

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861216

研究課題名(和文) β -catenin/CBP経路の選択的な活性化による新規iPS細胞作製法の開発研究課題名(英文) The activation of CBP/ β -catenin signal pathway promotes reprogramming of pluripotency on mice and human cells.

研究代表者

竹原 俊幸 (TAKEHARA, Toshiyuki)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60580561

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)：本研究では、ドナー細胞の性質・種類に問われないiPS細胞の誘導及び培養法の開発を試みた。実験には様々な生理現象に関わっており、また種保存性が高い β -cateninおよび転写コアクティベーターCBPに着目した。CBP/ β -catenin経路の活性化によってマウスだけでなく、ヒト細胞においても多能性幹細胞へのリプログラミングを促進することを明らかにした。また、マウス多能性幹細胞の未分化維持に対して、CBP/ β -cateninの活性化は基底状態を強く正に制御することが観察された。以上のことから、CBP/ β -catenin経路の活性化は、再現性が高いかつ効率的なiPS細胞の誘導及び培養法であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Wnt/ β -catenin signaling pathway is conserved in numerous animal species, and greatly involved in homeostasis mechanism as well as various body developments. We hypothesized the involvement of Wnt/ β -catenin, especially CBP/ β -catenin signaling pathway is deeply associated with the reprogramming of pluripotent stem cell (PSC). In this study, we tried to develop the inducing and culture method of iPS cells independent of characteristics of donor cells. It was promoted reprogramming of fibroblasts to PSC not only in mice but also in human cells by activating the CBP/ β -catenin pathway. In addition, it was observed that activation of CBP/ β -catenin strongly and positively regulates the maintenance of undifferentiation of mouse PSC as naive state. These results suggest that activation of the CBP/ β -catenin pathway is thought to be a highly efficient iPS cell induction and culture method.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 β -catenin CBP/p300 リプログラミング 多能性幹細胞 転写コアクティベーター ES細胞

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞は、生殖細胞を含む三胚葉へと分化できる高い分化能及び半永久的に分裂を繰り返すことができる自己複製能を有していることから組織発生学の体外モデルとしてあるいは、再生医療の移植材料の供給源として注目されている。特に、近年山中らが開発した体細胞に4つの遺伝子-Oct4, Sox2, Klf4, cMycを導入することで多能性幹細胞へとリプログラムを引き起こす技術から得られた細胞、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS細胞)の発見は、多能性幹細胞を用いた再生医療の実現において非常に大きな影響を与える技術である。しかしながら、これら iPS 細胞を含めた多能性幹細胞に関連する現象については未だに不明な点が多い。そのため、多能性幹細胞の未分化維持やリプログラミング機構を明らかにし、iPS 細胞の基本的な性質における詳細な知見を得ることができれば、より安定的かつ効率的に高品質な iPS 細胞の作製、培養及び提供することが可能となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では種間において保存性が高く、また iPS 細胞を含む多様な細胞の増殖・維持において重要な機能を示す β -catenin 経路、特に転写コアクティベーターである CBP/p300 の機能に着目し、ドナー細胞の性質・種類にとらわれない安定的かつ良質な iPS 細胞の作製・培養方法の開発とともに、リプログラミングに伴う β -catenin/転写コアクティベーター経路の機能解析をおこなうことを目的とする。

Wnt/ β -catenin 経路は、線虫からヒトにいたるまで広く保存されたシグナル伝達経路であり、発生、形態形成における細胞の運命決定に重要な役割を果たしている。また、これらの変異は細胞の癌化など細胞の転換においても重要な原因であると知られている。さらに、 β -catenin 経路について詳細にみると、これらの経路の活性化には転写コアクティベーターである CBP 及び p300 が作用しており、二つの転写コアクティベーターが選択的に遺伝子発現を調節し、細胞増殖や性質決定などに重要な役割を果たしていることが最近明らかになってきている。もちろん、多能性幹細胞においても同様に、CBP/ β -catenin 経路を選択的に活性化することが多能性の維持に重要である可能性を示唆する報告がなされている。)したがって、

β -catenin と転写コアクティベーターの関係は多能性及びリプログラミングに関わる遺伝子発現制御に大きな役割を果たしていると考えられるが、未だに転写コアクティベーター/ β -catenin 経路と iPS 細胞の関係性に着目した報告は少ない。

本研究では、山中4因子と、多能性幹細胞の未分化維持において種を超えて保存されている転写コアクティベーター/ β -catenin 経路の活性化を組み合わせることで汎用性の高い新規 iPS 細胞作製法の確立を行なった。

さらに、これらの活性化が多能性幹細胞の未分化維持に対してどのような影響を与えるのかを明らかにし、得られた知見をフィードバックすることで、動物・細胞種間を問わない均一で安定的な iPS 細胞の樹立・培養法の開発を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、非常に広い動物種間において保存されている β -catenin 経路、特に、転写コアクティベーターである CBP/p300 の機能に着目した。

本研究における iPS 細胞の誘導には、pMX plasmid をベースとした Oct4, Sox2, Klf4, cMyc を含むウイルスベクターを用いた方法と、最近主流となっている染色体へのインテグレーションが低いとされている Episomal vector (pEBNA-Oct4, Sox2, Lin28, Klf4, cMyc, p53DD) を用いて実施した。ドナー細胞としてマウス、ヒト共に最も基本的な細胞である皮膚線維芽細胞を用いた。

また、 β -catenin の活性化、特に CBP による β -catenin の活性化を引き起こさせるために、低分子化合物である IQ1、ID-8、YH249、YH250 (YH compound については大阪大学 樋口先生より分与いただいた) を使用した。これらの低分子化合物処理によって β -catenin /CBP 経路のリプログラミング過程における適切な活性化を行い、効率的な iPS 細胞の作製を行う。また、得られた細胞については遺伝子・タンパク質発現解析、*in vitro*・*in vivo* における分化能を評価した。また、iPS 細胞へのリプログラミング現象だけでなく、多能性幹細胞の未分化維持における CBP/ β -catenin の機能、特に多能性関連遺伝子の発現制御について検討を行った。

4. 研究成果

本研究では、多岐にわたる遺伝子発現制御に関わる転写コアクティベーターCBP/p300 と、幅広い動物種間において保存されている

β -catenin 経路に着目した新規 iPS 細胞樹立技術の開発を試みた。

まず初めにマウス線維芽細胞をモデルとした。マウス線維芽細胞に対して山中 4 因子 (Oct4、Sox2、Klf4、cMyc) を導入し iPS 細胞へ誘導する過程において、低分子化合物 IQ1 で処理をすることで CBP/ β -catenin 経路を特異的に活性化させる状態を作り出し、iPS 細胞化へのリプログラムに対して CBP/ β -catenin 経路が及ぼす影響を検討した。誘導 2 週間後に初期 iPS 細胞のマーカの一つであるアルカリフォスファターゼ活性を指標に iPS 細胞としてリプログラムされたコロニー数を計測した。コントロール区と比べ低分子化合物 IQ1 で処理した実験区ではアルカリフォスファターゼ活性陽性コロニー数は 3 倍へと向上した(図 1)。

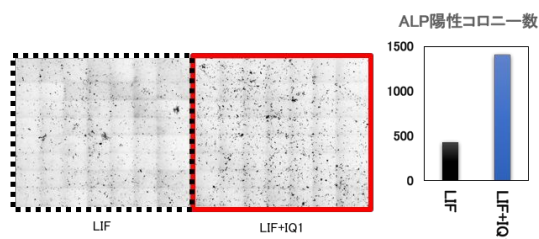


図1: CBP/ β -catenin 活性化処理がMEF由来iPS細胞誘導へ及ぼす影響
マウスiPS細胞の誘導過程でCBP/ β -catenin 活性化処理することで、ALP陽性細胞の出現が増加することが示された。

また、得られた細胞は多能性幹細胞マーカーである Oct4、Nanog、Sox2、Klf4 を発現していた。さらに、体外において複雑な構造を持つ胚様体を形成することから多分化能を有する iPS 細胞であると考えられる。

前実験において、CBP/ β -catenin 経路の活性化はマウス線維芽細胞から多能性幹細胞のリプログラムを促進する働きが示された。CBP および β -catenin は種保存性が高い遺伝子のひとつである。そこで、CBP/ β -catenin 経路の活性化によってマウス以外の種においても同様に共通の制御機構が保存されているかを検討するため、ヒト線維芽細胞を用いて同様に実験を行なった。ヒト線維芽細胞に対して Oct4、Sox2、Klf4、Lin28、LMyc、p53DD を導入し、iPS 細胞への誘導を実施した。この時、IQ1 だけでなく、IQ1 と同じく CBP/ β -catenin 経路の活性化を誘導する低分子化合物 ID-8、YH249、YH250 で処理をし、iPS 細胞の誘導効率が変化するか観察した。誘導 3 週間後において、アルカリフォスファターゼ活性陽性コロニー数は、コントロール区と比較し、CBP/ β -catenin 経路を活性化し

た全ての実験区において 4 倍以上となった。特に YH249 および YH250 で処理した区においては 12 倍以上のアルカリフォスファターゼ活性陽性コロニー数を示したことから、非常に有効な方法であることが示された(図 2)。

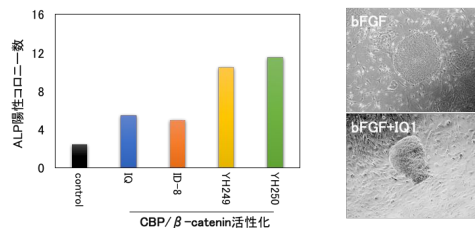


図2: CBP/ β -catenin 活性化処理がHDF由来iPS細胞誘導へ及ぼす影響
マウスと同様にヒトiPS細胞の誘導過程でCBP/ β -catenin 活性化処理することで、ALP陽性細胞の出現が増加することが示された。

得られた細胞株は、Oct4 や Nanog といった遺伝子の発現が観察され、bFGF 存在下において強い増殖能を示した。このことから、IQ1 を代表とした CBP/ β -catenin 経路を活性化させることは、マウスだけでなくヒト線維芽細胞においても iPS 細胞へのリプログラミングを促進することを明らかにした。また、CBP/ β -catenin 経路の活性化による iPS 細胞へのリプログラム現象の活性化間は、マウスおよびヒトにおいて共通に存在している制御機構であると考えられる。以上のことから、iPS 細胞へリプログラム現象において CBP/ β -catenin 経路は重要であることが示唆される。CBP および β -catenin 経路は種保存性が高いことが知られていることから、これらの知見は、マウスやヒトだけでなく、その他の動物種への適用が期待される。

次に、CBP/ β -catenin 経路と多能性幹細胞の間における詳細な制御機構を明らかにするために、多能性幹細胞の遺伝子発現にどのように関わっているか検討した。まず転写コアクティベーターCBPまたはp300の発現がどのようにになっているか検討した。免疫染色による CBP および p300 タンパク質の発現およびその局在について解析を行ったところ、マウス ES 細胞においては CBP および p300 どちらも発現していることが示された。興味深いことに、マウス ES 細胞では CBP は主に核内に多く存在しており、一方 p300 は核内ではなく細胞質内も含め細胞全体において弱く存在することが観察された(図 3)。

これらの CBP/p300 の発現の違いと β -catenin の活性化状態がマウス ES 細胞の未分化性にどのように影響を与えるか検討し

た。IQ1 を用いて特異的に CBP/ β -catenin 経路を活性化処理したところ、未処理の細胞と比べよりコンパクトな形態を示す細胞が観察された。さらに、基底状態を維持するために重要とされている 2 つの経路の抑制 (MAPK/ERK および GSK3 抑制の抑制): 2i による培養も含め、IQ1 処理したマウス ES 細胞における未分化関連遺伝子の発現への影響を観察した。多能性幹細胞の維持や iPS 細胞へのリプログラミング因子として重要であると報告されている Nanog 遺伝子および Klf4 遺伝子の発現を強く正に制御することが示された。また、多能性状態の質として基底状態に関わる Esrrb 遺伝子や Rex1 遺伝子の発現も同様に正に制御することが示された (図 4)。

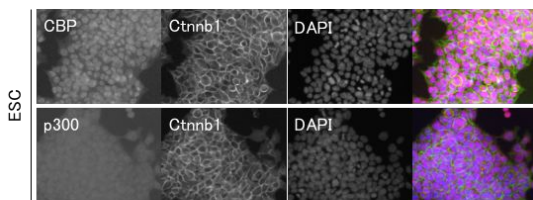
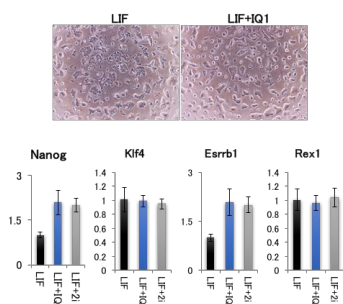


図3: ESCでは主にCBP/ β -cateninが相互作用している



実験4: CBP/ β -cateninは多能性幹細胞の未分化維持を強く正に制御する

驚くことに IQ1 で処理した ES 細胞は、基底状態の獲得および維持に重要とされている 2i 培養環境下と類似した状態を示した。2i 培養は iPS 細胞の誘導効率を上昇させる機能も有することから、本研究における IQ1 の iPS 細胞におけるリプログラムへの正の影響を裏付ける現象であると考えられる。

以上のことから、CBP/ β -catenin 経路の活性化は多能性幹細胞の未分化性を強く正に制御し、体細胞から多能性幹細胞におけるリプログラミング時において重要な因子であることを明らかにした。

本研究によって、 β -catenin / 転写コアクティベーター経路の活性化は、従来法と比べて効率的で汎用性が高く、動物・細胞種に影響

されない高性能な iPS 細胞を誘導する効果的な方法であると考えられる。また、種を超えて共通して存在する経路であると予想されることから、新規創薬研究や組織発生の体外モデルといった研究材料として、目的に適した動物あるいは細胞由来の iPS 細胞を安定的に提供することが可能となり、再生医療分野の発展につながると考えられる。

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 5 件)

Takehara T, Teramura T, Onodera Y, Frampton J, Fukuda K. Cdh2 stabilizes FGFR1 and contributes to primed-state pluripotency in mouse epiblast stem cells. *Sci Rep.* Sep 30; 5:14722. 2015 年「査読・有」

Kitada K, Kizu A, Teramura T, Takehara T, Hayashi M, Tachibana D, Wanibuchi H, Fukushima S, Koyama M, Yoshida K, Morita T. Gene-modified embryonic stem cell test to characterize chemical risks. *Environ Sci Pollut Res Int.* Nov;22(22):18252-9. 2015 年「査読・有」

Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Shigi K, Fukuda K. Reactive oxygen species induce Cox-2 expression via TAK1 activation in synovial fibroblast cells. *FEBS Open Bio.* Jun 6;5:492-501. 2015 年「査読・有」

Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Fukuda K. Hyaluronic acid regulates a key redox control factor Nrf2 via phosphorylation of Akt in bovine articular chondrocytes. *FEBS Open Bio.* May 29;5:476-84. 2015 年「査読・有」

竹原俊幸, 寺村岳士, 小野寺勇太, 細井美彦, ウサギ胚性幹細胞の樹立と培養、日本受精着床学会雑誌 31(2): 236 -241 2014 年、「査読・有」

[学会発表](計 6 件)

竹原俊幸, 寺村岳士, 小野寺勇太, 福田寛二, マウス半数体 ES 細胞の倍加抑制に関する研究、第 15 回日本再生医療学会、2016 年

3月17日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)。

竹原俊幸、寺村岳士、小野寺勇太、福田寛二、Twist1は多能性幹細胞の間葉転換に重要である、第29回日本軟骨代謝学会、2016年2月19日、広仁会館(広島県・広島市)。

Toshiyuki Takehara, Takeshi Teramura, Yuta Onodera, Kanji Fukuda. The activation of CBP/beta-catenin signal pathway is involved in the transition from primed- to naïve state on mice pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research Annual Meeting. 2015年6月25日。ストックホルム(スウェーデン)。

竹原俊幸、寺村岳士、小野寺勇太、神垣敏雄、須田佳雅、寺井陽平、小林直樹、福田寛二、ヒトiPS細胞における赤外線レーザーを利用した不要細胞除去装置の開発、第14回日本再生医療学会、2015年3月20日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

竹原俊幸、寺村岳士、小野寺勇太、福田寛二、マウスEpiSCの多能性状態におけるN-cadherinの機能解析、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)。

Toshiyuki Takehara, Takeshi Teramura, Yuta Onodera, Kanji Fukuda. CADHERIN-SWITCHING IS IMPORTANT FOR PLURIPOTENT STEM CELL BETWEEN Naïve AND PRIMED STATE International Society for Stem Cell Research Annual Meeting. 2014年6月18日、バンクーバー(カナダ)。

[その他]

ホームページ等

近畿大学 高度先端総合医療センター 再生医療部

<http://www.med.kindai.ac.jp/stemcell/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

近畿大学・医学部附属病院・助教

竹原 俊幸 (TAKEHARA, Toshiyuki)

研究者番号: 60580561