容量を安定的に供給することが必要であり、高効率で精度の高い細胞分化誘導法の確立が求められている。本研究では、化合物を用いた特異的なタンパク質分解の誘導により分化を制御するというアプローチで高効率分化誘導法の確立に取り組み、一定の成果が得られた。また、本手法は分化制御における新規重要因子の発見に繋がるという点において学術的な意義を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish a novel method to improve the efficiency and reproducibility of stem cell differentiation. To this end, we employed a protein knockdown strategy based on small-molecule compounds-inducible proteasomal degradation for controlling cell differentiation. The method developed in this study would be helpful to identify the compounds and its degradation target which enables to regulate cell differentiation.

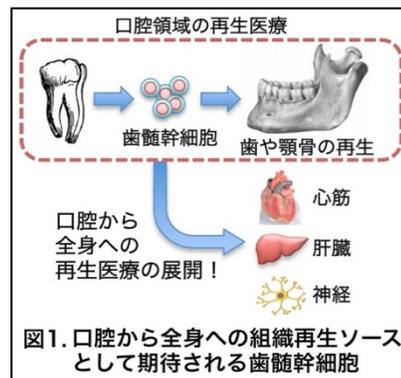
研究分野：タンパク質翻訳後修飾

キーワード：再生医療 細胞分化 プロテインノックダウン

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

現在、再生医療が目覚ましい発展を続ける中、幹細胞治療において歯髄幹細胞が有効な幹細胞ソースとして注目を集めている。その理由として、歯髄幹細胞は、1) 自然に抜けた乳歯や歯科治療により抜歯した歯から入手できるため採取が容易であり、患者への負担が少ないこと、2) 高い細胞増殖能を有し、迅速な治療の着手や産業化が可能であること、3) 移植治療後のがん化の危険性が少ないこと、4) 骨・筋・神経・肝細胞等への優れた分化多能性を有すること、5) 高効率でiPS細胞誘導が可能であることが挙げられる。これらの有益性から、口腔から全身の組織再生に向けた臨床応用への期待が高まっており、精度の高い分化誘導法の確立が求められている(図1)。そのため、分化誘導因子の組合せや濃度、処理のタイミング、細胞密度、マトリクス等これまでに様々な検討が精力的になされてきた。しかしながら、臨床応用を実現するためには依然として多くの分化誘導系でさらなる効率改善が必要とされている。従って、本課題を解決するためには、既存の方法論を刷新する革新的手法で効率的な分化誘導法の確立を目指す必要があると考えられた。

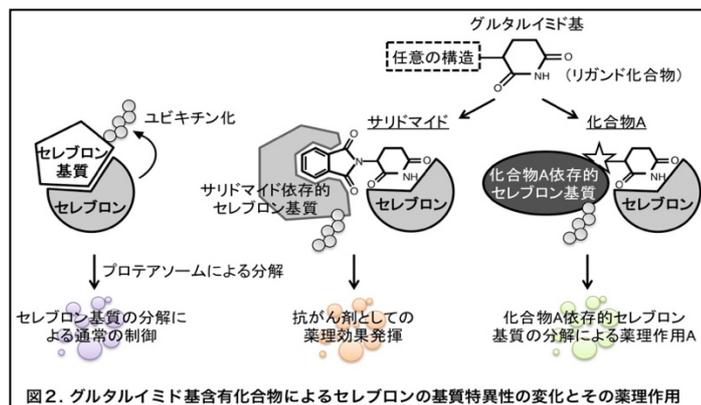


2. 研究の目的

歯髄幹細胞は他の組織由来の間葉系幹細胞と比べて、低侵襲で採取可能であること、高い細胞増殖能を持つこと、高効率でiPS細胞誘導が可能であることから、再生医療への応用が期待される。そこで本研究では、歯髄幹細胞を用いた再生医療の実現に向けて効率的な分化誘導法確立のための新しいプラットフォームを構築する。そのモデルとして、骨芽細胞の高効率分化誘導法を開発する。また、分化誘導高効率化が実現された場合、その分子基盤を解明することで、より高精度な細胞分化制御法の開発に還元することを目指す。

3. 研究の方法

近年、分子標的療法として腫瘍化タンパク質の特異的な分解を薬理作用とする抗がん剤の開発が進められている(Matyskiela et al., Nature, 2016; Lu et al., Chemistry & Biology, 2015)。本研究では、このメディエーターとして基質タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームによる特異的なタンパク質分解を誘導するユビキチン化酵素“セレブロン(CRBN)”に着目した。CRBNは、グルタルイミド基を持つリガンド化合物が結合すると、その構造により本来とは異なる基質を特異的に認識し、分解を誘導することで薬理効果を発揮する(図2)。多発性骨髄腫の治療薬として再び認可されたサリドマイドの薬理作用はまさにこの原理に基づいている。このCRBNの特性を利用して、グルタルイミド基を有する化合物ライブラリーを用いた表現型スクリーニングを行えば、リガンド化合物-CRBN 依存的タンパク質分解を介した様々な薬理作用の検討に利用できると考えられた。そこで本研究では、歯髄幹細胞の分化制御を可能にする化合物の探索に応用することを目指した。

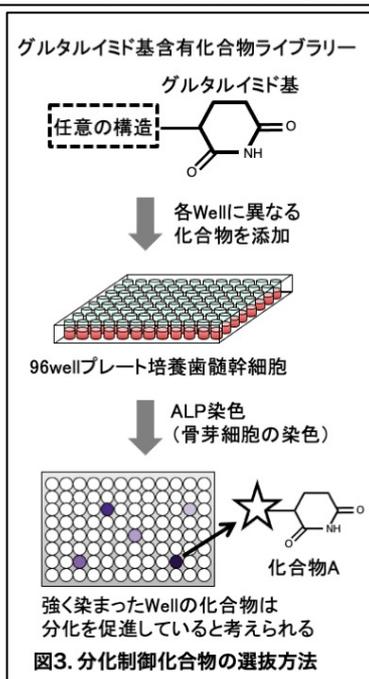


(1) CRBNによる化合物誘導性特異的なタンパク質分解を利用した細胞分化制御化合物の探索

グルタルイミド基含有化合物を用いて表現型スクリーニングを実施することにより、歯髄幹細胞から骨芽細胞へと効率的に分化を誘導・促進する化合物を選抜する(図3)。また、選抜した化合物がCRBN-/-歯髄幹細胞では分化誘導・促進の効果が無いことを確認する。

(2) 化合物依存的に分解するCRBN基質の同定

エピトープタグを付加したCRBNを安定的に発現する細胞株を樹立し、その細胞抽出液と選抜化合物を混合後、タグ抗体結合ビーズにより免疫沈降物を回収する。その後、質量分析により、選抜化合物を添加した場合にのみCRBNと結合する化合物依存的基質を同定する。また実際に、同定基質が選抜化合物の



添加により、CRBN 依存的にユビキチン化・分解されるか CRBN^{-/-}細胞を用いて検証する。

(3) 同定基質の骨芽細胞分化における役割の解析

化合物依存的 CRBN 基質の分解により骨芽細胞分化が促進されるというコンセプトから、同定基質は骨芽細胞分化における阻害因子の可能性が高い。まず、歯髄幹細胞で同定基質をノックダウンし、骨芽細胞分化が促進されることを ALP 染色及び分化マーカーの発現を指標に確認する。その後、トランスクリプトーム解析を行い、同定基質のノックダウン及び化合物処理により転写レベルで変化のある遺伝子群を見出す。さらに、バイオインフォマティクスを活用し、シグナル解析・タンパク質相互作用解析・転写因子予測を行い、同定基質が制御する骨芽細胞分化関連シグナル伝達を明らかにする。

4. 研究成果

(1) CRBN による化合物誘導性特異的タンパク質分解を利用した細胞分化制御化合物の探索

初年度は骨芽細胞分化をモデルとし、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞である UE7T-13 細胞を用いて選定したグルタルイミド基含有化合物の細胞毒性を評価し、適正な化合物濃度の範囲を設定した。その後、それらの化合物が UE7T-13 細胞の骨芽細胞分化に与える影響をアルカリフォスファターゼ染色により評価した。各化合物の処理により分化誘導状態の様々なバリエーションが確認でき、表現型スクリーニングの適正な条件を設定することができたと考えられる。

次年度は化合物を拡充し、前年度に設定したスクリーニング条件をもとに、骨芽細胞分化に加え、破骨細胞分化を制御可能な化合物の同定を目指した。破骨細胞分化は RAW264.7 細胞を用いて TRAP 染色により評価した。その結果、各化合物の投与により骨芽細胞・破骨細胞共に分化誘導状態の様々なバリエーションを確認することができた。

(2) 化合物依存的に分解する CRBN 基質の同定

当初の研究計画では、骨芽細胞分化を促進する化合物の同定を目指していた。本研究では、いくつか微弱に分化促進活性を示す化合物が同定できたものの、顕著な促進活性を示すものは見出すことができなかった。一方で、細胞毒性をほとんど与えることなく細胞分化を強力に抑制する化合物を同定することに成功した。そこで、骨芽細胞分化の新規制御機構を明らかにすることで、より効果的な細胞分化制御法の導出へと繋げていくことを目的に、後者の化合物に対する CRBN 基質の同定を試みることにした。生化学的な解析の結果、当該化合物の細胞への投与により、ネオ基質と考えられるタンパク質の著しいプロテアソーム分解が確認され、細胞分化制御の薬理作用として寄与している可能性を見出した。現在、CRBN^{-/-}細胞を樹立し、化合物薬理作用の CRBN 依存性の解析を進めている。

細胞分化制御法の確立において、低分子化合物を用いたプロテインノックダウン技術に基づく表現型スクリーニングの一定の有用性が示されたが、技術確立と今後の医療応用に向けて、同定したネオ基質の細胞分化における機能の詳細を明らかにしていく必要がある。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Kouhei, Nihira Naoe Taira, Inuzuka Hiroyuki, Wei Wenyi	4. 巻 46
2. 論文標題 Physiological functions of FBW7 in cancer and metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2018.02.009	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 該当する

1. 著者名 Watahiki Asami, Shimizu Kouhei, Hoshikawa Seira, Chiba Mitsuki, Kitamura Hiroshi, Egusa Hiroshi, Fukumoto Satoshi, Inuzuka Hiroyuki	4. 巻 524
2. 論文標題 Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 477 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.119	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 康平、千葉 満生、犬塚 博之、福本 敏
2. 発表標題 ユビキチン-プロテアソーム経路の破綻によるMCL1安定化機構とその制御方法の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星川 聖良、千葉 満生、綿引 麻美、清水 康平、犬塚 博之、福本 敏
2. 発表標題 プロテアソーム阻害剤を用いた効率的骨芽細胞分化誘導法の検討
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水 康平、千葉 満生、犬塚 博之、福本 敏
2. 発表標題 アセチル化による抗アポトーシスタンパク質MCL1の安定化機構とその制御方法の検討
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 綿引 麻美、清水 康平、瓜生 英尚、星川 聖良、福本 敏、江草 宏、犬塚 博之
2. 発表標題 Lipin2タンパク質分解を介したマクロファージ活性化調節機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
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
研究 分担者	犬塚 博之 (Inuzuka Hiroyuki) (20335863)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
研究 分担者	福本 敏 (Fukumoto Satoshi) (30264253)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	