

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790888

研究課題名（和文）iPS細胞を活用した間葉系細胞分化におけるエストロゲン関連受容体の役割の解明

研究課題名（英文）Evaluation of functional roles of estrogen related receptors (ERRs) on differentiation of mesenchymal-derived cells using induced pluripotent stem cells.

研究代表者

伊地知 暢広（IJICHI NOBUHIRO）

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80380624

研究成果の概要（和文）：

エストロゲン関連受容体（ERR）の間葉系由来細胞分化における役割を解明することを目的とし、定法と初期化特異的EGFP発現系を組み合わせることで遺伝子改変マウス由来iPS細胞を樹立した。さらに、分化マスター遺伝子強制導入による効率的分化誘導法を用いて脂肪・骨芽細胞分化誘導を行った結果、一定の分化誘導効率の改善は見られ、同時に対象となるiPS細胞クローン間のばらつきが大きいことも判明した。幹細胞分化における機能評価とiPS細胞の実用化には、均質なiPS細胞クローンの樹立・選別法の確立が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the functional roles of estrogen related receptors (ERRs) on the reprogramming and differentiation of mesenchymal-derived cells, we examined combined methods achieving efficient reprogramming and mesenchymal-derived cell differentiation using viral vector systems. This made a partly improved efficiency of differentiation, while it was demonstrated that differentiation potential of iPS cells varied widely between clones. In this study, we established the basis for evaluation of ERR functions in reprogramming and differentiation, while these results suggest that generation of genetically and functionally homogenous iPS cells is necessary for in vivo evaluation of gene function as well as clinical application of iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 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：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：再生医学、発生・分化、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞（ES細胞）は、ほぼ無限の増殖能とあらゆる組織への多分化能を有した細胞であり、その特性から再生医療への応用が期

待されている。しかしながら、未受精卵の利用に伴う倫理的問題を孕んでおり、ES細胞研究の積年の問題として今なおその是非が問われている。そこで、最終分化した体細胞が

ら多分化能を有する幹細胞への転換法が模索され、核移植法や細胞融合法などが確立されてきたものの、いずれの方法もやはり胚の利用が不可避であった。この問題を乗り越える画期的な方法が、2007年に2つのグループにより同時に報告された。これは、初期胚特異的発現パターンを示す Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc (山中グループ: Takahashi and Yamanaka, Cell 126, 663-676, 2007) あるいは Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28 (Thomsonグループ: Yu, et al., Science 318, 1917-1920, 2007) の、4つの転写因子をウイルスベクターを用いて強制的に発現させることで、体細胞を幹細胞様細胞へと再プログラミングできる方法で、胚の利用を伴わない。このような人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem 細胞: iPS 細胞) は、ES 細胞に代わる新たな再生医療戦略として注目を集めている。さらに、同一個体由来の細胞を利用するため、臓器移植時の自己・非自己問題をも回避できる可能性が示唆されている。一方で、ウイルスベクターの利用や原がん遺伝子である c-Myc の導入に伴う癌化の危険性が問題点として指摘されている。その後皮膚以外の体細胞の iPS 化や、新規初期化誘導因子の発見や化学物質の利用など誘導法の改善についての報告等が数多くなされており、精力的な研究が世界的に進められている。そうした中で、エストロゲン関連受容体 ERR が Klf4 遺伝子に代わる初期化誘導因子として機能するという報告がなされた (Feng, et al., Nat. Cell Biol. 11, 197-203, 2009)。エストロゲン関連受容体 (ERR α , ERR β , ERR γ) は核内受容体ファミリーに属し、ホルモン作用、細胞分化、エネルギー代謝、発癌など様々な生理機能ならびに病態において重要な役割を担う転写因子である。ERR と ERR は広範な組織発現パターンを示し、特に脂肪酸の β 酸化活性の高い褐色脂肪組織や筋肉組織において高発現しており、エネルギー代謝に関わることが示唆されている。これに関連して、我々は ERR と ERR のそれぞれが白色脂肪細胞分化をも促進することを最近見出している。一方、ERR はノックアウトマウスが胎盤形成不全により胎性致死であったことから (Luo, et al., Nature 388, 778-782, 1997) 胎盤形成に重要であるものの、成体における生理的機能、ならびに癌化における意義については十分に解明されていなかった。細胞初期化における ERR の作用は様々な標的遺伝子の転写調節を介してなされ、広範な転写調節ネットワークを形成していると考えられるが、その分子メカニズムや他の ERR ファミリーの細胞初期化ならびに細胞分化等における生理的意義、病態における役割などについては未解明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、エネルギー代謝や発癌における機能的役割に加え、細胞分化においても重要な役割を担うことが明らかにされつつあるエストロゲン関連受容体 (ERR α , ERR β , ERR γ) の、細胞初期化ならびに間葉系由来細胞分化における役割を解明することを目的としている。そのため、野生型マウス由来の iPS 細胞を樹立し、さらにこれら iPS 細胞から間葉系由来細胞である骨芽細胞・脂肪細胞への分化系を樹立する一連の技術基盤を確立し、その後 ERR 遺伝子改変マウスを用いた解析への応用を検討した。

3. 研究の方法

N 末端に Flag タグを付加した ERR の cDNA を CAG プロモーター下流に連結したプラスミドを構築し、直鎖状にした DNA フラグメントをマウス受精卵にマイクロインジェクションすることで ERR トランスジェニックマウス作出を行った。ERR の細胞初期化ならびに間葉系細胞分化における生理的役割の評価基盤として、野生型マウスならびに ERR のそれぞれの遺伝子のトランスジェニックマウス由来胚性繊維芽細胞 (MEF) を対象に、iPS 細胞への誘導を行った (図 1)。

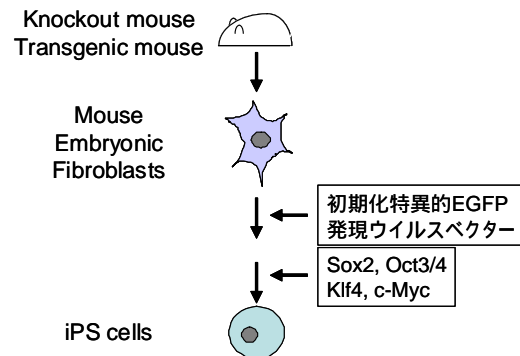


図 1. 遺伝子改変マウス由来 iPS 細胞樹立

胎生 16 日のマウス胚から、定法に従い繊維芽細胞を単離した。iPS 化の効率上昇を目的とし、初期胚特異的遺伝子 SOX2 あるいは Oct3/4 のエンハンサー領域を EGFP 遺伝子に連結したコンストラクトを有するレンチウイルスベクター (PL-EOS-S4(+)-EGFP-IRES-Puror vector, PL-EOS-C3(+)-EGFP-IRES-Puror vector, Hotta, et al., Nat. Methods 6, 370-376, 2009) を 293T 細胞にトランスフェクション後、ウイルス液を MEF に感染させ、安定発現株の樹立を行った。その後、初期化因子 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc 遺伝子をそれぞれコードするレトロウイルスベクターを Plat-E 細胞 (Cell Biolabs, CA) にトランス

フェクション後、そのウイルス液をさらに感染させ、iPS細胞誘導を行った。この際、DsRedを発現するレトロウイルス液も同時に調整・感染させ、レトロウイルス由来DNA挿入領域の細胞初期化に伴うサイレンシングもスクリーニングのさらなる指標とした。樹立したiPS細胞の性質評価として、DsRedの発現消失、EGFP発現、細胞塊形態変化の観察を行った。増殖能についてはWST-8アッセイ(ナカライテスク)により検討した。初期胚特異的マーカー遺伝子発現について、iPS細胞からISOGEN(ニッポンジーン)を用いてtotal RNAを調整し、定量的RT-PCR法(ABI PRISM 7000, Applied biosystems社)を用いて検討した。

iPS細胞から間葉系由来細胞への分化誘導は、脂肪細胞分化誘導ではPPAR γ 遺伝子、骨芽細胞分化誘導ではRunx2遺伝子をそれぞれ発現するアデノウイルスベクター(Ad-CA-PPAR γ , -Runx2)を293T細胞へトランスフェクションし、ウイルスを含む培養液を感染させることにより行った(Tashiro, *et al.*, *Stem Cells* 27, 1802-1811, 2009)。感染iPS細胞は、その後hanging-drop法により胚様体(embryoid body)を形成させた。脂肪細胞への分化誘導は、インスリン、デキサメタゾン、IBMX、トリオドサイロニンを用いて行い、Oil-red O染色により評価を行った。骨芽細胞への分化誘導は、アスコルビン酸、2-グリセロリン酸、デキサメタゾンを用いて行い、評価はvon Kossa染色ならびにアルカリフォスファターゼ染色により行った。

4. 研究成果

細胞初期化ならびに間葉系細胞分化における生理的役割の評価として、野生型マウスならびに遺伝子改変マウスから胚性繊維芽細胞(MEF)を単離し、iPS細胞への誘導を行った。その方法として、Sox2エンハンサーならびにレトロトランスポゾン由来細胞初期化特異的プロモーターにより発現制御されるEGFP遺伝子発現コンストラクトを有するレンチウイルスを予め感染させる方法を用いて、安定発現株の樹立を行った。その後、初期化因子をレトロウイルスベクターにより強制発現させiPS化を誘導した。得られたiPS細胞はEGFP発現ならびにDsRed消失を指標として選別し、その後、細胞塊形態変化、増殖能、初期胚特異的マーカー遺伝子発現などの検討を行った。iPS細胞コロニーの形態ならびに増殖能について遺伝子型間の顕著な差は見られなかった。さらに、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycのいわゆる山中4因子に加え、Nanog、Fgf4、Eras、Tgdf1、Zfp42などの初期胚特異的遺伝子の発現レベルを定量的RT-PCRにより確認したところ、遺伝子型によ

る顕著な差は見られなかった。遺伝子改変マウス由来iPS細胞の間葉系細胞分化誘導として、PPAR γ 遺伝子あるいはRunx2遺伝子をそれぞれ発現するアデノウイルスベクターを感染させる方法を用いて脂肪細胞分化ならびに骨芽細胞分化誘導を行った。その結果、本方法により一定の脂肪細胞分化ならびに骨芽細胞分化の誘導効率の改善は見られ、同時に対象となるiPS細胞クローン間のばらつきが大きいことも判明した。これに加え、均質な胚様体形成の方法が未確立であったことも分化能評価における結果の不安定性の一因であることも考えられた。これらの検討から、幹細胞分化における機能評価、あるいは生理機能や病態に関連する生理活性物質ならびに薬剤のスクリーニングに向けたiPS細胞の実用化には、遺伝的かつ性質的により均質なiPS細胞クローンの樹立もしくは選別法の確立が必要であると考えられた。本研究において確立した、ERRの細胞初期化ならびに間葉系由来細胞分化に対する機能評価のための研究基盤に、これらの視点からの改善をさらに加えることで、遺伝子改変マウス由来のiPS細胞を用いた細胞初期化ならびに細胞分化におけるより精度の高い機能評価系の確立が期待された。

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3件)

1. Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S. Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Horm Cancer* 2012, DOI: 10.1007/s12672-012-0111-0. 査読有
2. Abe Y, Ijichi N, Ikeda K, Kayano H, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. Forkhead box transcription factor, forkhead box A1, shows negative association with lymph node status in endometrial cancer, and represses cell proliferation and migration of endometrial cancer cells. *Cancer Sci* 2012;103:806-812. 査読有
3. Shigekawa T, Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S: FOXP1, an estrogen-inducible transcription factor, modulates cell proliferation in breast cancer cells and 5-year

recurrence-free survival of patients with tamoxifen-treated breast cancer. Horm Cancer 2011;2: 286-297. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

1. 重川崇、伊地知暢広、池田和博、堀江公仁子、清水千佳子、佐治重衡、青儀健二郎、津田均、大崎昭彦、佐伯俊昭、井上聡 ER陽性乳癌におけるフォークヘッド転写因子FOXP1の役割 第12回関東ホルモンと癌研究会 2012年1月21日 文京区

2. 伊地知暢広、重川崇、阿部弥生、池田和博、堀江公仁子、茅野秀一、津田均、大崎昭彦、竹田省、佐伯俊昭、井上聡 乳がんならびに子宮内膜がんにおけるフォークヘッド転写因子FOXA1の機能と臨床的意義 第19回日本ステロイドホルモン学会 2011年11月26日 福岡市

〔図書〕(計1件)

1. Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. 2012. Roles of Estrogen-Related Receptors in Adipocyte Differentiation. Adipocytes: Biology, Regulation and Health Impact. New York: Nova Science Publishers. At press.

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊地知 暢広 (IJICHI NOBUHIRO)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号: 80380624