

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－スイス研究交流）

1. 研究課題名：「着床前胚および iPS 細胞誘導過程におけるポリコム群を介した多能性獲得メカニズムの解明」
2. 研究期間：平成 22 年 4 月～平成 25 年 3 月
3. 支援額： 総額 13,750,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	古関 明彦	理研・免疫アレルギー総合科学研究センター	グループディレクター
研究者	遠藤 充浩	理研・免疫アレルギー総合科学研究センター	研究員
研究者	山田 大輔	理研・免疫アレルギー総合科学研究センター	研究員
研究者	遠藤 高帆	理研・情報基盤センター	研究員
参加研究者 のべ			4名

相手側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	Antoine Peters	Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research (FMI)	グループリーダー
研究者	Eszter Posfai	FMI	博士課程学生
研究者	Peter Nestorov	FMI	博士課程学生
研究者	Angeline Eymery	FMI	研究員
研究者	Michael Stadler	FMI	主任研究員
参加研究者 のべ			5名

5. 研究・交流の目的

iPS 細胞技術は、多能性獲得が試験管内でコントロールしうる事象であることを明らかにし、再生医療に新しい選択肢を賦与した。しかしながら、リプログラミングの過程は確率論的な過程が多く、安全な iPS 細胞樹立は未だ容易な過程であるとは言い難い。この確率論的な分子メカニズムを理解するために、iPS 細胞の誘導過程と、生理的な多能性獲得の過程をエピジェネティック制御に焦点を当てて比較し、ボトルネックを明らかにする。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

A) 体細胞リプログラミング過程におけるポリコム群の役割とその分子機序の解明

- ・マウス B リンパ球に由来する iPS 細胞 (B-iPS 細胞) をモデルとしてリプログラミングに抵抗する遺伝子群の抽出を行い、エピジェネティック因子であるポリコム群の標的のリプログラミングが不十分である事を示した。さらに、ポリコム群の標的のひとつであるがん抑制遺伝子が、機能的な標的となっている可能性を示した。この遺伝子座が、iPS 細胞の品質管理のためのひとつのマーカーである可能性を示した。この部分は、主に日本側で行った。
- ・ポリコム群がリプログラミングの過程にどのように作用するのか解析を行った。そのために、ポリコム群の標的であり B 細胞ではポリコム群に依存して発現抑制を受け、iPS 細胞

では発現している遺伝子である Sox2 遺伝子に GFP 遺伝子をノックインし、Sox2-GFP 融合タンパクを発現するアリルを作成し、ポリコム群によるリプログラミングがいつ起こるのかを解析した。その結果、山中因子導入後 12-14 日目から GFP の発現が始まる事が示された。このことは、ポリコム群による Sox2 遺伝子の抑制解除が、その頃に起こる事を示している。一方、Sox2 の発現がはじまったコロニーを継続して培養したところ、約 20% のコロニーから安定な iPS 様細胞が誘導された。しかしながら、MEF から iPS 細胞誘導を行った場合、Sox2 陽性コロニーの 100%において安定な iPS 様細胞が誘導されたことから、B 細胞のリプログラミング過程では、Sox2 発現誘導後に確率論的なプロセスがあることが明らかになった。ポリコム群の寄与を明らかにするために、Ring1B を欠損した B 細胞からの iPS 細胞誘導を行った。初期のコロニー誘導の頻度は、Ring1B 欠損 B 細胞からの方が 1.5 倍程度増加していたものの、一度樹立されたコロニーから安定な iPS 様細胞への誘導頻度は、4分の1程度に低下していた。これらのことから、ポリコム群はリプログラミング前期と後期とは違う役割を果たす事が示された。前期には、リプログラミングに対し抑制的に作用し、一方、後期には促進する事が示された。すなわち、ポリコム群標的の不十分なリプログラミングは、主に後期の確率論的なプロセスによることが示された。この部分は、日本とスイス両側の研究によって進められた。

B) 着床前胚における全能性獲得過程およびその後の細胞系譜決定過程におけるポリコム群の役割の解明

・ポリコム群を卵成熟過程において欠損させると、受精した胚は 2 細胞期で発生を停止することを見出した。これは、ポリコム群により抑制されている発生関連遺伝子群が卵成熟過程において、異所的に発現を開始するためであると考えられる。受精後に卵由来 mRNA の翻訳が開始され、異所的な発生関連タンパクの発現が起こるために、発生が初期に停止すると考えられた。このことは、ポリコム群による発生や分化に寄与する遺伝子の抑制は全能性を担保するために必須であることを示している。この研究は、主にスイス側でなされ、日本側からは、様々な研究資源の提供を行った。

・受精後においては、8 細胞期までは、ポリコム群は父由来のセントロメア領域に局限し、内細胞塊においては発生・分化関連遺伝子にリクルートされ、それらの抑制に寄与することで、多能性賦与に寄与することを明らかにした。一方、栄養外胚葉はポリコム群に依存せずに維持されることを明らかにした。栄養外胚葉の形質を保持する TS 細胞を用いた解析から、TS 細胞維持にもポリコム群は必須でないことが示された。しかしながら、ポリコム群が欠損すると TS 細胞の分化が著しく障害されることが示された。これは、TS 細胞の未分化性維持に必要な遺伝子群が分化にしたがって抑制されていく過程でポリコム群が必要であるためであることを明らかにした。これらの研究は、密接な共同研究によって行われ、スイス側の着床前胚を用いた研究技術、それらの培養技術に助けられたところが大きい。

C) クロマチン状況および遺伝子発現状況のゲノムワイドな解析による iPS 細胞と全能性を有する胚が誘導される過程におこるエピジェネティックリプログラミングの比較

・着床胚における RNA-seq 技術を開発し、ポリコム群の胚盤胞における機能を明らかにした。内細胞塊においても、ポリコム群は、発生・分化に寄与する遺伝子群の抑制に寄与することを明らかにした。この部分は、両側からの共同研究でなされた。

6-2 人的交流の成果

・スイス側から、研究を実質的に担当する研究員が来日し、研究内容や研究技術について討議を繰り返した。その結果、少数の細胞でのクロマチン状況や遺伝子発現状況について解析しうる技術開発に成功した。

・日本側の研究代表者は、毎年スイス側を訪問し、セミナーを開催して情報共有を行った

他、スイス側の研究者と多くの議論を行った。その結果、スイス側研究代表者が所属するフリードリッヒミーシャ研究所の他の研究者との交流が、この研究を端緒として開始されており、共同研究の領域はさらに拡充された。

7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

相手側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	Li X, Isono KI, Yamada D, Endo TA, Endoh M, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Otte AP, Casanova M, Kitamura H, Kamiyo T, Sharif J, Ohara O, Toyada T, Bernstein BE, Brockdorff N, Koseki H. Mammalian Polycomblike Pcl2/Mtf2 is a novel regulatory component of PRC2 that can differentially modulate Polycomb activity at both the Hox gene cluster and at Cdkn2a genes. <i>Mol Cell Biol.</i> 31, 351-364 (2011)	
論文	Takada Y, Naruse C, Costa Y, Shirakawa T, Tachibana M, Sharif J, Kezuka-Shiotani F, Kakiuchi D, Masumoto H, Shinkai Y, Ohbo K, Peters AH, Turner JM, Asano M, Koseki H. HP1 γ links histone methylation marks to meiotic synapsis in mice. <i>Development</i> 138, 4207-17 (2011)	
論文	Hisada K, Sanchez C, Endo TA, Endoh M, Roman-Trufero M, Sharif J, Koseki H, Vidal M. RYBP represses endogenous retroviruses and preimplantation- and germ line-specific genes in mouse embryonic stem cells. <i>Mol Cell Biol.</i> 32:1139-49 (2012)	
論文	Endoh M, Endo TA, Endoh T, Isono K, Sharif J, Ohara O, Toyoda T, Ito T, Eskeland R, Bickmore WA, Vidal M, Bernstein BE, Koseki H. Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity. <i>PLoS Genet.</i> 8:e1002774 (2012)	
論文	Ku M, Jaffe JD, Koche RP, Rheinbay E, Endoh M, Koseki H, Carr SA, Bernstein BE. H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. <i>Genome Biol.</i> 13:R85 (2012)	