

奥田 晶彦

埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 発生・分化・再生部門・教授

iPS 細胞誘導の為の分子基盤の解明による安全性の確保

§ 1. 研究実施体制

(1) 「奥田」グループ

① 研究代表者: 奥田 晶彦 (埼玉医科大学、教授)

② 研究項目

- ・Max-null ES 細胞を用いた、ES 細胞における c-Myc 活性の役割
- ・Max-null ES 細胞を用いた、2i 培養条件下における ES 細胞の未分化性維持機構
- ・partial iPS 細胞の、2i 培養条件による真の iPS 細胞への変換の分子メカニズムの解明

(2) 「岡崎」グループ

① 主たる共同研究者: 岡崎 康司 (埼玉医科大学、教授)

② 研究項目

- ・Partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換過程、及びヒト iPS 細胞の naive 化の過程におけるマイクロアレイ、及びバイオインフォマティクス解析
- ・卵細胞と ES 細胞に共通に高発現している遺伝子の中から、iPS 細胞の誘導促進、及び時短化に関わる遺伝子の同定とそれら遺伝子の機能解析

(3) 「高橋」グループ

① 主たる共同研究者: 高橋 智 (筑波大学、教授)

② 研究項目

- ・改変型 c-Myc/Max のペアーを用いて作製された iPS 細胞と、通常の iPS 細胞における癌発生率の比較
- ・キメラマウスを用いた Max-null ES 細胞の多分化能の解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

iPS 細胞は、ES 細胞と比べた場合に、抗原性等、様々なメリットを持つ一方、現状では安全性の面において、ES 細胞より劣る。本プロジェクトの主な目的は、この iPS 細胞の欠点といわれる部分を克服することである。また、最近では、iPS 細胞の樹立において、c-Myc タンパク質を用いることはほとんどないが、その iPS 細胞誘導促進活性の分子基盤を明らかにすることができれば、その活性を安全に利用する手段が見つかると考えられる。それ故、本プロジェクトでは、c-Myc の iPS 細胞誘導促進活性の分子基盤の解明を大きな目標の一つに据えている。私たちは、c-Myc, N-Myc, L-Myc の全ての Myc タンパク質が機能する上で必須であると考えられているパートナー因子、Max タンパク質をコードする遺伝子の発現が、Doxycycline の培地への添加の有無で 100%コントロールできる ES 細胞(inducible Max-null ES 細胞)を樹立し、ES 細胞における Myc タンパク質の機能について解析してきた。そして、本年度 7 月にその成果を論文に発表することができた¹⁾。本論文では、Max-null ES 細胞が未分化性の喪失とアポトーシスという 2 つの顕著なフェノタイプを示し、かつこの 2 つのフェノタイプに関して、未分化性の喪失というフェノタイプは、アポトーシスよりも必ず先じて起こることを報告している。かつ、この Max-null ES 細胞が、2i という培養条件、及び Nanog の強制発現のいずれにおいても、ES 細胞の無限の自己増殖性が維持されることを報告している。その後、この 2 つのフェノタイプの責任分子を探り、Sirt1, p53, p38MAPK が、それぞれ Max-null ES 細胞が呈する一連の反応の中の異なる段階で作用していることを明らかにし、現在、論文投稿中である。なお、Max-null ES 細胞が激しいアポトーシスを起こすのに対して、c-Myc/N-Myc ダブルノックアウト ES 細胞が、未分化性を維持できなくなるものの、アポトーシスを示さないという報告(Cell Stem Cell 7, 343-354, 2010)がなされている。いずれも Myc 活性を除去する為に作られた 2 つの ES 細胞株が、何故、アポトーシスに関してこれほど異なるフェノタイプを示すかという点が疑問だったので、c-Myc/N-Myc ダブルノックアウト ES 細胞の樹立者から同細胞を供与いただき、様々な検討を行なった。その結果、Max-null ES 細胞に存在する、Max タンパク質非存在化では全く機能を持たないと考えられていた c-Myc タンパク質が何らかのメカニズムをもって ES 細胞に対してアポトーシスを惹起しているであろうという予備的なデータを得ることができた。それ故、平成 24 年度においては、c-Myc タンパク質が、Max タンパク質非依存的にアポトーシスを引き起こす分子機構の解明に取り組む予定である。

Partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換に関わる遺伝子のゲノムワイドなスクリーニングから、Cnot2 遺伝子が同定された。かつ、Cnot2 遺伝子のノックダウンを施行することで、2i 培養条件に曝すことによる iPS 細胞への変換の反応が阻害されることがわかった。但し、Cnot2 の強制発現では、若干、iPS 細胞へと変換する細胞が見られるが、その効果は、2i 培養条件に曝した場合と比べると、比べものにならないほど低かった。このことは、Cnot2 の強制発現のみでは、partial iPS 細胞を、iPS 細胞へと変換する能力はなく、何らかの因子が発現しているとか、極めて限られた partial iPS 細胞の中の一部の sub-fraction のみが、Cnot2 の強制発現に応答できる能力を有すると考えられる。平成 24 年度においては、その要因を明らかにする為の第一歩として、iPS 細胞と partial

iPS 細胞間の遺伝子発現の違いを GO 解析により比較検討して、それらの違いに対して、Cnot2 の強制発現が、どのような影響を与えているかを明らかにし、多段階あるといわれている partial iPS 細胞から、iPS 細胞への変換において、Cnot2 がどのような役割を担当しているかを明らかにしたいと考えている。

内在性の c-Myc 及び Max タンパク質とは相互作用しない改良型 c-Myc, Max 変異体を用いて、iPS 細胞誘導を行うことにより iPS 細胞の安全性を高めようという試みに関しては、樹立できた iPS 細胞で何度かキメラマウス解析を試みたが、キメラマウスができて、そのキメラマウスから F1 マウスを得ることができておらず、それ故、野生型 c-Myc を用いて作製した iPS 細胞との比較ができていない。但し、作製した iPS 細胞を MEK inhibitor を用いて処理したところ、Nanog 遺伝子の発現上昇等、iPS 細胞としての質の向上を示唆するデータが得られたので、その細胞でもって平成 24 年度にキメラマウス解析に再びチャレンジする予定である。

リプログラミング因子の宝庫である卵細胞と ES 細胞に共通に高発現している遺伝子を 39 個ピックアップし、それらの中から、強制発現により、iPS 細胞誘導効率を常に促進する因子としてある特定の因子を同定し、その因子に焦点を絞って研究を行ってきた。平成 23 年度における研究において、本因子は、c-Myc による iPS 細胞誘導促進活性をさらに 3 倍程度高めるということを確定することができた。かつ、本因子が c-Myc タンパク質と直接結合していることも確認できた。さらに興味深いことには、通常、レトロウイルスを用いて iPS 細胞を樹立した場合、レトロウイルス由来の遺伝子のサイレンシングが十分ではないクローンがかなりの割合で得られることが知られているが、本因子を用いて作製した iPS 細胞では、調べた限りの iPS 細胞クローンの全てにおいてサイレンシングが完全に達成されていることがわかった。現在では、レトロウイルスを用いずに iPS 細胞を作製することが、iPS 細胞樹立において主流になっているが、レトロウイルス遺伝子の発現を許さないというのが、ES 細胞が持つ特徴的な性質の一つであり、その性質を獲得する上で、本因子が有用であるということが確定できれば、それは重要な意味を持った発見であると考えている。何故ならば、iPS 細胞の質の向上を目指した研究においては、ES 細胞と同じ性質を持つ iPS 細胞を樹立することを目標においており、本因子が、その目標達成に大いに貢献することが示唆されるからである。それ故、平成 24 年度においても引き続き研究を展開していく予定である。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M and Okuda A, "Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms" Cell Stem Cell, 9, 37-49, 2011 (DOI: 10.1016/j.stem.2011.04.020)
2. Mariani J, Favaro R, Lancini C, Vaccari G, Ferri A.L.M., Bertolini J, Tonoli D,

Latorre E, Caccia R, Ronchi A, Ottolenghi S, Miyagi S, Okuda A, Zappavigna V and Nicolis SK, "Emx2 is a dose-dependent negative regulator of Sox2 telencephalic enhancers" *Nucleic Acids Res.*, (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)