

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659115

研究課題名(和文)体細胞初期化因子の新規ヒト発現レポーター細胞システムの樹立とその応用

研究課題名(英文) Establishment of a new human reporter cells which can monitor the expression of somatic cell initialization factor and its application for elucidating the molecular mechanism of cell reprogramming

研究代表者

藤田 寿一 (Fujita, Hisiakazu)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30212187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Nanogは分化した細胞を、分化多能性と自己複製能をもつ未分化な状態へ細胞を戻すこと(リプログラミング)ができる体細胞初期化因子であり、終末分化した細胞では発現していない。Nanog遺伝子がヒトES/iPS細胞の分化に伴い発現が抑制される機構を解明するために、選択薬剤存在下において、未分化な状態では生存できるが、分化すると死滅する体細胞初期化因子の発現に細胞の生死が依存するレポーター細胞を樹立し解析した。また、GPCRが分化多能性と自己複製能に関与することから、フォルミル・ペプチド受容体に関して、ホモロジー・モデリングによる3D構造の構築とリガンドのドッキング・シミュレーションを行い解析した。

研究成果の概要(英文)：A homeobox transcription factor, Nanog, is one of the genes which support the self-renewal and pluripotency of embryonic stem (ES) cells. Nanog can reprogram human somatic cells to pluripotent stem cells in combination with OCT4, SOX2, and LIN28. Molecular mechanism(s) of the regulation of Nanog expression is important for understanding of reprogramming process. We sought to establish the reporter cell line, which can monitor the somatic cell initialization factor expression for elucidating the molecular mechanism(s) of cell reprogramming. In addition, stem cell pluripotency and differentiation are regulated by the signal transduction pathways involved in G protein coupled receptors (GPCRs). Therefore, we investigate ligand binding mode of the representative GPCRs, human formylpeptide receptor (hFPR) and formylpeptide receptor-like 1 (hFPRL1) by three-dimensional homology modeling of receptors and ligand docking simulation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：体細胞初期化因子

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ES細胞(胚性幹細胞)は体外組織を除く個体を構成するすべての細胞に分化できる分化万能性(pluripotency)を持つ。ES細胞では、転写因子であるOct3/4(POU domain, class5, transcription factor 1; Pou5f1)やSox(SRY-related HMG box)遺伝子ファミリーに属するSox2あるいはNanogなどの遺伝子が発現しており、ES細胞としての分化多能性が維持されているが、終末分化した体細胞ではこれらの遺伝子は発現していない。すなわち、全ての体細胞はOct3/4やSox2あるいはNanog遺伝子を核内に持ってはいないが、様々な転写因子やエピジェネティック機構により、発現が抑制されていると考えられている。

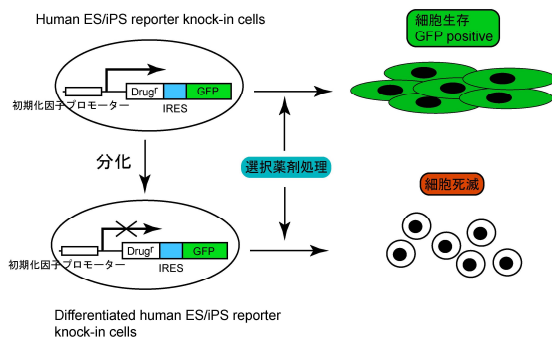
山中らのグループは、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-myc遺伝子を体細胞であるヒト由来線維芽細胞に導入してES細胞のような分化多能性と、分裂増殖を経てもそれを維持できる自己複製能を持つ誘導多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cells; iPS)と呼ばれる細胞を樹立し、また、ジェームズ・トムソンらのグループはOct3/4、Sox2、NanogおよびLin28遺伝子の導入によりヒトiPS細胞を樹立している。したがって、Oct3/4、Sox2およびNanog遺伝子は分化した体細胞を未分化な分化万能細胞へと戻すこと(リプログラミング)ができる体細胞初期化因子であり、これらの遺伝子発現制御の分子機構解明とそれに関与する制御因子の活性制御は重要な研究課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)図1に示すように選択薬剤存在下において、細胞は、未分化な状態では生存できるが、分化した状態では死滅するという、体細胞初期化因子の発現に依存して細胞の生死がコントロール可能なレポーター細胞システムを樹立する。

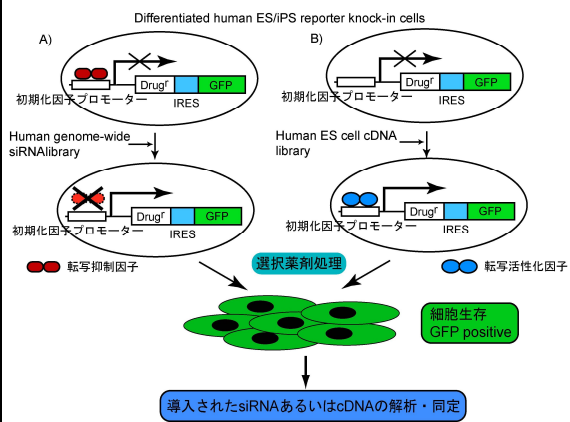
(2)分化させたレポーター細胞株にゲノムワ

図1: 体細胞初期化因子発現レポーター細胞株の樹立



イド siRNA ライブラリーあるいは ES 細胞由来の cDNA ライブラリーを導入し、選択薬剤存在下で生存可能な細胞を取得して、導入された siRNA あるいは cDNA を網羅的に解析することで、Oct3/4、Sox2 および Nanog の遺伝

図2: 体細胞初期化因子の発現を制御する因子の同定



子発現を制御する因子を同定する(図2)。

(3)同定した体細胞初期化因子の遺伝子発現制御因子の立体構造をホモロジー・モデリングにより構築して、低分子化合物のドッキング・シミュレーションによるバーチャル・スクリーニングを行い、制御因子の活性を修飾する可能性のある低分子化合物の検索・同定を目的とした。

(4)ヒト ES/iPS 細胞において G-protein coupled receptors (GPCRs)が分化多能性と自己複製能に関与していることから、GPCRであるフォルミル・ペプチド受容体(hFPRあるいはhFPR1)に関し、ホモロジー・モデリングによる受容体の3D構造を構築してシステイン・プロテアーゼであるカルpain阻害剤のドッキング・シミュレーションを行うことでリガンド・受容体についての解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) レポーターノックイン・ターゲティング・ベクターの構築
- (2) ヒト iPS/ES 細胞へのレポーターノックイン・ターゲティング・ベクターの導入、および樹立したレポーター細胞株の特性確認
- (3) ゲノムワイド siRNA 発現ライブラリーのレポーター細胞への導入と生存細胞選択によるネガティブ制御因子の同定
- (4) ES 細胞由来の cDNA 発現ライブラリーの構築およびそのレポーター細胞への導入と生存細胞選択によるポジティブな制御因子の同定
- (5) Oct3/4、Sox2 あるいは Nanog の発現制御に関与する因子群の立体構造予測
- (6) Oct3/4、Sox2 あるいは Nanog の発現制御に関与する因子群に相互作用可能な低分子化合物のバーチャル・スクリーニング
- (7) Protein Homology/analogy Recognition Engine (Phyre) server によるフォルミル・ペプチド受容体(hFPR および hFPR1)の3D構造を構築およびArgusLabを用いたリガンド・ドッキングシミュレーション
- (8) hFPR ならびに hFPR1 の予測 fMLF 結合部位に関与するアミノ酸のすべてをアラニンに置換した変異受容体の作製と、それらを発現する HEK293 細胞の樹立

- (9) 変異 hFPR あるいは hFPRL1 を発現する HEK293 におけるカルパイン阻害剤刺激による細胞内カルシウム濃度の一過性の上昇を指標にした解析

4. 研究成果

(1) レポーターノックイン・Nanog ターゲッティング・ベクターの構築

ヒト Nanog ゲノム遺伝子を含む大腸菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome: BAC) クローン (RP-11-298L8) を有する大腸菌株から、ファージ由来 Red 遺伝子 (Red (エクソヌクレアーゼ) および Red (DNA 結合タンパク質)) による相同組換え機構を利用した Red/ET 相同組換え法により、マルチサイト・ゲートウェイ技術を利用できるように、部位特異的組み換え反応に必要な配列を付加した Nanog 遺伝子のエクソン 1 をはさむ上流側の 5' 相同領域 (5' アーム) および下流側の 3' 相同領域 (3' アーム) を取得し、5' アーム・エントリークローン (5' -Nanog) および各 3' アーム・エントリークローン (3' -Nanog) を作製した。ネオマイシン、ハイグロマイシンあるいはピューロマイシンの薬剤耐性遺伝子 (Drug^r) をインターナル・リボゾーム・エントリーサイト (IRES) をもつ pIRES2-EGFP プラスミドに組み込んだレポーター遺伝子を作製した。

部位特異的組み換え反応に必要な配列を付加した各薬剤耐性遺伝子-IRES-GFP カセットを増幅するプライマーを用いて各レポーター遺伝子を増幅した後、BP 組み換え反応により、それぞれの薬剤耐性遺伝子を含むレポーター遺伝子エントリークローンを作製した。

で得られた Nanog の各 5' アーム・エントリークローンおよび各 3' アーム・エントリークローン、そして およびで作製した薬剤耐性レポーター遺伝子エントリークローンと pDEST DTA-MLS (ネガティブ選択用のジフテリア毒素 A 配列; DTA を含む) を用いて LR 組み換え反応によりレポーターノック・イン・Nanog ターゲッティング・ベクターを作製した。

- (2) レポーターノックイン・Nanog ターゲッティング・ベクターのヒト iPS 細胞への導入
ヒト Nanog レポーターノックイン・ターゲッティング・ベクターをエレクトロ・ポレーションによりヒト iPS 細胞へ導入し、ネオマイシンを含む培地で培養して、相同組み換えによるノックインが起こり、生存してくる Nanog 遺伝子のプロモーターが働き、選択薬剤耐性を獲得したクローンを選別してレポーター細胞株を樹立する予定であったが、選択薬剤耐性株が全く得られずエレクトロ・ポレーションによる遺伝子の導入効率が極端に低く、また、相同組み換えによるノックインの効率も悪いと考えられた。

そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いる遺伝子編集技術により先の問題点を解決することを試みた。まず、CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) を用いて CRISPR/Cas9 によるヒト Nanog 遺伝子の改変に必要な guide RNA (gRNA) を検索した。その結果、以下の 2ヶ所 A, B (A: start-end/459-481: AGAGAAGAGTGTCCGCAAAAAAGG, B: start-end/702-724/TAGCAATGGTGTGACGCAGAAGG) が off-target 効果の少ない gRNA の候補として予測され、gRNA および Cas9 発現ベクターである px459 の Bbs I サイトに cloning して px459-hNanog/459 および px459-hNanog/702 を作製した。また、A および B の配列を含む hNanog の target sequence 約 600 塩基を PCR で増幅後、pCAG-EGxxFP の SalI-EcoRI サイトに cloning して pCAG-EGxxFP-hNanog を作製し、dideoxy 法により塩基配列を確認した。

遺伝子導入効率の高いヒト胎児腎由来細胞 HEK293 に px459-hNanog/459 あるいは px459-hNanog/702 を pCAG-EGxxFP-hNanog と共に PEI を用いたりポフェクション法によりに遺伝子導入し、EGFP の蛍光を観察した (single strand annealing; SSA assay)。また、リポフェクション法により px459-hNanog/459 あるいは px459-hNanog/702 を HEK293 に遺伝子導入後、2 μg/ml の puromycin で選別してクローンを得た。

c) で得られたクローンから定法により全 RNA を抽出し、RT-PCR で Nanog の塩基配列を確認したところ、いくつかのクローンにおいて塩基の欠失が認められたことから、CRISPRdirect によるヒト Nanog 遺伝子の gRNA 候補は CRISPR/Cas9 システムで機能することが確認された。

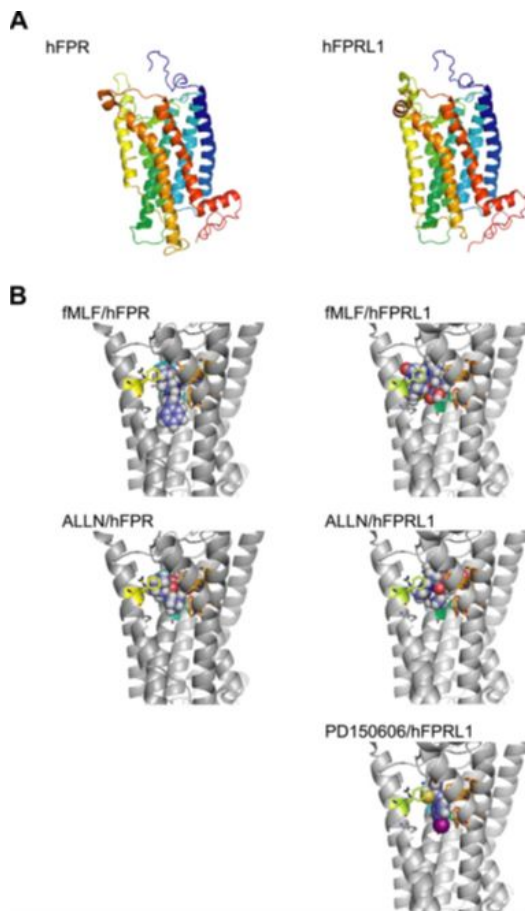
上記 b) で作製した px459-hNanog/459 あるいは px459-hNanog/702 をレポーターノックイン・Nanog ターゲッティング・ベクターと共にエレクトロ・ポレーションによりヒト iPS 細胞へ導入したところ、ネオマイシン耐性株が得られたことから、上記 d) と同様に Nanog の塩基配列を確認したところ、Nanog 遺伝子両アレルにノックインが起こっていた。

今後、px459-hNanog/459 あるいは px459-hNanog/702 とレポーターノックイン・Nanog ターゲッティング・ベクターの DNA 量の比率を変えて遺伝子導入して、Nanog 遺伝子の片側のアレルにノックイン・Nanog ターゲッティング・ベクターが挿入されたクローンを樹立し、Nanog 遺伝子の発現を制御する因子を同定・解析していく予定である。

- (3) システイン・プロテアーゼあるカルパインの阻害剤はヒトの好中球や単球において、百日咳毒素感受性のケモタキシスを誘導する (Katsube M et al. J Leukoc Biol.

2008 Jul; 84 (1): 255-63. doi: 10.1189/jlb.0907664., Noma H et al., Immunology. 2009 Sep; 128 (1 Suppl): e487-96. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03012.x.)。またカルパインの阻害剤は GPCR であるフォルミル・ペプチド受容体 (hFPR あるいは hFPRL1) を発現させた HEK293 において百日咳毒素感受性の細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こす (Fujita H et al. Arch Biochem Biophys. 2011 Sep 1; 513 (1): 51-60. doi: 10.1016/j.abb.2011.06.007.)。

今回、hFPR および hFPRL1 に関して、ホモロジー・モデリングによる 3D 構造を構築し、カルパイン阻害剤のドッキング・シミュレーションを行なったところ、以下の示すように、フォルミル・ペプチド受容体の代表的なリガンドである fMLF と同程度の結合自由エネルギーで、ペプチド性のカルパイン阻害剤 ALLN は hFPR および hFPRL1 に、また非ペプチド性の -mercapto



acrylic acid 誘導体である PD150606 は hFPRL1 にのみ結合することが明らかになった。

さらにドッキング・シミュレーションにおいてリガンドの結合に重要であると考えられた 10 か所のアミノ酸をアラニンに置換した hFPR および hFPRL1 を安定的に発現する HEK293 においては fMLF およびカルパイン阻害剤 (ALLN あるいは PD150606) による細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められなかった。したがって、カル

パイン阻害剤は、直接相互作用することでヒト・フォルミルペプチド受容体を活性化することが明らかとなった。

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 4 件)

Watanabe N, Kato T, Fujita H, Kitagawa S. Heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein Q is a novel substrate of SH2 domain-containing phosphatase-2.

J Biochem. 2013 Nov; 154 (5):475-80. doi: 10.1093/jb/mvt078. Epub 2013 Aug 13.

PubMed PMID: 23946508. (査読有)

Shirkoochi R, Fujita H, Darmanin S, Takimoto M. Gelsolin induces promonocytic leukemia differentiation accompanied by upregulation of p21CIP1. Asian Pac J

Cancer Prev. 2012; 13 (9):4827-34. PubMed PMID: 23167427. (査読有)

Fujita H, Kato T, Watanabe N, Takahashi T, Kitagawa S. Stimulation of human formyl peptide receptors by calpain inhibitors: homology modeling of receptors and ligand docking simulation. Arch Biochem Biophys. 2011 Dec 15; 516 (2):121-7. doi:

10.1016/j.abb.2011.09.017. Epub 2011 Oct 7. PubMed PMID: 22005393. (査読有)

Fujita H, Kato T, Watanabe N, Takahashi T, Kitagawa S. Calpain inhibitors stimulate phagocyte functions via activation of human formyl peptide

receptors. Arch Biochem Biophys. 2011 Sep 1; 513 (1):51-60. doi: 10.1016/j.abb.

2011.06.007. Epub 2011 Jun 23. PubMed PMID: 21723247. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

藤田 寿一、cAMP によるヒト抗アポトーシスタンパク質 Mcl-1 の分解抑制の分子機構、第 35 回 日本炎症・再生医学会、2014 年 7 月 2 日、万国津梁館 (沖縄県・名護市)

加藤 隆幸、Regulation of G-CSF/IFN/

ATP on TLR agonist-induced TNF-production in human neutrophils.、第 75 回 日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 12 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館（北海道・札幌市）

加藤 隆幸、LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からの TNF- 産生の G-CSF/IFN/ATP による制御機構、第 34 回 日本炎症・再生医学会、2013 年 7 月 3 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

藤田 寿一、Activation of human formyl peptide receptors by calpain inhibitors.、第 74 回 日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 20 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

藤田 寿一、カルパイン阻害剤はヒト・フォルミルペプチド受容体と直接相互作用して細胞機能を活性化する、第 105 回 近畿生理学談話会、2012 年 9 月 29 日、関西医科大学（大阪府・森口市）

藤田 寿一、カルパイン阻害剤はヒト・フォルミルペプチド受容体と直接相互作用して活性化する、第 33 回 日本炎症・再生医学会、2012 年 7 月 6 日、ホテル日航福岡（福岡県・福岡市）

Hisakazu Fujita, Stimulation of human formyl peptide receptors by calpain inhibitors., BIT's 5th Anniversary of Protein and Peptide Conference (PepCon-2012), 2012 年 3 月 25 日、北京、(中国)

藤田 寿一、Activation of cell functions by calpain inhibitors via human formyl peptide receptors.、第 73 回 日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 15 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

藤田 寿一、カルパイン阻害剤はヒトホルミルペプチド受容体を介して食細胞機能を活性化する、第 104 回 近畿生理学談話会、2011 年 10 月 1 日、大阪医科大学（大阪府・高槻市）

藤田 寿一、カルパイン阻害剤はフォルミル・ペプチド受容体を介して細胞機能を活性化する、第 32 回 日本炎症・再生医学会、2011 年 6 月 3 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕(計 1 件)

Seiichi Kitagawa, Takayuki Kato, Maki Kitagawa, Megumi Aomatsu, Hisakazu Fujita; Biological Effects of calpain inhibitors on human phagocyte functions. In Calpain: Structure, Biology and Clinical Significance. (https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=40972&osCsid=49f7bcf494a4c93a61e156529b0e941a)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/physiology2/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

藤田 寿一 (FUJITA, Hisakazu)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：30212187