

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 7 日現在

機関番号:84420

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:平成 22 年度 ~ 平成 24 年度

課題番号:22603018

研究課題名(和文)ヒト ES/iPS 細胞の未分化性維持に關与するシグナル伝達経路の探索

研究課題名(英文) Screening for signaling pathways regulating human ES/iPS cell self-renewal

研究代表者

木根原 匡希 (Masaki Kinehara)

独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・研究員

研究者番号:70568451

研究成果の概要(和文):ヒト多能性幹細胞の自己増殖は、様々なシグナル経路によってサポートされることが知られている。その中でも FGF-2 シグナルは、未分化状態の維持に必須であると考えられている。しかしながら、FGF-2 に応答する下流シグナル経路によって制御されるヒト多能性幹細胞の分化や自己増殖の機構は、十分に解明されていない。これまで私たちは、ミニマムエッセンシャルな成分からなる既知組成培地 hESF9 を開発した。この培地を用いて FGF-2 シグナルの下流経路に作用し、未分化なヒト ES/iPS 細胞の自己増殖を促進させる小分子化合物を探索した。未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を指標として数多くの小分子化合物をスクリーニングした結果、私たちは未分化なヒト ES/iPS 細胞の増殖を促進させる PKC 阻害剤(GF109203X)を発見した。PKC は、ヒト多能性幹細胞の分化・未分化性を制御する重要な FGF-2 の下流シグナル伝達経路に關与することが考えられた。PKC ノックダウン解析の結果、私たちは PKC が FGF-2 の下流経路である AKT、ERK1/2、GSK3 β のリン酸化に關与することを明らかにした。また Activin A の添加は、FGF-2 と相乗的に ERK1/2、GSK3 β のリン酸化を増加させた。この ERK1/2 と GSK3 β のリン酸化は、GF109203X および ERK 経路阻害剤 U0126 の添加によって阻害された。さらに、GF109203X および U0126 の添加は、ヒト多能性幹細胞の安定な増殖を促進し、単一細胞剥離による継代を可能にした。本研究において私たちは、FGF-2 の添加により活性化する PKC によって、ヒト ES/iPS 細胞の分化・未分化な状態が制御されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文):The self-renewal of human pluripotent stem (hPS) cells including embryonic stem and induced pluripotent stem cells have been reported to be supported by various signal pathways. Among them, fibroblast growth factor-2 (FGF-2) appears indispensable to maintain self-renewal of hPS cells. However, downstream signaling of FGF-2 has not yet been clearly understood in hPS cells. In this study, we screened a kinase inhibitor library using a high-throughput alkaline phosphatase (ALP) activity-based assay in a minimal growth factor-defined medium to understand FGF-2-related molecular mechanisms regulating self-renewal of hPS cells. We found that in the presence of FGF-2, an inhibitor of protein kinase C (PKC), GF109203X (GFX), increased ALP activity. GFX inhibited FGF-2-induced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), suggesting that FGF-2 induced PKC and then PKC inhibited the activity of GSK-3 β . Addition of activin A increased phosphorylation of GSK-3 β and extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK-1/2) synergistically with FGF-2. Intriguingly, functional gene analysis by RNA interference revealed that the phosphorylation of GSK-3 β was reduced by siRNA of PKC δ , PKC ϵ , and ζ , the phosphorylation of ERK-1/2 was reduced by siRNA of PKC ϵ and ζ , and the phosphorylation of AKT was reduced by PKC ϵ in hPS cells. Addition of GFX with a MEK inhibitor, U0126, in the presence of FGF-2 and activin A provided a long-term stable undifferentiated state of hPS cells even though hPS cells were dissociated into single cells for passage. This study untangles the cross-talk between molecular mechanisms regulating self-renewal and differentiation of hPS cells.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
24年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野:時限

科研費の分科・細目:ケミカルバイオロジー

キーワード:iPS細胞、多能性幹細胞、小分子化合物、シグナル経路、PKC

1. 研究開始当初の背景

ヒト胚性幹(hES)細胞ならびにヒト人工多能性幹(hiPS)細胞の自己増殖は、様々なシグナル経路によって維持されることが報告されている。その中でもFGF-2によるシグナルは、ヒト多能性幹細胞の維持に必須であると考えられている。2008年に、私たちはミニマムエッセンシャルな成分からなる既知組成培地hESF9を開発し、ヘパリンがFGF-2によるヒトES細胞の増殖活性を増強させることを発見した。しかしながら、FGF-2に応答する下流シグナル経路によって制御されるヒト多能性幹細胞の分化や自己増殖の機構は、十分に解明されていない。

2. 研究の目的

近年、様々な無血清培地が報告されているが、ヒト多能性幹細胞の未分化性の制御は、未だ難しいのが現状である。従って、FGF-2に応答する未知の分子機構を理解することは、ヒト多能性幹細胞のより安定した未分化状態の制御を可能とし、創薬など産業応用のための大量培養法の開発へとつながると期待される。そこで私たちは、未分化なヒト多能性幹細胞の自己増殖に関与するFGF-2シグナルの下流経路および因子の探索、同定を目指した。

3. 研究の方法

現在、一般的に使用されているヒトES/iPS細胞用培地は、数多くの不特定因子を含み、それら不特定因子によって多くのシグナル伝達経路が活性化される。そのため、添加する小分子化合物や増殖因子の作用機構の解明を困難にしている。私のグループが開発したhESF9培地は、構成タンパク質がインスリン、トランスフェリン、オレイン酸抱合アルブミン、

およびFGF-2のみであるため添加因子の効果を未知因子の影響を考慮せずに解析できる。この培地を用いることは、FGF-2シグナル経路の下流経路および因子の同定を容易にすると考えられる。私たちは、このhESF9培地を用いて未分化なヒト多能性幹細胞の自己増殖を促進させる作用を示すキナーゼ阻害剤(低分子化合物)を探索した。この探索には、様々なキナーゼ阻害剤の効果を検証するために、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を指標としたハイスループット解析方法を用いた。

4. 研究成果

(1) 数多くの小分子化合物をスクリーニングした結果、私たちはヒトES/iPS細胞のALP活性を促進させるPKC阻害剤GF109203X(GFX)の新規作用を発見した(図1)(参考論文:Masaki Kinehara et al., PLOS ONE., 2013)。

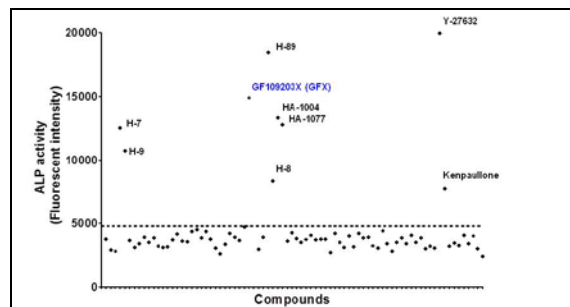


図1. ALP活性を指標とした小分子化合物のスクリーニング

- (2) hESF9 培地への GFX 添加は、ヒト多能性幹細胞のコロニー形成能を増加させた (図2) (参考論文: Masaki Kinehara et al., PLOS ONE., 2013)。これらの結果から、PKC はヒト多能性幹細胞の分化・未分化性を制御する重要な FGF-2 の下流シグナル伝達経路に関与することが示唆された。

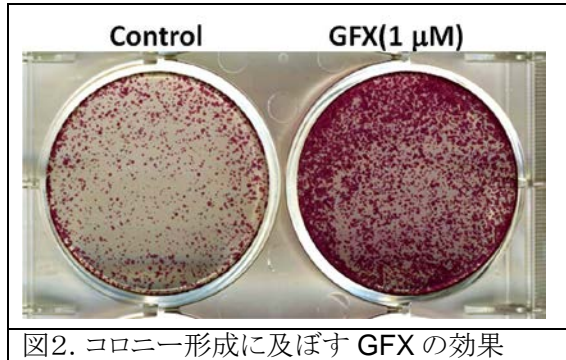


図2. コロニー形成に及ぼす GFX の効果

- (3) ヒト多能性幹細胞の FGF-2 下流シグナルは、AKT、ERK1/2、GSK3β 経路を活性化させることがこれまでわかっている。これらの FGF-2 下流経路に及ぼす GFX の効果を検証した結果、GFX は、FGF-2 刺激によって誘導される GSK3β のリン酸化を阻害することがわかった (図3) (参考論文 Masaki Kinehara et al., PLOS ONE., 2013)。

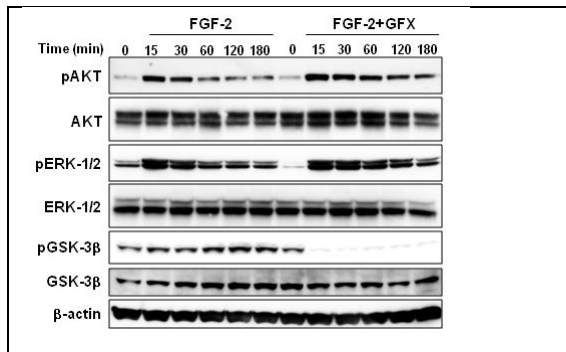


図3. FGF-2 シグナル下流因子のリン酸化に及ぼす GFX の影響

- (4) FGF2 シグナルの下流において PKC が活性化しているかを確認するために、FGF-2 刺激による PKC のリン酸化を検証した。少なくとも PKCδ、ε、ζ のアイソフォームは、FGF2 の刺激によってリン酸化されるかことがわかった (図4) (参考論文: Masaki Kinehara et al., PLOS ONE., 2013)。また GFX の添加によって、この PKC のリン酸化が抑制されることを確認した。

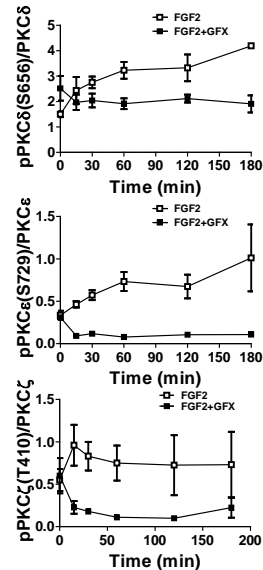


図4. PKC のリン酸化に及ぼす FGF-2 と GFX の効果

- (5) PKC が FGF-2 シグナル経路の AKT、ERK1/2、GSK3β のリン酸化に関与するかを検証するために、siRNA を用いた PKC ノックダウン解析を行った。その結果から、私たちは PKC が FGF-2 によって誘導される AKT、ERK1/2、GSK3 のリン酸化に関与することを明らかにした (図5) (参考論文: Masaki Kinehara et al., PLOS ONE., 2013)。PKCε、δ、ζ は、GSK-3β リン酸化に関与し、また PKCε、ζ は、ERK1/2、PKCε は AKT のリン酸化に関与することがわかった。

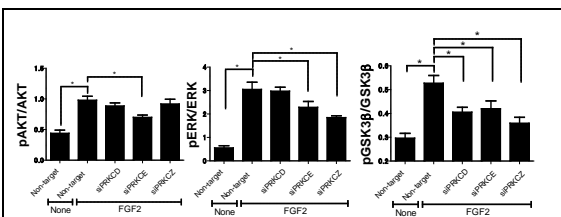


図5. FGF-2 シグナル下流因子である AKT、ERK1/2、GSK3β のリン酸化に及ぼす PKC の機能

- (6) さらに Activin A の添加は、FGF-2 と相乗的に ERK1/2、GSK3 のリン酸化を増加させた。この ERK1/2 と GSK3 のリン酸化は、GF109203X および ERK 経路阻害剤 U0126 の添加によって阻害された (図6) (参考論文: Masaki Kinehara et al., PLOS ONE., 2013)。

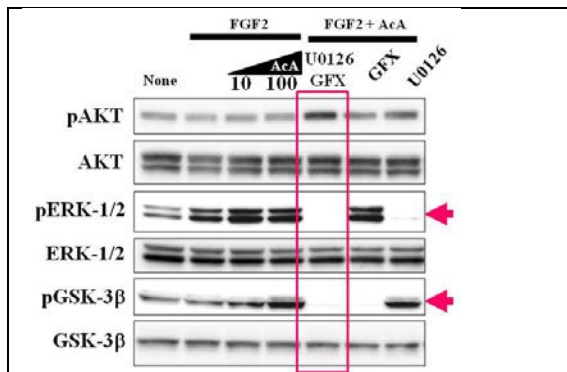


図6. FGF-2 シグナル下流因子のリン酸化に及ぼす Activin A と FGF-2 の相乗効果

(7) GF109203X および U0126 の添加は、ヒト多能性幹細胞の安定な増殖を促進し、単一細胞剥離による継代を可能にした(図7)(参考論文 Masaki Kinehara et al., PLOS ONE., 2013)。

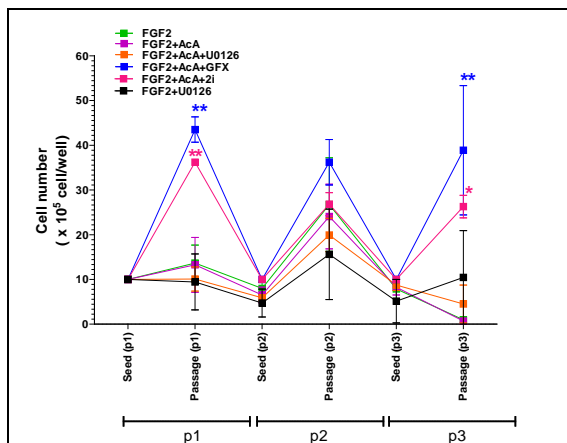


図7. 単一細胞の剥離による継代培養によるヒト多能性幹細胞の増殖

ヒト ES/iPS 細胞は増殖させる際に、細胞死や細胞分化を起こしてしまう特徴を持つため、未分化状態が不安定であった。この不安定な細胞の状態は、未分化な細胞を増殖させる上で大きな障害になっていた。本研究課題の遂行により私たちは、FGF-2 によって活性化される PKC 経路が、この「未分化状態の不安定」の引き金であることを発見した PKC の阻害は、細胞分化を抑制でき、またトリプシンなどでバラバラにしたヒト ES/iPS 細胞でも、安定して増殖することが可能であった。この成果は、ヒト多能性幹細胞のより安定した未分化状態の増殖を可能とし、創薬など産業応用のための大量培養法の開発へとつながると期待できる。

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) **Masaki Kinehara**, Suguru Kawamura, Daiki Tateyama, Mika Suga, Hiroko Matsumura, Sumiyo Mimura, Noriko Hirayama, Mitsuhi Hirata, Kozue Uchio-Yamada, Arihiro Kohara, Kana Yanagihara, **Miho K. Furue**, Protein Kinase C Regulates Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal, PLOS ONE、査読有、2013;8(1):e54122, DOI: 10.1371/journal.pone.0054122.

[学会発表](計 8 件)

- (1) Protein Kinase C Regulates Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal, **Masaki Kinehara**, Suguru Kawamura, Daiki Tateyama, Mika Suga, Hiroko Matsumura, Sumiyo Mimura, Mitsuhi Hirata, Kana Yanagihara and **Miho K. Furue.**, (2013 年) ISSCR 11th Boston, USA., Friday June 14., Poster No. F-2397 (発表予定).
- (2) 無血清培地を用いたヒト iPS 細胞を制御する化合物の探索、**木根原匡希**、独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発、BioExpo2013 東京ビックサイト (2013 年)5 月 8-10 日
- (3) ヒト胚性幹細胞の上皮間葉移行に関与する転写因子 EGR1 の同定、**木根原匡希**、河村卓、二川浩樹、**古江-楠田美保**、第 85 回日本組織培養学会(2012 年)5 月 17 日(金)京都大学 百周年時計台記念館 百周年記念ホール
- (4) EMT-related gene expression during cell differentiation into extraembryonic endoderm in human embryonic stem cells, Suguru Kawamura, **Masaki Kinehara**, Hiroki Nikawa, **Miho K. Furue.**, (2011 年) 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜、一般講演(口頭)とポスター発表(1P-0168)
- (5) PROTEIN KINASE C INDUCES EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION IN HUMAN ES AND IPS CELLS., **Kinehara Masaki**,

Kawamura Suguru, Tateyama Daiki, Inoue Shin-ich, Matsumura Hiroko, Hirata Mitsuhi, Furue, Miho K., (2011年) ISSCR 9th Toront, Canada. Poster No. 3419.

- (6) DEVELOPMENT OF A DEFINED SERUM FREE AND XENO FREE MEDIUM COMPOSED OF MINIMAL COMPONENTS FOR CULTURING HUMAN ES/IPS CELLS., Tateyama Daiki, **Kinehara Masaki**, Hirata Mitsuhi, Matsumura Hiroko, Inoue Shin-ichi, and **Furue Miho K.**, (2011年) ISSCR 9th Toront, Canada. Poster No. 3512.
- (7) Development of an alkaline phosphatase activity-based high-throughput screening assay using human iPS cells with chemically defined culture conditions., **Masaki, Kinehara, Miho, Furue Kusuda.**, 第83回日本培養学会(2010年)5月21日岡山大学創立五十周年記念館(Session in English)
- (8) DEVELOPMENT OF AN ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY-BASED HIGH-THROUGHPUT SCREENING ASSAY USING HUMAN IPS CELLS WITH CHEMICALLY DEFINED CULTURE CONDITIONS., **Kinehara Masaki**, Tateyama Daiki, Matsumura Hiroko, and **Furue Miho Kusuda.**, (2010年) ISSCR 8th San Francisco, CA, USA., Poster No. W66.

[図書](計0件)

特になし

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

特になし

○取得状況(計1件)

名称:「ヒト多能性幹細胞の培養方法」
発明者:古江美保・木根原匡希
権利者:独立行政法人医薬基盤研究所
種類:特許
番号:WO2012/104936A1
取得年月日:2012年08月09日
国内外の別:国外

[その他]
ホームページ等

http://www.nibio.go.jp/part/disease/cell_cultures/

6. 研究組織

(1)研究代表者

木根原 匡希(Masaki Kinehara)
独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・研究員
研究者番号:70568451

(2)研究分担者

古江 美保(Miho Furue)
独立行政法人医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部・研究員リーダー
研究者番号:80257310

(3)連携研究者

特になし