

## 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：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590232

研究課題名(和文) 未分化細胞の不均一な反応性と可逆的分化の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the non-uniform response and reversible differentiation of stem cells

研究代表者

高橋 秀治 (TAKAHASHI, SHUJI)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：90447318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では2種類の内胚葉へのスイッチ因子の探索を試みた。DNAアレイから見つかった因子や他の動物の研究から効果が示唆されている因子を数多くクローニング・過剰発現し、スイッチ機能の保持しているかを確かめたが現在のところ確定的な情報は得られていない。引き続きスクリーニングを行うことを計画している。また、iPS細胞の単一の内胚葉への分化を引き起こす方法については、本研究により単一の胚体内胚葉への不可逆的分化方法が開発できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we screened switch factors for two different endoderm in *Xenopus*. Using information from DNA array and study of the other model animals, a lot of gene are cloned and tested by overexpression. However, the factors did not identified. We are trying to functional screening. We developed a new induction method from human iPS cell to embryonic endoderm. Using this methods, We are trying to induce pancreatic endoderm.

研究分野：発生生物学、幹細胞

キーワード：アフリカツメガエル ネットイツメガエル ヒトiPS細胞 細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らはアフリカツメガエル胚の外胚葉片(アニマルキャップ)およびヒト iPS 細胞を用いた内胚葉・中胚葉への細胞分化の研究を行ってきた。この中で内胚葉の誘導には Activin/Nodal シグナルが必須であること、誘導因子の本体は Nodal であること、アニマルキャップは 2 種類の細胞集団からなりこれらは Activin/Nodal シグナルに対し異なる反応を示すこと、正常な形体形成運動には両方の細胞の相互作用が必要であることを明らかにしてきた (Takahashi et al. **Development** 2000, Ninomiya et al. **Nature** 2004, Takahashi et al. **Genesis** 2006, Ninomiya et al. **Nature Cell Biology** 2008)。これらの研究から現在メカニズムが明らかになっていない、重要な現象を見出している。これらの解明には位置情報を考慮する必要があり、発生学や形態学の視点に立った研究および理解が必要であると考え、この分野に申請する事にした。

### 2. 研究の目的

本申請の研究目的は、未分化細胞(胚の一部であるアニマルキャップおよびヒト胚性幹細胞)の反応の不均一性の分子メカニズムを明らかにし、均質な分化引き起こす方法を開発することである。また、分化させた iPS 細胞が元の iPS 細胞へ戻ってしまう可逆性の分子メカニズムを解明し、胚発生のように不可逆な分化を引き起こす新しい分化誘導法を開発することである。

#### (本研究の具体的な目的)

- (1) 同一な濃度の Activin による 2 種類の内胚葉への分化のメカニズムの解明。
- (2) Activin シグナルに対するヒト iPS 細胞が示す可逆的な分化のメカニズムの解明。
- (3) ヒト iPS 細胞を用いた 2 種類の内胚葉の単独誘導法と不可逆的な分化誘導法の開発。

### 3. 研究の方法

- (1) 同一シグナルに対する異なる反応性の分子機構の解析を両生類胚を用いて行う。このために遺伝子マーカーの収集、推定される候補因子の過剰発現スクリーニングを行う。またヒト iPS 細胞を用いて「反応性の違いが微小環境認識によるかどうか」を調べた上で、「分子メカニズムがヒト iPS 細胞と両生類と同じであるか否か」を明らかにする。
- (2) ヒト iPS 細胞の可逆的な分化メカニズムを明らかにし、不可逆的に分化させる「胚の中であって成体にはない脱 iPS ファクター」の正体を明らかにする。
- (3) 明らかになるメカニズムに基づき、ヒト iPS 細胞の分化完全制御法を確立する。

### 4. 研究成果

- (1) 同一な濃度の Activin による 2 種類の内胚葉への分化のメカニズムの解明について

同一な濃度の Activin による 2 種類の内胚葉への分化メカニズムの解明については、まず、ツメガエルの DNA アレイ解析から得られた多数の候補のうち、胚の外層/内層特異的に発現する遺伝子についてツメガエル胚を用いてホールマウントハイブリダイゼーションを行い、候補を絞ることに成功した。選出された候補遺伝子をクローニングし 2 種類の内胚葉への分化制御への関与を過剰発現により解析したが、これらの遺伝子の中にはこの分化制御に関わる因子は見いだされなかった。そこで文献等の情報から類推される、この分化制御に関わる可能性のある遺伝子 (aPKC, par1, par3, lgl2, numb, numb-like, wnt5b, crumbs3, prox1, hes3.1, notch-ICD, delta-like, grh3) をクローニングし、過剰発現を行い、表層に発現する nodal2 が原腸胚の内部にも発現するようになるかどうかをホールマウント in situ hybridization 法により調べた。現在のところ、これらの遺伝子による明確な nodal2 の発現の変化は見られていない。また、EMT 関連遺伝子である ovo-like2 に関してクローニングを行い同様の実験を試みている。

一方、マウス胚の研究から、卵内で局在化して存在する Hippo-Yap Pathway の遺伝子群がマウス胚の内層と外層の分化に関与していることが知られている。そこで Hippo Pathway の構成因子 (Mst1, Mst2, Lats1, Lats2, Yap1, Tead) をツメガエルでクローニングし解析した。これらの遺伝子はツメガエル卵では局在した発現をしておらず、マウス胚の胚体と胚体外を形成するメカニズムはツメガエルでは保存されていないことが明らかになった。また、Mst2 は神経胚期に胚の造血領域に局在化して発現し、血球分化・細胞増殖のスイッチとして機能していることが明らかになった (Nejigane et al. 2013)。この研究により、マウス卵の胚体と胚体外をわけるときのシステムは目的のシステムでないことがわかった。これまでの研究で ovo-like-2 の結果次第であるが、もし関与が観察されない場合は、この分化制御を行っている因子は現在想定され得ない全く新規の制御システムであることになる。そこで、過剰発現スクリーニング発現の準備 (ライブラリー作製) とターゲット遺伝子 (nodal2) のシスエレメント解析のための正確なアフリカツメガエルゲノム情報の取得及び解析を進行させている。また、派生的な研究結果については、胚の内部に発現する OTX2 の論文を始め多くの論文を国際誌に発表することができた。

- (2) Activin シグナルに対するヒト iPS 細胞が示す可逆的な分化のメカニズムの解明。ヒト iPS 細胞の反応性の違いについてはコロニー内の微小環境の違いがあるのではないかとする想定のもと、当初生体染色法による識別を利用した分化解析を検討していたが、細胞へのダメージが大きいうまくいかなかった。そこで、iPS 細胞のコロニー数十個を

中心部と周辺部に切り分けてサンプリングし、DNA アレイを用いて発現量に差があるものを抽出した。この結果、ほとんどの遺伝子の発現量に変化がないのにも関わらず Nodal、Lefty、Nanog が周辺部に数十倍多く発現していることが明らかになった。この結果は当初予想したようにそもそもコロニーの中には微小環境による遺伝子発現の違いがあることが確認された。これらが均一な分化の妨げ、および可逆的な分化の原因になっていると考えられる。

(3) ヒト iPS 細胞を用いた 2 種類の内胚葉の単独誘導法と不可逆的分化誘導法の開発。ヒト iPS 細胞の 2 種類の内胚葉のうち、胚体内胚葉の元となる細胞に関しては単独で誘導する方法を開発できた。activin 処理だけでは内胚葉へ不可逆的に分化させることが全くできないのであるが、これに Wnt signal inhibitor 処理を同時に行うことにより不可逆的な誘導を引き起こすことに成功した。またこの処理に加え、最初に蔕く細胞の密度をコントロールすることにより単独の胚体内胚葉と分化させることが可能となった。これらの結果はすでに国際誌に報告し、現在この誘導した内胚葉細胞を用いて脾臓を構成する細胞を誘導する研究を開始している。

#### 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 12 件)

- Haramoto Y, Oshima T, Takahashi S, Yuzuru Ito. Characterization of the insulin-like growth factor binding protein family in *Xenopus tropicalis*. *Int. J. Dev. Biol.* 2014, 58: 705 - 711, doi: 10.1387/ijdb.150032yi, 査読あり
- Haramoto Y, Oshima T, Takahashi S, Asashima M, Ito Y, Kurabayashi A. Complete mitochondrial genome of "Xenopus tropicalis" Asashima line (Anura: Pipidae), a possible undescribed species. *Mitochondrial DNA.* 2015 Feb 25:1-3, doi:10.3109/19401736.2015.1018213, 査読あり
- Ninomiya H, Mizuno K, Terada R, Miura T, Ohnuma K, Takahashi S, Asashima M, Michiue T. Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015 Jan;51(1):1-8, doi: 10.1007/s11626-014-9801-y, 査読あり
- Yasuoka Y, Suzuki Y, Takahashi S, Someya H, Sudou N, Haramoto Y, Cho KW, Asashima M, Sugano S, Taira M. Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by Otx2 and TLE/Groucho for embryonic head specification. *Nat Commun.* 2014 Jul 9;5:4322. doi: 10.1038/ncomms5322, 査読あり
- H.Tanno, T.Shigematsu, S.Nishikawa, A.Hayakawa, K.Denda, T.Tanaka and M.Komada. Ubiquitin-interacting motifs confer full catalytic activity, but not ubiquitin chain substrate specificity, to deubiquitinating enzyme USP37. *Journal of Biological Chemistry* 289, 2415-2423, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.528372, 査読あり
- Nejigane S, Takahashi S, Haramoto Y, Michiue T, Asashima M. Hippo signaling components, Mst1 and Mst2, act as a switch between self-renewal and differentiation in *Xenopus* hematopoietic and endothelial progenitors. *Int J Dev Biol.* 2013;57(5):407-14. doi: 10.1387/ijdb.130010st, 査読あり
- Morita M, Yamashita S, Matsukawa S, Haramoto Y, Takahashi S, Asashima M, Michiue T. Xnr3 affects brain patterning via cell migration in the neural-epidermal tissue boundary during early *Xenopus* embryogenesis. *Int J Dev Biol.* 2013;57(9-10):779-86. doi: 10.1387/ijdb.130161tm, 査読あり
- Li X, Bian Y, Takizawa Y, Hashimoto T, Kitamura N, Ikoma T, Tanaka J, Inagaki Y, Komada M, and Tanaka T. ERK-dependent downregulation of Skp2 reduces Myc activity with HGF, leading to inhibition of cell proliferation through a decrease in Id1 expression. *Mol. Cancer Res.*, 11, 1437-1447, 2013. doi:10.1158/1541-7786.MCR-12-0718, 査読あり
- Tanno H, Shigematsu T, Nishikawa S, Hayakawa A, Denda K, Tanaka T and Komada M. Ubiquitin-interacting motifs confer full catalytic activity, but not ubiquitin chain substrate specificity, to deubiquitinating enzyme USP37. *J. Biol. Chem.* 289,

2415-2423, 2013.  
doi:10.1074/jbc.M113.528372, 査読あり

10. Hara M, Abe Y, Tanaka T, Yamamoto T, Okumura E, Kishimoto T. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase promoting factor. Nature Communications vol. 3, 2012, 1059, doi: 10.1038/ncomms2062, 査読あり
11. Fujino T, Takeuchi A, Maruko-Ohtake A, Ohtake Y, Satoh J, Kobayashi T, Tanaka T, Ito H, Sakamaki R, Kashimura R, Ando K, Nishimaki-Mogami T, Ohkubo Y, Kitamura N, Sato R, Kikugawa K, Hayakawa M. Critical role of farnesoid X receptor (FXR) for hepatocellular carcinoma cell Proliferation. J.Biochem. vol. 152, 2012, 577-586, doi: 10.1093/jb/mvs101, 査読あり
12. Ninomiya H, David R, Damm EW, Fagotto F, Niessen CM, Winklbauer R. Cadherin-dependent differential cell adhesion in Xenopus causes cell sorting in vitro but not in the embryo. J Cell Sci. 2012 Apr 15;125(Pt 8):1877-83. doi: 10.1242/jcs.095315. , 査読あり

〔学会発表〕(計37件)

1. 原本悦和、高橋秀治(広島大)、小沼泰子、伊藤弓弦、浅島誠 “Functional analyses of a novel insulin-like factor” 第47回日本発生生物学会、名古屋(2014年5月27日~30日)
2. 今井 紗綾、桐ヶ谷 嘉章、安岡 有理、鈴木 穰、高橋 秀治、浅島 誠、菅野 純夫、平良 眞規“内胚葉系列の分化を担う発生準備エンハンサーの形成メカニズムの解析”(今井、口頭・ポスター発表) 第37回分子生物学会年会、横浜(2014年11月25日~27日)
3. 佐藤 夢子、柴野 卓志、儘田 博志、南 航平、細野 枝里菜、岡田 甫、高橋 秀治、浅島 誠、平良 眞規“眼の初期発生における転写活性調節に関わる細胞周期依存的な Otx2 のリン酸化修飾の役割”(佐藤、ポスター発表) 第37回分子生物学会年会、横浜(2014年11月25日~27日)
4. Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken Cho,

Makoto Asashima, Sumio Sugano, Masanori Taira "Genomics Study of the Spemann-Mangold Organizer: Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification." 15th International Xenopus Conference、Asilomar (California, USA) (2014年8月24日~30日)

5. Yoshikazu Haramoto, Tomomi Ooshima, Shuji Takahashi, Makoto Asashima, Yuzuru Ito “Comparative analysis of insulin-like growth factor binding proteins.” 15th International Xenopus Conference、Asilomar (California, USA) (2014年8月24日~30日)
6. 田中利明「分子細胞生物学的手法による魚鱗コラーゲン高次構造構築の試み」2014年4月16日 第32回魚コラーゲン研究会 於：東工大蔵前会館(東京)
7. 西川周平、重松壮、丹野秀崇、早川哲、田中利明、伝田公紀、駒田雅之「脱ユビキチン化酵素 USP37 におけるユビキチン結合モチーフ UIM の機能解析」演題番号:P-6、於：茨城大学理学部(茨城)2014年6月14日 日本生化学会関東支部例会
8. 川口紘平、齊藤尚吾、早川哲、田中利明、山本章嗣、駒田雅之「核小体ストレス応答におけるユビキチン化の機能」2014年6月14日 日本生化学会関東支部例会 於：茨城大学理学部(茨城)
9. 田中利明「三次元層板構造を有する次世代型コラーゲン材料」2014年7月15日 平成26年度ソリューション研究機構全体会議 於：東工大大会館(神奈川)
10. 田中利明「コラーゲン分泌過程のライブイメージング法による解析」2014年10月14日 第33回魚コラーゲン研究会 於：豊通ケミプラス 会議室(東京)
11. 川口紘平、齊藤尚吾、早川哲、田中利明、山本章嗣、駒田雅之「核小体ストレス応答における分解性及び非分解性ユビキチン化修飾の機能解析」2014年10月16日 第87回日本生化学会大会 ワークショップ(査読選抜口頭発表)於：国立京都国際会館(京都)
12. 川口紘平、齊藤尚吾、早川哲、田中利明、

- 山本章嗣、駒田雅之「核小体ストレス応答における分解性及び非分解性ユビキチン化修飾の機能解析」2014年10月16日 第87回日本生化学会大会於：国立京都国際会館（京都）
13. 川口紘平、齋藤尚吾、早川哲、田中利明、山本章嗣、駒田雅之「核小体ストレス応答における分解性及び非分解性ユビキチン化修飾の機能解析」2014年11月26日 第37日本分子生物学会年会ワークショップ 於：パシフィコ横浜（神奈川）
  14. 川口紘平、齋藤尚吾、早川哲、田中利明、山本章嗣、駒田雅之「核小体ストレス応答における分解性及び非分解性ユビキチン化修飾の機能解析」2014年11月26日 第37日本分子生物学会年会於：パシフィコ横浜（神奈川）
  15. 田中利明「魚鱗が有するコラーゲン三次元層板構造の有効利用にむけて」2015年1月25日 第9回長野ミーティング於：ラフォーレ倶楽部白馬八方（長野）
  16. 田中利明「三次元層板構造を有する次世代型コラーゲン材料の医用展開について」2015年2月18日 第1回医用に向けたコラーゲン新規材料開拓に関する研究会 於：東工大南7号館学科会議室（東京）
  17. 田中利明「三次元層板構造を有する次世代型コラーゲン材料」2015年3月23日平成26年度ソリューション研究機構全体会議 於：東工大大会館（神奈川）
  18. 二宮裕将「ツメガエル後方神経組織の伸長運動は前後組織極性により方向付けられる」第9回XCIJ-MA・第8回ツメガエル研究会ジョイント研究集会、2014年11月28日、北里大学相模原キャンパス
  19. 二宮裕将「ツメガエル後方神経組織の伸長運動における前後組織極性の働き」第85回日本動物学会大会、2014年9月11-13日、仙台。
  20. Hiromasa Ninomiya “Elongation movement of *Xenopus* posterior neural tissue is directed by anteroposterior tissue polarity” 15th International *Xenopus* Conference, 2014年8月24日~30日, Pacific Grove, USA.
  21. Hiromasa Ninomiya “Role of anteroposterior tissue polarity in elongation movement of *Xenopus* posterior neural tissue” 第47回日本発生生物学会大会、2014年5月27日~30日、名古屋
  22. 田中利明「分子細胞生物学的手法に関する研究：魚鱗コラーゲン高次構造構築の試み」第29回魚コラーゲン研究会 2013年7月26日 於：倉敷市倉敷物語館 会議室
  23. 田中利明、駒田雅之「ツメガエル初期胚の尾部形成における母性 cyclin E タンパク質分解とエピジェネティック制御の関係」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日 於：神戸ポートアイランド
  24. 重松荘、西川周平、丹野秀崇、早川哲、田中利明、駒田雅之「脱ユビキチン化酵素 USP37 の活性にはたす UIM の役割」平成25年度第2回領域班会議プログラム、2013年12月11日 於：熱海ニューフジヤホテル
  25. 川口紘平、齋藤尚吾、西川周平、丹野秀崇、早川哲、田中利明、駒田雅之「核小体ストレス応答へのユビキチン化と脱ユビキチン化の関与」平成25年度第2回領域班会議プログラム、2013年12月11日 於：熱海ニューフジヤホテル
  26. 田中利明「The anticancer property of Hepatocyte Growth Factor」第8回長野ミーティング(口頭発表)、2014年3月2日 於：ラフォーレ倶楽部白馬八方
  27. 田中利明「*X. laevis* ゲノム解析の中間報告：細胞周期と Hippo シグナル伝達」第8回ツメガエル研究会首都圏支部会(口頭発表) 2014年3月16日 於：横浜市立大学 カメリアホール
  28. 有泉高史「アクチピンと臓器形成」日本生物教育会 第68回大会 2013年08月08日 於：玉川大学農学部（東京都）
  29. 三浦颯人、田川日奈子、有泉高史「変態促進させたアホロートルの四肢再生」日本動物学会 第84回大会、2013年9月26日、於：岡山大津島キャンパス（岡山県）
  30. 瀧澤友里、辺頴、小山遼、楊宇、駒田雅之、福光寛、中尾祥絵、皆川香織、山岡華兒、住吉秀明、稲垣豊、喜多村直実、田中利明「Hepatocyte growth factor (HGF) による細胞増殖制御機構の解明」第19回肝細胞研究会 2012.6.29、於：

札幌医科大学

31. 田中利明「哺乳類由来不死化遺伝子の導入による金魚うるこ細胞の株化について」第 25 回魚コラーゲン研究会、2012.7.17、於：札幌医科大学
32. S. Takahashi, A. Toyoda, Y. Kuroki, Y. Uno, Y. Izutsu, A. Suzuki, T. Michiue, H. Ogino, H. Ochi, T. Tanaka, A. Fukui, Y. Ito, N. Ueno, M. Asashima, Y. Matsuda, M. Taira, A. Fujiyama 「Analysis of the *Xenopus laevis* J-strain genome by BAC end sequencing, FISH, and RNA-sequence.」The 14th International *Xenopus* Conference, 2012.9.10, Giens Peninsula. South of France
33. 辺穎、瀧澤有里、李曉然、駒田雅之、喜多村直実、田中利明「肝細胞増殖因子 HGF による肝癌細胞株 HepG2 の不可逆的な増殖停止誘導におけるヒストン H3K9 のメチル化局在変化の解析」第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11、福岡国際会議場、於：マリンメッセ福岡
34. 仁禮綾香、駒田雅之、喜多村直実、田中利明「新規 Cdk inhibitor Ink4X のツメガエル初期発生過程における役割と細胞質における局在の解析」第 35 回日本分子生物学会年会、2012.12.13、福岡国際会議場、於：マリンメッセ福岡
35. Taejoon Kwon, Shuji Takahashi, Toshiaki Tanaka, Hideki Noguchi, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Yutaka Suzuki, Naoto Ueno, Masanori Taira, John B. Wallingford, Edward M. Marcotte. “What we can do with over 300 billion bases of RNA-seq data: The case of *Xenopus laevis* genome project.” International Symposium on Genome Science, 2013.1.9, The University of Tokyo, Ito International Research Center, Japan
36. 田中利明「ツメガエル初期発生過程の中期胞胚遷移におけるサイクリン E のリン酸化 ユビキチン化依存的タンパク質分解による尾部形成の制御」科学研究費補助金新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」第 1 回班会議、2013.1.29、於：兵庫県淡路島 淡路夢舞台国際会議場
37. 田中利明「新規 Cdk インヒビター Ink4X によるツメガエル初期発生関連 mRNA の翻訳制御」第 7 回長野ミーティング、2013.2.27、ラフォーレ倶楽部白

馬八方

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称：コラーゲン融合タンパク質、それをコードする核酸を含むベクター及びベクターを含む大腸菌、並びにそれらの製造方法  
発明者：田中利明、生駒俊之、田中順三  
権利者：田中利明、生駒俊之、田中順三  
種類：特許権  
番号：特願 2015-057688  
出願年月日：平成 27 年 03 月 20 日  
国内外の別：国内

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 秀治 (TAKAHASHI, Shuji)  
広島大学・理学研究科・特任准教授  
研究者番号：90447318

(2) 研究分担者

有泉 高史 (ARIIZUMI, Takashi)  
玉川大学・農学部・教授  
研究者番号：30286166

田中 利明 (TANAKA, Toshiaki)  
東京工業大学・生命理工学研究科・助教  
研究者番号：40263446

二宮 裕将 (NINOMIYA Hiromasa)  
東京大学・総合文化研究科・学術研究員  
研究者番号：40514237