

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19614

研究課題名（和文）軟骨細胞系譜における分化段階特異的翻訳制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism underlying the chondrogenesis-specific translational regulation

研究代表者

金 永輝（JIN, YONGHUI）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90620344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞から神経堤細胞を經由して、分化誘導した間葉系間質細胞の軟骨分化誘導法を確立し、軟骨分化における翻訳制御の関与を確認した。さらに軟骨分化誘導段階において、RNA免疫沈降法を行い、翻訳開始因子eIF4G1の制御を受ける候補遺伝子の同定に成功した。そして翻訳効率解析用バイシストロニックベクターを作製し、候補遺伝子の5' UTR依存的翻訳がeIF4G1により制御されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、軟骨細胞の増殖分化にかんする転写レベルあるいは蛋白レベルの解析は数多く行われているが、それらをリンクする段階としての翻訳機構の解析は極めて重要である。社会的意義としては、軟骨組織の生理的および病的状態を翻訳制御という新しい観点から理解することで、未解決の課題の解明や新規治療法の開発に役立つ知見をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We established a method for chondrogenic induction of mesenchymal stromal cells that have been induced to differentiate from human iPS cells via neural crest cells, and confirmed the involvement of translational control in chondrogenic differentiation. At the chondrogenic differentiation induction stage, we performed RNA immunoprecipitation and succeeded in identifying candidate genes that are regulated by the translation initiation factor eIF4G1. Then, we manufactured a bicistronic vector for translation efficiency analysis and found that 5' UTR-dependent translation of candidate genes was regulated by eIF4G1.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：軟骨分化 翻訳制御 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで申請者らは、iPS細胞から骨軟骨細胞の分化誘導法を開発し、病態解明から創薬への応用を進めてきた。その1つである内軟骨性骨化による異所性骨形成を特徴とする進行性骨化性線維異形成症では、患者由来 iPS 細胞を活用した病態再現から、内軟骨性骨化の引き金となる因子としてアクチビン A を同定し(Hino et al, PNAS 2015)、更にアクチビン A の下流シグナルとして mTOR の活性化が重要な役割を果たしていることを明らかにした(Hino et al, JCI, 2017)。mTOR は、複数の細胞内シグナル伝達のハブ蛋白として様々な細胞において増殖、分化、アポトーシスなど重要な機能に関与しており、軟骨組織においても下流の p70S6K や HIF1 を介して、増殖や分化に関与していることが報告されている(Chen et al, Development 2014; Yan et al, Nature Commun, 2016; Agarwal et al, PNAS, 2016)。しかし申請者の解析により、これまで軟骨分化における関与が報告されていなかった、もう一つの主要な下流因子である eIF4F 複合体、特に eIF4G1 を阻害により、軟骨分化が顕著に抑制されることを見出した。eIF4G1 は eIF4F 翻訳開始複体の足場蛋白質として、RNA のキャップ構造に結合した eIF4E および RNA ヘリカーゼ eIF4A と結合する。このキャップ依存的な翻訳制御は数多く研究されてきたが、キャップ非依存的な翻訳制御における eIF4G1 の関与もいくつか報告されている。そしてその後の解析により、確かに軟骨分化に関連した遺伝子が転写レベルではなく翻訳レベルで制御を受けている遺伝子があることが判明し、本申請を構想するに至った。

### 2. 研究の目的

RNA レベルと蛋白レベルの解析結果の相違を理解する上で、翻訳制御機構の役割が注目されており、普遍的な現象と考えられていた翻訳が細胞特異的あるいは遺伝子特異的な制御を受けている可能性が明らかになりつつある。申請者らは稀少難病の1つである進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化形成機構の解析過程で、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化過程において、eIF4F 複合体の中心となる eIF4G1 による翻訳制御が重要な役割を果たしているという予備的知見を得た。本研究ではこの知見をもとに、独自に開発した多能性幹細胞から、未分化間葉系間質細胞を経由して、軟骨細胞を分化誘導する実験系のアドバンテージを生かして、研究分担者による最新の RNA 研究技術を応用することで、なぜ特定の軟骨関連遺伝子が分化段階特異的な翻訳制御を受けるのかを解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 段階的分化誘導法の確立

既報のヒト iPS 細胞から神経堤細胞を経由する誘導法を用いて、間葉系間質細胞(iMSC)を効率よく誘導した(Fukuta et al, PLoS One, 2014)。さらに比較的短時間で iMSC から軟骨細胞に分化できる軟骨分化誘導法を開発するために、増殖因子の種類と濃度を検討した。軟骨分化の評価はアルシアンブルー陽性を示す軟骨様結節の形成や、SOX9 など軟骨関連遺伝子の発現により行った。

#### (2) RIP アッセイ (RNA binding protein immunoprecipitation) による RNA 回収

iMSC の軟骨分化誘導段階において、eIF4G1 の制御を受ける mRNA を同定するために、ヒト eIF4G1 に対する抗体 (RIP-Certified Antibody) を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降により回収された eIF4G1 翻訳開始因子に結合する RNA (RIP-RNA) と精製した全 RNA の RNA シークエンシングを行った。

#### (3) siRNA を用いた候補遺伝子のノックダウン実験

iMSC の軟骨分化段階において、eIF4G1 に結合が増加した mRNA を同定し、それに該当する遺伝子を siRNA によりノックダウンさせた。これらの候補遺伝子の発現を抑制させることで、軟骨分化における影響をアルシアンブルー染色性および GAG (glycosaminoglycan) の産生量により検討した。

#### (4) バイシストロニックレポーターによる翻訳効率の検討

IRES (Internal Ribosome Entry Site) を介して二つのルシフェラーゼ (ホタルとウミシイタケ) のオープンリーディングフレームを接続させたバイシストロニックベクターを作製した。作製されたベクターの転写開始点に候補遺伝子の 5'UTR (非翻訳領域) を挿入し、翻訳効率における影響を検討した。

#### (5) 候補遺伝子の蛋白レベルでの変動

eIF4G1 による翻訳制御を確認するために、eIF4G1 をノックダウンさせた後、PCR およびウェスタンブロットングを行い、候補遺伝子の転写レベルと翻訳レベルの違いを検討した。さらに、マイクロアレイおよびプロテオーム解析を行い、eIF4G1 による翻訳制御の全体像を調べた。

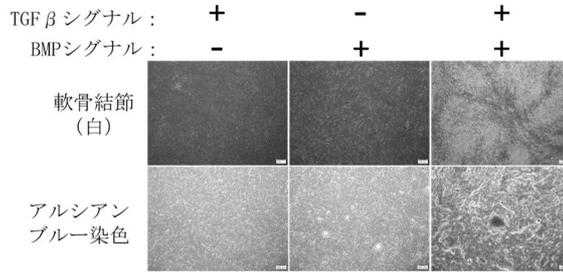
### 4. 研究成果

#### (1) 段階的分化誘導法の確立

進行性骨化性線維異形成症の病態解明の研究により、軟骨分化に TGF および BMP 両方のシグナルが必要であることが示された。この知見に従って、iPS 細胞由来 iMSC の軟骨分化に

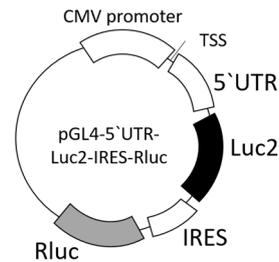
における TGFファミリーと BMP ファミリーの種類と濃度の組み合わせを検討し、比較的短時間で軟骨様結節が形成される分化誘導法の開発に成功した(図1)。従来の軟骨分化誘導の方法(三次元培養法とマイクロマス培養法)と異なり、間葉系間質細胞の単層培養で分化誘導を行うため、軟骨様結節の形成を経時的に観察することが可能である。さらに、軟骨分化誘導段階で siRNA ノックダウン、免疫沈降など分子生物学実験が効率よく実施することが可能になった。

図1：単層培養iMSCの軟骨分化誘導法の確立



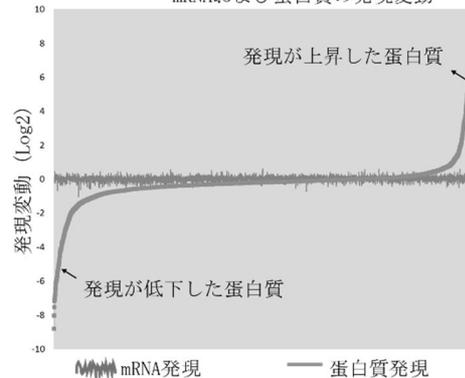
- (2) 軟骨分化における翻訳開始因子 eIF4G1 の関与  
iMSCの軟骨分化誘導段階において、siRNAによるeIF4G1のノックダウンを行った。eIF4G1をノックダウンさせても、細胞の生存に悪影響が見られなかった。この結果はiMSC段階ではeIF4G1のノックダウンにより細胞死が誘導される現象と大きく異なる。さらに、eIF4G1の発現抑制により、軟骨様結節の形成が顕著に抑制されると共に、軟骨関連遺伝子の発現も低下するという軟骨分化抑制結果が得られた。この結果により、eIF4G1による翻訳制御が軟骨分化に重要な役割をになうことを実証し、eIF4G1が軟骨関連遺伝子の翻訳を特異的に制御することが示された。
- (3) eIF4G1の翻訳制御を受けるmRNAの同定  
軟骨分化段階において、eIF4G1の抗体を用いてRIPアッセイを行い、回収されたRIP-RNAおよび全RNAのRNAシーケンシング解析を行った。全RNAに比べてRIP-RNAで発現が高く、eIF4G1に結合が増加したと予想されるmRNAを同定した。同定された候補遺伝子の中には明らかに軟骨分化に重要な役割をになう遺伝子および軟骨分化への役割が報告されていない遺伝子が含まれていた。
- (4) 同定された遺伝子の軟骨分化における役割  
RIPアッセイにより同定された候補遺伝子の軟骨分化における役割を調べるために、siRNAによるノックダウン実験を行った。軟骨分化における役割が明確な遺伝子に関しては、ノックダウンさせると軟骨分化が明らかに抑制された。一方、軟骨分化への役割が不明な遺伝子においても、ほとんどのノックダウンで軟骨様結節の形成が顕著に抑制された。この結果から、翻訳開始因子であるeIF4G1は軟骨分化段階特異的に関連遺伝子の翻訳制御を担うことが示された。
- (5) 候補遺伝子におけるeIF4G1の翻訳制御の検討  
mRNAの5'UTR(5'非翻訳領域)におけるステムループおよび特定の配列が翻訳制御に関わることが知られている。候補遺伝子における翻訳制御においても5'UTRが関与するかを検討するために、ルシフェラーゼシステムを利用した翻訳効率測定用のレポーターベクターを作製した。IRES(Internal Ribosome Entry Site)に接続された二つのルシフェラーゼのオープンリーディングフレームを持つ、翻訳効率が5'UTRに依存するバイシストロニックレポーターの転写開始点(TSS)とルシフェラーゼLuc2のオープンリーディングフレームの間に、同定された遺伝子の中から代表的な遺伝子の5'UTRを挿入し、翻訳効率を調べた(図2)。5'UTRの挿入により翻訳効率が大幅に増加される結果が得られた。更に、eIF4G1をノックダウンさせることで、この5'UTR依存的な翻訳が有意に低下した。また、ステムループを形成すると予想される配列を欠損させることで、翻訳効率が有意に減少した。これらの結果から、翻訳制御を規定する共通配列もしくはステムループ構造が存在すると確信し、その同定を進めている。

図2：翻訳効率検討用バイシストロニックベクター



- (6) 候補遺伝子の蛋白発現を確認  
PCRおよびウェスタンブロットングを行い、eIF4G1のノックダウンによる蛋白発現の低下を幾つかの候補遺伝子で確かめた。さらに、マイクロアレイおよびプロテオーム解析を行った結果、eIF4G1ノックダウンによるmRNA発現の変動はほとんど見られないが、蛋白発現が顕著に変動されることが示された(図3)。この網羅的解析を深めることで、軟骨分化段階特異的翻訳制御の全体像を調べている。

図3：eIF4G1のノックダウンによるmRNAおよび蛋白質の発現変動



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda M, Yamanaka Y, Uemura M, Osawa M, Saito Megumu K., Nagahashi A, Nishio M, Guo L, Ikegawa S, Sakurai S, Kihara S, Maurissen T, Nakamura M, Matsumoto T, Yoshitomi H, Ikeya M, Kawakami N, Yamamoto T, Woltjen K, Ebisuya M, Toguchida J, Alev C	4. 巻 580
2. 論文標題 Recapitulating the human segmentation clock with pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 124 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-020-2144-9	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 Kawai Shunsuke, Yoshitomi Hiroyuki, Sunaga Junko, Alev Cantas, Nagata Sanae, Nishio Megumi, Hada Masataka, Koyama Yuko, Uemura Maya, Sekiguchi Kazuya, Maekawa Hirotsugu, Ikeya Makoto, Tamaki Sakura, Jin Yonghui, Harada Yuki, Fukiage Kenichi, Adachi Taiji, Matsuda Shuichi, Toguchida Junya	4. 巻 3
2. 論文標題 In vitro bone-like nodules generated from patient-derived iPSCs recapitulate pathological bone phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 558 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-019-0410-7	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 Hino Kyosuke, Zhao Chengzhu, Horigome Kazuhiko, Nishio Megumi, Okanishi Yasue, Nagata Sanae, Komura Shingo, Yamada Yasuhiro, Toguchida Junya, Ohta Akira, Ikeya Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 An mTOR Signaling Modulator Suppressed Heterotopic Ossification of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.10.007	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 -

1. 著者名 Yoshitomi Hiroyuki, Kobayashi Shio, Miyagawa-Hayashino Aya, Okahata Akinori, Doi Kohei, Nishitani Kohei, Murata Koichi, Ito Hiromu, Tsuruyama Tatsuaki, Haga Hironori, Matsuda Shuichi, Toguchida Junya	4. 巻 9
2. 論文標題 Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory environments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3762 ~ 3771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06187-0	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 -

1. 著者名 Nakajima Taiki, Shibata Mitsuaki, Nishio Megumi, Nagata Sanae, Alev Cantas, Sakurai Hidetoshi, Toguchida Junya, Ikeya Makoto	4. 巻 145
2. 論文標題 Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 145 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.165431	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17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 前川裕継、吉富啓之、川井俊介、金永輝、松田秀一、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症に対するmTOR阻害剤の有効性の検討
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川裕継、吉富啓之、川井俊介、金永輝、西尾恵、永田早苗、松田秀一、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症に対するmTOR阻害剤の有効性の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金永輝、吉富啓之、西尾恵、鎌倉武史、玉置さくら、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化形成機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也、川井俊介、Yann Pretmer、櫻本玲菜、吉富啓之
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を活用した骨軟骨疾患の病態再現から創薬
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 iPS細胞の医療応用：現状と展望
3. 学会等名 第30回 メデック・ハイデック交流会（神戸医療産業都市クラスター交流会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を活用した病態解明から創薬
3. 学会等名 第30回日本小児科医会総会フォーラムin京都
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 細胞製品を用いた再生医療の展開
3. 学会等名 第56回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金永輝、吉富啓之、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化形成機構の解析
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解析から創薬
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉富啓之、川井俊介、戸口田淳也
2. 発表標題 運動器疾患に対する iPS 細胞研究の進歩 iPS 細胞を用いた新規骨分化誘導法による難治性骨疾患の病態解明と創薬
3. 学会等名 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toguchida J
2. 発表標題 Application of iPS cells for disease modeling and drug discovery.
3. 学会等名 第13回 International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 整形外科基礎領域への iPS 細胞の応用
3. 学会等名 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解析から創薬
3. 学会等名 第 91 回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toguchida J
2. 発表標題 Application of iPS cell technology for bone diseases
3. 学会等名 第 15 回 Bone Biology Forum
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解析から創薬
3. 学会等名 第 36 回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toguchida J
2. 発表標題 iPSC-based disease modeling and drug discovery for skeletal diseases.
3. 学会等名 12th Catholic International Stem Cell Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 iPS 細胞を活用した難治性疾患に対する創薬
3. 学会等名 第 4 回日本骨免疫学会
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	戸口田 淳也  (TOGUCHIDA JUNYA)  (40273502)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授   (14301)	
研究分担者	吉富 啓之  (YOSHITOMI HIROYUKI)  (50402920)	京都大学・医学研究科・准教授   (14301)	
研究分担者	齊藤 博英  (SAITO HIROHIDE)  (20423014)	京都大学・iPS細胞研究所・教授   (14301)	