

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成15年度採択研究代表者

山中 伸弥

(奈良先端科学技術大学院大学 遺伝子教育研究センター 教授)

「真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立」

1. 研究実施の概要

私たちは、組織幹細胞や体細胞に何らかの手を加えてES細胞に匹敵する分化多能性と増殖能を与え、臨床応用にとって理想的な多能性幹細胞を作り出すことを目標に研究を行っている。この目標に向け、平成16年度は、リプログラミング因子の探索、ECAT遺伝子の上流因子の同定、Nanog、STAT3などの標的遺伝子の同定、Nanogの結合蛋白質の同定、および他のECAT遺伝子の機能解析を行った。

2. 研究実施内容

研究目的

胚性幹（ES）細胞は、哺乳動物の初期胚に由来する幹細胞で、体を構成するすべての細胞へと分化する能力（分化多能性）を維持したまま、高速で増殖する。この特性からES細胞は神経変性疾患やI型糖尿病などに対する細胞移植療法の資源として高い期待を集めている。しかしヒトES細胞を樹立するためにはヒト受精卵を破壊する必要があり、倫理的には極めて問題が大きい。一方、成体には神経幹細胞や造血幹細胞などの組織幹細胞が存在しており、患者自身の細胞を使えることから倫理的問題が無く、また拒絶反応も回避できる。しかし組織幹細胞は分化能と増殖能はES細胞とは比べものにならないほど低い。私たちの研究目標は、組織幹細胞や体細胞に何らかの手を加えてES細胞に匹敵する分化多能性と増殖能を与え、臨床応用にとって理想的な多能性幹細胞を作り出すことである。

研究成果

リプログラミング因子の探索

平成15年度に開発したECATノックインマウスを用いたリプログラミング能力解析法を用いて、NanogなどのECATにリプログラミング活性があるかどうかを解析した。またES細胞や未受精卵、受精卵から作成したcDNAライブラリーを導入することにより、リプログラミング活性のある遺伝子のファンクショナルスクリーニングを試みた。さらに5-azadeoxycytidineやtrichostatinなどのクロマチン修飾薬によりリプログラミングが誘導されるかを検討した。またこれらの実験系に適した細胞の探索を行った。その結果、NanogなどのECAT単独では、リプログラミングを誘導できないことがわかった。5-aza-

deoxycytidineやtrichostatinなどのクロマチン修飾薬によりECATの発現が弱いながらも誘導されることがわかった。スクリーニングを行う細胞として生殖幹細胞が適していることがわかったので、ES細胞からcDNAライブラリーを作製し、スクリーニングを開始した。

ECAT遺伝子の上流因子の同定

各ECAT遺伝子のES細胞特異的な発現をもたらしている転写因子の同定を試みた。平成15年度に同定した各ECAT遺伝子のエンハンサー配列に結合する蛋白質を、ゲルシフト法およびクロマチン免疫沈降法により探索した。その結果、Nanog遺伝子のエンハンサーにSox2とOct3/4が結合し、発現調節していることがわかった。

Nanog、STAT3などの標的遺伝子の同定

Nanogを過剰発現させたES細胞、およびNanogを過剰発現させ、かつSTAT3を不活性化したES細胞における遺伝子発現パターンを比較した。平成15年度に立ち上げたDNAマイクロアレイ解析システムを利用した。その結果、STAT3の下流因子としてKlf4が重要であることがわかった。

Nanogの結合蛋白質の同定

抗Nanog抗体による免疫沈降法により、Nanog結合蛋白質を探索した。またFlag-Nanog融合蛋白質を発現するES細胞を樹立し、抗Flag抗体によって同様の探索を行った。免疫沈降および質量分析による解析を行っているが、これまでのところNanogに特異的に結合する蛋白質は同定できていない。

他のECAT遺伝子群の機能解析

ECAT2、ECAT8およびECAT9遺伝子ノックアウトマウスに関して、表現型の解析を行った。平成15年度において整備した組織切片作成装置や定量PCR装置を利用することにより初期発生や生殖細胞形成におけるECAT遺伝子の機能を詳細に解析する。ECAT2ノックアウトマウスやES細胞は一見正常であるが、マイクロアレイにより遺伝子発現を見ると、多くの遺伝子の発現が変動していることがわかった。ECAT8ノックアウトはES細胞の自己複製や胎児発生には影響しないが、精子細胞の減数分裂の以上によりオスは不妊となることがわかった。ECAT9遺伝子ノックアウトマウスは、羊膜における血管形成不全のため、約半数が胎児期に致死となることがわかった。

3. 研究実施体制

山中グループ

- ① 研究分担グループ長：山中 伸弥（奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター、教授）
- ② 研究項目：
 1. リプログラミング因子の探索
 2. ECAT遺伝子の上流因子の同定
 3. Nanog、STAT3などの標的遺伝子の同定
 4. Nanogの結合蛋白質の同定

5. 他のECAT遺伝子群の機能解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Takahashi K., Maruyama M., Tokuzawa Y, Murakami M, Oda Y, Yoshikane N, Makabe KW, Ichisaka T, Yamanaka S. Evolutionarily Conserved Non-AUG Translation Initiation in *NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2)*, *Genomics* **85**:360-71, 2005
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Tanaka M, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S., Hiramatsu R, Matsuzawa Y & Shimomura I. Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat that Mimics the Effects of Insulin. *Science* **307**: 426-430, 2005
- Hamazaki T., Oka M., Yamanaka S. & Terada N. Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J Cell Sci.* **117**: 5681-5686, 2004
- Tomoda K., Kato-Yoneda N., Fukumoto A., Yamanaka S. & Kato J.Y. Multiple Functions of Jab1 Are Required for Early Embryonic Development and Growth Potential in Mice. *J. Biol. Chem.*, **279**: 43013-8, 2004
- Murakami M., Ichisaka T., Maeda M., Oshiro N., Hara K., Edenhofer F., Kiyama H., Yonezawa K. & Yamanaka S. mTOR is essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 6710-6718, 2004
- Matsuda E., Shigeoka T, Iida R., Tocharus C., Yamanaka S., Kawaichi M. & Ishida Y. Expression Profiling with Arrays of Randomly Disrupted Genes in Mouse ES Cells Leads to in Vivo Functional Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:4170-4, 2004

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）