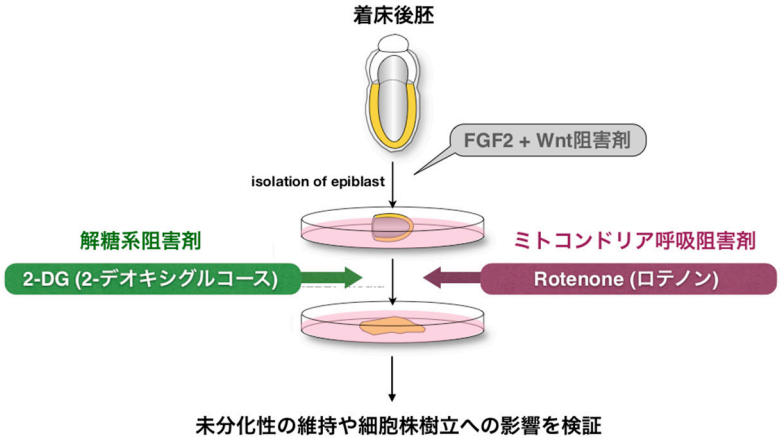
214　細胞の二元性による多能性幹細胞の不死化機構の解明	岡村　大治

【目的】万能細胞と呼ばれる多能性幹細胞は、一般的に二つに大別される。マウスの着床前胚から樹立される ES 細胞や最終分化した体細胞から樹立される iPS 細胞などはナイーブ型と呼ばれ、マウスの着床後胚から樹立されるエピブラスト幹細胞などはプライム型と呼ばれる。このナイーブ型とプライム型はそれぞれ異なる細胞特性を持つ。その代表的な例としてキメラ形成能や X 染色体の不活性化が挙げられる。これらの性質の違いに加え、もう 1 つ大きな違いとしてエネルギー代謝がある。通常、細胞はエネルギー代謝として解糖系とミトコンドリア呼吸を利用しているが、多能性幹細胞において、ナイーブ型では解糖系とミトコンドリア呼吸の両方に依存し「二元性」を実現しているのに対し、プライム型では主に解糖系に依存していることが知られている。近年、多能性幹細胞の未分化性の維持機構におけるエネルギー代謝の関連性が明らかになりつつある。そこで今回はプライム型多能性幹細胞におけるこの偏ったエネルギー代謝が、多能性幹細胞化する過程での未分化性にどのように影響しているのかを調べることにした。

【方法】近年、我々が樹立に成功した新規多能性幹細胞（領域選択型エピブラスト幹細胞：rsEpiSC 細胞）は、着床直後のマウス胚の未分化細胞集団であるエピブラストを Wnt シグナル抑制剤（IWR1）と FGF2 の添加条件下で培養することで、エピブラスト細胞は無限増殖能を獲得し多能性幹細胞株として樹立される。またこの細胞は、ナイーブ型であるマウス ES 細胞/iPS 細胞とは異なり「解糖系」にそのエネルギー代謝経路を大きく依存しており、癌細胞と同様のワールブルグ効果（好気性解糖）を示すことが分かっている（Okamura* et al.、*Nature*、2015）。我々は多能性幹細胞におけるエネルギー代謝の役割を解析すべく、rsEpiSC 細胞または同細胞の樹立過程におけるエピブラストを材料とし、解糖系ならびにミトコンドリア呼吸の阻害効果を検証した。本実験に際し我々は、細胞・組織培養下において以下の化合物添加を実施した。ミトコンドリア呼吸の阻害剤として呼吸鎖複合体 I 内の電子の移動を妨げる Rotenone（ロテノン）を用い、一方で解糖系の阻害剤として解糖系による代謝を受けないグルコース分子である 2-DG（2-デオキシ-D-グルコース）を用い、エネルギー代謝阻害によるエピブラスト細胞の未分化性への影響を検証した。

【結果】エネルギー代謝の調整は細胞の生死や増殖などの基本的な生理活性のみならず、細胞特性や分化多能性の維持機構に大きく影響を与えることが明らかとなった。近年、代謝物そのものが「情報」としての意味をもつことが分かってきている。「情報物質としての栄養」という観点の中で、近年特に注目されているのがクエン酸回路（TCA 回路）の中間代謝産物や補酵素である。これらの中には、ヒストンのアセチル化やメチル化修飾に関わる分子が多く含まれ、エネルギー代謝とエピゲノム情報・遺伝子発現調節の密接な関係が明らかになりつつある。我々の結果は、エネルギー代謝が単純な「活動エネルギーの源」としての役割のみならず、ときにその中間代謝産物量をコントロールすることで、細胞特性や発生・分化にも影響を与えうる可能性を示すものである。

エピブラスト細胞に対する選択的エネルギー代謝阻害



214. 細胞の二元性による多能性幹細胞の不死化機構の解明

岡村　大治

*近畿大学 農学部 バイオサイエンス学科 動物分子遺伝学研究室

Key words：多能性幹細胞，マウス，エネルギー代謝，未分化性の維持，エピブラスト

緒　言

万能細胞と呼ばれる多能性幹細胞は、一般的に二つに大別される。マウスの着床前胚から樹立される ES 細胞や最終分化した体細胞から樹立される iPS 細胞などはナイーブ型と呼ばれ、一方で、マウスの着床後胚から樹立されるエピブラスト幹細胞などはプライム型と呼ばれる。このナイーブ型とプライム型はそれぞれ異なる細胞特性を持つ。その代表的な例としてキメラ形成能や X 染色体の不活性化が挙げられる。ナイーブ型ではマウス胚盤胞注入によるキメラ形成能を有するのに対し、プライム型では形成できない。またナイーブ型では 2 本の X 染色体が活性状態であるのに対し、プライム型では一本の X 染色体が不活性化している。これはナイーブ型・プライム型の多能性幹細胞に対応する生体内の胚の中で見られる違いを反映しており、つまりは「細胞間の発生段階の違い」として、ナイーブ型・プライム型の様々な性質の違いに反映されている。これらに加え、もう 1 つ大きな違いとして“代謝”の違いに近年注目が集まっている。代謝といっても核酸合成やアミノ酸代謝、そして脂質代謝に至るまで様々なものがあるが、現在までによく理解されているナイーブ型・プライム型間に違いが認められる代謝に“エネルギー代謝”がある。エネルギー代謝には解糖系とミトコンドリア呼吸が存在するが、通常の我々の体細胞は、ミトコンドリア呼吸に大きく依存したエネルギー代謝を利用している。これは酸素を利用する酸化的リン酸化を行うことで、非常に効率的に大量の ATP を産生出来る利点が大きい。一方で多能性幹細胞においては、ナイーブ型では解糖系とミトコンドリア呼吸の両方に依存しているのに対し、プライム型では主に解糖系に依存したエネルギー産生を行なっていることが知られている［1］。しかしこの場合においても、完全に解糖系に依存するわけではなくミトコンドリア呼吸もわずかに利用していると考えられているが、その役割については未だ解明されていない。近年、多能性幹細胞の未分化性の維持機構におけるエネルギー代謝の関連性が明らかになりつつある。そこで今回は、プライム型におけるこの偏ったエネルギー代謝が未分化性にどのように影響しているのかを調べることにした。

当該研究課題において我々はこのプライム型のエネルギー代謝の役割を調べるために、より生体内に近い材料となりうる胚から採取したエピブラストを用いてアプローチしたいと考えた。”エピブラスト細胞”とはマウスの着床後、また分化開始イベントである原腸陥入前の初期胚（5.5～6.5 日胚）における多能性細胞集団である。これまでに、エピブラストから従来型のエピブラスト幹細胞（EpiSC）が樹立されており、その未分化性の維持は FGF2 と Activin の培養下への添加に依存している［2］。一方で 2015 年、岡村らによって FGF2 と Wnt 阻害剤の培養条件でもプライム型の多能性幹細胞である新規エピブラスト幹細胞（region selective-Epiblast Stem Cells : rsEpiSC）が樹立された。通常の EpiSC 樹立の際、未分化性を維持し多能性幹細胞化するエピブラスト細胞は約 0.5%であったが、この FGF2 と Wnt 阻害剤の新規培養条件では、ほとんどのエピブラスト細胞（99.5%）における未分化性の維持が可能であり、現在において最も”生体外におけるエピブラスト細胞の未分化性の維持” に効果的な培養条件であることが示されている［3］。生体内において未分化性を維持したまま発生が進行するのとは異なり、生体外ではすべてのエピブラスト細胞が分化してしまう。そこで本研究では、上記 FGF2 と Wnt 阻害剤によるエピブラストの未分化性維持条件を用いて、エネルギー代謝阻害によるエピブラスト細胞の未分化性への影響を検証した。

*現在の所属：近畿大学 農学部 生物機能科学科

方法および結果

1. エピブラストの初代培養における各種エネルギー代謝阻害剤の未分化性への影響

マウス系統には ICR を用い交配を行い、プラグ確認日を 0.5 日胚とした。6.25 日胚のエピブラスト細胞には顕著な原腸陥入は生じておらず、エピブラスト全体が未分化性を維持しているものと考えられた。外科的にエピブラストを採取しマウス線維芽細胞（MEFs）上に静置培養することで、エピブラストは形態を崩しながらも増殖を続け、平面的な増殖塊を形成する（エピブラスト増殖塊）。我々はこの初代培養下においてエピブラスト細胞は速やかに分化し、全ての未分化マーカーの発現を消失するが、一方で FGF2 と Wnt 阻害剤（IWR1）を添加することで、エピブラスト細胞のほぼ全て（99.5%）は代表的な未分化マーカーOCT4 や SSEA1 の発現を維持し、継代後、マウスプライム型多能性幹細胞 rsEpiSC が樹立されることを見出している［3］。このエピブラスト細胞の初代培養下においてエネルギー代謝の未分化維持機構への機能を探るために、解糖系阻害剤として 2-DG、またミトコンドリア呼吸阻害剤として Rotenone、Antimycin、Oligomycin、FCCP を添加し、未分化マーカーである OCT4 タンパクの発現への影響を解析した（図 1、2）。

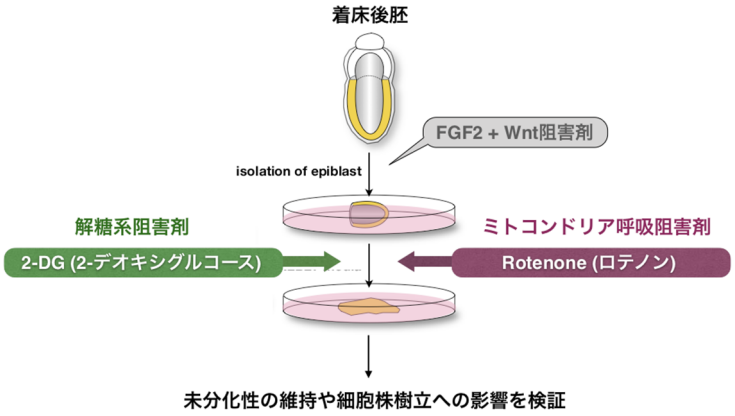


図 1. エピブラスト細胞に対する選択的エネルギー代謝阻害

着床後のマウスエピブラスト細胞の初代培養に対し FGF2 と Wnt 阻害剤を添加することで、ほぼ全てのエピブラスト細胞が未分化性を維持できる（Okamura et al.、Nature、2015）。この培養システムの中で、解糖系阻害剤 2-DG（2-デオキシグルコース）や Rotenone を含めた複数のミトコンドリア呼吸阻害剤を添加し、エピブラスト細胞における未分化性への影響を検証する。

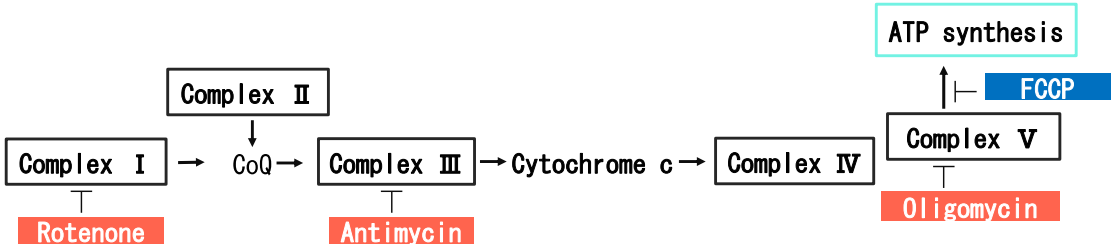


図 2. 各種薬剤による電子伝達系や酸化的リン酸化をターゲットとしたミトコンドリア呼吸阻害

ミトコンドリアにおける電子伝達系を経て、最終的に複合体Vによる酸化的リン酸化を介して ATP が産生される。電子伝達系の過程で複合体Ⅰ、Ⅲ、Ⅳに対する阻害剤として、それぞれ Rotenone（複合体Ⅰ）・Antimycin（複合体Ⅲ）・Oligomycin（複合体Ⅳ）が用いられる。一方、ATP 合成の場である複合体Vによる酸化的リン酸化は FCCP によって阻害される。

2. エピブラストの初代培養において電子伝達系の複合体阻害剤は未分化性を消失させる

この初代培養下において、コントロールであるFGF2とWnt阻害剤添加のみの条件では全ての細胞がOCT4タンパクを発現しており、強力に未分化性を維持していることが明らかとなった（図3）。一方で電子伝達系の複合体阻害剤（Rotenone、Antimycin、Oligomycin）の添加下では、多くのエピブラスト細胞においてOCT4タンパクの消失が認められ、未分化性が維持できていないことが示唆された。さらに驚くべきことに、同じミトコンドリア呼吸阻害剤でありながら、酸化的リン酸化を担う複合体Vの阻害剤FCCPを添加した条件では、ほとんどのエピブラスト細胞がコントロールと同レベルでOCT4タンパクを維持しており、このことはミトコンドリア呼吸を介した“ATP産生”ではなく、“電子伝達系”依存的な未分化性維持機構がエピブラスト細胞には存在することが強く示唆された（図3）。

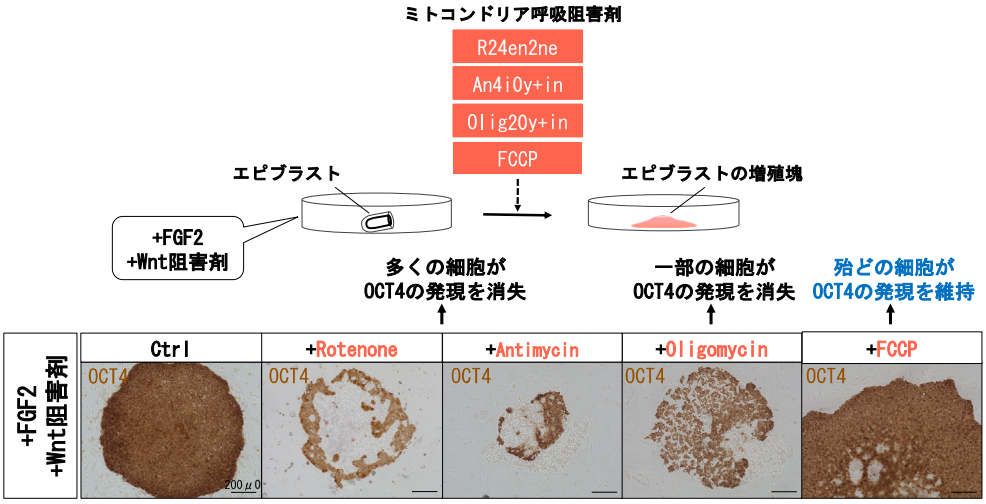


図 3. 電子伝達系阻害によるエピブラスト細胞の未分化性の消失

着床後のマウスエピブラスト細胞の未分化性を強力に維持出来る初代培養条件下において（FGF2 と Wnt 阻害剤の添加）、各種ミトコンドリア呼吸阻害を行なった。電子伝達系の複合体阻害剤（Rotenone、Antimycin、Oligomycin）を添加すると、エピブラスト細胞から未分化マーカーである OCT4 タンパクの発現が消失することが認められ、一方で酸化的リン酸化阻害剤（FCCP）の添加ではそのような未分化性の消失はほとんど認められなかった。

3. 種を超えたプライム型多能性幹細胞において電子伝達系の複合体阻害剤は未分化性を消失させる

上記エピブラスト細胞の初代培養下において、ミトコンドリア呼吸における電子伝達系が機能することが何らかの機構を介してエピブラスト細胞の未分化性の維持に寄与していることが示唆されたが、エピブラスト細胞由来の多能性幹細胞“プライム型”においては同様の未分化性維持機構が機能しているのだろうか？そこで我々は代表的なプライム型多能性幹細胞「ヒト iPS 細胞」と「マウス rsEpiSC」とを用い、さらにそのカウンターパートとしてナイーブ型多能性幹細胞「マウス ES 細胞」を用い、電子伝達系複合体 I 阻害剤“Rotenone”の添加下における未分化性を検証した。その結果、ナイーブ型マウス ES 細胞においてその未分化性にほとんど影響は観られず、それは複数回継代してもなお変化はなかった。一方でプライム型多能性幹細胞であるヒト iPS 細胞やマウス rsEpiSC において、細胞増殖は認められるにも関わらず、OCT4 タンパクの明らかな減弱化や消失が認められた（図 4）。さらに体細胞マーカーの遺伝子発現量の変化を定量的 PCR（q-PCR）で解析したところ、体細胞マーカーの発現量減少が認められた。このことから電子伝達系の複合体阻害は、エピブラスト細胞の初代培養のみならず、種を超えてプライム型多能性幹細胞に未分化性の消失を引き起こすことが明らかとなった。

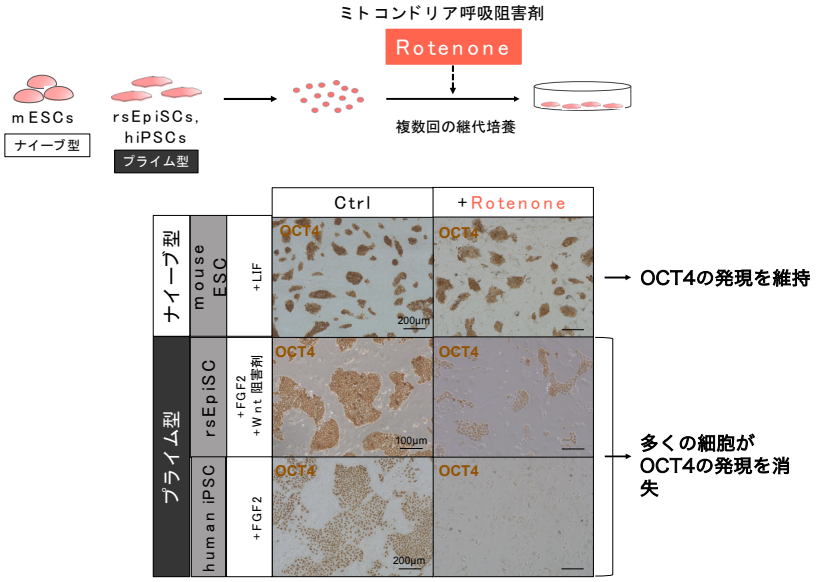


図 4. 電子伝達系阻害は種を超えてプライム型多能性幹細胞の未分化性を消失させる

ナイーブ型多能性幹細胞としてマウス ES 細胞、プライム型多能性幹細胞としてマウス rsEpiSC・ヒト iPS 細胞を用いた。電子伝達系複合体 I を阻害する Rotenone の添加条件下の中、複数回の継代培養の結果、ナイーブ型のマウス ES 細胞には増殖や未分化性の維持（OCT4 タンパクの発現）に影響は認められないが、プライム型においては著しい未分化マーカーの消失が認められた。

考　察

今回の結果から、これまで明らかにされていない「プライム型多能性細胞における、ミトコンドリア呼吸の電子伝達系の未分化性維持機構への関与」に対して、新たな知見を見出した。これまでの先行論文から、プライム型多能性幹細胞において、TCA 回路のα－ケトグルタル酸などの中間代謝産物が未分化性の維持において重要な役割を担っていることが示されているが、これまでに電子伝達系の関与というのは報告されていない。どのようなメカニズムで電子伝達系の働きが未分化性維持に関与しているかの詳細なメカニズムはこれからであるが、いずれにしても非常に新しい現象を見てるものと期待したい。

プライム型の代表例ヒト iPS 細胞において、電子伝達系の阻害による未分化性の消失、ひいては分化誘導の促進機構に迫ることで、将来的には目的の細胞系譜への分化誘導期間を大幅に短縮する技術の確立や、特定の細胞系譜への誘導促進技術への応用が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究にあたり多くの時間を割いて尽力頂いたのは、近畿大学農学部バイオサイエンス学科動物分子遺伝学研究室の田中法子である。

文 献

1) Zhou W、 Choi M、 Margineantu D、 Margaretha L、 Hesson J、 Cavanaugh C、 Blau CA、 Horwitz MS、 Hockenbery D、 Ware C、 Ruohola-Baker H. HIF1α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. EMBO J. 2012 May 2;31(9):2103-16. DOI: 10.1038/emboj.2012.71.

2) Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. Nature. 2007 Jul 12;448(7150):191-5.. DOI: 10.1038/nature05950

3) Wu J、 Okamura D、 Li M、 Suzuki K、 Luo C、 Ma L、 He Y、 Li Z、 Benner C、 Tamura I、 Krause MN、 Nery JR、 Du T、 Zhang Z、 Hishida T、 Takahashi Y、 Aizawa E、 Kim NY、 Lajara J、 Guillen P、 Campistol JM、 Esteban CR、 Ross PJ、 Saghatelian A、 Ren B、 Ecker JR、 Izpisua Belmonte JC. An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. Nature. 2015 May 21;521(7552):316-21. DOI: 10.1038/nature14413