

## 研究課題別中間評価結果

1. 研究課題名：人工染色体を用いた新たな細胞リプログラミング技術開発

2. 研究代表者：米田 悦啓（大阪大学大学院生命機能研究科 教授）

### 3. 研究概要

本研究では、現行のレトロウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立法の問題点を、任意に脱落可能な次世代人工染色体を開発・利用することにより克服し、さらに細胞の未分化・分化の運命決定に重要な役割を果たす転写因子とその核輸送因子のインタープレイに関する研究を融合させることにより、細胞リプログラミング技術開発に新しい視点で挑戦することを通して、安全で高効率なiPS細胞樹立法の確立を目指す。

### 4. 中間報告結果

#### 4-1. 研究の進捗状況及び研究成果の現状

細胞リプログラミング機構を、転写因子の核-細胞質間輸送制御という観点から理解し、得られた知見をもとに、タンパク質の細胞内局在を人為的に操作することで効率的な iPS 細胞誘導を試みるという発想は独創的な内容である。また、脱落制御可能な人工染色体を用い、受容側の染色体をリプログラミングの間、完全にインタクトな状態に保持したまま iPS 細胞を樹立させ、樹立後はその分配機能を失活させることにより外来遺伝子を含む人工染色体を脱落除去させる技術も、オリジナリティのある研究である。しかし、まだ、人工染色体に山中因子および関連輸送因子を載せて、効率よく iPS 細胞誘導が可能であるのか、また、完全に制御された高効率の人工染色体の脱落・除去が実現されるのか、などの検証は済んではいない。loxP 組換え部位を持つ人工染色体 tetO-HAC を取得し、iPS 細胞誘導に必要な遺伝子を tTS 遺伝子と共に HAC 上 loxP 部位へ組み込む作業が進められている。転写因子の核-細胞質間輸送に影響を与える因子の解析では、膜孔構成因子の未分化 ES 細胞と体細胞での発現を比較したところ、両細胞間で大きく異なる核輸送因子が複数存在することを見つけており、Oct-4 の核-細胞質間 shuffling および局在性に変化を与えるとリプログラミング効率が影響を受けることなどの興味深い発見をしている。研究代表者の得意分野でもあり、iPS 誘導転写因子の核膜輸送に関しては有意な進展があると考えられる。ES 細胞の分化過程で核輸送因子 importin- $\alpha$ 1 の発現パターンが大きく変化することから、iPS 誘導時に importin- $\alpha$ 1 遺伝子を発現させることで、iPS リプログラミング効率が上昇するという考えで実験が進められていたが、Importin- $\alpha$ 1 の共発現で誘導効率が上昇することはなかった。Importin $\alpha$ 1 が ES/iPS の未分化維持に必須な因子かどうかという疑問を検討する必要がある。総じて、核移行と多能性の研究については、直接的な証拠が得られておらず、核心には迫っていないものと考えられる。転写因子の核膜移行の研究を通じて iPS 細胞の研究に貢献し得る可能性があるが、現段階では未知数であると考えられる。未分化状態・分化状態の核内輸送の違いは科学的に興味深いものの、未分化性の維持機構の研究が非常に速く進捗している現在、国際的な競争の面からは厳しいように思われる。脱落制御可能な人工染色体ベクター構築で遅れが生じた。まだこれから行われるものとも考えられるが、研究のスピードを考えると、競争力の面から不利ではないかと思われる。これまでの研究費の執行については、人件費の増加が見られるものの、特に問題は見あたらない。しかし、旅費の計上が大きい。

#### 4-2. 今後の研究に向けて

山中4因子の核内輸送はリプログラミングにおいて重要な問題であり、明らかにして欲しい。核輸送の研究は

米田チームの得意分野であり、その強みを最大限生かした iPS 細胞研究に集中することが望ましい。Importin の役割についての証明が不十分という指摘があり、これについては研究の質を高めるよう努力していただきたい。critical なデータを提示することが必要である。人工染色体は選択肢の一つとしての意義はあろうが、世界的な iPS 研究進展の中で優位性を出すのはかなり困難であるとする。

#### 4-3. 総合評価

核移行と多能性を追求する研究は面白い着眼ではあるが、転写因子研究から考えると基礎面・応用面いずれにおいても、本質的な重要性を孕んでいるとは現在のところ見られない。少なくとも、早急に本質的に重要であるかどうかを確認する研究が必要である。厳密に制御された脱落・除去が可能な効率的 iPS 細胞誘導人工染色体が実現できれば、潜在的には高いインパクトを有するものと思われる。しかし、本研究チームにおける人工染色体の研究は、かけた年月と研究費の割に進捗が思わしくない。今後の見込みも考えると、現状の計画通りに研究費を費やすことは適当でないと判断される。総じて、現在のところ、CREST の研究費規模に見合うだけの成果が得られているとは言いがたく、これから挽回を期待したい。今後さらなる成果を出していただきたい。