

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 15 年度採択研究代表者

山中 伸弥

(京都大学再生医科学研究所 教授)

## 「真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立」

### 1. 研究実施の概要

ES 細胞は受精後間もない胚から樹立する幹細胞であり、様々な細胞へと分化する多能性を維持したまま、長期かつ大量に培養することが可能であることから、脊髄損傷、若年性糖尿病、心不全などに対する細胞移植療法の資源として期待されている。しかし、ヒト胚利用に関する倫理的問題や移植後の拒絶反応など、問題点も多い。私たちの研究目標は成体の細胞から ES 細胞と類似した多能性幹細胞を樹立し、ES 細胞の持つ倫理的問題や拒絶反応を克服することである。そのためには、成体に潜んでいる多能性幹細胞を分離すること、もしくは分化細胞の核をリプログラミングすることが必要である。リプログラミングの実現のためには、リプログラミング因子の同定、もしくは多能性の分子機構に基づいたリプログラミング技術の確立が必要である。私たちはこれまでに ES 細胞で特異的に発現する遺伝子群 ECAT (ES cell associated transcript) を In silico アプローチにより多数同定してきたが、今年度もこの ECAT をツールとして、成体に潜んでいる多能性幹細胞の探索、および分化細胞の核におけるリプログラミング誘導法の開発に取り組んだ。

### 2. 研究実施内容

#### (1) 成体マウスにおける多能性幹細胞の探索

これまでに知られているすべての多能性幹細胞において私達が多能性維持遺伝子として同定した ECAT4 (Nanog) が発現している。そこで、Nanog 遺伝子座に緑色蛍光蛋白質 (EGFP) をノックインしたマウスを作製し、EGFP の発現を指標に、成体マウスに存在する多能性細胞を探索した。その結果、初期胚においては 8 細胞期ごろに EGFP 陽性となり、胚盤胞では内部細胞塊に、着床後はエピブラストに限局することがわかった。その後は生殖腺でのみ EGFP 陽性細胞が認められ、受精後 15 日目前後で消失することがわかった。成体においては骨髄および骨格筋で GFP 陽性細胞を探索したがこれまでのところ同定には至っていない。

## (2) リプログラミング因子の探索

平成 16 年度までに ECAT 遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子をノックインしたマウスがリプログラミング因子探索のアッセイ系となることを示したが、今年度は、本アッセイ系による探索を行った。リプログラミング因子が存在すると考えられる ES 細胞や精巣から cDNA の発現ライブラリーを作成した。また後述する多能性維持の分子機構に関する知見から、リプログラミング因子の候補として 24 因子を選択した。これらの活性を上述のアッセイ系により解析した結果、**単独因子ではリプログラミングは誘導できないが、いくつかの因子を組み合わせることにより達成できる可能性が示された。**

## (3) 多能性の分子機構の解明

### (3-1) ECAT 遺伝子の上流因子の同定

精子幹細胞において Nanog を含む一部の遺伝子の調節領域が特異的に DNA メチル化メチル化を受ける分子機構の解明を試みた。その結果、高メチル化は Oct3/4 と Sox2 の結合部位を中心に発生することが明らかとなった。

### (3-2) Nanog、STAT3 などの標的遺伝子の同定

平成 16 年度の研究で STAT3 の下流として同定した因子の、ES 細胞における機能を解析した。その結果、転写因子である Klf4 は LIF 非依存的にマウス ES 細胞の未分化状態を維持することが明らかとなった。

### (3-3) Nanog の結合蛋白質の同定

Flag タグを付けた Nanog、Oct4、Sox2 などを発現させた ES 細胞の核抽出液を抗 Flag 抗体カラムを用いることにより精製し、質量分析による結合蛋白質複合体の同定を試みた。いくつかの候補蛋白質が得られており、現在詳細に解析している。

### (3-4) 他の ECAT 遺伝子群の機能解析

ECAT2 ノックアウトマウスや ES 細胞は顕著な表現型を示さないこと、ECAT8 ノックアウトマウスは減数分裂の異常によりオス不妊となること、ECAT24 ノックアウトマウスはホモ変異胚は着床前後に致死となり、ヘテロ変異の一部に神経管の閉鎖異常や肛門閉鎖が認められることを見いだした。

## 3. 研究実施体制

### (1)「山中」グループ

①研究分担グループ長：山中 伸弥（京都大学再生医科学研究所、教授）

②研究項目：

1. 成体マウスにおける多能性幹細胞の探索

- 2. リプログラミング因子の探索
- 3-1. ECAT 遺伝子の上流因子の同定
- 3-2. Nanog、STAT3 などの標的遺伝子の同定
- 3-3. Nanog の結合蛋白質の同定
- 3-4. 他の ECAT 遺伝子群の機能解析

#### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

##### （1）論文（原著論文）発表

- Amano H., Itakura K., Maruyama M., Ichisaka T., Nakagawa M. and Yamanaka S. Identification and targeted disruption of the mouse gene encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5). *BMC Developmental Biology*, **6**: 11, 2006.
- Takahashi K., Nakagawa M., Young S.G. and Yamanaka S. Differential membrane localization of ERas and Rheb, Two Ras-related proteins involved in the PI3 kinase / mTOR pathway. *J. Biol. Chem.*, **280**: 32768-74, 2005
- Maruyama M., Ichisaka T., Nakagawa M. and Yamanaka S. Differential roles for SOX15 and SOX2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 24371 – 9, 2005
- Wang X, Beugnet A., Murakami M., Yamanaka S. and Proud C.G. Distinct signaling events downstream of mTOR co-operate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **25**:2558-72, 2005
- Takahashi K., Maruyama M., Tokuzawa Y, Murakami M, Oda Y, Yoshikane N, Makabe KW, Ichisaka T, Yamanaka S. Evolutionarily Conserved Non-AUG Translation Initiation in *NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2)*, *Genomics* **85**:360-71, 2005
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Tanaka M, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S. Hiramatsu R, Matsuzawa Y & Shimomura I. Visfatin: A Protein Secreted by Visceral Fat that Mimics the Effects of Insulin. *Science* **307**: 426-430, 2005

##### （2）特許出願

H17 年度出願件数：2 件（CREST 研究期間累積件数：6 件）