

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660287

研究課題名(和文)細胞膜透過型Pin1の作成と幹細胞分化

研究課題名(英文)Preparation for PTD-Pin1 and its application to stem cell differentiation

研究代表者

内田 隆史(Uchida, Takafumi)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：80312239

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)：PTD (Protein transduction domain) としてはtrans-activator of transcription (TAT) を融合させ、さらに間葉系幹細胞膜に発現している接着因子インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ に結合するArg-Gly-Asp (RGD) を2個N末端に付与した (RGD)₂-TAT-Pin1を作成した。Pin1の機能評価は、Pin1^{-/-} ; p53^{-/-} マウスより構築した脂肪由来間葉系幹細胞(Pin1-KO ASC)株を使用した。(RGD)₂-TAT-Pin1によるASCの脂肪細胞への分化能は高まった。骨、軟骨への分化能について現在検討中である。

研究成果の概要(英文)：We prepared for (RGD)₂-TAT-Pin1 as a novel Protein transduction domain (PTD)-Pin1 consisting of 2 of Arg-Gly-Asp (RGD) motif that binds to the integrin $\alpha 5 \beta 1$ expressing on mesenchymal stem cell membranes at the N-terminal end, trans-activator of transcription (TAT) and Pin1. Function of Pin1 was evaluated with the Pin1-knockout ASC clone prepared from the Pin1^{-/-} ; p53^{-/-} mouse. The differentiation of ASCs into adipocytes was significantly improved by (RGD)₂-TAT-Pin1. The effect of (RGD)₂-TAT-Pin1 on differentiation of ASC into osteoblasts and chondrocytes are being studied.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：Pin1 間葉系幹細胞 細胞分化 細胞膜透過性Pin1

1. 研究開始当初の背景

Pin1 が間葉系幹細胞の分化を促進することは我々の研究で明らかになってきていた。しかし、Pin1 を大量に発現させると癌化の恐れがあるので一過的に細胞内の pin1 レベルを上げるだけにしたかった。そのため遺伝子導入ではなく、Pin1 タンパク質を直接細胞に導入することが望まれた。

我々は、これまでに、細胞膜透過性 Pin1 (PTD-Pin1) の作成を試みてきたが (Ohashi T *et al* (2010) *Biosci Biotechnol Biochem*, 74,2067)。また、効率よく細胞内に Pin1 を導入することに成功していなかった。また、細胞内に導入された Pin1 と細胞の外に付着している Pin1 を識別することは、細胞を回収して Pin1 の量を western blot で測定することや PPIase 活性測定で検討することでは不可能であることが分かっていた。すなわち、細胞内に Pin1 が導入されたことは、細胞の機能が変化することから検討するしかないと分かっていた。

2. 研究の目的

遺伝子を使わないで、酵素 Pin1 を間葉系幹細胞内に直接導入する方法を確立することで、間葉系幹細胞の脂肪細胞、骨芽細胞や軟骨細胞への分化を促進することを可能にし、組織を安全に速く再構築する技術とし、再生医療に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

p53-/-マウスと Pin1-/- ; p53-/-マウスの脂肪から調製した脂肪由来間葉系幹細胞を培養し株化した Pin1-WT ASC および Pin1-KO ASC を構築した。それぞれの細胞の培養液に PTD-Pin1 を添加した。この方法で高効率に細胞に導入される PTD の評価を行った。

PTD-Pin1 としては Pin1 の N 末端に TAT 配列を融合させた TAT-Pin1 ではまだ導入効率が悪かった。導入効率改良のため、N 末端側に ASC の表面に発現しているインテグリン

5 11 に結合する Arg-Gly-Asp (RGD) を 2 個付与した (RGD)2-TAT-Pin1 を作成した。終濃度が 0.5 μM になるように PTD-Pin1 を含む培地でコンフルエントになるまで培養した Pin1-WT および KO ASC を、脂肪細胞または骨芽細胞への分化誘導培地に変えて培養を行った。

4. 研究成果

我々はどのような細胞の機能変化が Pin1 の細胞への導入を最も正確に評価できるかについて検討することが大変難しいことを実感した。

当初は、細胞周期能の回復により評価することを考えた。なぜならば、我々は、Pin1-KO マウス由来の胎仔線維芽細胞(MEF)は G0 停止からの脱出ができないことを見出していたからである (Fujimori F *et al* (1999) *Biochem Biophys Res Commun*, 265, 658)。しかし、

この方法では MEF の最適条件を検討することになってしまう。そこで、我々は間葉系幹細胞でこの実験を行うことが重要であると考え、間葉系幹細胞を評価系として最初から使用することに計画を変更した。

脂肪細胞から調製した間葉系幹細胞のマーカーである CD105, CD44 陽性の細胞を使用した。Pin1-WT および Pin1-KO ASC をクローン化するために p53-/- および Pin1-/- ; p53-/- マウスから調製した脂肪由来間葉系幹細胞株を構築した。Pin1-WT ASC は脂肪細胞にも骨芽細胞にも分化したが、Pin1-KO ASC は分化しにくかった。これらの細胞に Pin1 を高発現させることで WT-Pin1 ASC 株はより早く、Pin1-KO ASC は分化能を WT と同程度まで回復することを目指した。これらの細胞の機能変化が Pin1 の発現上昇により予想通り起こることについてはレンチウイルスに Pin1 cDNA を組み込んで細胞に感染させ、Pin1 を確実に高発現させることで確認できた。

研究課題にとっては初期の段階で多くの時間をつかったが、ここで得られた研究成果は、すでに、間葉系幹細胞の分化機構を調べることに利用された。我々は、ここで確立した間葉系幹細胞を用いて、海藻 (褐藻類) より抽出したポリフェノールが脂肪細胞への分化を抑制し、肥満を抑制することを解明した (Suzuki A *et al* (2016) *PLoS One* 11(12): e0168830)。またすでにこの細胞を使用したという研究者も国内外にいる。

(RGD)2-TAT-Pin1 添加により、WT-Pin1 ASC 株はより早く脂肪細胞に分化した。また、Pin1-KO ASC 株は WT-Pin1 ASC 株と同程度まで分化能を回復したこれらの結果は、(RGD)2-TAT-Pin1 が WT-Pin1 ASC 株と Pin1-KO ASC 株の両方の間葉系幹細胞に導入されたことを示している。また導入された Pin1 が分化促進機能を発揮していることは Pin1 が核内にまで導入できたことを示唆している。

以上の結果から、(RGD)2-TAT-Pin1 はタンパク質の導入効率を TAT-Pin1 よりも高めたことがわかった。しかし、培地に添加した (RGD)2-TAT-Pin1 は、最終濃度が 1.25 μM と高濃度であり、PTD-Pin1 を実用的な薬剤とするにはさらに導入効率を高めるための検討が必要である。

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19件)

1. Xu T, Zhang H, Park S, Venneti S, Kuick R, Ha K, Michael LE, Santi M, Uchida C, Uchida T, Srinivasan A, Dlugosz A, Olson J, Camelo-Piragua S, Rual JF (2017) Loss of Pin1 suppresses Hedgehog-driven medulloblastoma tumorigenesis. *Neoplasia* 19, 216-225.

- 10.1016/j.neo.2017.01002 査読有
2. Suzuki A, Saeki T, Ikuji H, Uchida C, Uchida T (2016) Brown Algae polyphenol, a prolyl isomerase Pin1 inhibitor, prevents obesity by inhibiting the differentiation of stem cells into adipocytes. *Plos One* 11(12): e0168830. 10.1371/journal.pone.0168830 査読有
 3. Huang GL, Liao D, Chen H, Lu Y, Chen L, Li H, Li B, Liu W, Ye C, Li T, Zhu Z, Wang J, Uchida T, Zou Y, Don Z, He Z (2016) The Protein Level and Transcription Activity of Activating Transcription Factor 1 is Regulated by Prolyl-isomerase Pin1 in Nasopharyngeal Carcinoma Progression. *Cell Death Dis* 7(12), e2571. 10.1038/cddis.2016.349 査読有
 4. Shimizu T, Bamba Y, Kawabe Y, Fukuda T, Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, and Uchida T (2016) Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Doxorubicin- Inducible P-glycoprotein Level by Reducing Foxo3 Stability. *Biochem Biophys Res Commun* 471, 328-33. 10.1016/j.bbrc.2016.02.014 査読有
 5. Hidaka M, Gotoh A, Shimizu T, Minamisawa K, Imamura H and Uchida T (2015) sNOOpy, a Sensor for Physiological $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ Employing a Bacterial Two-Component Regulatory System. *J Biol Chem* 291, 2260-2269. 10.1074/jbc.M115.687632 “Paper of the week”, (A New Sensor to Detect Physiological Levels of Nitrate and Nitrite *J Biol Chem* 291, 2270) 査読有
 6. Nakatsu Y, Iwashita M, Sakoda H, Ono H, Nagata K, Matsunaga Y, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiyama A, Kamata H, Takahashi SI, Katagiri H, Honda H, Kiyonari H, Uchida T, Asano T (2015) Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates AMPK by associating with the CBS domain in the γ -subunit. *J Biol Chem* 290, 24255-24266. 10.1074/jbc.M115.658559 査読有
 7. Baik SH, Fane M, Hyung PJ, Cheng YL, Yun UJ, Choi Y, Park JS, Chai B, Park JS, Back SH, Jeong JI, Jang YJ, Bahn G, Lee JY, Li YI, Sobey C, Uchida T, Park JH, Kim HT, Tang S, Arumugam T and Jo DG. (2015) Pin1 Promotes Neuronal Death in Stroke by Stabilizing Notch Intracellular Domain. *Ann Neurol* 77(3), 504-516. 10.1002/ana.24347 査読有
 8. Onodera T, Futai E, Kan E, Abe N, Uchida T, Kamio Y and Kaneko J. (2015) Phosphatidylethanolamine plasmalogen enhances the inhibiting effect of phosphatidylethanolamine on γ -secretase activity. *J Biochem* 157(5):301-309. 査読有 10.1093/jb/mvu074
 9. Hiradate Y, Inoue H, Kobayashi N, Shirakata Y, Suzuki Y, Gotoh A, Roh SG, Uchida T, Katoh K, Yoshida M, Sato E, Tanemura K (2014) Neurotensin Enhances Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mice. *Biol Reprod* 91(2), 1-9. 10.1095/biolreprod.113.112789 査読有 10.1095/biolreprod.113.112789
 10. Sánchez C, Itakura M, Okubo T, Matsumoto T, Yoshikawa H, Gotoh A, Hidaka M, Uchida T, and Minamisawa K (2014) The nitrate-sensing NasST system regulates nitrous oxide reductase in *Bradyrhizobium japonicum*. *Environ Microbiol*, 10, 3263-3274. 10.1111/1462-2920.12546 査読有 10.1111/1462-2920.12546
 11. Islam R, Bae HS, Yoon WJ, Woo KM, Baek JH, Kim HH, Uchida T, and Ryoo HM (2014) Pin1 regulates osteoclast fusion through suppression of the master regulator of cell fusion DC-STAMP. *J Cell Physiol*, 229,2166-2174. 査読有 10.1002/jcp.24679
 12. Mori T, Hidaka M, Ikuji H, Yoshizawa I, Toyohara H, Okuda T, Uchida C, Asano T, Yotsu-Yamashita M, and Uchida T. (2014) A High-Throughput Screen for Inhibitors of the Prolyl Isomerase, Pin1, Identifies a Seaweed Polyphenol that Reduces Adipose Cell Differentiation. *Biosci Biotechnol Biochem* 78, 832-838. 査読有 10.1080/09168451.2014.905189
 13. Inoue H, Hiradate Y, Shirakata Y, Kanai K, Kosaka K, Gotoh A, Fukuda Y, Nakai Y, Uchida T, Sato E and Tanemura K (2014) Site-specific Phosphorylation of Tau Protein is Associated with Deacetylation of Microtubules in Mouse Spermatogenic Cells During Meiosis. *FEBS Lett*. 588, 2003-2008. 10.1016/j.febslet.2014.04.021 査読有
 14. Toko H, Hariharan N, Konstantin MH, Ormachea L, McGregor M, Gude NA, Sundararaman B, Joyo E, Joyo AY, Collins B, Din S, Mohsin S, Uchida T, and Sussman MA. (2014) Differential Regulation of Cellular Senescence and Differentiation by Prolyl Isomerase Pin1 in Cardiac Progenitor Cells. *J Biol Chem*, 289, 5348-5356.

- 10.1074/jbc.M113.526442 査読有
15. Katayama M, Donai K, Sakakibara H, Ohtomo Y, Miyagawa M, Kuroda K, Kodama H, Suzuki K, Kasai N, Nishimori K, Uchida T, Watanabe K, Aso H, Isogai E, Sone H and Fukuda T (2014) Coffee consumption delays the hepatitis and suppresses the inflammation related gene expression in the Long-Evans Cinnamon rat. *Clin Nutr*, 33, 302-310. 10.1016/j.clnu.2013.05.006 査読有
 16. Fukuda T, Katayama M, Kinoshita K, Kasugai T, Okamoto H, Kobayashi K, Kurita M, Soichi M, Donai K, Uchida T, Onuma M, Sone H, Isogai E, Inoue-Murayama M (2014) Primary fibroblast cultures and karyotype analysis for the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 50, 381-383. 10.1007/s11626-013-9715-0 査読有
 17. Takahashi K, Shimizu T, Kosaka K, Hidaka M, Uchida C, and Uchida T. (2014) Role of prolyl isomerase Pin1 in pathogenesis of diseases and remedy for the diseases from natural products, *Current Drug Target*, 15(10), 973-981. 査読有
 18. 高橋勝彦、内田千代子、内田隆史 (2016) 白血病治療薬剤ATRAの新規標的分子、プロリン異性化酵素Pin1, 血液内科、73(4), 491-496. 査読無
 19. 内田隆史 (2016) 根粒菌タンパク質を応用した硝酸センサー“スヌーピー”、化学、71(2), 73. 査読無

〔学会発表〕(計22件)

1. 清水泰希、坂場義正、川邊庸介、内田隆史、Pin1によるFoxO3を介したP-glycoproteinの発現制御機構、日本農芸化学会、2017年3月19日、京都女子大学(京都府・京都市)
2. 星野由美、宮本拓真、川合智子、内田隆史、島田昌之、プロリン異性化酵素Pin1は受精卵の卵割に機能する、日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
3. 畠山皓大、岡部恵美子、日高将文、内田隆史、c-Mycとの相互作用によるPin1の構造変化を解析できるFRET法の確立、日本生化学会大会、2016年9月25日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
4. 鈴木充子、佐伯俊之、内田隆史、内田千代子、プロリン異性化酵素Pin1阻害剤である褐藻ポリフェノールによる脂肪由来間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化抑制、日本生化学会大会、2016年9月25日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
5. 菅原佑衣、金井研太、清水泰希、広瀬恵子、日高将文、内田千代子、内田隆史、Pin1はCamKIIの活性を低下させることでTauの機能制御を行う、日本生化学会大会、2016年9月25日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
6. 清水泰希、藤田彩子、後藤愛那、日高将文、内田隆史、Growth arrest specific protein 7bによる微小管関連蛋白質Tauの制御、日本生化学会大会、2016年9月25日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)
7. 星野由美、川合智子、内田隆史、島田昌之、プロリン異性化酵素Pin1による着床前初期胚発生に果たす役割、日本受精着床学会総会・学術講演会、2016年9月15日、軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県・軽井沢市)
8. Uchida T, Miyashita T, Suzuki T, Suzuki A, Uchida C, Establishment of mesenchymal stem cell line from p53-deleted mouse and its application to drug discovery, Bioprocessing summit, Aug.16,2016, Boston, USA
9. 星野由美、川合智子、内田隆史、島田昌之、卵子の形成・成熟、受精後の初期胚発生過程におけるプロリン異性化酵素Pin1の発現と機能、日本卵子学会、2016年5月14日、新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市)
10. 日高将文、後藤愛那、清水泰希、南澤究、今村博臣、内田隆史、微生物環境応答システムの速度論的解析と応用開発、日本農芸化学会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
11. 對馬早織、日高将文、高橋典子、津吹政可、内田隆史、プロリン異性化酵素Pin1阻害ポリフェノールの発見、日本農芸化学会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
12. 秋吉皓太、韋達翀、カスジャン・マシュー、内田隆史、Crisper/Cas9法によるPin1-欠損ヒト細胞の作製と解析、日本農芸化学会、2016年3月29日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
13. 鈴木寿弥、鈴木充子、宮下拓也、佐伯俊幸、阿部素子、内田隆史、Pin1は脂肪由来間葉系幹細胞の分化を促進させた、日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会、2015年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
14. 鈴木充子、宮下拓也、秋吉皓太、鈴木寿弥、日高将文、内田隆史、内田千代子、海藻ポリフェノールはPin1活性を阻害しマウスの脂肪量を低下させた、日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会、2015年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
15. 高橋さゆり、内田隆史、星野由美、マウス卵子および初期胚におけるPin1の局在解析、日本卵子学会、2015年5月31

- 日、栃木県総合文化センター（栃木県・宇都宮市）
16. 馬場貴大、金井研太、日高將文、内田隆史、プロリン異性化酵素 Pin1 によるタウキナーゼの活性制御の解析、農芸化学会、2015年3月27日、岡山大学（岡山県・岡山市）
 17. 大滝博和、桐山恵介、渡邊潤、山本麗奈、松本皆子、高橋勝彦、内田隆史、塩田清二、Pin1 gene deficient mice impaired spatial cognitive function and exhibited frontotemporal lobar atrophy、日本解剖学会総会・全国学術集会・日本生理学会大会合同大会、2015年3月21日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）
 18. 佐伯俊幸、鈴木寿弥、秋吉皓太、阿部素子、内田隆史、Pin1/p53 ダブルノックアウトマウス由来 脂肪由来間葉系幹細胞株の樹立と解析、日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜国際会議場（神奈川県・横浜市）
 19. 小坂啓太、生地紘子、日高將文、内田隆史、Pin1 阻害剤としてのポリフェノール類の構造・機能相関、日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜国際会議場（神奈川県・横浜市）
 20. 金井研太、馬場貴大、日高將文、内田隆史、プロリン異性化酵素 Pin1 による脳内 CaMK の活性と安定性制御、日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜国際会議場（神奈川県・横浜市）
 21. 岡部恵美子、日高將文、内田隆史、Improvement of FRET based indicator for structural change of Pin1、日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜国際会議場（神奈川県・横浜市）
 22. 後藤愛那、日高將文、清水泰希、板倉学、クリスチーナ・サンチェス、南澤究、今村博臣、内田隆史、根粒菌の二成分制御システムを利用した NO3⁻ /NO2⁻ - バイオセンサーの開発、日本生化学会大会、2014年10月15日、京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕(計 0件)

〔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：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
 1). 東北大学 大学院農学研究科 分子細胞科学講座 分子酵素学分野
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/enzyme/index-j.html>
 2). 東北大学 「研究シーズ集 2017-2018」
<http://www.rpip.tohoku.ac.jp/seeds/profile/516/lang:jp/>
 3). 東北大学 大学院農学研究科 研究ハイライト&トピックス
<http://www.rpip.tohoku.ac.jp/seeds/profile/516/lang:jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 隆史 (UCHIDA, Takafumi)
 東北大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：80312239

(2)研究分担者

内田 千代子 (UCHIDA, Chiyoko)
 福島大学・人間発達文化学類・教授
 研究者番号：80312776

(3)連携研究者

無し。

(4)研究協力者

無し。