

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06693

研究課題名(和文) FLCN-RAG-TFEによる代謝とエピジェネティクスを介した多能性幹細胞の制御

研究課題名(英文) Metabolic and epigenetic regulation of pluripotency via FLCN-RAG-TFE axis

研究代表者

遠藤 充浩 (Endoh, Mitsuhiro)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：40391883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞でFlcnを欠損させると、Tfe3が恒常的に核内に局在してLIF非依存性に自己複製するようになるが、Tfe3をさらに欠損させるとその表現型は失われた。Tfe3の強制的活性化により同様の表現型が誘導され、カノニカルWNT経路の活性化が起こること、その表現型がナイーブ型多能性因子EsrrbとNanogに依存することが分かった。Tfe3/Tfeb両欠損ES細胞は樹立・維持が不可能であることからTfe3/Tfebは協調的にES細胞維持に寄与すると考えられる。恒常的にTFE3を活性化させたマウス胚盤胞が試験管内で一定期間維持可能であることからTFE3が着床前胚の維持に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウスES細胞および初期胚を用いた研究を通して、リソソーム生合成のマスター転写因子であるTFE3を活性化させることにより、着床前胚の多能性状態を維持することが可能であることが分かった。この研究成果は、リソソームを介したエネルギー代謝活性の変化が多能性の遷移に関与する可能性を明らかにした点において、学術的に重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Deletion of Flcn in ES cells resulted in permanent nuclear localization of Tfe3 and LIF-independent self-renewal, whereas further deletion of Tfe3 resulted in loss of this phenotype. Forced activation of Tfe3 also resulted in the LIF-independent self-renewal phenotype, and this phenotype was dependent on the naive pluripotency factors Esrrb and Nanog. Since ES cells deficient in both Tfe3 and Tfeb could not be established and maintained, Tfe3/Tfeb may contribute to ES cell maintenance in a coordinated manner. Mouse blastocysts with constitutively activated TFE3 could be maintained for a certain period of time in vitro, suggesting that TFE3 may contribute to the maintenance of preimplantation embryos.

研究分野：幹細胞

キーワード：多能性幹細胞 胚性幹細胞 ES細胞 多能性 リソソーム 転写因子 多能性 初期発生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多能性と自己複製能を合わせ持つ細胞を多能性幹細胞と呼び、初期胚から作製される ES 細胞や、体細胞を初期化することで作製される人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が知られる。多能性幹細胞はナイーブ型とプライム型に分類される。マウス ES 細胞は着床前の初期胚から作製され、試験管内で 2i (GSK3 阻害剤と ERK 阻害剤) の存在下で初期胚に近い基底状態のナイーブ型多能性を維持することができる。サイトカイン LIF もマウス ES 細胞の維持に寄与する。一方、着床後の胚から作成されるエピプラスト幹細胞は、着床前胚から樹立される ES 細胞に比べて発生が進んでいると考えられ、プライム型に分類される。エピプラスト幹細胞の維持にアクチビンと FGF2 が必要であることが分かっている。着床前胚と、母体からの栄養供給を受ける着床後胚では、エネルギー代謝に相違があることが予想される。実際、栄養ストレス応答因子として知られる転写因子 TFE3 が 2i 培養 ES 細胞では主に核内に局在し、一方エピプラスト幹細胞では細胞質に局在する。しかしながら、内因性 TFE3 やそのファミリー遺伝子産物の多能性への機能的関与の有無や、規定状態のナイーブ型でのみ TFE3 が活性される仕組み、さらに TFE3 が媒介するエネルギー代謝と多能性との関係はよく分かっていない。申請者は、FLCN-TFE3 経路が遊離アミノ酸プールとアミノ酸由来の糖新生を制御する新規代謝経路であることを、造血系と腎癌細胞の実験系を用いて明らかにしてきた (参考文献)。本研究では、TFE3 とその抑制因子である FLCN-RagGTPase によるアミノ酸代謝制御の経路に注目することにより、多能性制御の分子基盤の解明を目指す。

### 2. 研究の目的

ナイーブ型からプライム型への多能性の遷移・分化を規定する分子機構は依然良く分かっていない。本研究では、リソソーム生合成のマスター転写因子 TFE3/TFEB とその抑制因子であるアミノ酸センシング因子 FLCN-RagGTPase の役割に注目した解析を行う。まず、マウス ES 細胞およびエピプラスト幹細胞における FLCN-Rag-TFE3/B 経路の機能解析を行い、多能性への関与と作用機序の解明を行う。さらに Flcn/Tfe3 欠損マウスや Tfe3 過剰発現マウスの初期胚発生における表現型解析を行い、FLCN-Rag-TFE3/B 経路の in vivo における役割の解析を行う。以上の解析を通して、多能性の遷移を規定する新規分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) Crispr-Cas9 技術を用いて Flcn, Tfe3, Tfeb を欠損させた ES 細胞を作成し、多能性や遺伝子発現様式への影響を調べる。
- (2) Tfe3-ERT2 融合蛋白質を発現する ES 細胞を作成して Tfe3 の恒常的活性化による影響について同様の解析を行う。
- (3) 以上で作成した ES 細胞株を用いて、Flcn-Tfe3 経路によるカノニカル WNT 経路への影響を調べる。
- (4) PRCC-TFE3 を発現するマウスおよび Tfe3 欠損マウスを導入し、TFE3 機能の恒常的活性化および欠損による初期発生への影響を調べる。

### 4. 研究成果

(1) Flcn を欠損した ES 細胞はプライム型多能性への分化抵抗性を示し、LIF 除去下で一カ月維持が可能であった (LIF 非依存性 self-renewal)。野生型 ES 細胞では Tfe3 は細胞質と核内の両方に存在するが、Flcn 欠損 ES 細胞では Tfe3 が恒常的に核内に局在していた (Fig.1)。この Tfe3 の恒常的核内移行 (Tfe3 の恒常的活性化) が Flcn 欠損 ES 細胞の LIF 非依存性 self-renewal の表現型の原因になっている可能性を確かめるため、Flcn 欠損 ES 細胞において Tfe3 をさらに欠損させたところ、その表現型が失われた。従って Flcn 欠損 ES 細胞における LIF 非依存性 self-renewal の表現型は Tfe3 に依存することが分かった。マウス ES 細胞では Tfe ファミリーに属する 4 遺伝子のうち Tfe3 と Tfeb が発現することを RT-PCR と RNA-seq データ解析で確認した。ES 細胞における Tfe3/Tfeb の役割を調べるため、各欠損 ES 細胞を作成した。Tfe3 欠損 ES 細胞及び Tfeb 欠損 ES 細胞は維持可能だが、Tfeb 欠損 ES 細胞では増殖速度の低下が認められた。Tfeb 欠損 ES 細胞でリソソーム関連遺伝子に加えてナイーブ型多能性因子 Esrrb と Nanog の発現の低下が認められた。一方、Tfe3/Tfeb 両欠損 ES 細胞は樹立不可であった。従って、Tfe3 と Tfeb が協調的にナイーブ型多能性の維持に寄与することが示唆された。

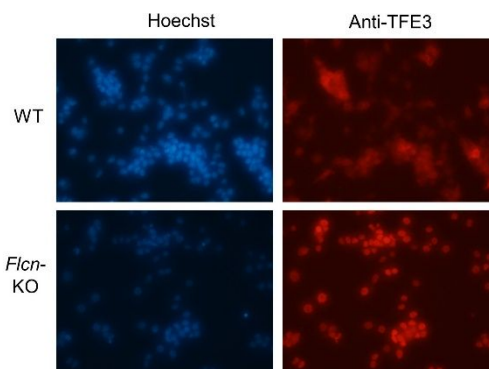


Fig.1 Loss of Flcn induces nuclear translocation of TFE3 in ES cells

(2) Tfe3-ERT2 を発現するマウス ES 細胞を作成し、Tamoxifen 投与で Tfe3 を強制的に活性化させたところ、LIF 非依存性 self-renewal の表現型を示した (Fig. 2)。Tfe3 を恒常的に活性化させた ES 細胞では、ナイーブ型多能性因子 *Esrrb* と *Nanog* の発現の顕著な増加が認められた (Fig. 3)。Tfe3 活性化で誘導される LIF 非依存性 self-renewal の表現型へのこれらの因子の機能的関与の有無を確かめるため、*Esrrb* 欠損 ES 細胞および *Nanog* 欠損 ES 細胞へ Tfe3-ERT2 発現ベクターを導入し、Tamoxifen 投与により Tfe3 活性化の影響を調べた。その結果、*Esrrb* または *Nanog* 欠損下では、Tfe3 活性化による LIF 非依存性 self-renewal の表現型がキャンセルされることが分かった。Tfe3 の ChIP-seq 解析において、Tfe3 の *Esrrb* への弱い結合が認められ、*Nanog* への結合は殆ど認められなかった。以上より、Tfe3 の恒常的活性化によって LIF 非依存性 self-renewal が誘導され、その表現型はナイーブ型多能性因子 *Esrrb* あるいは *Nanog* の発現増強を介していることが示唆された。Tfe3 がこれらの因子の発現を直接制御しているかについては、明確な結論が得られなかった。

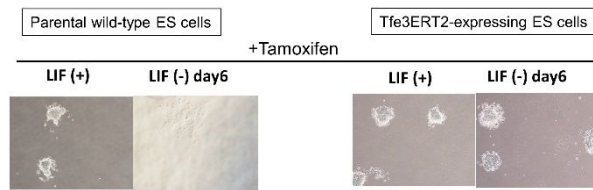


Fig. 2 Enforced expression of active Tfe3 supports LIF-independent self-renewal of ES cells

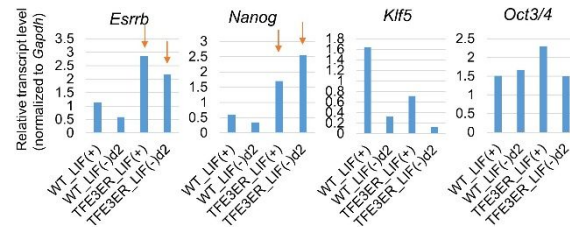


Fig. 3 The expression of *Esrrb* and *Nanog* was upregulated by Tfe3 activation in ES cells

(3) *Fln* 欠損 ES 細胞および Tfe3 活性化 ES 細胞において、活性化ベータカテニンの核内集積が認められ (Fig. 4)、一方で *Fln*/*Tfe3* 両欠損 ES 細胞では活性化ベータカテニンの核内集積は認められなかった。これらの ES 細胞株へ TCF/LEF-luciferase レポーター遺伝子を導入し、レポーターアッセイを行ったところ、*Fln* 欠損 ES 細胞および Tfe3 活性化 ES 細胞において有意なシグナル増加が認められたが、*Fln*/*Tfe3* 両欠損 ES 細胞ではシグナル増加は認められなかった。従って Tfe3 活性化で誘導される LIF 非依存性 self-renewal や *Esrrb*/*Nanog* の発現増加に、カノニカル Wnt 経路の活性化が介在する可能性が示唆された。

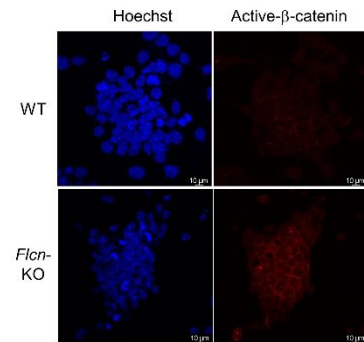


Fig. 4 Loss of *Fln* also increases active  $\beta$ -catenin levels in ES cells

(4) 多くの哺乳類において、受精卵が子宮に着床する前の胚盤胞の段階で発生を一時停止する現象が知られるが、その分子機構は未解明である。そのようなマウス休眠胚における遺伝子発現様式の変化について公開 RNA-seq データの解析を行ったところ、Tfe3 標的遺伝子群が有為に活性化していることが分かった。恒常的に核内移行する PRCC-TFE3 融合タンパクを強制発現させたマウス胚盤胞を回収して試験管内で培養すると、一週間あまり胚盤胞として維持できることが分かった。よって TFE3 の活性化が胚休眠の制御に関与する可能性が示唆された。

(5) 以上に加え、申請者はマウス血液細胞においても *Fln* がリソソームのマスター転写因子 Tfe3 の活性を抑制していること、そして *Fln*-Tfe3 が形成するフィードバックループがリソソーム活性調節を介してグリコーゲン代謝を制御し、細胞の増殖分化に影響を及ぼすことを明らかにして報告した (Endoh et al., 2020)。さらに Tfe3 がミトコンドリア制御に関わることも明らかにして報告した (Yang, Endoh et al., 2021)。

<参考文献>

Baba M, Endoh M, Ma W, Toyama H, Hirayama A, Nishikawa K, Takubo K, Hano H, Hasumi H, Umemoto T, Hashimoto M, Irie N, Esumi C, Kataoka M, Nakagata N, Soga T, Yao M, Kamba T, Minami T, Ishii M, Suda T.  
 Folliculin Regulates Osteoclastogenesis Through Metabolic Regulation.  
 J Bone Miner Res. 33:1785-98 (2018)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yang C, Endoh M, Tan DQ, Nakamura-Ishizu A, Takihara Y, Matsumura T, Suda T.	4. 巻 193
2. 論文標題 Mitochondria transfer from erythroblasts to their macrophage niche via tunneling nanotubes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 1260-1274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Mitsuhiro Endoh, Masaya Baba, Tamie Endoh, Akiyoshi Hirayama, Ayako Nakamura-Ishizu, Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Kunio Nagashima, Tomoyoshi Soga, Martin Lang, Laura S Schmidt, W Marston Linehan, Toshio Suda	4. 巻 30
2. 論文標題 A FLCN-TFE3 Feedback Loop Prevents Excessive Glycogenesis and Phagocyte Activation by Regulating Lysosome Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1823-1834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.01.042	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 該当する

1. 著者名 Yuji Takihara, Ayako Nakamura-Ishizu, Darren Qiancheng Tan, Masahiro Fukuda, Takayoshi Matsumura, Mitsuhiro Endoh, Yuichiro Arima, Desmond Wai Loon Chin, Terumasa Umemoto, Michihiro Hashimoto, Hidenobu Mizuno, Toshio Suda	4. 巻 3
2. 論文標題 High Mitochondrial Mass Is Associated With Reconstitution Capacity and Quiescence of Hematopoietic Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2323-2327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2019032169	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 遠藤充浩, 遠藤多美枝, 岡野正樹, 丹羽仁史
2. 発表標題 転写因子Dppa2/4によるES細胞におけるテロメア長の制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤充浩, 遠藤多美枝, 岡野正樹, 丹羽仁史
2. 発表標題 Regulation of germline genes by PRC1.6 Polycomb and Dppa2/4 in mouse pluripotent stem cells.
3. 学会等名 新学術「全能性&非ゲノム複製」領域合同若手研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤充浩、馬場理也、遠藤多美枝、梅本晃正、橋本倫拓、平山明由、須田年生
2. 発表標題 腎がん抑制遺伝子Folliculinの欠損はリソソーム制御転写因子TFE3の活性化を介してグリコーゲン合成を促進する
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 Mitsuhiro Endoh
2. 発表標題 Role of PCGF6-PRC1 Polycomb in regulation of germ cell-related genes in mouse ES cells
3. 学会等名 The 4th Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 遠藤充浩、丹羽仁史	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 生体の科学「多能性の遷移とエピジェネティクス」	

〔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	須田 年生  (Suda Toshio)  (60118453)	熊本大学・国際先端医学研究機構・卓越教授    (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関