

2015年度 個人特別研究費 研究成果報告書

所属・職・氏名：理工学部・教授・平井洋平

研究課題：移植用の高機能細胞凝集体の調製

研究期間：2015年4月1日～2016年3月31日

研究成果概要 (2,000字程度)

本研究は生体組織損傷部位へ移植する高機能細胞凝集体を提供するための技術開発であり、内容としては、分化万能性を有する ES 細胞やそのモデルである胚性癌細胞 (EC 細胞) にエピモルフィンファミリータンパク質の遺伝子を人工的に導入し、1) その発現を人工的に調節すると共に 2) 各種の分化マーカーを定量的・網羅的に発現追跡し、エピモルフィンファミリー遺伝子による分化誘導の解析である。

1) エピモルフィンファミリー遺伝子の万能細胞等への導入と発現誘導

組換えエピモルフィン蛋白ならびにエピモルフィンのファミリータンパク syntaxin-4 を用いた解析より、ES ならびに EC 細胞の形態は syntaxin-4 を細胞外から作用させると劇的に変化することが判明した。また、ES 細胞の強力な未分化維持因子として知られる 2i の非存在下では ES 細胞コロニー中で形態・分化状態の異なる細胞が局所的に出現し、この際に syntaxin-4 が一部の細胞で表面 (細胞外) に呈示されることがわかった。これらの結果より本研究の対象遺伝子を syntaxin-4 に特化することとした。syntaxin-4 の遺伝子導入においては、万能細胞の特徴 (安定した遺伝子導入が困難) を鑑み piggybac トランスポゾン (トランスポゾン) の活性を利用した系を用いることとし、発現 ON/OFF が任意のタイミングで誘導できるように抗生物質 (テトラサイクリンやドキシサイクリン) の添加時でのみ発現できるプラスミドを構築した。なお、導入した syntaxin-4 が発現誘導時に効率的に細胞外に発現するよう syntaxin-4 遺伝子には予めシグナルペプチドを付加しておいた。これを ES 細胞に導入・検討した結果、ドキシサイクリンの添加に応答して syntaxin-4 が細胞外に発現する ES 細胞を樹立できた。

2) syntaxin-4 発現による ES 細胞の分化の解析

まず、1) で調製した ES 細胞を用いて syntaxin-4 の細胞外発現が引き起こす挙動変化を古典的な分子発生生物学的手法を用いて解析した。その結果、syntaxin-4 は ES 細胞中で細胞接着分子の発現挙動を変化 (E-cadherin から P-cadherin へのスイッチ) させて間質細胞様の形態へと誘導し、同時に中胚葉への分化を促すことが明らかになった。また、2i は syntaxin-4 の細胞外呈示を阻害し未分化性維持に貢献する一方で、syntaxin-4 を強制的に細胞外へ呈示させた場合には未分化性維持効果を発揮できないことが判明した。次に、syntaxin-4 のフラグメントの組換え体の中から syntaxin-4 の細胞外機能を阻害するアンタゴニストを見出し、これが 2i よりも強力に ES 細胞の未分化性を維持させる可能性も示唆できた。これらの結果を受けて、最新のトランスクリプトーム解析を通して syntaxin-4 の下流因子を網羅的に抽出し、それぞれについて syntaxin-4 の機能発現との関わりを詳細に解析した。その結果、syntaxin-4 の細胞外発現により ES 細胞は中胚葉系へと変化することが再確認でき、また、ES 細胞の未分化性を

支持する一連の転写因子 Zscan4 ファミリー全ての発現を劇的に減少させることも分かった。この解析結果を糸口として、細胞外 syntaxin-4 の機能発現と PI3K/Akt シグナルの関わりを導き出すことができた。さらに、ES 細胞より安定で分化刺激応答の単純な各種 EC 細胞 (F9 細胞, P19-CL6 細胞) を用いた場合でも ES 細胞と同様に細胞形態の変化と中胚葉への分化誘導が再現され、細胞外 syntaxin-4 による E-cadherin から P-cadherin へのスイッチ機構の詳細が判明した。

結論

ES 細胞は、一般的な未分化維持条件下でも単一コロニー中で形態や分化状態の異なる細胞が局所的・自然発症的に出現し、これにより特定の分化刺激に対して不均一な分化応答を生み出してしまう。このような多能性幹細胞の不安定性は、分化刺激により目的細胞を効率的に調製する際の致命的な障害となり、これが従来から再生医療実現の大きなハードルとなっていたが、本研究で ES 細胞の局所的不均一性を生み出す原因をつきとめることができた。また、同時にその原因をとり除くアンタゴニストの調製にも成功した。今後は、本研究で作製した ES 細胞の凝集体とアンタゴニストを併用し、動物個体内での移植細胞の挙動制御を試みる。

本報告書は、データで gakunai@kwansei.ac.jp まで提出してください。