

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

丹羽 仁史

(独)理化学研究所発生再生科学総合研究センター
多能性幹細胞研究チーム チームリーダー

分化細胞に多能性を誘導する転写因子ネットワークの構造解析

1. 研究実施の概要

我々は本研究提案に於いて、従来の手法に iPS 的手法を組み合わせることにより、可逆的に多能性を喪失／獲得させ、この過程に於ける転写因子ネットワークの動的変化を解析することにより、より精緻にその構造を解明することを目指す。

研究計画は、以下の6つの部分から成る。

- (1) 多能性幹細胞の分化過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (2) 分化細胞における多能性誘導過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (3) ヒト型とマウス型多能性幹細胞の違いを規定する転写因子ネットワークの解析
- (4) 転写因子ネットワークのノード構造の解明
- (5) 多能性獲得の指標となる遺伝子の同定
- (6) 多能性転写因子ネットワークモデルの構築

本年度は主に上記(1)～(3)について研究を実施し、転写因子 **Klf4** と **Tbx3** の転写因子ネットワークに於ける位置の確定、可逆型 **ES-TS** 変換系の検証、さらには **EpiSC** と **ES** 細胞の差を規定する遺伝子の候補としての **Klf4** の同定などの成果を得た。今後も当初の計画に沿って、粛々と研究を進めていく予定である。

2. 研究実施内容

- (1) LIF シグナル制御下で働く転写因子ネットワークの階層性の解析

LIF シグナルは、マウス **ES** 細胞の多能性維持に必要なであるが、その核内転写因子ネットワークとの結びつき方は、明確ではなかった。我々は、**Oct3/4** 標的候補遺伝子の機能解析から、これまで知られていた **Nanog** に加えて、**Klf4** と **Tbx3** がその強制発現により、マウス **ES** 細胞に LIF 非依存的自己複製能を賦与出来る事を見出した。そこで、これらの転写因子の発現と LIF シグナルの関係を検討し、LIF によって刺激される細胞内シグナル伝達機構のうち、**JAK-STAT3** は主に **Klf4** を、**PI3K-Akt** は主に **Tbx3** を転写レベルで活性化する事を明らかにした。また、**Tbx3**

はその核移行が MAPK により負の制御を受け、Nanog は Tbx3 の下流で間接的に LIF シグナルの制御を受けていることが明らかとなった(Nature, in press)。

(2) ES 細胞と TS 細胞を可逆的に変換させるシステムの検証

Oct3/4 誘導欠損型マウス ES 細胞に、異なるホルモンで誘導される Oct3/4 ならびに Klf4 融合遺伝子を導入し、Oct3/4 活性抑制により ES から TS へ、そして Oct3/4 と Klf4 の同時活性化により TS から ES へと変換される細胞培養系を構築した。次に、この変換が、グローバルな遺伝子発現変化を伴った正常な変換であるかどうか、マイクロアレイによる遺伝子発現解析で検討した。この結果、この細胞培養系の ES ならびに TS の状態は、対照となる野生型 ES ならびに TS 細胞と遺伝子発現パターンではほぼ同等であり、今後のリプログラミング機構の解析において、本実験系が重要なツールとなりうる事が証明された。

(3) P19EC 細胞を用いた ES 化因子としての Klf4 の同定

P19 細胞は円筒期胚原始外胚葉に由来する胚性癌細胞(EC 細胞)で、これまでも広く神経や心筋分化の解析に用いられてきた。我々は、この P19 細胞に於ける多能性関連転写因子群の発現を、QPCR ならびに免疫染色法により解析し、これが EpiSC と極めて近いことを確認した。そこで、遺伝子導入法が既に確立出来ているこの P19 細胞を用いて、ここに ES 細胞では発現しているが、P19/EpiSC では欠落している転写因子の発現ベクターを導入し、その遺伝子発現パターンを ES 細胞型に変換出来るものがあるかどうか検討した。この結果、P19 細胞に Klf4 を発現させると、P19 で欠落していた他の多能性関連転写因子の発現も回復し、ほぼ ES 細胞と同等のパターンになることを見出した(論文作成中)。

3. 研究実施体制

「丹羽」グループ

①研究分担グループ長: 丹羽 仁史((独)理化学研究所、チームリーダー)

②研究項目

- (1) LIF シグナル制御下で働く転写因子ネットワークの階層性の解析
- (2) ES 細胞と TS 細胞を可逆的に変換させるシステムの検証
- (3) P19EC 細胞を用いた ES 化因子としての Klf4 の同定

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Hitoshi Niwa, Kazuya Ogawa, Daisuke Shimosato and Kenjiro Adachi; A parallel circuit of LIF signaling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells, in press for Nature.