



報道機関 各位

熊本大学

**ヒト ES/iPS 細胞の未分化能維持と分化
におけるメチオニン代謝の役割を解明
～ヒト ES/iPS 細胞の高効率かつ安全な分化細胞の作成へ期待～
ヒト ES/iPS 細胞を利用した創薬研究および再生医療に寄与**

熊本大学の白木伸明助教、桑 昭苑教授らは、ヒト ES 細胞^{注1)}および iPS 細胞^{注2)}の未分化能維持と分化において、これまで明らかにされていなかったヒト ES/iPS 細胞におけるアミノ酸代謝の役割について着目し、メチオニン^{注3)}という必須アミノ酸の一つが無い環境で長時間培養した場合、細胞が死滅することを発見しました。また、このことを応用し、未分化状態において培養中にメチオニンが無い環境を数時間与えた後に内胚葉・中胚葉・外胚葉へそれぞれ分化誘導すると、顕著な分化促進効果が現れることを確認しました。さらに、内胚葉への分化過程においてメチオニンを除去した培養液で培養することにより、残存する未分化細胞のみを死滅させることができ、その後の肝臓分化を効率的に行うことに成功しました。

本研究により、ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持および分化においてメチオニン代謝が重要な役割を担っていることが明らかになりました。さらに、ヒト ES/iPS 細胞の分化誘導においてメチオニン除去培養液を未分化維持過程で利用することにより、3胚葉(内胚葉・中胚葉・外胚葉)への分化促進効果が得られました。また、分化過程で利用することにより分化細胞の中に混ざった未分化細胞の除去が可能となりました。

本研究は、2014 年 4 月 17 日 12:00(米国時間)【情報解禁(日本時間)2014 年 4 月 18 日(金)午前 1 時】に米国科学雑誌『Cell Metabolism』オンライン版に発表されます。

今回の方法が3胚葉への分化促進に使えることは、今後すべての組織への分化に応用できることを意味します。今回開発した方法はメチオニンを除去した培養液を利用するという簡便な方法であり、これまで開発されてきた既存の分化誘導方法と併用することで、より効率的に目的の細胞を作製することが可能になると期待できます。

メチオニン除去培養液による処理による各胚葉への分化促進については、各種細胞を作成する期間の短縮および分化の効率化につながり、ヒト ES/iPS 細胞を利用した創薬研究および再生医療に寄与できます。また、残存未分化幹細胞は腫瘍化の原因にもなるため、この残存未分化幹細胞を除去することは、移植医療において腫瘍が発生するリスクの低減に大きく寄与できると期待できます。

ヒト ES/iPS 細胞におけるメチオニン代謝特性については、本研究により世界で初めて明らかになりました。今後はヒト ES/iPS 細胞におけるメチオニン代謝と遺伝子発現制御との関係性の解明が課題です。

<本研究のポイント>

- 多能性幹細胞である ES/iPS 細胞の代謝プログラムを詳細に理解することにより、細胞に与える栄養因子を操作することによって、目的の細胞の効率的な分化誘導が可能になると考えられる。
- 今回の研究で、ヒト ES/iPS 細胞の生存にはメチオニンが必須であること、そして、その代謝物である S アデノシルメチオニン^{注4)}を介して、ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持および分化を制御することを明らかにした。
- メチオニンが除去されると、S アデノシルメチオニンの細胞内の量が急激に減少し、それに応答して、刺激に対して分化しやすい状態になる。
- メチオニン除去培養液^{注5)}で短時間培養した後に、ヒト ES/iPS 細胞は内胚葉(将来、肝臓・膵臓などになる)・中胚葉(将来、筋肉・血液などになる)・外胚葉(将来、神経・皮膚などになる)へ分化しやすい状態にあるため、分化誘導因子を加えると、より高い分化効率を得られた。
- 未分化細胞は内胚葉細胞と比較して、生存により多くのメチオニンが必要である。
- このことを利用して、内胚葉への分化過程において、メチオニン除去培養液で 2 日間培養することにより、(内胚葉に影響を与えずに)残存する未分化細胞へ特異的に細胞死を誘導して、その後の肝臓分化を効率化できる。
- メチオニン除去培養液を利用する、という安全性の高い方法により分化誘導期間の短縮、腫瘍化の原因である残存未分化幹細胞の除去が可能となり、ヒト多能性幹細胞を利用した創薬研究および再生医療に寄与できる。

<要旨>

熊本大学の白木伸明助教、桑 昭苑教授らは、メチオニン代謝がヒト ES 細胞および iPS 細胞の未分化維持および分化を制御していることを明らかにし、メチオニンを除去した培養液を利用した分化促進および未分化細胞の選択的除去に世界で初めて成功しました。

アミノ酸代謝と幹細胞との関係については 2009 年に、マウス ES/iPS 細胞の生存にはアミノ酸の一種であるスレオニンが必須であることが報告されていましたが、ヒト多能性幹細胞におけるアミノ酸代謝の役割は不明でした。

今回の研究では、ヒト ES/iPS 細胞の生存にはマウスの場合とは異なるアミノ酸であるメチオニンが必須であることを見出し、その代謝物である S アデノシルメチオニンを介してヒト ES/iPS 細胞の未分化維持および分化を制御することを見出しました。さらに、未分化細胞は分化した内胚葉細胞(将来、肝臓・膵臓・腸などになる)と比較して、生存により多くのメチオニンが必要であることも見出しました。

未分化なヒト ES/iPS 細胞をメチオニン除去培養液で培養すると、細胞内の S アデノシルメチオニン濃度が顕著に低下し、それに伴い p53^{注6)}の発現上昇、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化^{注7)}の低下、未分化マーカーである Nanog^{注8)}の発現低下が起こりました。つづいて、ヒト ES/iPS 細胞がもつ代謝特性の分化誘導へ応用を試みた結果、未分化過程においてメチオニン除去後に内胚葉・中胚葉・外胚葉へそれぞれ分化誘導すると顕著な分化促進効果を確認しました。さらに、内胚葉への分化誘導過程においてメチオニン除去培養液で培養することにより、

残存する未分化細胞特異的に細胞死を誘導することができ、その後の肝臓分化を効率的に行うことに成功しました。

本研究により、これまで不明であったヒト ES/iPS 細胞におけるメチオニン代謝の役割を明らかにすることができました。さらに未分化細胞の高いメチオニン代謝特性を利用し、メチオニン除去培養液を未分化維持過程、および内胚葉分化過程で利用するという2つの新たな分化誘導方法を構築しました。これらの結果は幹細胞におけるアミノ酸代謝の新たな知見をもたらすとともに、ヒト ES/iPS 細胞を利用した創薬研究および再生医療に寄与できると考えられます。

本研究は、下記機関により資金的支援を受け実施されました。

独立行政法人日本学術振興会 「最先端・次世代研究開発支援プログラム」

独立行政法人医薬基盤研究所 「保健医療分野における基礎研究推進事業研究プロジェクト」

<論文名>

“Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells” (メチオニン代謝はヒト多能性幹細胞の未分化維持および分化を制御する)

<著者名>

白木伸明、白木恭子、津山友徳、遠藤文夫、桑昭苑(熊本大学)

小幡史明、三浦正幸、永江玄太、油谷浩幸(東京大学)

桑和彦(熊本大学/名古屋市立大学)

<研究の背景と経緯>

ES/iPS 細胞はどんな細胞にでも分化する万能細胞として知られており、難病の原因究明、治療法の開発を目指した疾患研究、医薬品の安全性試験などへの利用、細胞製剤の開発などの創薬研究、神経や血液、組織や臓器の機能の修復や再生を目指した再生医療への応用が期待されています。熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野(桑 昭苑教授)では、これまでに ES/iPS 細胞を用いて内胚葉の発生・分化メカニズムの解明を行ってきました。その過程で細胞外マトリックスや低分子化合物の利用により、細胞外環境を変化させることにより ES/iPS 細胞から肝臓・膵臓・小腸細胞を選択的に分化誘導することに成功しています。ES/iPS 細胞といった多能性幹細胞では、分化細胞とは異なる代謝プログラムを保持していることがわかっています。その代謝プログラムが幹細胞の未分化維持や自己複製能などに関与することが明らかになってきています。そこで、ES/iPS 細胞の代謝特性を利用した分化誘導方法の構築ができないかと考え、培養液に含まれるアミノ酸の代謝に着目しました。培養液には10種類以上の様々なアミノ酸が含まれていますが、それぞれの分化誘導に適した組み合わせ・濃度について検討があまり進んでいませんでした。そこで、まずヒト ES/iPS 細胞の未分化状態におけるアミノ酸代謝について検討することとしました。

ES/iPS 細胞のアミノ酸代謝と幹細胞との関係については 2009 年に、マウス ES 細胞の生存にはアミノ酸の一種であるスレオニンが必須であることが明らかにされており、未分化なマウス ES 細胞ではスレオニンからグリシンとアセチル CoA を合成する際の律速酵素であるスレオニン脱水

素酵素が高発現していることがわかっていました。また、2013年にはスレオニンから複数のステップを経て合成されるSアデノシルメチオニンがマウスES/iPS細胞のエピゲノムの状態を維持するために重要であることも報告されました。しかし、ヒトES/iPS細胞においては上記のスレオニン脱水素酵素は発現していないことがわかっており、ヒトES/iPS細胞におけるアミノ酸代謝の役割は不明でした。

<研究の内容>

本研究では、まずアミノ酸を除去した培養液を作成してヒトES/iPS細胞におけるアミノ酸代謝の役割を調べました。検討の結果、ヒトES/iPS細胞の生育には必須アミノ酸の一つであるメチオニンが重要であることを見出しました。メチオニン除去培養液で培養した場合、メチオニン代謝物であるSアデノシルメチオニン(SAM)の細胞内濃度が顕著に低下することがわかり、メチオニン除去後における細胞死はSAMの添加により抑制されることがわかりました。さらに、SAMの低下に伴いp53の発現上昇、ヒストンH3の4番目のリジン残基のトリメチル化の低下、未分化マーカーであるNanogの発現低下が起きました。これらの現象が未分化性を維持できなくなる理由と考えられ、2日間このような状況に晒されたヒトES/iPS細胞は死滅してしまいます。

つづいて、ヒトES/iPS細胞の代謝特性を分化誘導へ応用することを試みました。まずは、未分化状態における10時間のメチオニン除去後に内胚葉・中胚葉・外胚葉へそれぞれ分化誘導すると顕著な分化促進効果を確認しました。さらに、内胚葉への分化過程においてメチオニン除去培養液で培養することにより残存する未分化細胞特異的に細胞死を誘導することができ、その後の肝臓分化を効率的に行うことに成功しました。

<参考図>

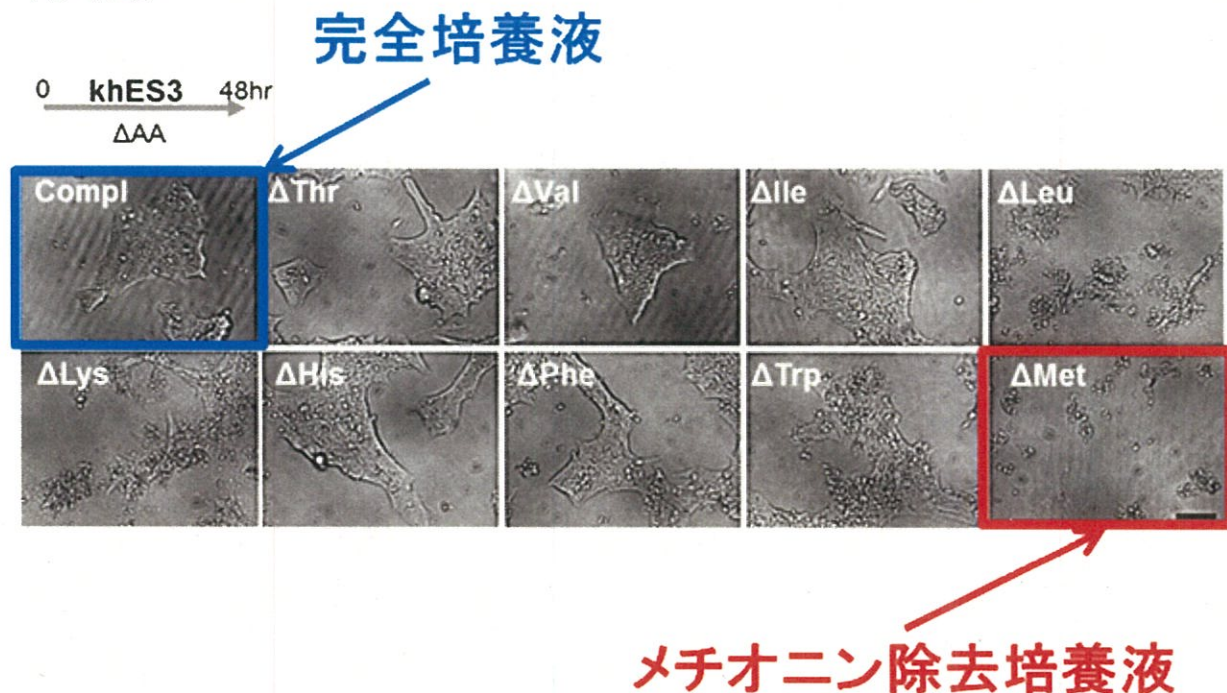


図1: 未分化ヒトES細胞における各種アミノ酸除去の効果

ヒトES細胞(khES3)を各種アミノ酸除去培養液で2日間培養した結果、メチオニンを除去した未分化維持培養液(ΔMet)で培養すると、細胞死が起こる。

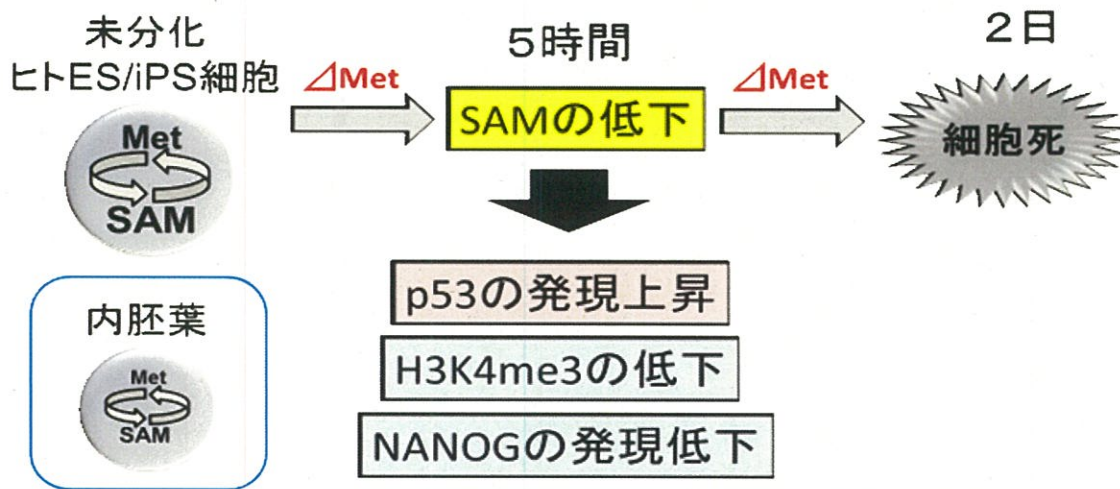


図 2:ヒト ES/iPS 細胞におけるメチオニン除去の影響

ヒト ES/iPS 細胞では、未分化状態では内胚葉に比べて高いメチオニン代謝特性を持ち、培養液からの短時間のメチオニン除去 (Δ Met) により細胞内 S アデノシルメチオニン (SAM) 濃度の低下、細胞内の P53 活性化、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K4me3) 低下、NANOG 発現低下が起きる。さらに長時間のメチオニン除去により、細胞死が誘導される。

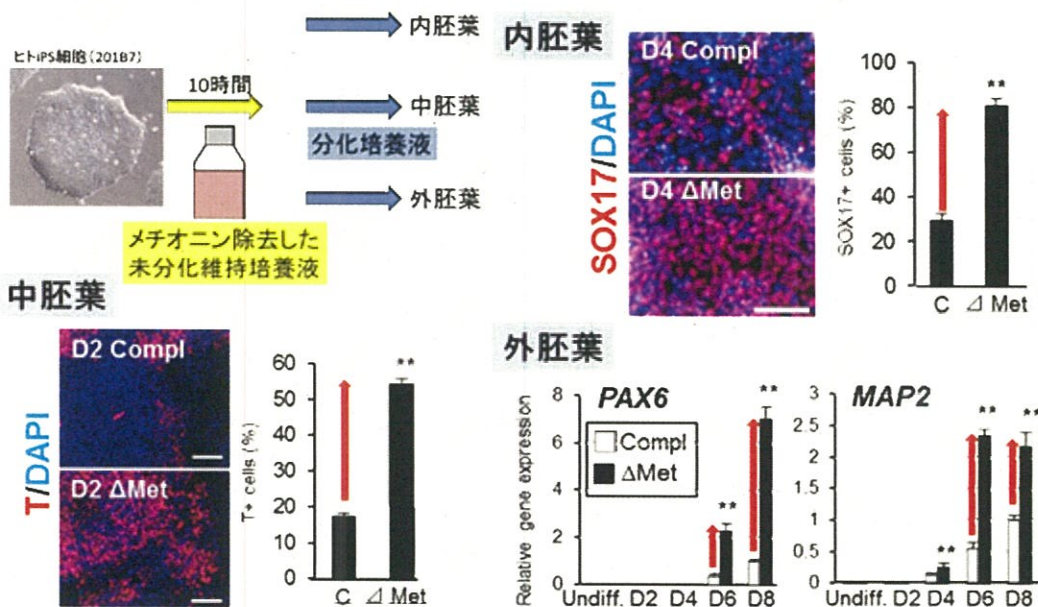


図 3:未分化維持過程における短時間メチオニン除去により分化促進効果が得られる。

ヒト iPS 細胞株(201B7)を用いて、未分化維持過程における 10 時間のメチオニン除去後に内胚葉 (SOX 17 陽性) ・中胚葉 (T 陽性) ・外胚葉 (PAX6, MAP2 陽性) へそれぞれ分化誘導すると、分化促進が起こる。

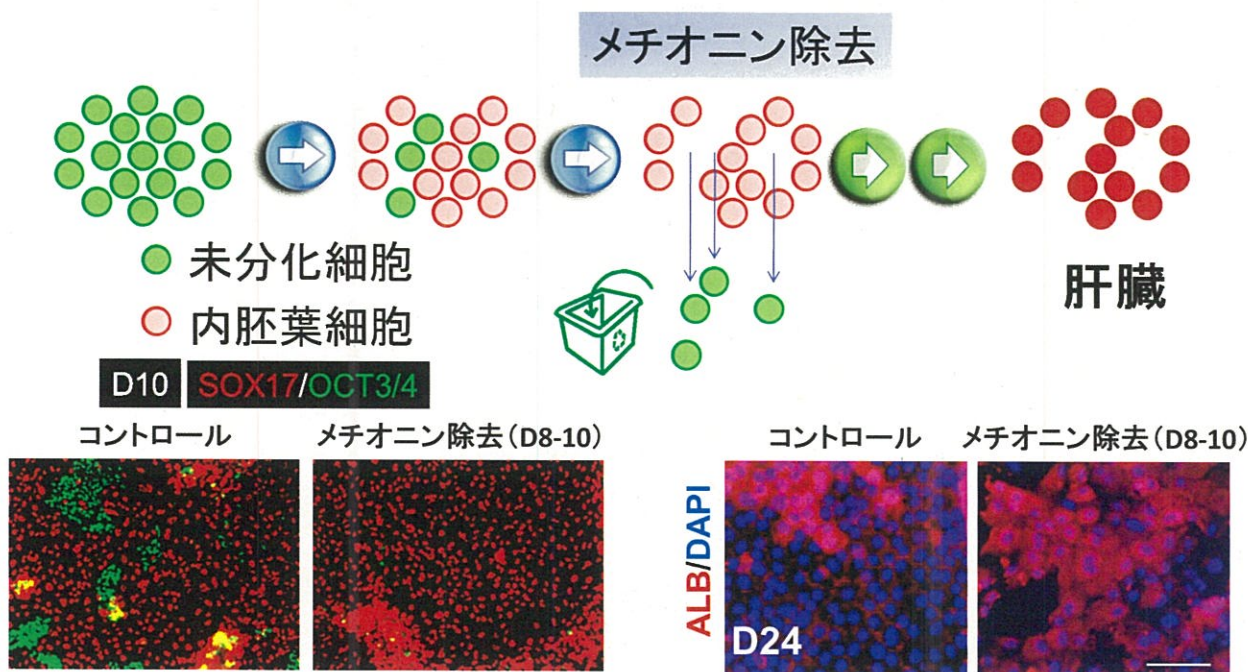


図 4:分化過程におけるメチオニン除去 (Δ Met) により未分化細胞の除去が可能となり、その後の効率的な肝臓分化に成功。OCT3/4:未分化細胞マーカー、SOX17:内胚葉マーカー、ALB (アルブミン) 肝臓マーカー

<用語解説>

注1) ES 細胞

Embryonic stem cell、胚性幹細胞。さまざまな異なる細胞に分化し、増殖する能力を持つ、発生初期の胚由来の細胞。受精卵の一段階である胚盤胞から取り出した内部細胞塊から樹立される。ES 細胞の採取は受精卵を殺すことになるので倫理面的問題があります。

注2) iPS 細胞

Induced pluripotent stem cell、人工多能性幹細胞。ES 細胞と同様に増殖して各種の細胞へと分化することが可能な細胞。平成 18 年(2006)、京都大学の山中教授らがマウスの体細胞に初期化因子とよばれる数種類の遺伝子を導入することで、初めて作製に成功。皮膚細胞などから作り出すことができるために倫理的問題がありません。また、自分の体細胞から臓器などを作れば拒絶反応を回避できるため、再生医療への応用が期待されています。

注3) メチオニン

メチオニンは人の体内で作り出せない必須アミノ酸の一つで側鎖に硫黄を含んだアミノ酸。システイン、カルニチン、タウリンの生合成や、リン脂質の生成に関与する。タンパク質翻訳の開始に必要なアミノ酸です。

注4) S-アデノシルメチオニン(SAM)

メチオニンから生体内で合成される物質で、活性メチオニンとも呼ばれています。核酸や蛋白のメチル化など、各種のメチル化反応に必要な化合物です。

注5) メチオニン除去培地

ヒトES/iPS細胞の未分化維持および分化誘導には培養には、それぞれ専用培養液を用います。通常は、どちらの培養液にもメチオニンが含まれていますが、今回の研究ではメチオニンの役割を調べるために、それぞれの培養液からメチオニンを除去した培地を特別に作成して実験に使用しました。

注6) p53

細胞の恒常性の維持やアポトーシス誘導といった重要な役割を持つ転写因子。p53はDNAの損傷に応答して、誘導され、その活性化により増殖停止や細胞死が起こります。

注7) NANOG

ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞に特異的に発現している転写因子。多能性と自己複製維持に関与する。

注8) ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K4me3)

ヒストンは、長い DNA 分子を折り畳んで核内に収納する役割をもつ。ヒストンはメチル化、アセチル化、リン酸化などの化学修飾をうけ、これらの化学修飾は遺伝子発現を制御していることがわかっている。なかでも、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化は、転写が活性化している遺伝子に見られる。

【お問い合わせ先】

白木 伸明 (シラキノブアキ) 熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野 助教
桑 昭苑 (クメ ショウエン) 熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野 教授
〒860-0811 熊本県熊本市本荘 2-2-1 発生医学研究所 2 階
Tel: 096-373-6806, Fax: 096-373-6807
E-mail: (白木) shiraki@kumamoto-u.ac.jp (桑) skume@kumamoto-u.ac.jp