

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)における自己複製・分化機構の解析

著者	横田 崇
著者別表示	Yokota Takashi
雑誌名	平成14(2002)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	2001-2002
ページ	7p.
発行年	2003-05
URL	http://doi.org/10.24517/00049408



ヒト胚性幹細胞（ES細胞）における自己複製・
分化機構の解析

（研究課題番号 13480204）

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤研究B2）

研究成果報告書

平成15年5月

金沢大学附属図書館



0300-02128-3

研究代表者 横田 崇
（金沢大学医学系研究科・教授）

KAKEN
2000
23

ヒト胚性幹細胞（ES細胞）における自己複製・
分化機構の解析

（研究課題番号13480204）

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤研究B2）

研究成果報告書

平成15年5月

研究代表者 横田 崇
（金沢大学医学系研究科・教授）

はしがき

胚性幹細胞（ES細胞）とは自己複製能と分化した細胞を作る能力を併せ持った細胞であり、血液、神経、皮膚、腸上皮、生殖器などの、種々の組織、臓器を形成することが可能である。さらに、ES細胞から個体を作ることが可能である。この幹細胞の持つ自己複製能と分化能という2つの機能の解析は、生物学にとってもっとも基本的かつ重要な課題であるが、その分子機構は現在のところ全く不明である。マウスでは、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) というサイトカインがES細胞の自己複製因子として働き、試験管内でES細胞を増幅することが可能となった。最近、試験管内で各種の組織に分化することができるヒトES細胞が樹立されたことから、再生医学や臨床医学への可能性が大きく開けた。しかし、現在のヒトES細胞はLIFに反応しない等の欠点を抱えており、2倍に増えるのに約1週間かかるなど、1個の細胞からクローンとして自己複製させコロニーを形成することが非常に困難である。そのため、遺伝子導入を行い、安定形質導入株を得ることが困難であるという問題がある。

我々はLIFシグナルの下流で機能する転写因子STAT3のコンディショナル活性化型遺伝子を構築し、これを用いてマウスES細胞をLIF非存在下で未分化状態で維持できることを示した。この活性化型STAT3遺伝子をヒトES細胞に導入すれば、LIFの反応性にかかわらず、ヒトES細胞を未分化状態で維持できる可能性がある。つまり、シングルクローンとして維持できるよりよいヒトES細胞株が樹立できる可能性がある。

得られたヒトES細胞株は自己複製機構の解析や分化因子遺伝子を導入し、その特定の系列への分化条件の解析に用いられる。胚性幹細胞の自己複製や分化に関与するシグナル伝達機構を解明することは、現在行われている細胞移植や臓器移植の制約を克服した幹細胞を移植可能な形で大量調製する技術の開発につながり、ひいては遺伝子治療、細胞治療、個体制御の基盤技術の開発につながる。さらに、組織の再生修復や生着促進に関する医薬品開発にもつながるものである。

そこで本研究では、LIF受容体の下流で機能し、かつ、幹細胞の自己複製能に影響を及ぼす因子を探索することにより、幹細胞の自己増殖・分化のメカニズムを解明することを目的とした。さらに、この因子を他の幹細胞に応用し、遺伝子治療、骨髄移植など再生医学に向けた基盤技術を開発することを目的とした。

本研究は、研究代表者、研究分担者の他に多くの共同研究者と研究協力者によって行われた。これらの共同研究者に厚く感謝したい。また、本科学研究費によって必要な設備の一部が設置され、本研究を大きく発展させることができたことについて、文部科学省の援助に感謝を表したい。

平成15年5月

研究代表者 横田 崇

研究組織

- 研究代表者 横田 崇 (金沢大学医学系研究科教授)
- 研究分担者 小出 寛 (金沢大学医学系研究科助教授)
- 研究分担者 西中村 隆一 (東京大学医科学研究所客員助教授)

交付決定額 (配分額) (金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	8,300	0	8,300
平成14年度	6,400	0	6,400
総計	14,700	0	14,700

研究発表

(1) 学会誌等

(和文)

1. 松田孝彦、赤木紀之、臼田雅幸、横田崇 (2001) ES細胞の未分化状態維持機構. 実験医学. 羊土社. 19(3): 330-338.
2. 横田崇、松田孝彦、高木峰生、平家俊男 (2001) 造血幹細胞の維持機構. 分子細胞治療. 先端医学社. 2(2): 3-10.
3. 松平忠弘、荒井好裕、横田崇 (2001) 造血系に作用するサイトカインの開発の方向性と将来. 組織培養工学. 27(3): 36-39.
4. 横田 崇 編集 (2001) 「再生医学と幹細胞」実験医学増刊. 羊土社、Vol 19, No 15 (増刊)
5. 西中村隆一、横田崇 (2001) 腎臓の発生と分化—腎臓に幹細胞はあるか? 「再生医学と幹細胞」実験医学増刊. 羊土社、Vol 19, No 15 (増刊), 99-105.
6. 中山直樹、横田崇 (2001) ES細胞を用いた *in vitro* 軟骨形成 「再生医学と幹細胞」実験医学増刊. 羊土社、Vol 19, No 15 (増刊), 126-132.
7. 長船健二、西中村隆一、横田崇 (2001) アクチビン. Medical forum CHUGAI 5(6):21.
8. 横田崇、平家俊男、高木峰生 (2001) キメラレセプタートランスジェニックマウスを用いた造血幹細胞の分化・増殖の制御. 新臨床医のための分子医学シリーズ「造血幹細胞のいまと医療への展開」羊土社. 15: 92-102.
9. 西中村隆一、横田崇 (2001) ES細胞による再生医療の現状. 「発生・分化・再生」生物の科学 遺伝別冊. 裳華房 13: 130-136.
10. 横田 崇 編集 (2002) 再生医学がわかる 羊土社
11. 水野憲一、横田崇 (2002) ES細胞の神経分化はどこまで解明されたか、総合臨牀、永井書店、51(1):42-46.
12. 水野憲一、横田崇 (2002) 神経幹細胞の自己再生メカニズム、Clinical Neuroscience, 中外医学社、20(1): 37-40.
13. 横田 崇 (2002) ヒト型モデル動物 井上達、野田哲生、野本明男編 ヒトマウスキメラ受容体マウス スプリングァーフェアラーク社 p.208-218.
14. 小出寛、横田崇 (2002) ES細胞における全能性の維持機構 細胞工学 21(8), 827-830.

15. 水野憲一, 横田 崇 ES細胞から神経分化へ 再生医学再生医療 (現代化学増刊41), 59-62 (2002)
16. 西中村 隆一 腎臓発生を制御する遺伝子群 *Nephrology Frontier* 1: 24-29, 2002
17. 小出寛, 横田崇 (2002) classII サイトカイン 「再生医学がわかる」 p.41-48.

(英文)

1. Nakayama, N., Han, C., Nishinakamura, R., Scully, S., He, C., Zeni, L., Yamane, H., Chang, D., Yu, D., Yokota, T. and Wen, D. A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. *Dev Biol*, 232: 372-387, 2001.
2. Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Scully, S., Lacey, D.L., Katsuki, M., Asasima, M. and Yokota, T. Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development*, 128 (16): 3105-3115, 2001.
3. Yamazaki, Y., Kaziro, Y. and Koide, H. Ral promotes anchorage-independent growth of human fibrosarcoma, HT1080. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 868-873, 2001.
4. Mizutani, S., Inouye, K., Koide, H. and Kaziro, Y. Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett.* 507: 295-298, 2001.
5. Oka, M., Tagoku, K., Russell, T., Nakano, Y., Hamazaki, T., Meyer, E.M., Yokota, T. and Terada, N. CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell*, 13 (4): 1274-1281, 2002.
6. Ishibashi, H., Hihara, S., Takahashi, M., Heike, T., Yokota, T. and Iriki, A. Tool-use learning selectively induces expression of brain-derived neurotrophic factor, its receptor trkB, and neurotrophin 3 in the intraparietal cortex of monkeys. *Cognitive Brain Res.* 14 (1):3-9, 2002.
7. Matsuda, T., Haraikawa, R., Usuda, M., Koide, H., Nakao, K., Katsuki, M., Mori, K., Heike, T. and Yokota, T. Production of transgenic mice from pluripotent embryonic stem cells maintained by using conditionally active form of STAT3. submitted.
8. Ishibashi, H., Hihara, S., Takahashi, M., Heike, T., Yokota, T. and Iriki, A. Tool-use learning induces BDNF expression in a selective portion of monkey anterior parietal cortex. *Molecular Brain Res.* 102: 110-112, 2002.
9. Senga, T., Iwamoto, T., Humphrey, S.E., Yokota, T., Taparowsky, E.J. and Hamaguchi, M. Stat3-dependent induction of BATF in M1 cells. *Oncogene*, 21 (53): 8186-8191, 2002.
10. Matsui, T., Kinoshita, T., Hirano, T., Yokota, T. and Miyajima, A. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J. Biol. Chem.*, 277 (39): 36167-36173, 2002.
11. Tanaka, T., Kunath, T., Kimber, W.L., Jaradat, S.A., Stagg, C.A., Usuda, M., Yokota, T., Niwa, H., Rossant, J. and Ko, M. Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome Res.* 12 (12): 1921-1928, 2002.
12. Osafune K, Nishinakamura R, Komazaki S, Asashima M. In vitro induction of the pronephric duct in *Xenopus* explants. *Dev Growth Differ*, 44 (2), 161-7, 2002.
13. Sato A, Matsumoto Y, Koide U, Kataoka Y, Yoshida N, Yokota T, Asashima M, Nishinakamura R. Zinc-finger protein Sall2 is not essential for embryonic and kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 23 (1): 62-69, 2003.
14. Senga, T., Iwamoto, S., Yoshida, T., Yokota, T., Adachi, K., Azuma, E., Hamaguchi, M. and Iwamoto, T. LSSIG is a novel murine leukocyte specific GPCR that is induced by the activation of STAT3. *Blood*, 101 (3): 1185-1187, 2003.

(2) 口頭発表

1. 医科学研究所創立記念シンポジウム「21世紀の医科学」June 1, 2001, Tokyo.
Yokota, T. 幹細胞の自己複製シグナル制御、
2. 金沢大学十全会シンポジウム「再生医学と幹細胞」June 2, 2001, Kanazawa.
Yokota, T. 胚性幹 (ES) 細胞の未分化状態維持機構の解明、
3. 第74回日本生化学会大会シンポジウム、2001年12月
横田崇、松田孝彦、祓川亮、小出寛、赤木紀之、臼田雅幸 胚性幹細胞 (ES細胞) の自己複製シグナル制御
4. 第24回日本分子生物学会年会シンポジウム、2001年12月
横田崇、赤木紀之、臼田雅幸、S.A. Jaradat、洪実、松田孝彦、小出寛 胚性幹細胞 (ES細胞) における自己複製シグナルの解析
5. 第16回Transfusion Medicine Conference、Tokyo, January 25-26, 2002
Yokota, T. 幹細胞の未分化性を維持するシグナル、
6. Yokota, T. Self-renewal mechanism of embryonic stem cells. 日米科学技術協力事業 (非エネルギー分野) 「組換えDNA」標的ベクター生物学と胚及び幹細胞生物学ワークショップFebruary 21, 2002, NIH, Bethesda
7. 横田崇、日本炎症再生学会年会シンポジウム、2002年京王プラザホテル
8. 西中村隆一、日本炎症再生学会シンポジウム
9. 第64回血液学会・第44回日本臨床血液学会合同シンポジウム、2002年9月12-14日パシフィコ横浜、横田崇、松田孝彦、Jaradat S.A., 洪実、赤木紀之、臼田雅幸、小出寛 ES細胞の未分化性維持機構
10. 横田崇、日本生化学会シンポジウム、2002年10月京都国際会館
11. 第25回日本分子生物学会年会、2002年10月11-14日パシフィコ横浜、赤木紀之、臼田雅幸、松田孝彦、S.A. Jaradat、洪実、丹羽仁史、小出寛、横田崇 zinc fingerタンパク質 Zfp57のES細胞の自己複製への関与
12. 第25回日本分子生物学会年会、2002年10月11-14日パシフィコ横浜、臼田雅幸、赤木紀之、松田孝彦、小出寛、横田崇 ポリコーングループ遺伝子 eed の標的遺伝子の探索
13. 第25回日本分子生物学会年会、2002年10月11-14日パシフィコ横浜、佐藤朗、松本祐子、横田崇、浅島誠、西中村隆一 腎臓形成に必須な因子 Sal1 の機能解析
14. 第25回日本分子生物学会年会、2002年10月11-14日パシフィコ横浜、小出麗、横田崇、浅島誠、小出寛 活性化 Ras による ES細胞の脂肪細胞への分化誘導

(3) 出版物

なし

研究成果

マウス ES 細胞は LIF 存在下で自己複製する。その自己複製には、STAT3 の活性化及び Oct-3/4 の発現が必須である。本研究では ES 細胞の自己複製の分子機構を解明する目的で、DNA チップ解析、フィルターハイブリダイゼーション法により候補遺伝子として Zfp57 (Zn フィンガータンパク質) および Eed (embryonic ectoderm development, ポリコームタンパク質) を同定した。Zfp57 は Oct3/4 と結合し、Oct3/4 の標的遺伝子である Rex-1 の発現を協同的に促進することが明らかとなった。一方、Eed は HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) と複合体を形成し、標的遺伝子の転写抑制に関与する可能性が考えられる。そこで HDAC の阻害剤を添加すると、LIF 存在下でも ES 細胞は分化が誘導された。したがって、HDAC による分化誘導因子の発現抑制に Eed が関与している可能性が示唆された。さらに、Eed が Rex-1 とも結合することを見いだした。以上の結果から、Oct3/4 と STAT3 の標的分子である Zfp57 によって誘導された Rex-1 が STAT3 標的分子 Eed や HDAC と結合して、ES 細胞の分化誘導因子の発現を抑制することによって、ES 細胞の未分化状態が維持されている可能性が考えられた。

さらに、Wnt シグナルがサルおよびマウス ES 細胞の未分化性維持に関与することを示した。Wnt シグナルはサル ES 細胞には LIF と独立に働き、また、マウス ES 細胞には LIF と協同的に働き、未分化マーカーである SSEA-4、アルカリフォスファターゼの発現を維持した。

ヒト ES 細胞は 1998 年にウイスコンシン大学の Thomson らにより樹立されている。しかし、マウスと異なりヒトおよびサル ES 細胞は LIF に反応しない、一個の細胞からシングルクローンとして増殖できないなど欠点を抱えている。そこで、細胞外からのシグナルではなく、STAT3 という細胞内シグナル伝達分子を直接活性化してヒト ES 細胞を自己複製させることが考えられる。ヒト ES 細胞に STAT3ER を遺伝子導入する計画は金沢大学の倫理委員会に実験計画書を申請し、国の機関であるヒトクローン・生殖委員会での指針にもとづく承認を待っている段階である。