

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830088

研究課題名(和文) 低分子量GTPase制御因子によるヒト多能性幹細胞の染色体安定性維持に関する研究

研究課題名(英文) Chromosome stability by Rho-family small GTPase regulator in human embryonic stem cells

研究代表者

大串 雅俊 (Masatoshi, Ohgushi)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・上級研究員

研究者番号：00462664

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)：ヒト胚性幹細胞(ES細胞)や誘導多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞の実用化を考えた場合、長期培養に伴うゲノム異常細胞の出現が大きな課題として浮上している。本研究では、ヒトES細胞におけるゲノム安定性制御機構の理解を目指し、Rho制御因子ABRの機能解析を実施した。ヒトES細胞にてABRをノックダウンしたところ、有糸分裂期に様々な異常を生じ、長期培養に伴い異数染色体細胞の出現頻度が亢進することが判明した。このことから、ABRはヒトES細胞のゲノム安定性に寄与する分子であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells, including embryonic stem cells (hESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), hold huge potential as reproductive resources for cell-therapies to treat a variety of diseases as well as for drug discovery. In this study, we explored biological function of ABR, a regulator of Rho-family small GTPases, in hESCs. We found that RNAi-mediated depletion of ABR caused several defects in mitotic process, leading to aneuploidy transformation with a high frequency. This indicates that ABR has a pivotal role in mitotic fidelity and precise inheritance of genetic information in self-renewing hESCs. Since the emergence of genetically detrimental cells during long-term culture has been regarded to be a big obstacle for the practical utilization of hESCs/iPSCs, these results provide implications for developing hESC/iPSC culture methods that are better suited for human genetic studies and cell-based therapies.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒトES細胞 染色体安定性 Rhoシグナル経路 多能性幹細胞 ゲノム不安定性

1. 研究開始当初の背景

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)及び誘導多能性幹細胞(iPS細胞)は、試験管内で無限に増殖でき、また個体を構成する全ての細胞へ分化する能力を備えた多能性幹細胞である。これらの特性から、ヒト発生現象の*in vitro*モデルとして有用であり、また、特定の細胞へ分化させることにより薬剤スクリーニングや再生医療に必要な細胞のソースとしても期待されている。

ヒトES細胞やiPS細胞の再生医療応用の現実的な課題として、移植後の腫瘍化がある。先行研究から、幾つかの腫瘍化誘起要因が指摘されているが、その1つにヒトES細胞等の培養過程に生じる染色体異常性が挙げられている。通常のヒト正常細胞は46本の染色体を持ち、細胞周期の決まった時期に正しく複製、分配されることにより、その数は厳密に維持される。このような厳密性を喪失し、細胞分裂の度に染色体数が変動する状態を染色体不安定性と呼び、細胞のガン化や悪性化、ダウン症候群など先天性疾患の要因となることがある。ヒト多能性幹細胞は、低い頻度ながら、長期培養により染色体異常性を呈する場合があることが知られており、奇形腫を含めた腫瘍化の発生リスクを増悪させることが報告されているが、このような異常細胞の出現頻度は可能な限り低減することが望まれているにもかかわらず、「なぜ異常を生じるのか」という本質的な疑問にアプローチする研究はほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

我々は、分散培養時に誘起されるヒトES細胞死の分子機構解析を進める過程で、低分子量GTPase制御因子ABRの機能阻害により、ヒトES細胞が染色体不安定性を示すことを見いだした。本研究では、ABRの機能解析を通じて、ヒトES細胞の特徴である自己複製能の根幹をなす「正確な染色体分配の分子的基盤」に対する理解を拡げ、ヒトES/iPS細胞の染色

体安定性を向上できる培養法の戦略的開発への足掛かりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトES細胞株KhES-1を用いて、低分子量GTPase制御因子であるABRが、ヒト多能性幹細胞の特性維持に関与する分子機構に関して、細胞生物学的解析を行う。我々が持つ遺伝子発現操作技術と、時間・空間解像度の高いライブイメージング技術をベースに、ヒトES細胞においてABRノックダウンにより誘起される異常を、一細胞レベルで詳細に記述する。また、ABRの起点として、その上流・下流因子の探索に取り組み、Rhoファミリー分子群により制御を受ける染色体安定性維持機構の全体像解明を目指す。

4. 研究成果

(1) レンチウイルスベクターと、フローサイトメーターによる細胞ソーティングを活用して、ドキシサイクリン添加により、ABR mRNA 特異的なショートヘアピンRNA(shRNA)を発現誘導するヒトES細胞をポリクローナルに調製した。この実験系を用いて、ABRノックダウンによる表現型を詳細に解析したところ、ABRノックダウン細胞は細胞周期G2M期に蓄積する傾向が認められた。その結果、細胞増殖スピードが顕著に減速していた。以上の観察結果から、ABRノックダウン細胞では、有糸分裂期に何らかの異常を生じることが考えられた。

(2) 細胞周期のG2M期前後に焦点を当て、シングルセルレベルでの細胞挙動の解析を進めたところ、ABRノックダウン細胞はG2期からM期への進行過程における重要イベントである中心体分離に有為な遅れを生じていること、そのためM期への進入が阻害されていることが分かった。一部の細胞では、中心体分離が起きないままM期に進行するもの、過剰な中心体分離により細胞分裂軸が

3個以上の状態に陥るものなど、正常にメタフェーズに進むことができないケースも認められた。

(3)そのような状況でも、ABR ノックダウン群の大部分は M 期に進入することはできていたが、メタフェーズにおいて細胞死や細胞質分裂エラーを起こす頻度が亢進していた。また、最終的に M 期を脱し、次の G2 期への進行する場合でも、野生型に比べ染色体の整列に非常に時間がかかっていることがわかった。このことは染色体整列機能に何らかの障害を生じ、チェックポイント機能が活性化されていることを示唆している。

(4)メタフェーズ以降の過程の詳細な解析を進めたところ、ABR ノックダウン細胞の一部で lagging chromosome (両極への染色体分配から遅れる染色体) が認められ、娘細胞で核外に微小核を形成するケースも観察された。さらに、ABR ノックダウン群を長期間培養したところ、コントロール群に比べて染色体異数性を呈する細胞の出現頻度が亢進することが分かった。

(5)以上の結果から、ABR は正確な染色体分配機構を保障し、ヒト ES 細胞におけるゲノム安定性の維持に関わる分子であることが判明した。

(6)上記成果を得た一方で、ABR 作用ポイント、ABR により駆動されるシグナル経路など、未だ不明な点も残されている。引き続き ABR-Rho シグナル経路による染色体安定性の制御機構の全体像解明を目指し、研究を推し進めたい。

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)

Masatoshi Ohgushi、Maki Minaguchi、Mototsugu Eiraku、Yoshiki Sasai、A RHO Small GTPase Regulator ABR Secures Mitotic Fidelity in Human Embryonic Stem Cells、Stem Cell Reports、査読有、印刷中

Hideya Sakaguchi、Taisuke Kadoshima、Mika Soen、Nobuhiro Narii、Yoshihito Ishida、Masatoshi Ohgushi、Jun Takahashi、Mototsugu Eiraku、Yoshiki Sasai、Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue、Nature Communications、査読有、vo16、2015、8896、DOI: 10.1038/ncomms9896.

Masatoshi Ohgushi、Maki Minaguchi、Yoshiki Sasai、Rho-Signaling Directed YAP/TAZ Activity Underlies the Long-Term Survival and Expansion of Human Embryonic Stem Cells、Cell Stem Cell、査読有、Vol. 17、2015、448-461 DOI: 10.1016/j.stem.2015.07.009.

[学会発表](計 2件)

大串 雅俊、Toward understanding the immortal trait of human embryonic stem cells、第 14 回幹細胞シンポジウム、2016 年 5 月 21 日、淡路島夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

大串 雅俊、ヒト ES 細胞の不死性を支える生存メカニズム、第 15 回日本再生医療学会年会、2016 年 3 月 18 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

[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]

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/11658>
<http://www.sankei.com/west/news/150926/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大串 雅俊 (Ohgushi, Masatoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞シ
ステム形成研究センター・上級研究員

研究者番号：00462664

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし