

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21791580

研究課題名（和文） 胚性幹細胞の未分化性を規定する膜タンパク質の機能的ダイナミクスに関する研究

研究課題名（英文） Molecular basis of membrane proteins in embryonic stem cells

研究代表者

三浦 巧 (MIURA TAKUMI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：60405355

研究成果の概要（和文）：膜4回貫通型蛋白質テトラスパニンファミリーに属するCD9は、マウス及びヒト胚性幹（ES）細胞において高発現していることが報告されており、ES細胞の未分化性の維持に何らかの強い関与が示唆されている。そこで本研究では、マウスES細胞未分化維持機能に及ぼすCD9の関与を明らかにする目的で、CD9遺伝子欠損（CD9^{-/-}）マウス由来の内部細胞塊（ICM）よりES細胞が樹立可能であるかを検討した結果、CD9はES細胞の未分化性評価に関わる因子の1つではあるが、ES細胞の機能性の維持においては必須の因子でないことが判明した。

研究成果の概要（英文）：We have previously demonstrated that the tetraspanin CD9 is necessary for membrane fusion between sperm and oocyte during fertilization. While knockout mice for CD9 are viable, CD9^{-/-} females are sterile due to the inability of their oocytes to fuse with sperm. In this study, we focused on the role of CD9 in embryonic stem (ES) cells. To investigate whether CD9 has a direct effect on ES cells, we generated and characterised several CD9 knockout mouse ES cell lines. Taken together, our results reveal that CD9 is dispensable for mouse ES cell self-renewal and pluripotency. The generation of CD9^{-/-} ES cells should prove to be a useful tool with which to study the function of this protein and a range of other associated cellular processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：ES細胞、CD9、テトラスパニン、未分化マーカー、膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、多分化能と自己複製能を併せ持つ未分化な細胞であり、生理的な細胞の入れ替わりや組織修復に関わると考えられている。こうした幹細胞は、今や様々な組織に存在することが明らかにされ、「体性幹細胞」

と呼ばれている。また、中でもES細胞やiPS細胞は、培養により無限に増殖させることが可能であることと、全ての組織に分化することができる多能性を持っていることから、将来的には再生医療のみならず医薬品・食品・化粧品の開発にまでも、その利用が期待され

ている。しかし、現状は目的とする細胞を効率よく分化誘導し安定供給することが困難な上に、分化した細胞の安定性についても不安が残されている。これらの問題は、ひとえに、「多能性幹細胞」そのものについての理解が極めて乏しいため、ES 細胞および iPS 細胞の特性が未だ完全に標準化されていないことに起因する。そこで、本研究では、多能性幹細胞の特徴の一つである「未分化性」に着目し、その未分化性を規定している膜タンパク質の重要性について解析することを主な目的とし、膜タンパク質群の機能的動態から見た多能性幹細胞の標準化を行う。

膜タンパク質は、細胞を内と外に区切っている細胞膜に存在し、細胞外の情報や物質の通り道として重要な役割を担っている。また、細胞膜には多くの接着分子が存在し、細胞間の相互作用にも深く関与している。これまでに、未分化 ES 細胞の細胞表面に特異的に発現する分子として、膜 4 回貫通型タンパク質 (CD9)、胚発生段階特異抗原 (SSEA) およびフォルスマン抗原 (FA) が同定されており、これら膜タンパク質は、ES 細胞の特性を決定するための細胞表面マーカーとして広く認知されている。これら膜タンパク質の中でも、特にテトラスパニン・ファミリーに属する CD9 に関しては、その分子本体が詳細に解明されている。このような中、当研究室では CD9 ノックアウトマウスの作製に成功し、CD9 分子の *in vivo* における分子機能についてこれまで解析を遂行してきた。そこで、本研究では、CD9 が未分化細胞に特異的に発現していることに注目し、ES 細胞における CD9 の機能解析を遺伝子ターゲティング法により行った。

2. 研究の目的

本研究では、胚性幹細胞 (ES 細胞: embryonic stem cells) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞: induced pluripotent stem cells) の特性を標準化するための目的で、多能性幹細胞の特徴の一つである「未分化性」に着目し、その未分化性を規定している膜タンパク質の重要性について解析する。

3. 研究の方法

ES 細胞の未分化性維持における CD9 分子の役割を詳細に解明する目的のために、CD9^{-/-} ES 細胞の樹立を試み、得られた CD9^{-/-} ES 細胞が ES 細胞としての特性を保持しているかを以下の解析により評価した。

(1) 実験 1: CD9^{-/-} ES 細胞樹立

当研究室ではこれまでに、受精過程において、CD9 は精子が卵細胞膜と融合するために必要な因子であること報告している。そのため、CD9^{-/-} マウス由来の受精卵を卵細胞室内精子注入法 (ICSI) により獲得し、胚盤胞期ま

で培養した。次に、CD9^{-/-} 胚盤胞より内部細胞塊 (ICM) を単離培養し、ES 細胞様の形態を示した細胞株の樹立を試み、複数の CD9^{-/-} ES 細胞株が樹立可能であることを検討した。

(2) 実験 2: CD9^{-/-} ES 細胞における未分化マーカーの評価

CD9^{-/-} ES 細胞が ES 細胞未分化マーカーを発現しているかを、以下の解析により評価した。

① 未分化時に特異的に発現する遺伝子

(Oct3/4, Sox2, Nanog, Rex1) を、RT-PCR 法により確認した。

② 上述の未分化マーカータンパク質の発現を、免疫組織化学法により検出した。

③ 未分化時に特異的に活性が認められるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性化状態を、高感度の化学発光基質を用いて検出した。

(3) 実験 3: CD9^{-/-} ES 細胞における分化能の評価

CD9^{-/-} ES 細胞が ES 細胞の特性の一つである「多分化能」を保持しているかを、以下の解析により評価した。

① 分化誘導三次元培養法により、胚様体

(EB: embryoid body、三胚葉 [内胚葉・中胚葉・外胚葉] が誘導された状態) の形成を行った。得られた EB において、三胚葉の分化マーカーとなる遺伝子発現を RT-PCR 法により確認した。

② 免疫不全マウスの皮下に CD9^{-/-} ES 細胞を移植することにより、テラトマ形成能 (三胚葉系列の細胞への分化能) を評価した。

③ CD9^{-/-} ES 細胞が多能性を保持しているかどうかは、キメラマウスを作製ことで証明できる。それ故、キメラマウス組織における CD9^{-/-} ES 由来の細胞を簡易に同定するために、まず CD9^{-/-} ES 細胞へ EGFP 導入した細胞株を樹立し、この EGFP-CD9^{-/-} ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、CD9^{-/-} ES 細胞のキメラ形成能への影響を EGFP の発現分布により確認した。

(4) 実験 4 遺伝子発現パターンの評価

CD9^{-/-} ES 細胞と CD9^{+/+} ES 細胞における遺伝子の発現パターンを、DNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、遺伝子発現レベルから見た両 ES 細胞株の類似性または相違性を評価した。

4. 研究成果

(1) 実験 1: CD9^{-/-} ES 細胞樹立

受精過程において、CD9 は精子が卵細胞膜と融合するために必要な分子であるため、CD9^{-/-} マウス由来の受精卵を卵細胞室内精子注入法 (ICSI) により獲得し、胚盤胞期まで培養した。次に、CD9^{-/-} 胚盤胞より ICM を

単離培養し、ES 細胞様の形態を示した細胞を 3 株樹立することに成功した。これら 3 株の CD9^{-/-} ES 細胞における細胞増殖速度は野生型 ES 細胞と同等であり、また核型の状態も正常に維持されていた。

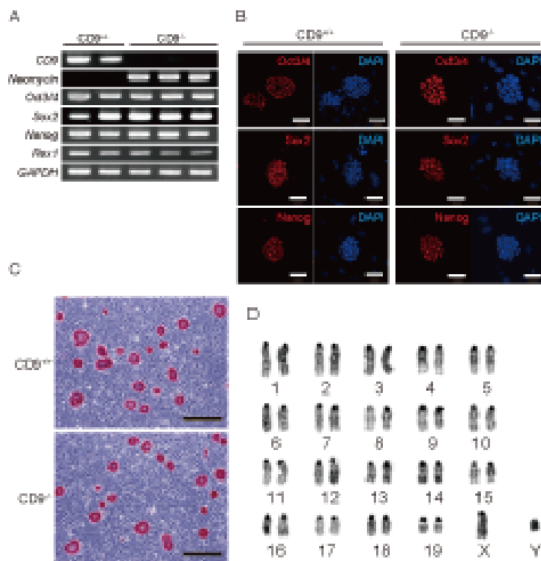


図 1. CD9^{-/-} ES 細胞樹立

(2) 実験 2 : CD9^{-/-} ES 細胞における未分化マーカーの評価

CD9^{-/-} ES 細胞が ES 細胞未分化マーカーを発現しているかを、以下の解析により評価した。

- ① 未分化時に特異的に発現する遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Nanog、Rex1) を、RT-PCR 法により解析した結果、野生型 ES 細胞と同等の発現が確認された。
- ② 上述の未分化マーカータンパク質の発現を、免疫組織化学法により解析した結果、野生型 ES 細胞と同等の発現が確認された。
- ③ 未分化時に特異的に活性が認められるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性化状態を、高感度の化学発光基質を用いて解析した結果、CD9^{-/-} ES 細胞のすべてのコロニーにおいて ALP 活性が陽性であった。以上の結果より、CD9 は ES 細胞の未分化維持にとって必須の分子でないことが示唆された。

(3) 実験 3 : CD9^{-/-} ES 細胞における分化能の評価

① CD9^{-/-} ES 細胞が ES 細胞の特性の一つである「多分化能」を保持しているかを、以下の解析により評価した。(i) 分化誘導三次元培養法により、胚様体 (EB : embryoid body、三胚葉 [内胚葉・中胚葉・外胚葉] が誘導された状態) の形成を行ったところ、得られた CD9^{-/-} EB は CD9^{+/+} EB と同様な形態を示し、CD9^{-/-} ES 細胞は効率的に分化誘導されたことが確認できた。(ii) CD9^{-/-} EB におい

て三胚葉の分化マーカーとなる遺伝子発現 (外胚葉マーカー : Nestin、中胚葉マーカー : Brachyury、内胚葉マーカー : Gata6) を RT-PCR 法および定量的 PCR 法により確認した結果、CD9^{-/-} ES 細胞は野生型 ES 細胞と類似の遺伝子発現パターンを示し、CD9^{-/-} ES 細胞は三胚葉系列への分化能を保持していることが確認できた。一方で、未分化マーカー (Oct3/4、Sox2、Nanog、Rex1) の発現が減少していることも同時に観察された。(iii) CD9^{-/-} EB を特定の細胞種へ分化誘導するための培養環境下でさらに培養を行った結果、Tuj1 (神経系細胞マーカー)、cTnT (心筋系細胞マーカー)、AFP (肝臓系細胞マーカー) の発現が免疫組織化学法により観察できた。以上の結果より、CD9^{-/-} ES 細胞は三胚葉それぞれに由来する細胞へと分化する能力を持つ多能性幹細胞であることが示唆された。

② 免疫不全マウスの皮下に CD9^{-/-} ES 細胞を移植し、一ヶ月後に腫瘍を摘出し、テラトーマ形成能を評価した結果、三胚葉系列の各組織へ CD9^{-/-} ES 細胞が分化したことが観察された。

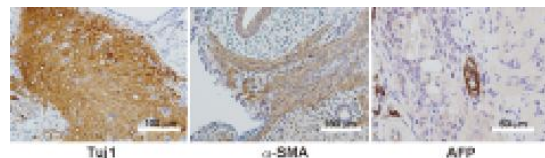


図 2. CD9^{-/-} ES 細胞におけるテラトーマ形成能評価

③ 次に、CD9^{-/-} ES 細胞が多能性を保持しているかを証明するために、CD9^{-/-} ES 細胞に由来するキメラマウスの作製を行った。まず、正常マウスの胚盤胞に緑色蛍光たんぱく質 EGFP で標識した CD9^{-/-} ES 細胞を注入し、仮親の子宮へ移植した後、新生児を解析した。その結果、一様に EGFP 陽性細胞の分布がマウス新生児において認められ、CD9^{-/-} ES 細胞は十分に分化多能性を保持していることが判明した。以上の結果より、CD9 は ES 細胞の分化系譜を規定する分子ではないことが示唆された。また、CD9^{-/-} ES 細胞と野生型 ES 細胞における遺伝子発現レベルの違いを網羅的に解析した結果、CD9 遺伝子の欠損が ES 細胞における遺伝子発現動態に顕著な変化をもたらさないことが示された。即ち、CD9^{-/-} ES 細胞においては、CD9 の働きを他の分子が補填することで、未分化性および分化多能性の性質が維持されているものと推測された。

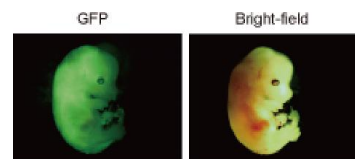


図 3. CD9^{-/-} ES 細胞におけるキメラ形成能

(4) 実験4：遺伝子発現パターンの評価
 CD9^{-/-} ES細胞と野生型 ES細胞における遺伝子発現レベルの違いを網羅的に解析することにより、CD9^{-/-} ES細胞においてCD9分子の機能を補填する因子の同定を試みた。マイクロアレイの解析結果をもとに、CD9^{-/-} ES細胞において野生型 ES細胞よりも高く発現している遺伝子について考察した結果、CD9^{-/-} ES細胞において膜タンパク質関連遺伝子の発現が、主に上昇していることが示された。そこで、一部の膜タンパク質関連遺伝子について、定量的PCR法によりその発現量を詳細に解析した結果、細胞膜関連遺伝子群 (Adm, Ptprc, Itga4, Tspan11, Pou4f3, Zdhc1, Ptger4, Zdhc7) に関しては、CD9^{-/-} ES細胞において大きな発現上昇は見られないものの全体的に上昇傾向にあることが観察された。しかしながら、以上の結果がCD9^{-/-} ES細胞の生存維持に直接関与しているとは考えにくく、その詳細については不明であり、今後さらなる解析を進める必要があると結論づけた。

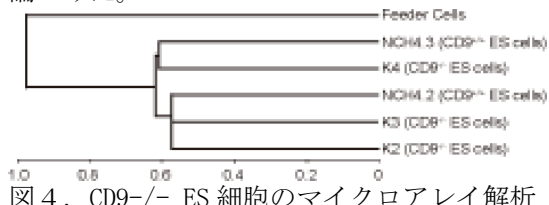


図4. CD9^{-/-} ES細胞のマイクロアレイ解析

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Akutsu H, Miura T, Machida M, Birumachi J, Hamada A, Yamada M, Sullivan S, Miyado K, Umezawa A. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9. *Differentiation*, **78**, 137-142, 2009. 査読有

[学会発表] (計4件)

① Miura, T., Machida, M., Hamada, A., Yamada, M., Miyado, K., Umezawa, A. and Akutsu, H. Molecular basis of tetraspanin CD9 in pluripotent stem cells, 第32回日本分子生物学会年会 (横浜)、2009年12月9日-12日 (招待講演)

② 三浦巧、町田正和、濱田亜樹、山田満稔、宮戸健二、梅澤明弘、阿久津英憲、多能性幹細胞の未分化維持におけるテトラスパニンCD9の機能解析、第82回日本生化学会大会 (神戸)、2009年10月21日-24日 (招待講演)

③ 三浦巧、町田正和、美留町潤一、濱田亜樹、宮戸健二、梅澤明弘、阿久津英憲、マウス ES細胞未分化維持におけるテトラスパニ

ン分子 CD9 の役割、第31回日本分子生物学会年会 (神戸)、2008年12月9日-12日 (ポスター発表)

④ Miura, T., Machida, M., Birumachi, J., Miyado, K., Umezawa, A. and Akutsu, H. Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9, 第23回内藤コンファレンス (神奈川)、2008年11月11日-14日 (ポスター発表)

[図書] (計1件)

① Miura, T., Umezawa, A. and Akutsu, H. Molecular biomarkers of embryonic stem cells. *Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis* (ed. by Craig Atwood) INTECH publication, 159-172, 2011.

[その他]

【公開シンポジウム】

① 三浦巧、幹細胞を用いた治療への応用、Japan iPS cell and stem cell forum、2009年 (京都)、主催：インビトロジェン (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 巧 (MIURA TAKUMI)

独立行政法人国立成育医療研究センター・

生殖・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：60405355