

Title	miR-27b inhibits hepatic differentiation via antagonizing BMP signaling in early differentiation of human induced pluripotent stem cells.
Author(s)	Lim, Jaeun
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/87985
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (LIM JAEUN)	
論文題名	miR-27b inhibits hepatic differentiation via antagonizing BMP signaling in early differentiation of human induced pluripotent stem cells. (miR-27bはヒトiPS細胞の初期分化におけるBMPシグナルと拮抗することにより肝分化を抑制する)
論文内容の要旨	
<p>ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞は、<i>in vitro</i>においてヒトの胚発生を模倣し分化することから、胚発生の生物学的メカニズムの解明のための有用な研究ツールの一つである。脊椎動物の初期発生では、胚盤葉上層 (epiblast) に原始線条 (primitive streak) が形成され原腸陥入が始まり、三胚葉へ分化する。この発生段階はNODAL、Wnt、BMP等の様々な細胞内シグナルによる制御を受けるため、ヒト胚性幹 (ES) 細胞及びヒトiPS細胞からの分化誘導は、外部から低分子化合物などを添加し、このような細胞内のシグナル変動を再現する形で行われる。</p> <p>マイクロRNA (miRNA) は、約20塩基からなる短い一本鎖RNAであり、メッセンジャーRNA (mRNA) の3'UTR領域の相補配列を認識することで、転写後の遺伝子発現を制御する。miRNAは、細胞環境に応じて発現量が変わり、細胞の種類や分化段階において異なる発現パターンを示す。例えば、受精と発生の進行に伴い、miRNAの発現プロファイルは大きく変動することが知られている。また、ヒトES/iPS細胞の自己複製能及び多分化能の維持に寄与するmiRNAの存在が報告されており、幹細胞分化の制御にあたり重要な役割を果たすことが示されている。従って、ヒトiPS細胞分化におけるmiRNAの機能解析は、ヒトの発生を制御する細胞の分子メカニズムを理解する上で重要である。</p> <p>miR-27bは、脊椎動物間でその配列が広く保存されたmiRNAの一つであり、TGFβ、BMPなどの細胞内シグナルに関わる複数の遺伝子を標的としており、肝分化における機能が示唆される。実際に、内胚葉から肝細胞への分化過程で発現量が急激に上昇することや、miR-27bを含むmiR-23b~27b²⁴ clusterの発現がTGFβスーパーファミリーのシグナル伝達分子SMAD3/4/5を抑えることにより肝幹前駆細胞から肝細胞への分化を促すことが報告されており、miR-27bによる肝分化制御が示された。一方、内胚葉に至る前の分化過程については、マウス接合子の割分に伴いmiR-27bの発現量が激減することから、miR-27bの発現抑制が初期発生に重要であることが示唆されているが、その詳細については明らかではない。</p> <p>そこで、本研究では、ヒトiPS細胞の内胚葉分化培養系を用いることによりmiR-27bが初期分化に与える影響を明らかとすることを目的とした。そのため、まず、miR-27bの発現を制御できるヒトiPS細胞の樹立を試みた。Tet-on systemにより制御されるmiR-27b発現カセットを、CRISPR/Cas9を用いた相同組換えにより、外来遺伝子の安定的発現が期待されるAAVS1遺伝子座へ挿入した。その結果、Doxycycline (dox) 添加によりmiR-27bの発現が誘導されるヒトiPS細胞株 (hiPS-AAVS1-27b) の樹立に成功した。</p> <p>樹立されたhiPS-AAVS1-27bを用いて、まず、miR-27bがヒトiPS細胞の未分化状態に与える影響について検討した。未分化状態のヒトiPS細胞の培地にdoxを加えmiR-27bの発現を誘導すると、幹細胞マーカーであるアルカリホスファターゼ (Alkaline Phosphatase, AP) の活性が低下し、免疫染色の結果、同じく幹細胞マーカーであるNANOGの発現が低下することが明らかになった。また、iPS細胞の未分化性を示す特徴である細胞増殖性について検討したところ、細胞増殖マーカー (Ki-67) の発現抑制が免疫染色により観察され、細胞増殖の低下がWST-8 assayにより認められた。このことから、miR-27bがヒトiPS細胞の未分化性を阻害することが明らかになった。</p> <p>次に、内胚葉分化におけるmiR-27bの影響を検討した。4日間の内胚葉分化過程においてiPS細胞は中胚葉 (mesoderm) /内胚葉 (endoderm) いずれにも分化が可能な中内胚葉 (mesendoderm) (2日目) を経て内胚葉に分化する。この分化過程でmiR-27bの発現を誘導すると、中内胚葉マーカー (Brachyury, MIXL1, EOMES) の発現減少が認められた。特に、中内胚葉から中胚葉に渡って高発現するBrachyuryの発現が強く抑制されたことから、中内胚葉/中胚葉分化が阻害されていることが考えられた。そこで、中内胚葉/中胚葉分化に必須であることが知られるBMPシグナルについて検討を行った。BMPシグナルは、TGFβスーパーファミリーに属する細胞内シグナル経路の一種であり、<i>in vivo</i>と<i>in vitro</i>において中内胚葉及び中胚葉への分化に寄与することが知られている。例えば、ヒトES細胞の<i>in vitro</i>分化系において、BMP4の添加が中内胚葉/中胚葉形成を誘導することや、BMPの2型レセプター (BMPR2) がノックアウトされたマウス胚では中胚葉が形成されないなど、中胚葉分化におけるBMPシグナルの重要性は以前から報告されている。そこで、BMP</p>	

シグナルの下流分子であるSMAD1/5のリン酸化状態をWestern Blottingにより解析した結果、miR-27bの発現が中内胚葉におけるSMAD1/5のリン酸化を抑制することが明らかになった。

発生において、BMPシグナルの一時的なシグナル増強は、原始線条の形成に寄与することが報告されている。そこで、分化開始から中内胚葉分化過程にわたってリン酸化SMAD1/5の発現変動を解析した結果、miR-27bの発現によるSMAD1/5のリン酸化状態の持続的な抑制が認められた。特に、分化開始36時間後に現れるBMPシグナルの急激な活性化が抑えられたことから、分化に必要なシグナルの活性化が阻害されたことが示唆された。また、BMPシグナルによる直接的な転写制御を受ける遺伝子（ID1、ID3）の遺伝子発現を解析した結果、miR-27bの発現による有意な低下が見られた。更に、中内胚葉から内胚葉分化過程でBMP4を添加すると誘導される中内胚葉関連遺伝子（EOMES、GSC、Brachyury、LHX1、MIXL1）の発現が、miR-27bの発現により抑制された。このことから、miR-27bがBMPシグナルに対して拮抗的に働くことが明らかになった。

次に、BMPシグナルに関わるmiR-27bの標的遺伝子の探索を行った。miRNAの標的探索ツールTargetScanHuman7.2及びパスウェイ探索ツールDAVIDを用いて選出された遺伝子群に対してReporter assayを行った結果、BMPシグナル制御に関わる3つの遺伝子（SMAD5、SMAD9、BMP2）をmiR-27bの標的として同定した。残念ながら、iPS細胞から分化誘導した中内胚葉ではmiR-27bを発現させてもこれらの遺伝子の発現低下は認められなかった。これは、miR-27bによるBMPシグナルの制御が、同定した3遺伝子を介さずに間接的に起こっている可能性を示す。あるいは、BMPシグナルの活性化は全体の細胞集団ではなく分化が進んだ一部の細胞で起きており、従って、全細胞集団の解析はmiR-27bの発現による影響の検出を困難にした可能性も考えられる。

以上の結果から、ヒトiPS細胞の初期分化においてmiR-27bがBMPシグナルに拮抗的に働き、中内胚葉・中胚葉分化を阻害することが明らかになった。miR-27bによる分化阻害の詳細な分子メカニズムはまだ不明な点が残っているが、今回の知見を踏まえヒトの胚発生を制御する細胞内シグナルの理解を深めることで、今後*in vitro*細胞分化系の改善から不妊治療など臨床領域に至るまで、幅広い分野での応用へつながることが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (LIM JAEUN)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 水口 裕之
	副査 教授 辻川 和丈
	副査 教授 齊藤 達哉

論文審査の結果の要旨

ヒト人工多能性幹(iPS)細胞は、自己複製能と多分化能を有する細胞であり、ヒトiPS細胞からの分化誘導は、脊椎動物の初期発生に必要なNODAL、Wnt、BMP等の様々な細胞内シグナルを刺激し、胚発生を模倣する形で行われる。このように、ヒトiPS細胞から分化される細胞は、分化過程において正常なヒトの発生過程を再現すると考えられるため、発生メカニズム解明の有用な研究ツールになりえる。

マイクロRNA(miRNA)は、約20塩基からなる短い一本鎖RNAであり、標的遺伝子の3'UTR領域上の相補配列を認識することで、遺伝子の転写・翻訳を制御する。ヒトES/iPS細胞で高発現するmiRNAは細胞の自己複製能・多分化能の維持に寄与する一方、体細胞に豊富に発現し、分化を促進するmiRNAの存在が報告されるなど、miRNAが幹細胞の性質を制御する重要な生体内因子であることはよく知られている。従って、ヒトiPS細胞の分化におけるmiRNAの機能解析は、ヒトの発生過程を制御する細胞内の分子メカニズムを理解する上で重要である。

miR-27bは、種間で広く保存されたmiRNAの一つであり、幹細胞を含む体細胞では発現量が高く、ES/iPS細胞では発現量が低いことが知られている。実際に、当研究室のヒトiPS細胞からの肝細胞分化に伴い発現量が上昇することが認められた。また、miR-27bを含むmiR-23b~27b~24 cluster発現がTGFβスーパーファミリーのシグナル伝達分子SMAD2/3/5を介してマウス肝幹前駆細胞からの肝細胞分化を促進することが報告されている。一方で、内胚葉までの初期分化過程については、マウス受精卵の割分に際してmiR-27b発現量が激減することが報告され、miR-27bの発現抑制が初期発生に重要であることが示唆されたが、その詳細な機能については明らかではない。そこで、本研究では、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によりmiR-27bの発現制御可能なヒトiPS細胞株を作製し、ヒトiPS細胞の未分化状態及び初期分化におけるmiR-27bの機能を解析した。その結果、以下のような結果を得ることができた。

1. miR-27b は、ヒト iPS 細胞株の自己増殖と分化効率を低下させ、未分化状態を阻害する。
2. ヒト iPS 細胞株の初期分化過程における miR-27b 発現は、中内胚葉・中胚葉関連遺伝子の発現を低下させ、細胞分化を阻害する。
3. miR-27b は、ヒト iPS 細胞株の初期分化過程で SMAD1/5 のリン酸化を抑制することで、BMP シグナルの活性化に拮抗的に働く。

以上、本論文では、miR-27bがヒトiPS細胞の未分化状態を阻害すること及び初期分化過程でBMPシグナルに拮抗し分化を阻害することを明らかにした。今回得られた知見に基づき、分化を制御する細胞内メカニズムの一端を明らかにすることができた。また、本成果によりmiR-27bと正常な胚発生の相関性が示され、不妊の予測など、臨床領域への応用が期待される知見を得ることができた。従って、本論文は発生過程を理解し、臨床へ応用する上で極めて意義深く、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。