

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24680052

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞の自己複製・分化誘導機構の解明と化学合成培養システムの開発

研究課題名(英文) Understanding molecular mechanisms in human ES/iPS cell renewal and development of defined culture system

研究代表者

長谷川 光一 (Hasegawa, Kouichi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・講師

研究者番号：50378890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円、(間接経費) 6,180,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES/iPS細胞の自己複製に関わる主な細胞外シグナルとしては、FGFとTGFとされているものの、これらの分子による自己複製の制御機構は未だ解明されていない。また、FGFやTGFを置換可能な化合物が無いことは、ヒトES/iPS細胞の応用利用において、安全性やコストの面で大きな妨げとなっている。我々は以前の研究で、DYRK阻害剤とWntを用いることで、FGF/TGF非依存性の培養法を開発した。本研究では、DYRKとWntが自己複製に関わる仕組みを解明し、それらを制御可能な化合物の同定を行い、世界で最もタンパク質成分の少ない長期安定なヒトES/iPS細胞用の培養システムの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The extrinsic factors regulating human ES/iPS cell self-renewal are incompletely understood to date, but bFGF and TGF $\beta$  signaling form the cornerstone of most systems for human ES/iPS cell propagation. In previous study, we have identified a DYRK inhibitor that could modulate Wnt pathway and support Wnt-induced self-renewal without inducing differentiation. Utilizing Wnt and the compound, we have developed a defined xeno-free culture system that allows for long-term expansion of human ES/iPS cells without FGF/TGF $\beta$  supplementation. In further investigation, we have identified several key pathways involved in DYRK inhibition/Wnt-dependent self-renewal and found small chemical compounds can control these. Utilizing these chemical compounds, we have developed a novel and simple defined-culture system for human ES/iPS cells.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医工学材料 化学合成培地

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト未分化幹細胞(ES 細胞や iPS 細胞)の自己複製に関わる主な細胞外シグナルとしては、FGF と TGF とされているものの、これらのシグナル分子による自己複製の制御機構は未だ解明されていない。

(2) 我々は DYRK 阻害剤(ID-8)を用いることで、FGF と TGF 非依存で Wnt 依存にヒト ES/iPS 細胞の自己複製・安定培養できるシステムを開発したが、その分子メカニズムは未だに不明であった。

2. 研究の目的

(1) DYRK 阻害剤と Wnt によるヒト ES/iPS 細胞の自己複製機構を解明する。

(2) 解明した自己複製機構を制御可能な低分子化合物を見出し、新規培養システムを開発する。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES/iPS 細胞における DYRK のターゲット分子の同定

(2) Wnt シグナルによる未分化性維持・自己複製機構と分化誘導機構の解明

(3) 低分子化合物を用いた新規培養システムの開発

4. 研究成果

(1) DYRK のターゲット分子を同定するため、最初に免疫沈降による結合分子の同定を試みたが、DYRK 阻害剤(ID-8 の有無)による結合分子群のパターンに変化は見られなかった。このため、他の細胞種で知られている DYRK の基質分子の発現、およびリン酸化状態を網羅的に調べた(図1)。その結果、ID-8 によって NFATc1 と p53、c-Jun の発現と、AKT1 と Catenin のリン酸化に変化が見られた。また、キナーゼパネルでの ID-8 の特異性解析から、ID-8 の直接のターゲットが DYRK1A と B であり、これらの分子群でないことも確認した(図2)。これらの分子群がこれらの分子群がヒト ES/iPS 細胞の DYRK ターゲット分子であることを見出した。

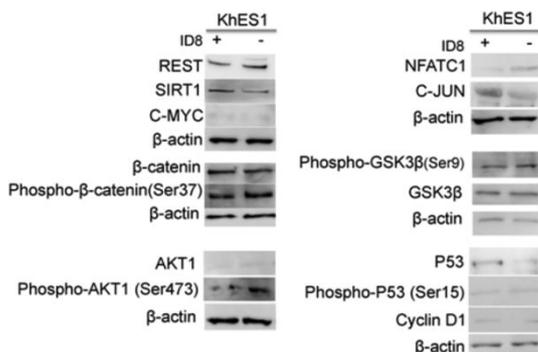


図1 .ID-8 添加の有無によるタンパク質発現と修飾の変化の一例

Kinase	IC <sub>50</sub> (nM)
DYRK1B	54
DYRK1A	78
PIM1	280
GSK3a	380
CLK4	440
GSK3b	450
CLK1	4200

図2 .336 キナーゼパネルによる ID-8 結合キナーゼとその特異性(IC50)

(2) 自己複製における Wnt 経路を解明するため、最初に Catenin の局在を調べたところ、核内での蓄積が認められ(図3)、古典的 Wnt 経路が主な経路であることが示唆された。これを確定するため、古典的 Wnt 経路を特異的に活性化可能な GSK 3 阻害剤で Wnt を置換可能か調べたところ、用いた4種の GSK3 阻害剤のうち3種でヒト ES/iPS 細胞の自己複製を維持可能なが分かった(図4)。これらの結果から、自己複製における Wnt 経路は古典的 Wnt 経路であることが分かった。

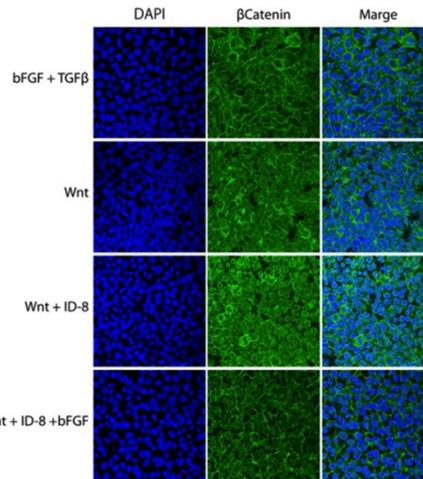


図3 .ヒト ES 細胞における Catenin の局在(緑: Catenin、青、核)

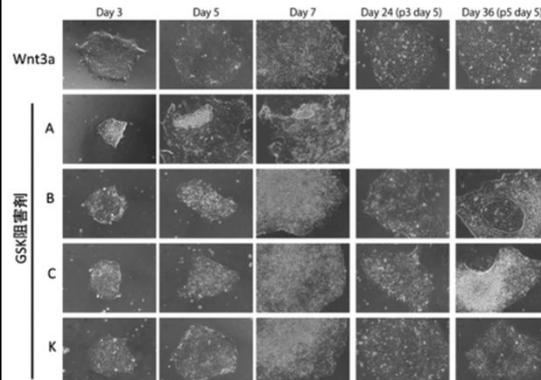


図4 . GSK 阻害剤(A、B、C、K)と ID-8 によるヒト ES 細胞の維持(形態写真)

(3) 我々は以前の研究で、ID-8 により、古典的 Wnt 経路の Catenin 複合体において、転写補助因子の p300 から CBP へシフトすることを見出していた。これが未分化・分化に重要かどうか確かめるため、研究協力者の Kahn 博士に依頼し、特異的な Catenin と CBP の結合阻害剤 (ICG-001) と p300 結合阻害剤 (YH249 および YH250) の開発と合成を行った。これらを用いたところ、ID-8 を用いずとも YH249 および YH250 によって未分化性が維持できること(図 5)、ID-8 存在下でも ICG-001 によって分化誘導が起こることを見出した。この結果から、ID-8 は DYRK を阻害することにより古典的 Wnt 経路の Catenin-CBP 複合体の形成を促進し、未分化性維持・自己複製を行っていることが分かった(論文投稿中)。

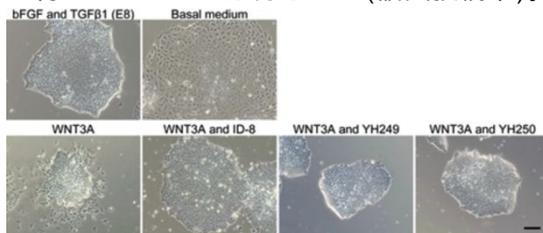


図 5 . Catenin-p300 結合阻害剤によるヒト ES 細胞の自己複製(形態写真)

(4) DYRK 阻害剤と Wnt によるヒト ES/iPS 細胞の自己複製の分子機構をさらに調べるため、ID-8 と GSK3 阻害剤、FGF、TGF の 4 種の自己複製因子の各組み合わせ下における遺伝子発現変化を、研究協力者の Wells 教授との共同で RNAseq により網羅的に調べた。その結果、ID-8 と GSK3 阻害剤の組合せと、FGF と TGF の組合せでは 81.5% の遺伝子発現パターンに相同性が見られ、優位に発現が異なる遺伝子群は 18.5% であった(図 6)。さらに、ID-8 と GSK3 阻害剤の組合せでは、TGF /FGF 非添加でも TGF 経路が高く活性化されており、FGF 経路も活性化されていることが分かった。また、それぞれの添加物のみ、もしくは組合せ特異的に発現変化が見られる遺伝子群も同定した。これらによって、それぞれで影響を受けているシグナル経路とその転写因子を推測できた。

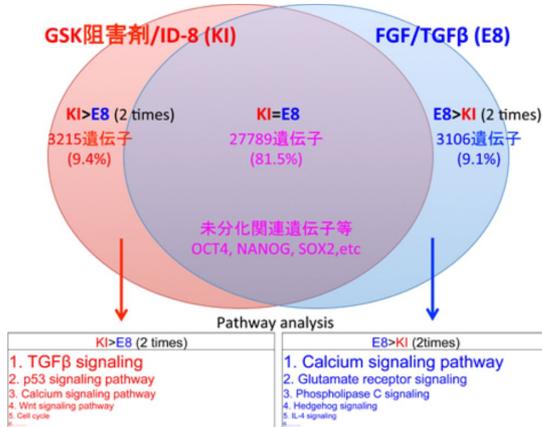


図 6 .GSK3 阻害剤 /DYRK 阻害剤 (KI) と bFGF/TGF (E8) の間での遺伝子発現の違い (遺伝子数) と変化したシグナル経路

(5) 上記(1)~(4)で得られた知見から予測されたシグナル経路や分子機構が実際にヒト ES/iPS 細胞の自己複製に関与するのかを確かめるために、これらのシグナル経路を活性化もしくは不活性化する化合物、他の DYRK 阻害剤や p300 阻害剤、Wnt 活性化剤等を含む数千種類の化合物からなる化合物ライブラリーを作製し、その効果を調べた(図 7)。その結果、FGF/TGF 非存在下では、Wnt/GSK3 / Catenin/CBP 経路は細胞増殖と神経誘導に関与すること、ID-8 等による DYRK 阻害は主に GSK3 を介して Wnt 経路の安定化を促進すると同時に Wnt 経路による神経誘導を阻害すること、カルシウムシグナル経路と AKT シグナル経路の一部欠落によって NFATc1 と p53、c-Jun が抑制されることにより細胞増殖が抑制されていること、が分かった。

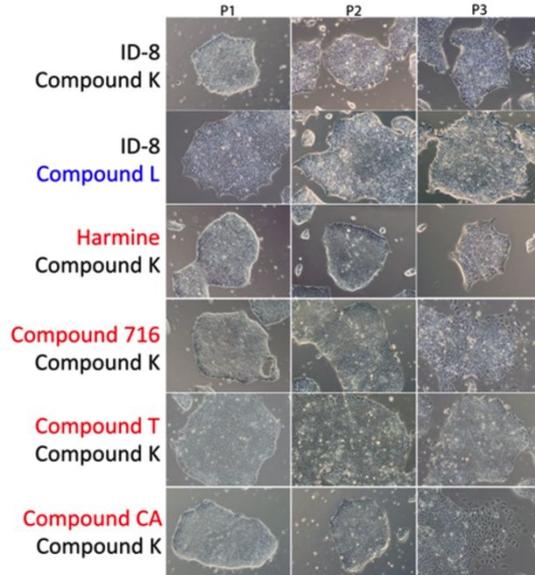


図 7 . 化合物によるシグナル経路の探索、検証の一例(形態写真)

(6) これまでの DYRK 阻害剤 (ID-8) と GSK 3 阻害剤 (古典的 Wnt 経路活性化剤) を添加した培地では、ヒト ES/iPS 細胞の自己複製はできたものの、FGF と TGF を添加した培地に比べ、細胞増殖が遅かった。上記(5)で得られた知見と効果のある化合物群について、さらに解析と化合物群のスクリーニングを行い、2 種類の化合物(化合物 L と T)の組み合わせにより、細胞増殖を 2 倍以上に早めることに成功した(図 8)。この結果、市販の FGF と TGF を添加した培地と同等の速度でヒト ES/iPS 細胞を培養可能な FGF/TGF 不含有培地の開発に成功した。

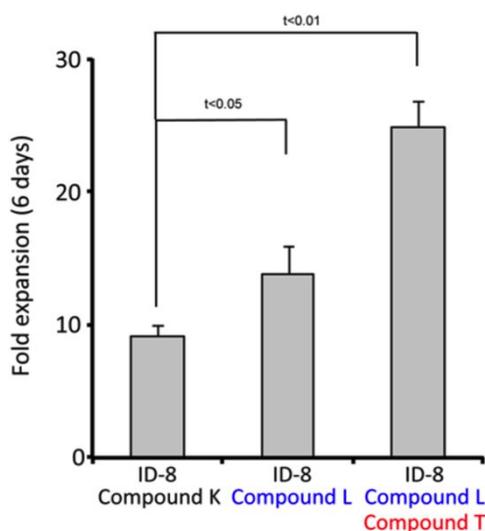


図 8. 化合物の組み合わせによる細胞増殖の変化(継代比率の変化)

(7) 上記(6)で開発した培地について、培地基本成分、粘性、浸透圧、細胞外基質、継代方法の検討を行い、培養システムを最適化した。こうして開発した培養システムを用いると、使用した全てのヒト ES/iPS 細胞株で、正常核型(図 9)と未分化マーカー発現(図 10)、分化能(図 11)を維持したまま、長期に培養維持可能で(図 12)あることを検証できた。また、この培養システムを用いて iPS 細胞株を作製可能であることも確かめた(特許出願済、論文作成中)(最適化過程で派生した共同研究の成果は 2 報論文発表済)。

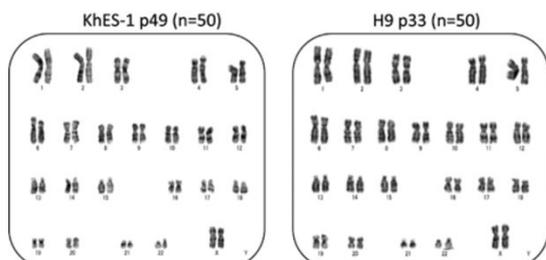


図 9. 新規培養システムで培養した細胞の核型

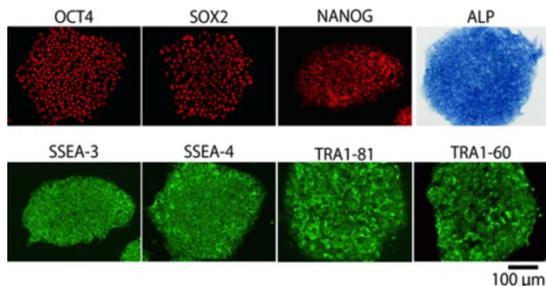


図 10. 新規培養システムで培養した細胞での未分化マーカーの発現



図 11. 新規培養システムで培養した細胞の

分化能の検定(テラトーム形成により分化した細胞種の組織切片)

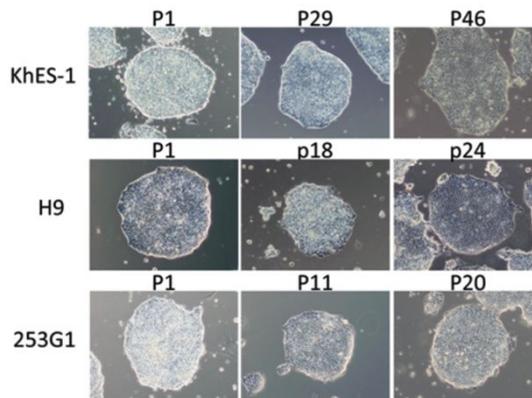


図 12. 新規培養システムで長期培養したヒト ES 細胞(KhES-1 と H9) iPS 細胞(253G1)とその形態

### 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) Tomomi G. Otsuji, Jiang Bin, Azumi Yoshimura, Misayo Tomura, Daiki Tateyama, Itsunari Minami, Yoshihiro Yoshikawa, Kazuhiro Aiba, John E. Heuser, Taito Nishino, Kouichi Hasegawa and Norio Nakatsuji "A Novel 3D Sphere Culture System Containing Functional Polymers for Large-scale Human Pluripotent Stem Cell Production" Stem Cell Report, 2014, 2(5) 734-745 査読有

(2) Li Liu, Momoko Yoshioka, Minako Nakajima, Arata Ogasawara, Jun Liu, Kouichi Hasegawa, Sisi Li, Jianli Zou, Norio Nakatsuji, Ken-ichiro Kamei, Yong Chen "Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells" Biomaterials, 2014, 35(24) 6259-6267 査読有

[学会発表](計 18 件)

(1) Noriko Yoshida, Shin-ya Yasuda, Hosein Shahsavarani and Kouichi Hasegawa "Development of FGF/TGF-Independent Human ES/iPS cell Culture System with Chemical Compounds" World Stem Cell Summit 2013, San Diego, USA, December 4-6, 2013

(2) Kouichi Hasegawa "Wnt signaling in human pluripotent stem cell self-renewal and differentiation" International Symposium, Human Pluripotent Stem Cells: Progress to Therapy. The University of Sheffield. Sheffield UK. April 8-10, 2013

(3) Kouichi Hasegawa "Technical innovation of human pluripotent stem cell

biology towards regenerative  
medicine” 6th Annual Symposium on  
Nanobiotechnology, Cell-Material  
Integration, Kyoto University, Kyoto,  
Japan, November 8-9, 2012

(4) Kouichi Hasegawa “Wnt signaling in  
human pluripotent stem cell self-renewal  
and differentiation” International  
Conference on Stem Cells and Regenerative  
Medicine, The University College London,  
London, UK, July 11-13, 2012

〔図書〕(計2件)

(1) Mirella Dottori, Mary Familiari, Stefan  
Hansson and Kouichi Hasegawa. Hindawi  
Press. Stem Cells International, “Stem  
Cells as in vitro Models of Disease”  
2012, vol. 2012, Article ID 565083

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：多能性幹細胞用培地  
発明者：長谷川光二、安田晋也、シャーサバ  
ラニ ホセイン、吉田則子  
権利者：京都大学(発明者から譲渡)  
種類：特許  
番号：特願 2014-064174 号  
出願年月日：26年3月26日  
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 光一 (HASEGAWA KOUICHI)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・  
講師  
研究者番号：50378890

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (2) 研究協力者

Michael Kahn  
University of Southern California・教  
授  
研究者番号：無し  
Christen Wells  
The University of Queensland・准教授  
研究者番号：無し