

## 平成28年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	TGF $\beta$ -activated kinase1(TAK1)抑制による iPS 細胞作成効率の改善と新規未分化維持培養系の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：近畿大学医学部附属病院 高度先端総合医療センター・再生医療部 助手 小野寺勇太	

### 1. 研究目的・内容

人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚性幹細胞(ES細胞)の幅広い応用を目指す上では、低率な樹立効率と長期培養下での不安定さが課題となる。本研究では、多能性幹細胞の未分化性を不安定化させる要素として細胞内ストレス応答のエフェクター分子である TGF $\beta$ -activated kinase1(TAK1)に注目した。TAK1は様々な細胞内シグナル伝達経路の中でも最も上流に位置する MAPKKK の1つであり、種を越えて幅広く保存されていることから、生物の発生、恒常性維持に極めて重要な機能を有していると考えられる。事実、TAK1のノックアウト(KO)マウスは胎生12.5日齢で致死となる(Sato S. et al. 2005.)。また細胞株を使った検討では、Stat3(Tyr705)の異所(Ser727)リン酸化を促進する(Ohkawara B. et al. 2004)こと、Wnt/ $\beta$ カテニン経路にある TCF/LEF の抑制(Ishitani T. et al. 1999)、Smadの核移行を制御するなど重要な知見が多く報告されている。さらに、TAK1はキナーゼでありながら核内でも機能するなど興味深い性質も明らかになってきている。

当初の計画を進める中で、TAK1が多能性幹細胞に特異的な分子経路を制御しているというよりは、幹細胞性の基本的機能に関わっている可能性を見出した。そこで本研究では、当初の目的である TAK1 と多能性の関わり の 解明 に 加 え、幹細胞の基本的機能である増殖、自己複製における TAK1 の役割を解明することを目的とした。特に後者については、骨髄間葉系幹細胞(MSC)を研究材料とすることで、あたらしい再生医療技術の開発につながると考えられる。MSCは分化多能性を有する組織幹細胞の一つであるが、継代を重ねる度に細胞増殖及び分化多能性能の低下が認められることから、培養系の改良が課題となっている。一方で自己複製に関わる分子経路が未解明である。

本研究では、TAK1がMSCの維持に中心的な役割を果たすと考え、分子機能の解明を目指した研究を実施する。

## 2. 研究経過及び成果

### 1. マウス ES 細胞における TAK1 の作用の検討

TAK1 は IL-1  $\beta$  r や TNF  $\alpha$  r、TGF  $\beta$  r といった様々なレセプターに対して間接的に結合しており、刺激が加わると直ちにリン酸化(活性化)され下流の因子へとシグナルが伝達される。そこで、今回は mES 細胞の分化誘導でも用いられる TGF  $\beta$  の添加により TAK1 の活性化を誘起し、未分化維持に関わる遺伝子発現の変化を検討した。

TGF  $\beta$  濃度依存的な TAK1 の活性化、未分化マーカー(Pou5f1、Sox2、Klf4、Nanog)の遺伝子発現が抑制、T や Tbx-6 といった分化マーカーの亢進が認められ、未分化性の低下にともなう細胞分化の促進が示唆された(Fig1-1)。

次に、5Z-7-oxozeaenol という TAK1 のリン酸化阻害剤を添加すると TAK1 の活性化抑制、未分化マーカーの亢進が確認された。TGF  $\beta$  添加によって抑制されていた未分化維持に重要な遺伝子、特に Nanog の遺伝子発現は回復していた(Fig1-2)。これにより、mES 細胞の未分化維持機構において、TGF  $\beta$  による TAK1 活性化の有無は細胞分化・未分化維持の ON/OFF に重要な役割を担っているものと示唆された。

また、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって TAK1 のノックアウト ES(TAK1KO-mES)細胞を作成し、ES 細胞としての特性評価を実施した (Fig1-3)。mES 細胞は様々な細胞へと分化可能な性質(多分化能性)を有することから、分化を促進するような環境下におくと様々な細胞へと分化しながら複雑な構造体(テラトーマ)を形成する。そこで、免疫不全マウスである BALB/c NUDE マウスの皮下に TAK1KO-mES 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^6$  細胞移植し、4 週間後に摘出しテラトーマの形成能を検討した。コントロールとして用いた mES 細胞においては in vivo で十分なサイズにエクスパンドしていた。一方、TAK1KO-mES 細胞を移植したマウスの皮下においては非常に小さなテラトーマの形成が認められたもの、またはテラトーマが全く形成されなかったものもあった(Fig1-4)。また、TAK1KO-mES 細胞のテラトーマ作出に限って移植のエンドポイントを延長したが結果は変わらなかった。この結果を受けて、TAK1 は mES 細胞が分化していく中で増殖に不可欠な存在であることが予想された。

Fig1-1

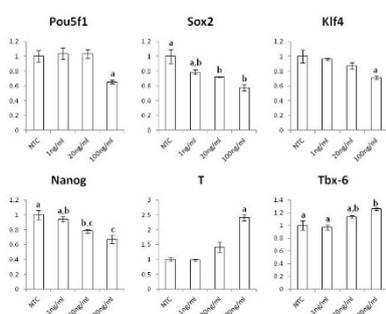


Fig1-2

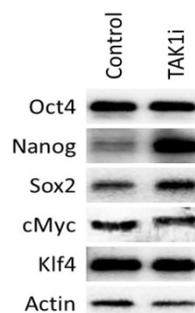


Fig1-3

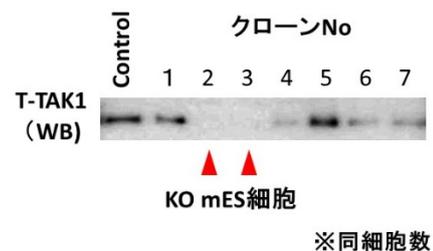


Fig1-4



## 2. 間葉系幹細胞(MSC)における TAK1 の機能の検討

初めに、MSC 株として用いられる KUSA-A1 において TGF $\beta$  シグナルの効果を検討した。TGF $\beta$  の濃度依存的に細胞増殖が亢進していくことが認められた(Fig2-1)。また、TGF $\beta$  添加区に TAK1 阻害剤、ALK 阻害剤、p38 / JNK / Erk 阻害剤をそれぞれ添加し、TGF $\beta$  による細胞増殖賦活化が TAK1 に依存していることを確認した (Fig2-2)。また、ヒト MSC においても同様の結果を得ることが出来た(Fig2-3)。

次に、実験①で CRISPR/Cas9 法を用いて作成した TAK1-KO ES 細胞からテラトーマを作成し、さらにテラトーマから MSC のみを FACS にて回収し TAK1-KO MSC の分化多能性への影響を検討した。MSC マーカーの発現は低下しており(未開示)、MSC 特有のコロニー形成能も著しく抑制されていることが確認された(Fig2-4)。

In vivo における TAK1 阻害効果検討実験として、マウス新生仔に TAK1 阻害剤を投与し、どのような効果が現れるか検討した。TAK1 阻害剤の投与効果の評価は体重をモニタリングすることで行い、薬剤投与は 1 週間継続し、8 日目から投与をせずモニタリングのみ継続した。結果、薬剤投与群では体重増加が著しく抑制されており阻害効果が顕著に現れた。また、投与を終えてから 20 日程度でコントロール群の体重と同程度にまで成長することが可能であった。これより、In vivo / vitro で TAK1 阻害は細胞増殖の抑制に対して効果があると考えられ、さらにはヒト MSC でも同様の効果が確認出来たことから、TAK1 の機能が種を越えて保存されたものであることが示唆された。

最後に、TAK1 の機能を検討した。蛍光免疫染色では、MSC における TAK1 の局在は細胞質と核の双方に認められ、阻害剤の添加により核内での発現が低下した。リン酸化 TAK1 が核内へと移動していることが確認された(未開示)。次に、スクリーニング及び既存のデータベースを活用したドメイン検索等から、TAK1 と相互作用するタンパク質の同定を行った。また、KUSA-A1 に pPB HAtag-TAK1 DA Vector を導入し、TAK1 DA 恒常性発現細胞株を作成、Co-IP を実施した。これより、幾つか IP-WB によって相互作用するタンパク質を同定することが出来た。その内の一つは、MSC マーカーとして用いられている PDGFR $\alpha$ 、また、細胞増殖に関連したコアクチベーターや転写因子も同定され表現型と合致する様な結果を得ることが出来た(Fig2-6)。さらに、同定されたコアクチベーターにおいては、TAK1 阻害剤の添加により核内での発現が認められず、TAK1-KO MSC への TAK1 DA Vector 導入によって核内での発現が確認出来るようになることも付きとめた(Fig2-7,8)。細胞質と核に分画した Co-IP サンプルにおいて SDS-PAGE 後に銀染色を行ったところ、複数の特異的なバンドが確認された(Fig2-9)。

Fig2-1

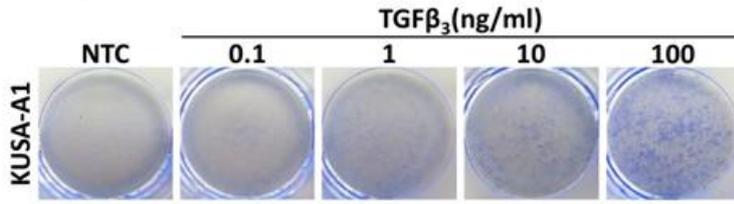


Fig2-3

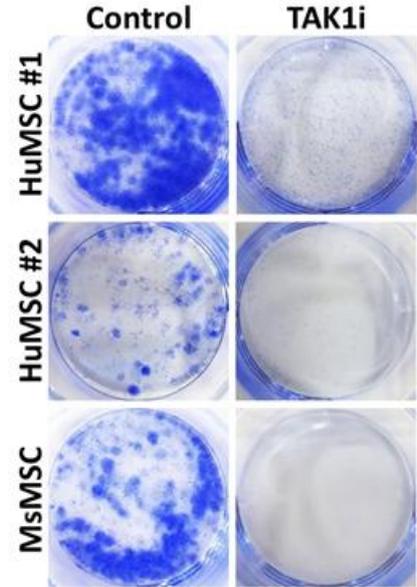


Fig2-2

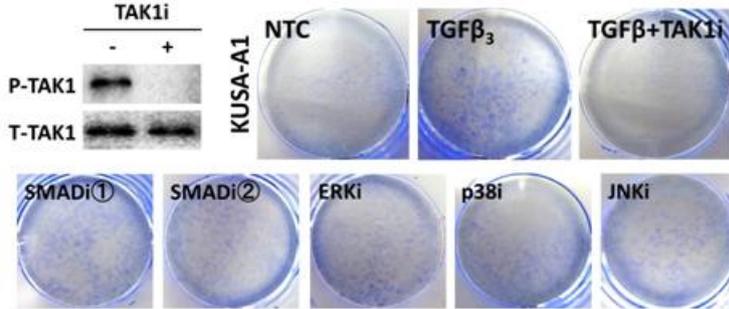


Fig2-4

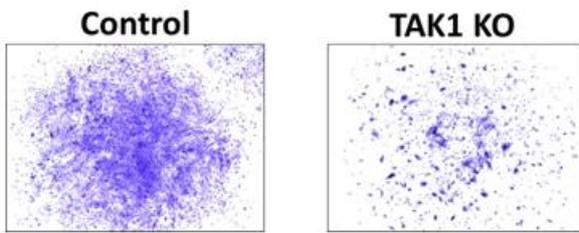


Fig2-5

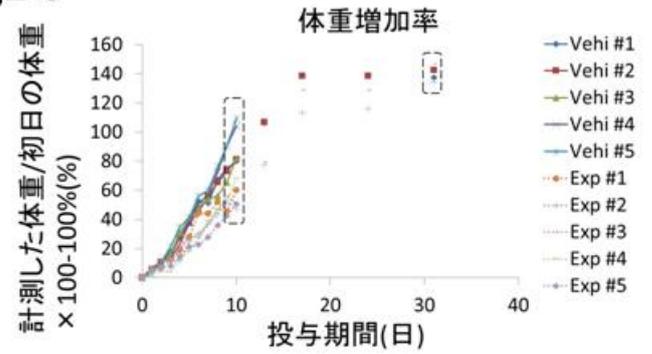


Fig2-6

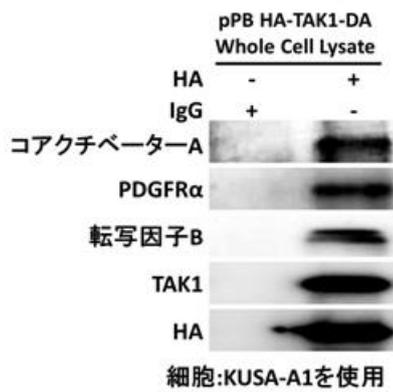


Fig2-8

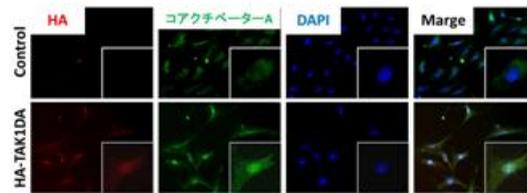
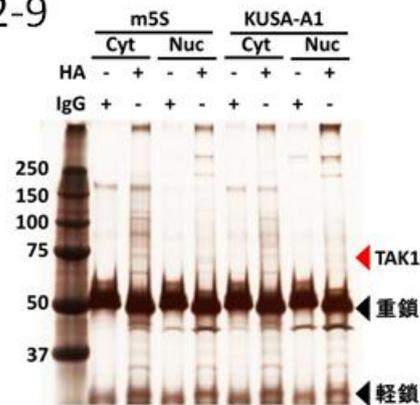


Fig2-7



Fig2-9



### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

炎症における代表的なキナーゼである TAK1 が幹細胞の増殖に寄与していることを示唆する新たな知見である。今後はプロテオミクスに造詣の深い研究者と共同研究として詳細な解析を行う予定であり、TAK1 の持つ幹細胞での機能を解き明かすことを目標としたい。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会	ポスター(優秀ポスター賞ノミネート)	2016/10/13~14
第 30 回日本軟骨代謝学会	口頭発表	2017/3/3~4