

「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
多能性幹細胞研究プロジェクト・プロジェクトリーダー

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)～(5)について研究を実施し、(1)では多能性転写因子ネットワークのゆらぎに対する LIF シグナル入力ゆらぎの影響を明らかにし、(2/5)では Piggy-Bac system を用いた 2 次 iPS 細胞誘導系を構築した。また、(3)ではマウス型とヒト型の識別の為に X 染色体不活性化をモニターする系の構築を進めた。さらに、(4)では Oct3/4 プロモーター活性化機構を、体細胞における再構築系を用いて解析した。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. 研究実施体制

- (1) 「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、プロジェクトリーダー)

② 研究項目

- (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
- (6) 多能性転写因子ネットワークモデルの構築

(2)「長田」グループ

① 研究分担グループ長:長田 智治(三菱化学メディエンス株式会社、主任研究員)

② 研究項目

- (5) 多能性獲得の指標となる遺伝子の同定

§ 3. 研究実施内容

(1) 多能性転写因子ネットワークのゆらぎに対する LIF シグナル入力ゆらぎの影響

我々はこれまでに、マウスES細胞においては、一部の多能性維持に関わる転写因子の発現に不均一性が認められる事を見出している。このような不均一性が生じる原因としては、転写因子ネットワーク自身のゆらぎ、ないしは転写因子ネットワークの発現を制御する外部シグナル入力のノイズが考えられる。さらに、後者の原因としては、細胞内シグナル伝達機構に存在するネガティブフィードバックによる調節が考えられる。そこで、このシグナル入力のゆらぎを生細胞内でモニターするとともに、ネガティブフィードバックが転写因子ネットワーク構成因子の発現の不均一性にどれだけ寄与しているのかを明らかにするために、マウスES細胞の多能性維持に必須なサイトカイン LIF のシグナル伝達におけるネガティブフィードバック因子 Socs3 に注目した。Socs3 は LIF シグナルで活性化される Stat3 により転写活性化され、その遺伝子産物は LIF による Stat3 ならびに Akt/Mapk の活性化を抑制することが知られている。そこで、この Socs3 の発現をモニターし、かつ機能を喪失させるべく、destabilized Cherry を内在性翻訳開始部位に挿入するノックインベクターを構築し、ES細胞に導入した。挿入遺伝子をヘテロに持つクローンでは、培地中の LIF の除去—再添加により、Cherry 蛍光の消失—再活性化が認められ、かつ定常的な LIF 存在下でも、その発現量には不均一性が認められた。このことから、このクローンは LIF シグナル入力の不均一性をモニターする優れた実験系になると判断された。また、挿入遺伝子をホモに持つクローンでは、ネガティブフィードバックの破綻による過剰な LIF シグナル入力に起因すると考えられるコロニー形態の変化が認められ、野生型ないしはヘテロES細胞では顕著な不均一発現を示す Tbx3 の発現の上昇と均一化が観察された。今後、これらの細胞株を用いて、シグナル入力のノイズと転写因子ネットワークの動態の関係が明らかに出来ると期待される。

(2) Piggy-Bac system を用いた 2 次 iPS 細胞誘導系の構築

本研究提案では、計画2と5において、効率がよく再現性の高いiPS細胞誘導実験系が必要となる。我々はこれまでこの目的にTS細胞からのiPS細胞誘導系を用いてきた。しかし、最近Nagyらのグループが報告したPiggy-Bac vectorを用いたiPS細胞誘導系でも、我々の方法に匹敵する高効率で、2次 iPS 細胞誘導が可能である。そこで、我々もこの方法を採用し、他の実験結果と比較が容易なマウス胎児性線維芽細胞からの2次 iPS 細胞誘導系を併用する事とした。ホストとしては、Rosa26-rtTA:Oct3/4-Egfp を持つマウス胎児性線維芽細胞を用い、ここに電気穿孔法ないしはLipofection 法により山中4因子をテトラサイクリン制御プロモーター下に発現する Piggy-Bac vectorを導入した。現在得られた複数のiPS細胞株について、そのキメラ形成能と、そこからの2次iPS細胞誘導効率の検討を進めている。

(3) マウス型とヒト型の識別の為にX染色体不活性化をモニターする系の構築

雌細胞株における X 染色体不活性化は、naïve pluripotent state の喪失の指標として、種を越えた普遍性があると考えられている。我々は、この X 染色体不活性化を生細胞内でモニターすることを可能とするシステムを考案した。それは、2本ある X 染色体のどちらかが不活性化されたときに蛍光を消失させるべく、Cherry 蛍光蛋白を二分割し、これらを雌ES細胞の X 染色体にそれぞれ挿入するもので、現在作成を進めている。

(4) Oct3/4 プロモーター活性化機構の解析

転写因子ネットワークのノードの構造を明らかにする事は、転写因子ネットワークの全体像を把握する上で、極めて重要なポイントである。我々は、多能性転写因子ネットワークの中心的構成員である Oct3/4 について、その転写が複数の転写因子によってどのように制御されているのかを検討した。Oct3/4 の転写開始点上流10kb を含むルシフェラーゼレポーターを構築し、その活性化を293T細胞へのco-transfectionにより検討したところ、これまでOct3/4プロモーターへの結合が知られている複数の転写因子の如何なる組み合わせによっても、対照空ベクターとの対比で10倍以上の転写活性化は認められなかった。そこで、体細胞の内在性因子による Oct3/4 プロモーター活性の抑制を解除すべく、人工転写因子 X を構築し、これを加えた組み合わせによる Oct3/4 プロモーターの活性化を検討した。この結果、X を含む5因子で約100倍、6因子で約300倍の活性化が観察された。この対照空ベクターとの対比としての活性化の度合いは、ES細胞における Oct3/4 プロモーター活性に匹敵するものであり、293T細胞において、Oct3/4 プロモーターの活性化を概ね再現出来たと考えられた。今後、この複数因子による協調的転写活性化がどのような機構で起こるのか、詳細な検討を進める予定である。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Aiba, K., Nedorezov, T., Piao, Y., Nishiyama, A., Matoba, R., Sharova, L.V., Sharov, A.A., Yamanaka, S., Niwa, H. and KO, M.S.: Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.*, 16, 73-80, 2009. DOI: 10.1093/dnares/dsn035
2. Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, H., Stephenson, R.O., Ogoniki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E.M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H. and Sasaki, H.: The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell*, 16, 398-410, 2009. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.02.003
3. Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H. and Nishinakamura, R.: Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells*, 27, 796-805, 2009. DOI: 10.1002/stem.14
4. Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. and Adachi, K.: A parallel circuit of LIF signaling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460, 118-122, 2009. DOI: 10.1038/nature08113
5. Sun, C., Nakatake, Y., Akagi, T., Ura, H., Matsuda, T., Nishiyama, A., Koide, H., Ko, M.S.H., Niwa, H. and Yokota, T.: Dax1 binds to Oct3/4 and inhibits its transcriptional activity in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, 29, 4574-4583, 2009. DOI: 10.1128/MCB.01863-08