

# 細胞系譜の二元性という幹細胞のシーソーモデル

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

岡村 大治

## 1. はじめに

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、もう一つ大きな違いとして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多い。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する「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たエネルギー産生を行なっていることが知られている。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。

## 2. 方法

近年、申請者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。本実験に際し申請者らは、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、電子伝達系の過程で複合体I, III, IVを阻害するRotenone（複合体I）・Antimycin（複合体III）・Oligomycin（複合体IV）を用い、一方でATP合成の場である複合体Vによる酸化的リン酸化の阻害剤としてFCCPを用いた。解糖系の阻害剤としては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。

## 3. 結果

このエピブラスト細胞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分かった（図1）。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1）。

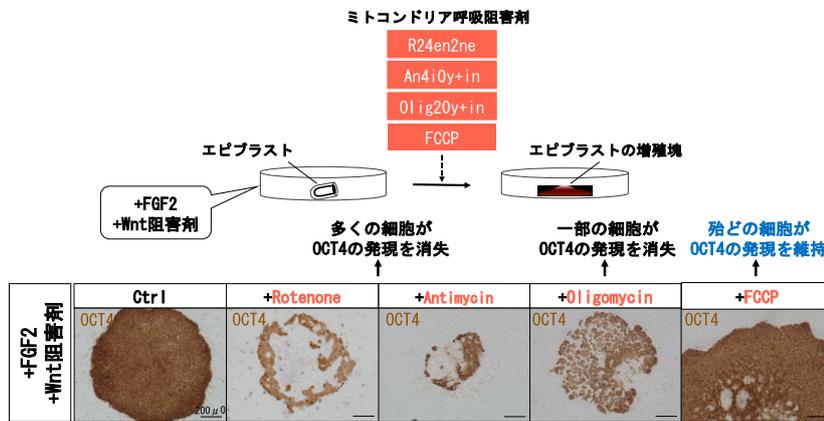


図1. 電子伝達系阻害によるエピプラスト細胞の未分化性の消失

着床後のマウスエピプ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、エピプ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。

上記エピプ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プ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、エピプ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2）。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、エピプ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分かった。

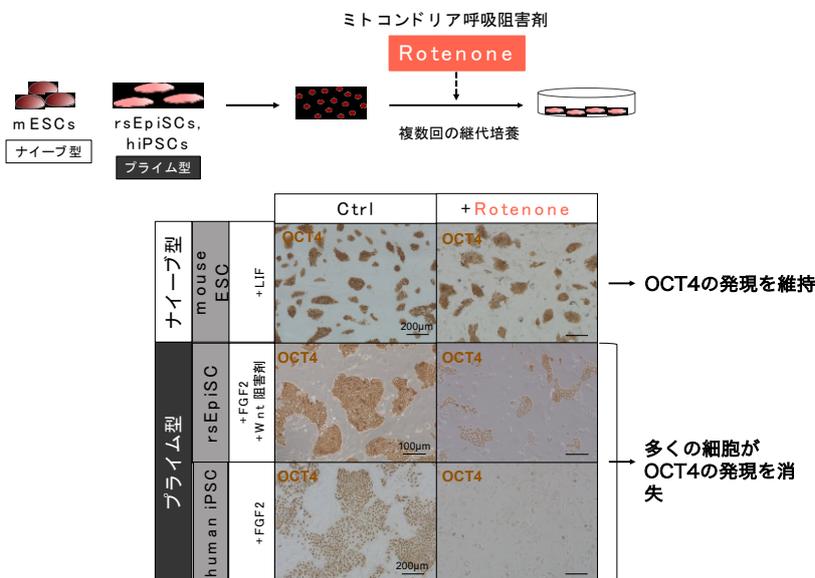


図2. 電子伝達系阻害は種を超えてプライム型多能性幹細胞の未分化性を消失させる

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。

#### 4. 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 $\alpha$ -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。

## 5. 助成開始からの発表論文

### 1) Efficient derivation of stable pluripotent bovine embryonic stem cells

Yanina Soledad Bogliotti, Jun Wu, Marcela Vilarino, Okamura D, Delia Soto, Masahiro Sakurai, Rafael Vilar Sampaio, Keiichiro Suzuki, …Juan Carlos Izpisua Belmonte, Pablo Juan Ross  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Feb 9; 115(9):2090-2095

### 2) CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs.

Wu J, Vilarino M, Suzuki K, Okamura D, Bogliotti YS, Park I, Rowe J, McNabb B, Ross PJ, Belmonte JCI.  
*Sci Rep.* 2017 Sep 5;7(1):10487.

### 3) Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells.

Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, Sugawara A, Gil MA, Yamauchi T, Suzuki K, Bogliotti YS, Cuello C, Morales Valencia M, Okamura D, Luo J, Izpisua Belmonte JC.  
*Cell.* 2017 Jan 26; 168(3):473-486