

平成 30 年 9 月 28 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 456

氏 名

播磨有希子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ハーバード大学医学大学院 (国名: アメリカ)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

PSM-like cell を用いた様々な筋組織への分化誘導因子の同定

3. 派遣期間: 平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 8 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Harvard Medical School, HMS-Gene; HMS-Pathology-Brigham & Women

5. 所期の目的の遂行状況及び成果 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入のものも可）**

（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）

<研究成果>

私は、派遣先研究室で確立されたヒト iPS 細胞の分化誘導システムを利用し、発生過程における分化決定因子の新たなメカニズムを解明した。近年、ES 細胞や iPS 細胞のような多能性幹細胞を、制御された空間内で高密度培養することにより形成される三次元の立体的な臓器、細胞組織体の研究が広く進められている[1]。これらの細胞組織体は、移植や毒性試験、病理モデルの確立など将来的に幅広い分野への応用が期待されているが、複雑な構造を持つ臓器への分化誘導は困難であり、まだ多くの課題が残っている。近年、派遣先指導者の Pourquié 教授らは、マウス ES 細胞やヒト iPS 細胞のシグナル伝達を調節することで PSM-like cell（“未分節中胚葉”様細胞）という発生過程で一時的に存在する中胚葉系の細胞群を誘導し、さらにそこから骨格筋への分化誘導を行うことに成功した（図 1）[2]。この成果は、従来の分化誘導方法と異なり、PSM の性質に着目して高い効率で PSM-like cell への誘導を可能にした点が画期的であった。そして最近、誘導された PSM-like cell で、正常な体節形成に不可欠な *Hes7* 遺伝子のオシレーションが観察されたことから[3]、これらの細胞は、遺伝子発現レベルでも *in vivo* と非常に近い状態に誘導できていることが示された。

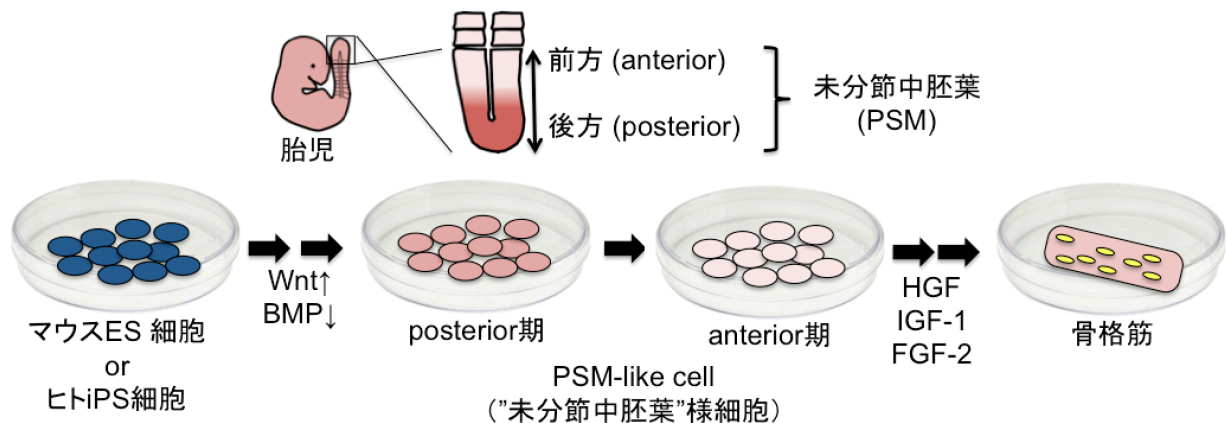


図 1. Pourquié 研究室で開発された ES 細胞から PSM-like cell、そして骨格筋への誘導

近年、PSM の後方から前方にかけて、Wnt シグナルと同様の勾配が解糖系にもあることが、ニワトリ胚とマウス胚で証明された（図 2）[4,5]。そして、ニワトリ胚で解糖系を阻害すると PSM の後方への伸長、つまり成長が止まってしまうことから、解糖系は発生過程の PSM において非常に重要な役割を果たしていることがわかった [4]。そこで、ヒト iPS 細胞から誘導した posterior PSM-like cell（後方未分節中胚葉様細胞、以下 pPSM-like cell）と anterior PSM-like cell（前方未分節中胚葉様細胞、以下 aPSM-like cell）における解糖系の傾向を調べた。未分化のヒト iPS 細胞に Wnt シグナルのアゴニストである GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) 阻害剤の CHIRON99021 と BMP シグナル阻害剤の LDN193189 を加えることにより pPSM-like cell を誘導し、続いて IGF、HGF、

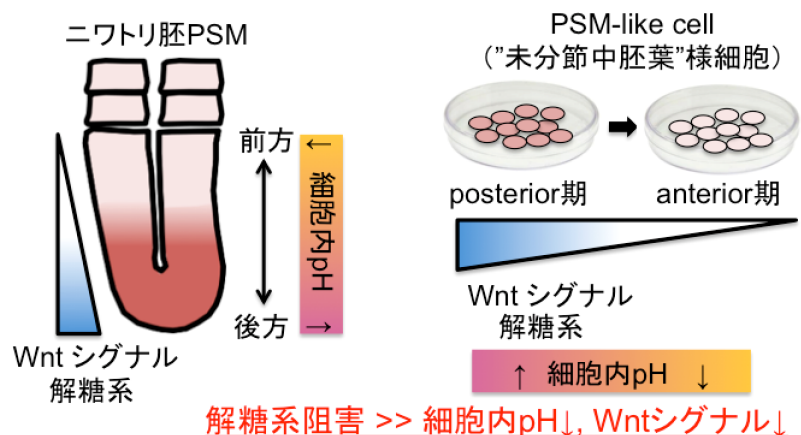


図 2. ニワトリ胚と PSM-like cell における解糖系と Wnt シグナルの勾配

FGFを加えた培地で培養することにより aPSM-like cell を誘導した（図 1）。そして、解糖系の指標として培養液中に放出された Lactate の量を比較した結果、aPSM-like cell に比べ pPSM-like cell での放出量が多く、さらに解糖系の別の指標として LDH-B の mRNA 発現レベルを比較した結果、同様の勾配が確認できた（図 2）。

胚の発生過程では、PSM に分化する直前に Neuro-Mesodermal Progenitor (NMP) と呼ばれる前駆細胞が存在し、この前駆細胞は神経系と中胚葉系組織の両方への分化ポテンシャルを持っている[6]。そして、この前駆細胞の分化決定を左右する重要な因子として Wnt シグナルが知られており、Wnt シグナルが優位だと中胚葉系組織への分化誘導が促進される。このように、発生過程において Wnt シグナルは分化決定を左右する重要な因子であることが知られているが、どのようなメカニズムで制御されているかわかっていなかった。しかし、近年、ニワトリ胚で解糖系を阻害すると Wnt シグナルが低下したことから、解糖系が Wnt シグナルを制御していることが明らかになった[4]。さらに PSM-like cell においても同様の現象が確認できた。そこで、発生過程では解糖系がどのように Wnt シグナルを制御しているのか、解糖系が盛んな癌細胞を例に検証を行った。

癌細胞では、一般的な細胞と比べて細胞内 pH が高く細胞外 pH が低いことが知られており[7]、さらに解糖系が盛んな環境では細胞内 pH が上昇するという報告もある[8]。このことから、PSM-like cell の細胞内 pH を、分化過程に沿って測定試薬 BCECF を用いて検証を行った。この結果、pPSM-like cell への分化が始まる分化誘導 2 日目で細胞内 pH がピークに達し、その後細胞内 pH は低下することがわかった（図 2）。そして興味深いことに、分化誘導開始から 5 日間、Wnt シグナルのアゴニストである CHIRON99021 を培養液に添加し続けているにも関わらず、Wnt シグナル活性化の指標である β -catenin の核への局在が分化誘導 2 日目にのみ観察されることがわかった。これは、細胞内 pH がピークに達する時期と一致することから、細胞内 pH と Wnt シグナルにも何らかの関係性があることが推測できた。そこで、Wnt シグナルのレベルによって運命決定が変わる NMP に着目し、pPSM-like cell に分化誘導される直前の細胞での細胞内 pH や解糖系を変化させ、Wnt シグナルに与える影響を調べた（図 3）。

培養液中の pH を変化させることにより細胞内 pH を変化させ、検証を行なった結果、細胞内 pH が高いと Wnt シグナルの下流因子である Axin2 の発現レベルが上昇し、初期の神経分化マーカーである Sox1 の発現レベルが低下した（図 3）。そして細胞内 pH が低い条件では、培養液中に Wnt シグナルのアゴニストを添加しているにも関わらず、逆の傾向が観察された。さらに、NMP で解糖系を抑制すると Axin2 の発現レベルの低下や Sox1 の発現レベルの上昇が起こると同時に、細胞内 pH の低下が観察された（図 3）。また、同様の結果がニワトリ胚でも確認できた。以上の結果から、解糖系や細胞内 pH は NMP の運命決定において重要な因子であることがわかった。そして、解糖系が細胞内 pH を制御し、最終的に Wnt シグナルを制御することが推測できた。

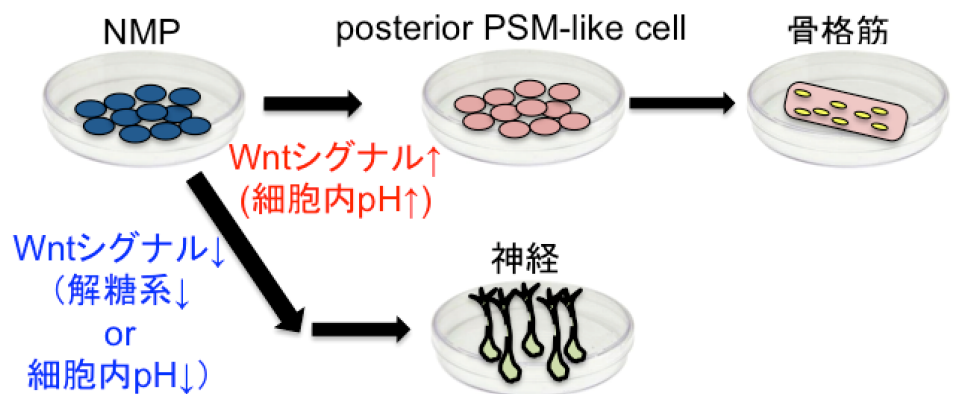


図 3. 分化誘導過程の PSM-like cell における糖代謝と Wnt シグナルの関係

次に、解糖系や細胞内 pH がどのように Wnt シグナルを制御するのか分子メカニズムの検証を行った。癌細胞では、活発な解糖系により β -catenin のアセチル化が起こり、核へ局在が移行することによって Wnt シグナルが活性化されることが知られている[9]。そこで、PSM-like cell における β -catenin のアセチル化レベルと核局在を調べた結果、解糖系が活発な pPSM-like cell では aPSM-like cell に比べて β -catenin のアセチル化レベルが高く、核に局在する割合が多いことがわかった（図 4）。また、 β -catenin のアセチル化レベルは細胞内 pH のピークである分化誘導 2 日目に核に多く

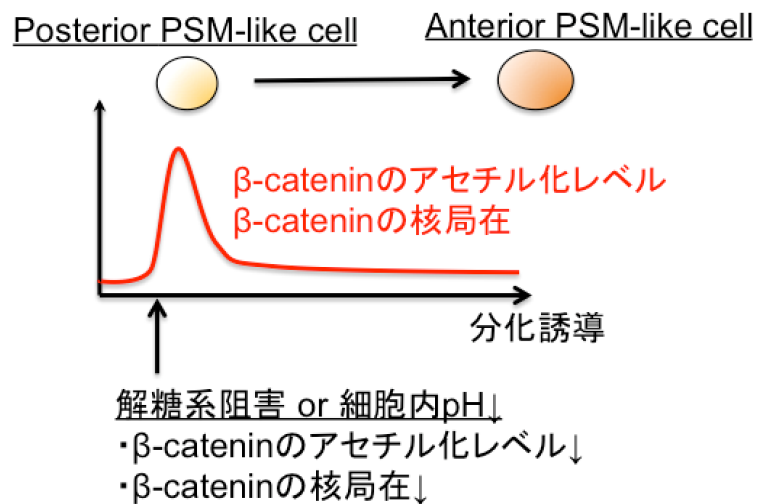


図 4. 解糖系のレベルや pH の調整による運命決定の変化

局在していることも確認できた。そして、解糖系を阻害した条件や細胞内 pH の低い条件では、 β -catenin のアセチル化レベルが下がり核局在の割合も減少した（図 4）。また、細胞内 pH の高い条件では逆の現象が確認できた。以上の結果から、解糖系や細胞内 pH は NMP での運命決定に影響し、その過程では、 β -catenin のアセチル化と核移行が関わっていることがわかった。また、recombinant β -catenin タンパクを Acetyl CoA ナトリウム塩と共に、異なる pH の条件下でインキュベートした結果、pH を変えただけで β -catenin のアセチル化レベルが変化した。これらの結果から、 β -catenin のアセチル化には非酵素的なアセチル化反応も関与していることが分かった。

<まとめ>

本研究では、ヒト iPS 細胞から分化誘導した PSM-like cell に着目し、発生初期のニワトリ胚の PSM と平行して生化学的解析を行った。これにより、生体での発生過程における現象がニワトリ胚で明らかになり、さらにヒト iPS 細胞の分化誘導過程に重要な因子が明らかになった。また、発生過程に見られる PSM では、癌細胞と同様に解糖系が活発に行われるという現象は非常に興味深く、さらにその分子メカニズムまでも似ているという発見は、今後の研究発展に繋がることが期待できる。そして、発生過程において、細胞内 pH の調整で β -catenin のアセチル化レベルが変化するという非酵素的なアセチル化反応の発見は、ヒト iPS 細胞の分化誘導研究においても非常に重要で、今後さまざまな組織へ分化誘導を行う上でも注目すべき点であることがわかった。

<研究成果の発表>

研究成果は、「Intracellular pH controls Wnt signaling downstream of glycolysis in the vertebrate embryo」として bioRxiv に掲載しており、現在論文投稿中である。

<参考文献>

- [1] Eiraku, M. et al., (2008) **Cell Stem Cell**, Volume 5, 519-532
- [2] Chai, J. et al., (2015) **Nature Biotechnology**, Volume 33, 962-969
- [3] Matsumiya, M. et al., (2018) **Development**, Volume 145
- [4] Oginuma, M. et al., (2017) **Developmental Cell**, Volume 40, 342-353
- [5] Bulusu, V. et al., (2017) **Developmental Cell**, Volume 40, 331-341
- [6] Henrique, D. et al., (2015) **Development**, Volume 142, 2864-2875
- [7] Webb, B.A. et al., (2011) **Nature Reviews Cancer**, Volume 11, 671-677

- [8] Rubenstein, E.M et al., (2010) The EMBO Journal, Volume29 (15), 2473-2474
- [9] Chocarro, A. et al., (2012) Molecular Cell, Volume 49, 474-486