

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22718

研究課題名（和文）Aurora-Bによる多能性幹細胞の分化制御機構の解明と再生医療への応用

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism on differentiation of pluripotent stem cells by Aurora-B and its application to regeneration therapy

研究代表者

工藤 保誠（KUDO, Yasusei）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授

研究者番号：50314753

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Aurora-Bによる未分化能維持に、Aurora-Bキナーゼの基質タンパク質であるヒストンH3のSer10（H3S10）のリン酸化がクロマチン構造を変化させ、未分化能維持に関わる遺伝子発現を制御するのではないかと考え、実験をおこなった。Aurora-Bキナーゼ活性阻害による分化誘導において、ヒストンH3修飾、H3S10リン酸化とH3K9トリメチル化の関連、クロマチン構造の変化に特に顕著な変化は認められなかった。Aurora-Bキナーゼによる多能性幹細胞の未分化能維持には、H3S10以外の他のリン酸化標的タンパク質があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目する「Aurora-Bキナーゼ」は細胞分裂制御への関与はよく知られているものの、それ以外の役割は全く知られていない。本研究では、Aurora-Bキナーゼによる多能性幹細胞の未分化能維持に、恒常的なH3S10のリン酸化が重要な役割を果たすという結果は得られず、H3S10以外の他のリン酸化標的タンパク質があることが考えられた。我々の予備検討では、代謝状態に劇的な変化があることがわかり、Aurora-Bキナーゼによる代謝制御が分化誘導に関わることが示唆された。本研究成果は、その機構を応用した初期化効率の改善や効率的な分化誘導などの技術革新に繋がり、臨床へのフィードバックが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I hypothesize that phosphorylation of Ser10 (H3S10) of histone H3, which is a substrate protein of Aurora-B kinase, changes the chromatin structure to regulate the gene expression related to the maintenance of undifferentiated status by Aurora-B. In this study, I could not observe significant changes of histone H3 modification, the association between H3S10 phosphorylation and H3K9 trimethylation, and chromatin structure by induction of differentiation via inhibiting Aurora-B kinase activity. These findings suggest that there are other phosphorylation target proteins other than H3S10 for maintaining the undifferentiated ability of pluripotent stem cells by Aurora-B kinase.

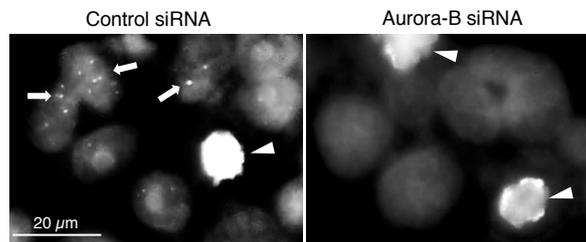
研究分野：実験腫瘍学

キーワード：Aurora-B 多能性幹細胞 分化

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに細胞周期調節因子のユビキチン分解の基質特異性を決定するユビキチンリガーゼである APC/C 複合体や SCF (Skp1/Cullin/F-box) 複合体に着目し、ユビキチン分解制御機構とその制御機構の破綻がもたらす病態に興味を持ち、研究を続けてきた。APC/C の新規基質タンパクとして、CPC の構成因子である Borealin を同定し、G1 期にユビキチン分解されることを見出した。体細胞では、CPC は細胞分裂期のみで活性化し、厳密な染色体分配を制御することにより、円滑な細胞分裂に関与する。一方、多能性幹細胞では APC/C の活性が低いために、細胞周期を通じて Borealin が安定化し、恒常的に CPC が活性化していることを発見した。この CPC の恒常的な活性化は、その活性の中心となる Aurora-B キナーゼの恒常的な活性を引き起こし、その基質タンパクの一つである H3S10 を恒常的にリン酸化する (図 1)。予想外の結果として、多能性幹細胞において Borealin をノックダウンさせると、種々の分化マーカーの発現上昇が認められ、分化が誘導された。また、同じ現象が Aurora-B のノックダウンや Aurora-B 阻害剤の投与によっても認められ、多能性幹細胞の未分化能維持に CPC の安定化を介した恒常的な Aurora-B キナーゼの活性化が必須であることを明らかにした。

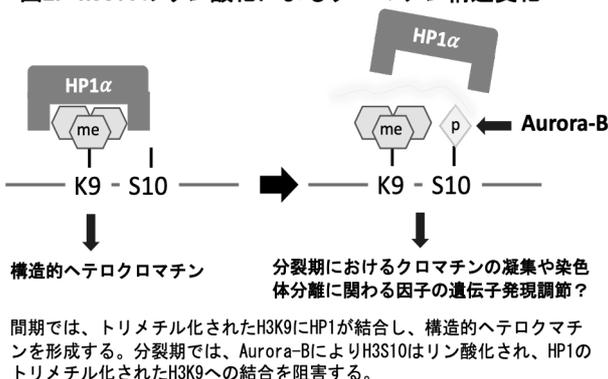
図1 多能性幹細胞におけるPhospho-H3S10の発現



通常、体細胞ではヒストンH3のSer10のリン酸化は、分裂細胞にのみ観察される。多能性幹細胞では、分裂細胞(▲で示す)のみならず間期の細胞にも核内にfociが認められる(↑で示す)。Aurora-Bをノックダウンすると、間期のfociのみが消失する。

しかし、恒常的な Aurora-B の活性化がどのような機構で胚性幹細胞の未分化能を維持するのかは未だ明らかにできていない。ヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などの翻訳後修飾はクロマチン構造を変化させ、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが明らかになりつつある。体細胞において、分裂期でのみリン酸化される H3S10 は、H3K9 のトリメチル化に結合する HP1 をクロマチンから解離することにより、細胞分裂に関わる遺伝子発現を制御する (図 2)。多能性幹細胞における恒常的な H3S10 のリン酸化は、メチル化された H3K9 への HP1 の結合を抑制することによりクロマチン構造を変化させ、未分化能維持に関わる遺伝子発現を制御するのではないかと考えた。この仮説を証明するために、本研究構想に至った。

図2. H3S10のリン酸化によるクロマチン構造変化



2. 研究の目的

多分化能と自己複製能を兼ね備えた多能性幹細胞は、生殖細胞を含む身体を構成するあらゆる細胞に分化でき、胚の再構築も可能である。多能性幹細胞は *Nanog*、*Oct4*、*Sox2* などの転写因子が正確な発現レベルを保つことにより未分化状態を維持しており、これら転写因子の発現変化に応じて外胚葉・中胚葉・内胚葉に分化する。胚性幹細胞や iPS 細胞を含めた多能性幹細胞は、再生医療への応用が期待され、歯科領域でも歯根膜や歯槽骨、神経、唾液腺の再生などへの臨床応用が期待されている。しかしながら、幹細胞から体細胞への分化や体細胞から幹細胞への初期化機構は、未だその全容が解明されておらず、これら機構の解明は、多能性幹細胞を用いた再生医療の実現に必要な不可欠である。

本研究で着目する Chromosome passenger complex (CPC) はその活性の中心となるセリン・スレオニン型キナーゼである Aurora-B、その活性を制御する Survivin や Borealin、複合体の足場として働く INCENP の 4 つのタンパクより構成されている。CPC は、Aurora-B による様々な基質タンパクのリン酸化を介して、正確な染色体分配を制御するキー調節因子として機能する。申請者は、体細胞では細胞分裂に重要な役割を果たす Aurora-B キナーゼが、多能性幹細胞では未分化能維持に重要な役割を果たすことを発見した (現在投稿中)。そこで、本研究では多能性幹細胞の Aurora-B キナーゼ活性による未分化維持機構の解明とその機構に基づいた初期化や分化誘導への応用を模索することを目的とする。

3. 研究の方法

多能性幹細胞において、細胞周期を通じて恒常的に Aurora-B キナーゼが活性化していることを見出した。実際に、多能性幹細胞では Aurora-B の基質タンパクの一つであるヒストン H3 の Ser10 (H3S10) のリン酸化が細胞周期を通じて認められる (図 1 参照)。Aurora-B のノックダウンやキナーゼ活性阻害は、分化マーカーの発現を上昇させ、分化を誘導することから、Aurora-B の活性化が未分化能維持に重要な役割を果たすことを見出した。体細胞では、H3S10 は Aurora-B により細胞分裂時にリン酸化され、そのリン酸化によりヒストン H3 の Lys9 (H3K9) のトリメチル化に結合するヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) がクロマチンから解離される (Nature 438:1116-1122, 2005; Nature 438:1176-1180, 2005)。HP1 のクロマチンからの解離は、分裂期におけるクロマチンの凝集や染色体分離に関わる遺伝子の発現を制御すると考えられている (図 2 参照)。これら知見から、多能性幹細胞における恒常的な H3S10 のリン酸化は、メチル化された H3K9 への HP1 の結合を抑制することによりクロマチン構造を変化させ、未分化能維持に関わる遺伝子発現を制御するのではないかと考えた。そこで、本研究計画では次に示すような検討を行う。

(1) 多能性幹細胞における恒常的なH3S10のリン酸化がもたらすクロマチン構造変化と未分化能維持に関わる遺伝子発現制御機構の解明

① 分化誘導におけるヒストンH3修飾の変化

Aurora-Bは、染色体パッセンジャー複合体の活性の中心となるセリン・スレオニン型キナーゼで、Aurora-Bの活性を制御すると考えられているSurvivinやBorealin、複合体の足場として働くINCENPとともに、染色体パッセンジャー複合体を構成している。染色体パッセンジャー複合体は、Aurora-Bによる様々な基質タンパク質のリン酸化を介して、正確な染色体分配を制御するキー調節因子として機能することが知られている。研究代表者らは、体細胞において、細胞分裂終了後に、APC/C^{Cdh1}により、BorealinおよびAurora-Bがユビキチン分解され、その役割を終えることを報告している (Tsunematsu et al., J Cell Sci 2020)。本実験では、Borealinをテトラサイクリン誘導性にノックダウンし、Aurora-Bの活性を阻害し、多能性幹細胞の分化を誘導し、分化誘導した細胞におけるヒストンH3修飾を網羅的に定量解析する。本実験では、多能性幹細胞として、胚性がん細胞株であるNCC-IT-A3細胞を用いる。NCC-IT-A3細胞にテトラサイクリン誘導性Borealin shRNAを遺伝子導入し、テトラサイクリン (Doxycyclin) を処理する。テトラサイクリンの投与により、Borealinの発現が抑制され、CPC活性の低下を確認し、未分化マーカーおよび分化マーカー (外胚葉、中胚葉、内胚葉、栄養外胚葉) の発現をreal-time PCRにより検討する。網羅的なヒストンH3修飾は、Histone modification Multiplex Assay Kit, Colorimetric, EpiQuick (EPIGENTEK) を用いる。

② H3S10リン酸化とH3K9トリメチル化の関連

胚性幹細胞において、免疫蛍光染色法により、H3S10のリン酸化がH3K9のメチル化とHP1との共局在を抑制するかを検討する。また、HP1の発現をクロマチン分画を用いてウエスタンブロット法により検討する。

③ 分化誘導におけるクロマチン構造の変化

胚性幹細胞とAurora-Bキナーゼ阻害剤により分化誘導した細胞におけるクロマチン構造の変化をAssay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq)により網羅的に解析する。

4. 研究成果

(1) 多能性幹細胞における恒常的なH3S10のリン酸化がもたらすクロマチン構造変化と未分化能維持に関わる遺伝子発現制御機構の解明

① 分化誘導におけるヒストンH3修飾の変化

NCC-IT-A3 細胞にテトラサイクリン誘導性 Borealin shRNA を遺伝子導入し、テトラサイクリン (Doxycyclin) を処理した。テトラサイクリンの投与により、Borealin の発現が抑制され、CPC 活性

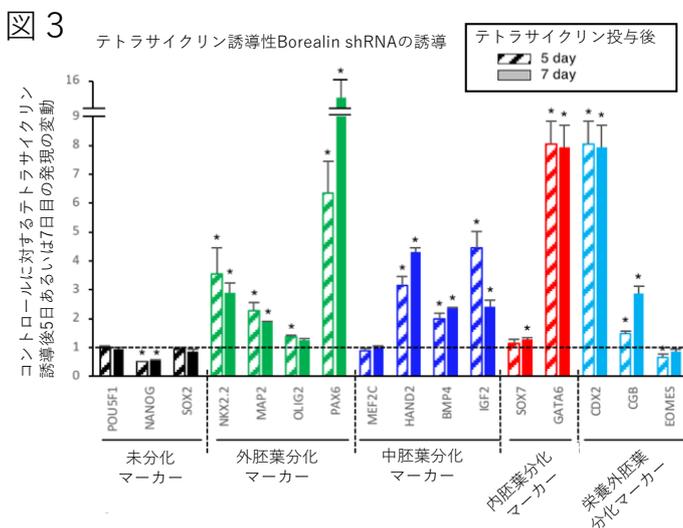
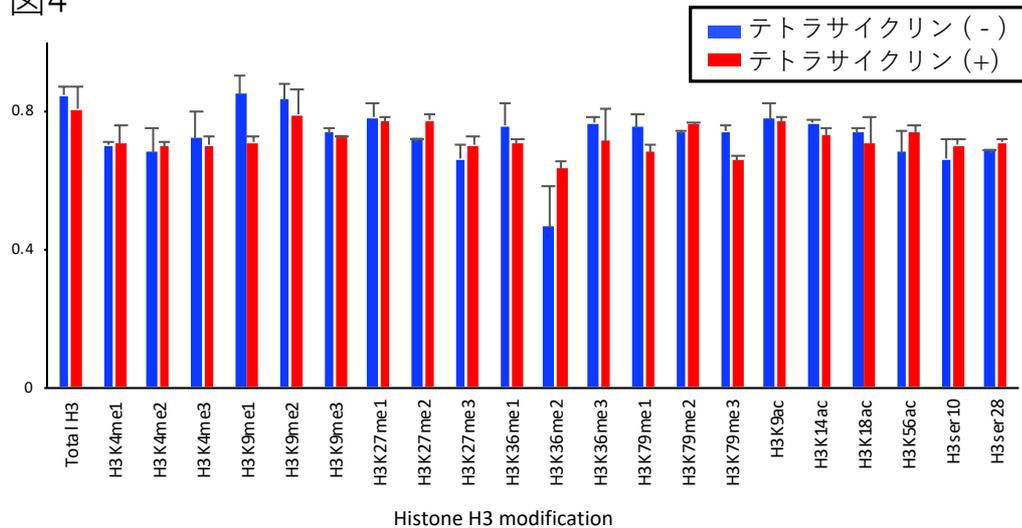


図4

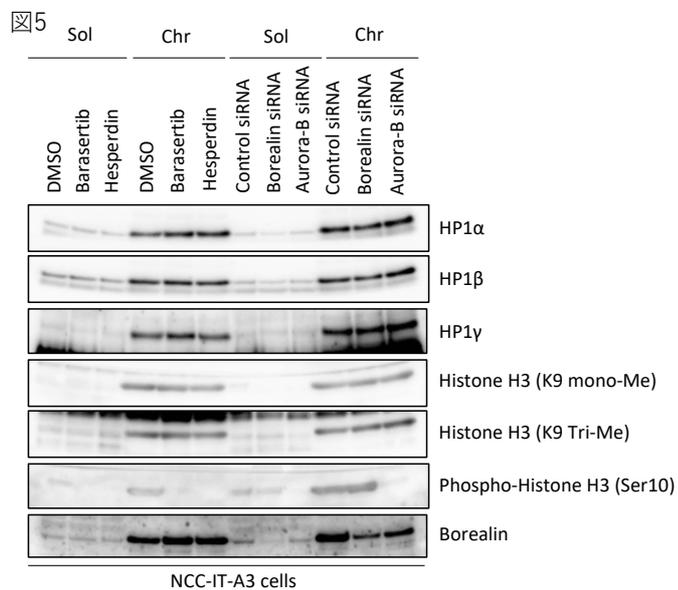


の低下を確認し、未分化マーカーおよび分化マーカー（外胚葉、中胚葉、内胚葉、栄養外胚葉）の発現を real-time PCR により検討した。テトラサイクリン投与後 5 日目および 7 日目に、未分化マーカーである NANOG の発現低下と種々の分化マーカーの発現上昇を確認した（図 3）。この条件で、テトラサイクリン投与後 5 日目の細胞を回収し、ヒストン H3 修飾を Histone modification Multiplex Assay Kit を用いて、網羅的に定量解析をした。図 4 に示すように、Borealin をノックダウンし、Aurora-B の活性を阻害すると、ヒストン H3 の 9 番目のリシンのモノメチル化 (H3K9me1) およびヒストン H3 の 79 番目のリシントリメチル化 (H3K79me3) の発現低下が認められた。しかしながら、Aurora-B の活性阻害においてヒストン H3 の修飾に顕著な変化は認められなかった。

② H3S10リン酸化とH3K9トリメチル化の関連

胚性幹細胞において、免疫蛍光染色法により、H3S10 のリン酸化が H3K9 のメチル化と HP1 との共局在を抑制するかを検討する。しかしながら、H3S10 のリン酸化抗体を用いて、発現を検討すると、核内にドット状の focus が見られたが、HP1 や H3K9 のメチル化との共局在は明らかではなかった。

また、NCC-IT-A3 細胞に Aurora-B キナーゼ阻害剤（Barasertib および Hesperadin）を投与および Borealin siRNA、Aurora-B siRNA を導入して、72 時間後に細胞を回収した。細胞は、可溶化分画とクロマチン分画を抽出し、HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ の発現およびヒストン H3K9 のモノメチル化 (K9 mono-Me)、ヒストン H3K9 のトリメチル化 (K9 Tri-Me)、ヒストン H3S10 のリン酸化 (Phospho-Histone H3 Ser10) をウエスタンブロット法により検討した。Barasertib および Hesperadin の投与、Borealin siRNA および Aurora-B siRNA による Aurora-B キナーゼ活性阻害は、いずれも HP1 のクロマチン上の発現に変化をおこさなかった（図 5）。



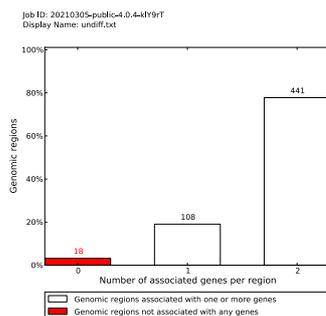
③ 分化誘導におけるクロマチン構造の変化

NCC-IT-A3 細胞に Aurora-B キナーゼ阻害剤 (Barasertib) を投与し、分化誘導した細胞におけるクロマチン構造の変化を ATAC-seq により網羅的に解析した。図 6 に示すように、Barasertib を投与した細胞 (分化細胞) とコントロール細胞では、劇的な変化は見られなかったものの、転写開始領域からの特異的ピークに違いを認めた。

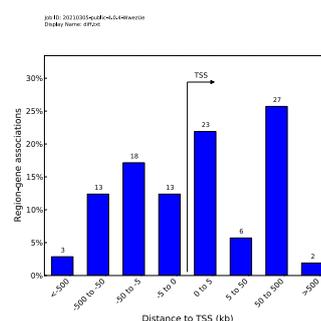
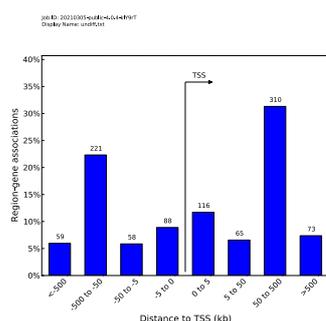
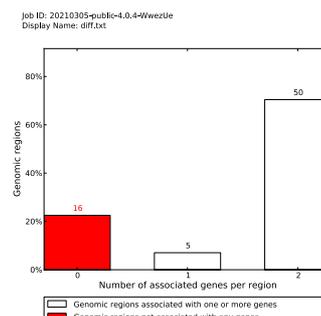
また、ATAC-seq 解析と遺伝子発現情報 (RNA-seq) と照らし合わせて解析を行った。そ

の結果、未分化状態に特異的なオープンクロマチン領域で、発現亢進している遺伝子が11個、発現低下している遺伝子が40個あった。Barasertibの投与により分化させた状態では、サンプル間で共通のオープンクロマチン領域はみられなかった。この理由としては、様々な分化状態が混在するためであると考えられる。さらに、未分化状態に特異的なオープンクロマチン領域のモチーフ解析を行ったところ、いくつか転写因子の結合配列が同定された。今後は、Barasertib投与により分化制御において、変化する転写因子に着目してそのメカニズムを明らかにしたいと考えている。

図6 Control specific peaks



Barasertib specific peaks



以上のように、Aurora-B キナーゼ活性阻害による多能性幹細胞の分化誘導における恒常的なH3S10のリン酸化の役割を検討したが、H3K9のメチル化を介したクロマチン構造の変化がもたらす遺伝子発現制御に顕著な変化を認めなかった。Aurora-B キナーゼによる多能性幹細胞の未分化能維持には、H3S10以外の他のリン酸化標的タンパク質があると考えられる。我々の予備検討では、代謝状態に劇的な変化があることがわかり、Aurora-B キナーゼによる代謝制御が分化誘導に関わることが示唆された。

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 2件）

1. 著者名 Kitamura Naoya, Sento Shinya, Yoshizawa Yasumasa, Sasabe Eri, Kudo Yasusei, Yamamoto Tetsuya	4. 巻 22
2. 論文標題 Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 240 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22010240	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 Tsunematsu Takaaki, Arakaki Rieko, Kawai Hidehiko, Ruppert Jan, Tsuneyama Koichi, Ishimaru Naozumi, Earnshaw William C., Pagano Michele, Kudo Yasusei	4. 巻 133
2. 論文標題 APC/CCdh1 is required for the termination of chromosomal passenger complex activity upon mitotic exit	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.251314	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 常松貴明、石丸直澄、工藤保誠
2. 発表標題 染色体パッセンジャー複合体による多能性幹細胞の未分化能維持機構
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 常松貴明、石丸直澄、工藤保誠
2. 発表標題 染色体パッセンジャー複合体によるAurora-B活性を介した多能性幹細胞の未分化能維持機構
3. 学会等名 第16回日本病理学会カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 常松貴明、石丸直澄、工藤保誠
2. 発表標題 The maintenance of pluripotency by chromosome passenger complex in pluripotent stem cells.
3. 学会等名 第11回日本RNAi研究会
4. 発表年 2019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	北島 正二郎 (KITAJIMA Shojiro) (00452590)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任講師 (32612)	

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			
米国	New York University			
英国	The University of Edinburgh			