

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890269

研究課題名(和文) 幹細胞のオートファジーを応用した効果的組織再生に向けたロジスティクス

研究課題名(英文) Application of autophagy on ES cells for logistics tissue regeneration

研究代表者

山田 陽一 (Yoichi, Yamada)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20345903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーはタンパク質や細胞構造体の大規模分解・リサイクルシステムで、発生・分化、発癌抑制、長寿、免疫応答など生理・病的に様々な生命活動で重要な働きをしている。しかし、多能性幹細胞における機能については、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、オートファジーの多能性幹細胞(ES細胞)における機能解明を目的とした。オートファジー関連遺伝子であるATG12ノックアウトES細胞を樹立して検討した結果、増殖能の低下や細胞死を引き起こしやすいことが明らかとなり、オートファジーが多能性幹細胞の生死制御に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is the major intracellular degradation system and has been implicated in many physiological and pathological processes. It contributes not only to the maintenance of homeostasis but also to pathogenesis of diverse diseases. However, the functional contribution of autophagy to embryonic stem (ES) cells has not been known yet. The purpose of this study is to analyze the function and effect of autophagy on ES cells. Since the expression of several autophagy-related genes were found in ES cells and ATG 12 gene showed one of the highest expression level among tested ATG genes, we focused on ATG12 and established ATG knockout (ATG 12<sup>-/-</sup>) ES cells. ATG 12<sup>-/-</sup> ES cells formed well defined typical undifferentiated colonies and the morphology was resembled to wild type ES cells and retained their capacity to form differentiated cell types of all three germ layers. Our results indicated that autophagy was not active in ATG12<sup>-/-</sup> ES cells and related to cell survival and proliferation.

研究分野：再生医療・歯学・口腔外科

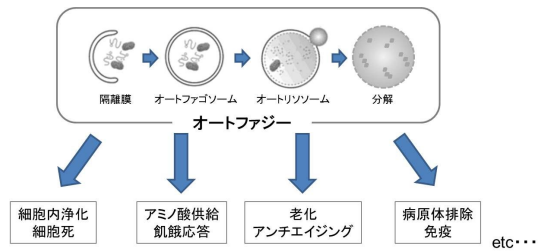
科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：再生医学 多能性幹細胞 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) オートファジーはギリシャ語で自分を食べる(自食)という意味で、細胞の自己成分を細胞内消化器官であるリソソームに運び込み分解する作用と定義される。つまり、生命を支える細胞の自己分解システムと認識されており、生命維持に大変重要な働きをしているとされる。このオートファジーは酵母からヒトにいたるまで真核生物に見られる機構で、細胞内での異常なタンパク質の蓄積を防いだり、リサイクルを行う機能に加え、細胞質内に侵入した病原微生物を排除することにより、生体の恒常性維持にも関与しているとされる。近年、このオートファジーについては永らく不明であった分子基盤の解明が急速に進むと同時に、さまざまな生理機能が明かとなるにつれて、世界的に最も注目されている熱い研究領域の一つとなっている (Cell, 140: 313-326, 2010. Cell, 147:728-741, 2011)。しかし、このオートファジーは細胞の生存維持を図る守護神として極めて重要な機能を果たしているとの認識、理解が進んでいるとはいえ、未だ解明されていないことが多く存在し、炎症反応、細胞の新陳代謝、老化、発生、分化、心不全抑制、免疫応答、飢餓応答、病原体排除、アンチエイジング、がん化抑制などへの関与やさまざまな疾患への関与も報告されつつあるものの、その詳細な機序については不明な点も多く、特に、高等生物や幹細胞についての研究はほとんど行われていない現状も存在する。

(2) 一方、再生医療は難治性疾患や機能喪失組織や臓器を修復・再生・回復させる医療として、また induced pluripotent stem cells (iPS) 細胞の発見により医療新時代の幕開けとして注目を集めている。さまざまな現象、再生の重要な key を果たすのは細胞、特に幹細胞であることも疑いのない事実で、幹細胞の機能、神秘についても徐々にではあるが明かとなってきている。患者貢献は医療の実践であることが大きく、臨床応用という意味で注目されるのは、様々な組織から得られる組織幹細胞を用いた再生医療と言える。その中には臨床応用が検討、実践されているものも存在し、我々も骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨再生医療を臨床応用し、長期予後も含めて、良好な結果を得ている (Stem cells, 572-80, 2013)。しかし、分化能力に限りがある組織幹細胞の応用による再生能力には限界があることは歪めない。そこで、難治性疾患に対する治療法の開発や再生させることが難しいとされる、様々な細胞、組織からなる歯などの臓器や広範囲顎骨欠損再生は未だ達成されておらず、無限の分裂、分化能を有し、さまざまな可能性を有する多能性幹細胞 Embryonic stem cells (ES)・iPS 細胞からのアプローチ、細胞機能の応用、解明が待たれている。



(図1) オートファジーの機能

2. 研究の目的

本研究では、再生医療においてとりわけ重要な働きを担っている幹細胞、特に今後様々な分野への応用が期待されている多能性幹細胞 (ES 細胞) に注目し、多能性幹細胞におけるオートファジーの意義解明・再生医療における発展性、応用性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞におけるオートファジーの関与の検討

幹細胞におけるオートファジーの働きについて検討するため、オートファジー (Autophagy; ATG) 関連遺伝子 (ATG3, 5, 6, 7, 10, 12, 16 等) の発現について、マウス ES 細胞から RNA を抽出して定量的 Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) を行なった。

(2) ATG12 ノックアウト ES 細胞の樹立

マウス ES 細胞において特に高い発現を示した ATG12 に焦点をあて、まず、ATG12<sup>fl/fl</sup> マウスを作製した。その後、ATG12<sup>fl/fl</sup> マウスの胚盤胞より内部細胞塊を単離した後、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) 上にて培養し、ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞の樹立を試み、樹立に成功した。樹立した ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞を無フィーダー条件下にて培養後、cre-GFP 遺伝子をリポフェクション法を用いて遺伝子導入した。また、トランスフェクション後に、GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーにてソーティングすることにより、細胞分離を行った。

(3) ATG12 ノックアウト ES 細胞の表現型解析

樹立された ATG12 ノックアウト ES 細胞の細胞形態について観察を行った。また、ES 細胞のマーカーである Oct4, Sox2, Nanog の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法、タンパク発現を免疫染色法を用いて検討した。なお、コントロールとしては wild type (WT)、ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞等を用いた。さらに、ATG12 ノックアウト ES 細胞の増殖能について、BrdU によるラベリング後 FACS を用いて、コントロールと比較検討した。

(4) ATG12 ノックアウト ES 細胞由来 EB の表現型解析

ATG12 ノックアウト ES 細胞をハンギングドロップ法にて浮遊培養し、EB 形成を誘導して形態観察を行った。その後、二次元でシャーレ上に付着培養し、外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化が起こるか否か検討した。各胚葉への分化については、それぞれマーカータンパク (beta-tubulin, smooth muscle actin, alpha-phenoprotein) の免疫染色にて確認した。

(5) ATG12 ノックアウト幹細胞におけるオートファジー機能への影響の検討  
オートファゴソームのマーカーとして知られる LC3 を用いて、オートファジーが誘導されているかどうか検討した。ATG12 ノックアウト ES 細胞を飢餓状態および通常の培養条件にて培養後、それぞれタンパク質を抽出した。抗 LC3 抗体を用いて、LC3I, II の発現についてウエスタンブロット法を用いて検討した。また、オートリソソーム形成を阻害する Bafilomycin を併用した培養条件においても LC3 発現について比較検討した。コントロールとしては、ATG12<sup>fl/fl</sup> 細胞を用いる。さらに、GFP 標識 LC3 発現ベクターをレトロウイルスを用いて遺伝子導入し、LC3-GFP を蛍光顕微鏡にて観察することによりオートファゴソーム形成を比較検討する。さらに、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、隔離膜、オートファゴソームならびにオートリソソーム等のオートファジーに関連する細胞内部構造を観察した。

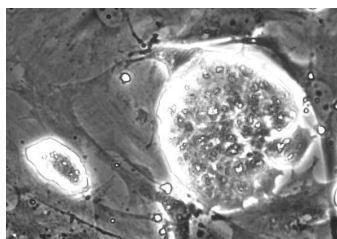
#### 4. 研究成果

(1) ES 細胞におけるオートファジー関連遺伝子の発現

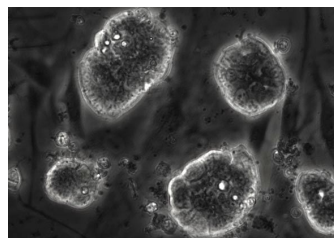
マウス ES 細胞における Real Time RT-PCR 解析によって、ES 細胞においても ATG 遺伝子の発現はみられたが、特に ATG12 遺伝子の高い発現を認めた。

(2) ATG12 ノックアウト ES 細胞の樹立  
ATG12 ノックアウト ES 細胞、コントロールとしての ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞を分離、樹立した。

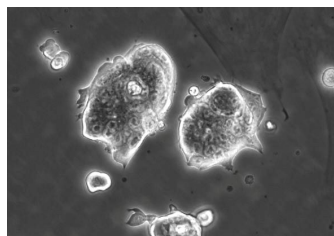
(3) ATG12 ノックアウト ES 細胞の表現型  
樹立された ATG12 ノックアウト ES 細胞、ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞の細胞形態はマウス ES 細胞 WT と比較して同様の特徴的な細胞形態を有しており、ES 細胞として増殖することが確認された (図 2 A-C)。



(図 2 A マウス ES 細胞 WT)



(図 2 B マウス ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞)



(図 2 C マウス ATG12 ノックアウト ES 細胞)

しかし、飢餓状態とすることにより、ATG12 ノックアウト ES 細胞においては、有意に細胞死が観察され、オートファジーの機能は働いていないことが確認された。また、ES 細胞のマーカーとされる Oct4, Sox2, Nanog の遺伝子、タンパク発現は認められ、ES 細胞の特徴を有していることが示唆された。

(4) ATG12 ノックアウト ES 細胞由来 EB の表現型

ATG12 ノックアウト ES 細胞、コントロールとしての ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞をハンギングドロップ法にて浮遊培養し、EB 形成を誘導して形態観察を行ったところ、両細胞とも EB 形成するも ATG12 ノックアウト ES 細胞による EB 形成に関しては形態不整を認めた。しかし、二次元シャーレ上での付着培養において、外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化誘導したところ、両細胞、WT と同様に beta-tubulin, smooth muscle actin, alpha-phenoprotein の発現が確認され、分化能は維持していることが明らかとなった。

(5) ATG12 ノックアウト ES 細胞におけるオートファジー機能への影響

抗 LC3 抗体を用いて、LC3I, II の発現について、WT、ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞、ATG12 ノックアウト ES 細胞を用いてウエスタンブロット法を用いて検討した結果、飢餓状態では ATG12 ノックアウト ES 細胞はオートファジーの機能は阻害されており、LC3 II の発現は見られなかった。また、Bafilomycin を併用した培養条件においても LC3 発現は同様の結果を示していた。一方、WT、ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞においては LC3 II の発現が認められ、オートファジーの機能は維持されていた。さらに、透過型電子顕微鏡 (TEM) 像では、WT、ATG12<sup>fl/fl</sup> ES 細胞では隔離膜、オートファゴソームならびにオートリソソーム等のオートファジーに関連する細胞内部構造

を観察することができたが、ATG12 ノックアウト ES 細胞では十分なオートファジーの機能について観察することができなかった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山田陽一, Kein Ophir, 風岡宜暁.  
Autophagy は ES 細胞の生死制御に関し, 再生医療の実用化に有用である, 第 58 回日本口腔外科学会総会, 2013.10.11. 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 陽一 (YAMADA, Yoichi)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 20345903

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし