

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01280

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞におけるMBTファミリーの役割

研究課題名(英文) ROLE OF MBT FAMILY GENES IN STABILITY OF UNDIFFERENTIATED STATE OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS

研究代表者

友常 大八郎 (Daihachiro, Tomotsune)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：80283802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：L3MBTL1とFMBT2は、例外的に、多能性幹細胞が不安定化する際に発現が上昇する。そこで、これらの遺伝子をCRISPR-Cas9法を用いてノックアウトした結果、未分化の破綻が著しく促進することを見出した。従って、これらの遺伝子は未分化破綻する状況で発現上昇し、未分化に引き戻すという役割を果たしていると考えられた。この仮説を実証するため、これらの遺伝子をクローン化して、iPS細胞に強制発現させた結果、不安定化は有意に抑制され、上記の仮説が部分的に裏付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞などの多能性幹細胞は、様々な細胞に分化する能力を持つため、疾患のある組織を健康な組織で置き換える再生医療において、その細胞供給源になると期待されている。多分化能を保持するためには、未分化してない未分化状態である必要があるため、未分化維持機構の解明は医学的な重要性がある。本研究では、ポリコム遺伝子の二つ、L3MBTL1とFMBT2は未分化状態が不安定になる際に発現して、未分化に戻す役割を果たしていることが示された。これは分化が正しい方向にのみ進むことを補助しているとも言えるもので、再生医療だけでなく、分化研究においても意義深い。

研究成果の概要(英文)：Maintenance of undifferentiated state is a critical requirement for regenerative medicine using pluripotent stem cells. In this study, we created the spontaneous differentiation by removing MEF cells, and then analyzed global changes of gene expression during the spontaneous differentiation using DNA microarray. As results of the microarray analysis using four human pluripotent stem cell lines, we found that some polycomb group genes were commonly up-regulated during the collapse of undifferentiated state. Then we analyzed function of the spontaneous differentiation-induced polycomb group genes in pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 mediated knockout. These knockout cells showed tendency to differentiate more frequently than control. Therefore these polycomb group proteins may function as defense against the spontaneous differentiation. To evaluate the proposed function, we analyzed cell lines over-expressing the polycomb genes. The results supported the hypothesis.

研究分野：再生医療

キーワード：多能性幹細胞 iPS細胞 未分化維持

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞は身体を構成する全ての細胞になることが出来るとされ、多能性幹細胞と呼ばれている。多分化能を有している状態とは、分化し得るが分化していない状態でもあり、未分化状態と呼ぶこともできる。

多能性幹細胞の未分化状態は Nanog や Oct4、Sox2 などのコア因子によって形成可能であるが、未分化状態を安定に保つためには、クロマチンの構成にかかわるエピジェネティックな因子が必要である。その一方で、in vitro における実際の培養では未分化維持が難しく、積極的に未分化方向へ誘導しないと自然に分化してしまうことが広く知られている。

多能性幹細胞を用いた再生医療を広く普及させるためには、細胞の分化状態を完全かつ容易にコントロールする技術が必要である。そのためには実際の培養条件下における未分化状態の維持機構とそれを破綻させる要因を適切に理解する必要があるが、これを直接的に検討した研究は少ない。

2. 研究の目的

事前の研究において、研究代表者は、通常の培養条件に近い状況下での多能性幹細胞の振る舞いに焦点を当てた研究を行っている。ここで、未分化状態が自然に破綻する不安定な培養条件 (DP) を細胞形態と未分化マーカーの発現を指標に確立し、そのときの細胞の状況をマイクロアレイによって解析した。その結果、明白な分化までは至っていないが、未分化性が不安定になっている状態が存在することが示された。

この研究の過程で、不安定化に際して発現が顕著に上昇している遺伝子として、ポリコム遺伝子群に含まれる L3MBTL1 と SFMBT2 を見出した。

そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞の不安定化において、L3MBTL1 と SFMBT2 の発現が上昇することの意味を解析する。また、不安定化と分化の違いを明確にするため、積極的に分化させた場合についても検討を行う。

3. 研究の方法

ヒト ES 細胞および iPS 細胞を用い、その未分化状態、および、不安定化状態、さらに、積極的に分化 (肝臓方向へ分化) させた場合の遺伝子発現の変化を、L3MBTL1 と SFMBT2 を中心に解析する。また、これらの遺伝子を CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトすることや、クローン化した遺伝子を用いて発現を強制的に上昇させることで、不安定化における役割を解析する。さらに、網羅的解析法を用いて、分化状態が変わった場合のターゲット遺伝子の変化を検討する。

4. 研究成果

未分化状態、不安定化状態、積極的な分化状態 (胚様体および肝細胞) を含む、6 種類の多能性幹細胞 (ヒト ES 細胞株: KhES1, KhES2, KhES3, H1、ヒト iPS 細胞株: 253G1, 201B7) について、その網羅的遺伝子発現を統合的に解析した。その結果、それぞれの状態で特異的な遺伝子群を見出し、多能性幹細胞が不安定になった状態を遺伝子の発現パターンとして特徴付けることに成功した。そして、L3MBTL1 と FMBT2 がポリコムとしては例外的に不安定化でのみ発現上昇することが確認された。

そこで、多能性幹細胞において、これらの遺伝子を CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトした結果、多くの未分化マーカーの発現が減少し、未分化状態の破綻が促進することを見出した。従って、これらの遺伝子は未分化破綻する状況で発現上昇し、未分化に引き戻すという役割を果たしていると考えられた。

さらに、この仮説を実証するため、これらの遺伝子 (L3MBTL1 と FMBT2) を PCR 法によってクローン化して発現ベクターに組み込み、iPS 細胞において強制発現させる実験を行った。その結果、強制発現によって、不安定化状態に移行しても未分化マーカーの発現減少は小さく、不安定化は有意に抑制された。このことは、上記の仮説を少なくとも部分的に裏付けるものである。

また、不安定化と分化の違いをより明確に明らかにするため、多能性幹細胞を確定的な分化状態に誘導する研究も行い、リアルタイム PCR 法による解析の他に、統合的な解析も行った。その結果、各分化段階における遺伝子発現パターンの変化傾向やポリコム遺伝子群の発現変化を総合的に検討することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

. Tomotsune, D. *, Hirashima K., Fujii M., Yue, F., Matsumoto K., Takizawa-Shirasawa S., Yokoyama T., Sasaki, K., Enrichment of Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells by Ammonia Treatment. PLoS One. 11(9):e0162693. 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 9件)

・ Tomotsune, D., Yoshitome, A., Yue, F., Hirashima, K., Takizawa-Shirasawa, S., Yokoyama, T., Sasaki, K., ROLE OF POLYCOMB GROUP GENES IN STABILITY OF UNDIFFERENTIATED STATE OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS. The 16th ISSCR Annual Meeting (ISSCR), Melbourne, 2018,6,

・ 平島 寛司、岳 鳳鳴、友常 大八郎、佐々木 克典、リプログラミングによる口腔がん幹細胞様細胞樹立の試み、日本解剖学会 第77回 中部支部学術集会, 愛知, Oct 7-8, 2017

・ Tomotsune D., Yoshitome A., Hirashima K., Fujii M., Yue F., Matsumoto K., Takizawa-Shirasawa S., Yokoyama T., Nakamura S., Sakai S., Sasaki K., Enrichment of pluripotent stem cell derived hepatocyte-like cells by lanford medium and low-molecular compound, The 14th ISSCR Annual Meeting, Boston, USA, 2017.6

・ 友常 大八郎、平島 寛司、吉留 明子、藤井 昌子、滝澤 佐季子、横山 忠幸、松本 健、岳 鳳鳴、佐々木 克典、網羅的遺伝子解析を用いた低コストな幹細胞誘導法開発の試み 第16回 日本再生医療学会総会, 仙台, Mar 7-9, 2016

・ 平島 寛司、中村 駿介、酒井 爽子、内田 百合子、尾崎 真美、田畑 遼、藤田 楓、横山 忠幸、滝澤 佐季子、松本 健、岳 鳳鳴、友常 大八郎、佐々木 克典、リプログラミングによる人工肝臓がん・大腸がん幹細胞樹立の試み、122回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, Mar 28-30, 2016

・ 中村 駿介、滝澤 佐季子、横山 忠幸、友常 大八郎、岳 鳳鳴、佐々木 克典、ALDEFLUORを用いた iPS 細胞由来前駆細胞単離の検討、第15回 日本再生医療学会総会, 大阪, Mar. 17-19, 2015

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.shinshu-u.ac.jp/institution/ibs/>

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-1kaibo/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 岳 鳳鳴

ローマ字氏名:(Fengming Yue)

研究協力者氏名: 佐々木 克典

ローマ字氏名:(Katsunori Sasaki)

研究協力者氏名: 平島 寛司

ローマ字氏名:(Kanji Hirashima)

研究協力者氏名: 藤井 昌子

ローマ字氏名:(Masako Fujii)

研究協力者氏名：中村 駿介
ローマ字氏名：(Shunsuke Nakamura)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。