



配布先：文部科学記者会 科学記者会 熊本県内報道機関

2023年7月11日
国際医療福祉大学
熊本大学

NEWS RELEASE

多能性幹細胞に人工的に概日時計機構を作動させることに成功 ～1日のリズムを刻む（‘ticking’）iPS細胞の誘導～

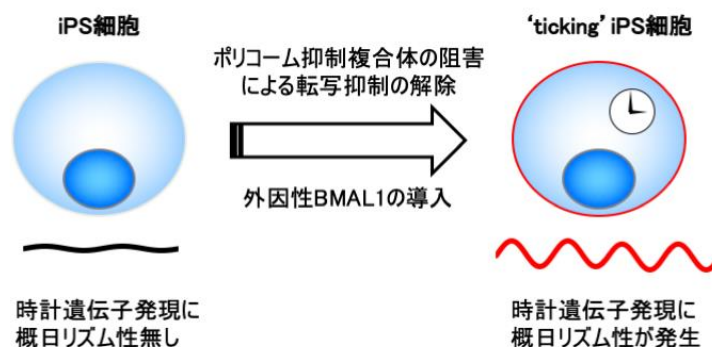
国際医療福祉大学福岡薬学部の貝塚拓講師、熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学講座の金子瞳研究員、富澤一仁教授らの研究グループは、時計遺伝子発現の概日リズム性を有するiPS細胞（人工多能性幹細胞）の誘導に成功しました。本研究は、多能性幹細胞において概日時計機構が抑制されるメカニズムとその必要性を示すものであり、今後はヒト発生初期の分子機構に関する研究やがん細胞の増殖抑制手法の開発に繋がる可能性があります。2023年7月8日（中央ヨーロッパ時間）にシュプリンガー・ネイチャー出版の学術誌 *Cellular and Molecular Life Sciences* のオンライン版に掲載されました。

（研究成果のポイント）

- ・多能性幹細胞は概日時計機構を有さないことで知られているが、ある低分子化合物の処理と時計遺伝子の導入により人工的に概日リズムを誘導することに成功した。
- ・時計機構が作動したiPS細胞（‘ticking’ iPS細胞）ではあらゆる体細胞になれる能力（多能性）は保持しているが、無限に分裂する能力（増殖能）が顕著に抑制されていた。
- ・本研究の成果は、多能性幹細胞が時計機構を有さないメカニズムとその必要性を説明するものであり、ヒト発生初期の時計出現機構を解明する上で重要な知見である。

（研究の概要）

植物、昆虫やヒトに至るまで、体を構成するほとんどの細胞は概日時計機構を有しており、24時間周期の生体機能を発揮しています。しかしながら多能性幹細胞*¹ではこの時計機構が未発達であることが分かっています。哺乳類において概日リズム*²は時計遺伝子の転写フィードバックループにより駆動していますが、iPS細胞では時計遺伝子の転写がポリコム抑制複合体*³により抑制されていること、その複合体の阻害剤と時計遺伝子 BMAL1 の細胞内導入の組み合わせで概日リズムが惹起されることを明らかにしました（図1）。一方でこの人工的な概日時計機構の誘導はiPS細胞の増殖能を著しく低下させることを発見しました。



【図1】ヒトiPS細胞でポリコム抑制複合体の阻害と時計遺伝子 BMAL1 の導入により概日リズムを誘導することに成功

(背景)

多能性幹細胞 (PSC) は無限に増殖する能力を有し、胚体外組織以外のあらゆる体細胞に分化できる特異な細胞である。しかしながら、PSC は多能性を有する一方で、体細胞が示す一部の性質を欠いている。その一つが概日リズムである。

生体を構成する個々の細胞は、時計遺伝子群の相互の発現誘導と抑制機構により細胞機能の概日リズム性を有している。時計の中枢は視床下部にある視交叉上核であり、光の刺激により同期し、末梢細胞の時計をコントロールしている。全身の細胞が 24 時間周期のリズムを刻むことで覚醒・休息、消化・吸収、体温調節、ホルモン分泌など 1 日の営みが正常に果たされている。

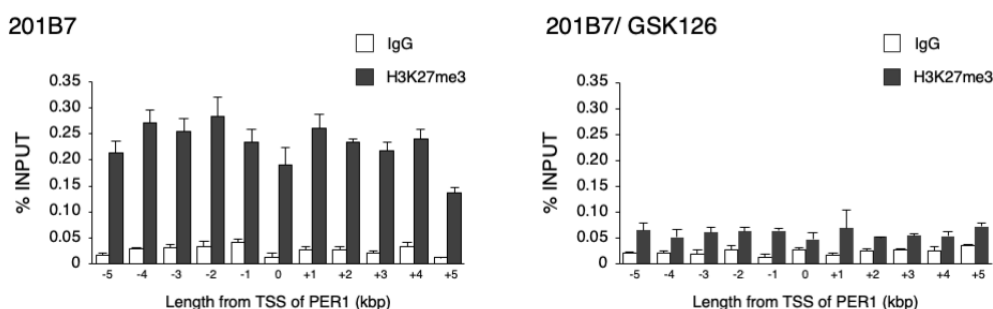
一方で上述の通り、体細胞の元となる胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) では概日時計機構が未発達であり、同調刺激^{*4}を与えても時計遺伝子の発現は 24 時間のリズム性を示さない。これらの細胞は各臓器や器官を形成する体細胞へと分化する過程で時計機構を獲得していく。しかしながら、ES 細胞や iPS 細胞において時計機構が作動しないメカニズムや、その必要性について十分に明らかでなかった。本研究ではヒト iPS 細胞を用いてその 2 点について調べた。

(研究手法)

多能性幹細胞で時計機構が作動しないメカニズムの一つとして、BMAL1、CLOCK、PERs、CRYs などの時計遺伝子の転写レベルが体細胞に比べて低いことが指摘されていた。一般的に、多能性幹細胞では未分化能を維持するために、分化に関連する遺伝子はポリコム抑制複合体 2 (PRC2) によるエピジェネティクス制御により発現阻害されている。そこで本研究では PRC2 の阻害剤を処理して時計遺伝子の転写抑制を解除する方法を試みた。さらに BMAL1 遺伝子を細胞内に導入し、人工的に概日リズムを発生させることで、ヒト iPS 細胞でどのような影響が生じるか解析した。

(結果)

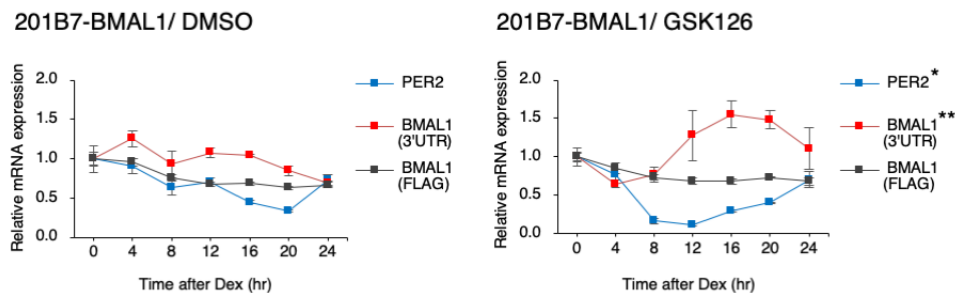
まず、ヒト iPS 細胞では主要な時計遺伝子である PER1 や BMAL1 の転写開始点付近で PRC2 の基質であるヒストン H3 リシン 27 (H3K27) が高頻度にメチル化されていることが初めてわかった。このヒストン修飾である H3K27 のメチル化はクロマチン構造を変化させ、遺伝子転写を抑制状態にする。次に PRC2 の阻害剤である GSK126 を処理したところ、その修飾が顕著に低下することを見出した (図 2)。また BMAL1 を導入したところ、CLOCK、PERs、CRYs の遺伝子発現が増加し、体細胞レベルまで回復した。さらに GSK126 と BMAL1 導入を組み合わせると、同調刺激に応答して PER2 や内因性 BMAL1 の発現に概日リズム性が出現した (図 3)。最後に、ヒト iPS 細胞における時計機構の発生が多能性や無限増殖能に如何に影響するか調べたところ、GSK126 と BMAL1 の処理は多能性に影響しなかったが、増殖能を顕著に抑制することがわかった (図 4)。



【図 2】ヒト iPS 細胞の PER1 遺伝子転写開始点近傍のヒストン H3 メチル化レベル
左のグラフ) 未処理の iPS 細胞 (201B7 株) からクロマチンを精製し、免疫沈降法により 27 番目のリシンがトリメチル化されたヒストン H3 と結合する DNA を単離した。リアルタイム

PCR 法により PER1 遺伝子転写開始点近傍の DNA 配列を定量したところ、コントロール (□ IgG) に対して顕著に高かった (■ H3K27me3)。

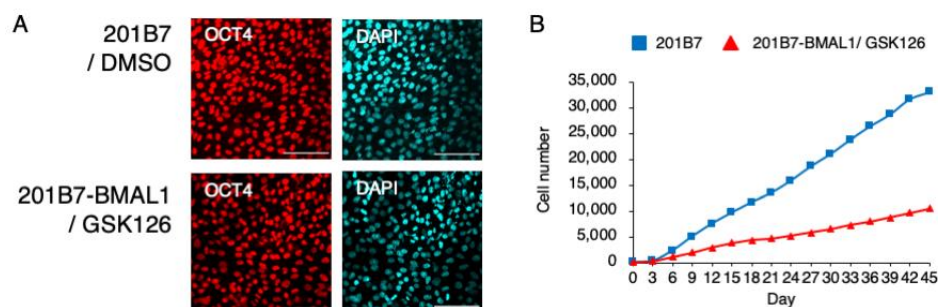
右のグラフ) PRC2 阻害剤である GSK126 を処理した細胞について、同様の実験を行ったところ、PER1 遺伝子転写開始点近傍の H3K27me3 レベルは著しく減少した。



【図 3】ヒト iPS 細胞の同調刺激による時計遺伝子発現リズムの同期

左のグラフ) GSK126 の溶媒である DMSO を処理した細胞にデキサメタゾン (Dex) による同調刺激を与え、時計遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR 法により解析した。PER2、内因性 BMAL1 (3'UTR)、外因性 BMAL1 (FLAG) のいずれも概日リズム性を示さなかった。

右のグラフ) PRC2 阻害剤である GSK126 を処理した細胞について、同様の実験を行ったところ、PER2、BMAL1 (3'UTR) の発現に有意なリズム性が認められた。



【図 4】ヒト iPS 細胞の多能性と増殖能

A) DMSO を処理した細胞と BMAL1 の導入に加え GSK126 処理した細胞について、免疫染色法により多能性マーカーである OCT4 のタンパク質レベルを解析した。どちらの細胞も同等レベルの OCT4 を発現していた。

B) BMAL1 の導入に加え GSK126 処理した細胞について、細胞の増殖性を 45 日間解析した。未処理の細胞 (201B7) に比べて増殖性が顕著に抑制されていた。

(考察と展望)

ヒト iPS 細胞では PRC2 による時計遺伝子のエピジェネティクス制御が概日リズムの発生を抑えていることが示唆された。一方で、PRC2 の阻害のみでは有意なリズムが観察されないため、BMAL1 の細胞内導入のようなスイッチが必要であると考えられた。

また時計機構が作動しない必要性について、概日リズムが発生したヒト iPS 細胞では増殖能が低下することから、その発生を抑えることが無限増殖能の獲得に重要である可能性が示された。ヒト発生においても受精卵の急速な分割を可能とするために、敢えて時計機構を未獲得としたまま増殖性の獲得に集中する必要があったと推測できる。

本研究は、ヒト iPS 細胞の生理機構の一端を示すとともに、ヒト発生における概日時計機構の OFF/ON スwitch の重要性を示す報告である。さらに多能性幹細胞と同様に無限増殖能を有する一部のがん細胞では概日時計機構の破綻が生じており、本研究を応用した戦略でそれらのがん細胞の増殖を抑制する薬剤の開発に繋がる可能性がある。

(論文発表の概要)

研究論文名 : Artificial induction of circadian rhythm by combining exogenous BMAL1 expression and polycomb repressive complex 2 inhibition in human induced pluripotent stem cells (ヒト iPS 細胞における外因性 BMAL1 の発現とポリコム抑制複合体 2 の阻害による概日リズムの人工的誘導)

著者、所属 : Hitomi Kaneko¹, Taku Kaitsuka^{2*}, and Kazuhito Tomizawa^{1*} (金子瞳¹、貝塚拓²、富澤一仁¹; ¹熊本大学大学院生命科学研究部 分子生理学講座、²国際医療福祉大学 福岡薬学部 薬学科)

公開雑誌 : *Cellular and Molecular Life Sciences*

Doi 10.1007/s00018-023-04847-z

URL <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-023-04847-z>

(謝辞)

本研究成果は、文部科学省科学研究費助成事業、国立研究開発法人科学技術振興機構研究成果展開事業の支援を受けて実施したものです。

【用語説明】

* 1 多能性幹細胞 : 胚体外組織以外のあらゆる体細胞に分化できる細胞。受精 4 日目の胚盤胞から樹立された ES 細胞や山中 4 因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) により人工的に誘導した iPS 細胞がこれにあたる。多能性幹細胞は多能性の他に無限増殖能を有する。

* 2 概日リズム : おおよそ一日周期のリズムのこと。細胞内で時計遺伝子発現が概日リズムを示すことで生体の様々な生理現象に概日リズム性が現れる。

* 3 ポリコム抑制複合体 : DNA の高次構造を形成するヒストンタンパク質を修飾するタンパク質複合体である。ヒストン H3 の 27 番目のリシンをメチル化することで DNA の高次構造を変化させ遺伝子転写を抑制する。多能性幹細胞で活性が高く、分化に関わる遺伝子発現を抑制することで多能性を保持する役割を有する。

* 4 同調刺激 : 個々の細胞のリズムを同調する刺激のこと。生体では光が同調刺激であり、細胞では副腎皮質ホルモンであるデキサメタゾンなどがある。

■ 研究に関するお問い合わせ先 ■

国際医療福祉大学 福岡薬学部

貝塚 拓

TEL: 0944-89-2000

E-mail: kaitsuka@iuhw.ac.jp

熊本大学大学院生命科学研究部 分子生理学講座

富澤 一仁

TEL: 096-373-5051

E-mail: tomikt@kumamoto-u.ac.jp

■ 報道に関するお問い合わせ先 ■

国際医療福祉大学 東京事務所 広報部

TEL: 03-5574-3828

E-mail: press@iuhw.ac.jp

熊本大学 総務部総務課 広報戦略室

TEL: 096-342-3269

E-mail: sos-koho@jim.kumamoto-u.ac.jp