

「人工多能性幹細胞(iPS 細胞)作製・制御の医療基盤技術」  
平成 20 年度採択研究代表者

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. 研究実施の概要

本研究プロジェクトでは、4つの研究項目(1, Integration defectiveなレンチウイルスを用いたiPS細胞の誘導; 2, 神経幹細胞を出発材料としたiPS細胞の誘導; 3, c-Myc 遺伝子によるiPS細胞誘導促進活性の解明; 4, iPS細胞誘導の為の分子基盤の解明)を行うことを計画し、実施している。その中で、顕著な成果を挙げることができたのは、研究項目3に関してであり、遺伝子改変技術を用いて、c-Mycタンパク質が機能できないようにすると、ES細胞に致死的なフェノタイプをもたらすが、ある特定の薬剤で処理することで、ある程度レスキューできた。また、DNAマイクロアレー解析から、上記の細胞において、発現が顕著に低下している20種類の遺伝子に関して、レンチウイルスを用いて強制発現させたところ、ES細胞の致死性をキャンセルすることができた。研究項目1に関しては、不完全にリプログラミングされた細胞集団を得るに留まった。研究項目の2に関しても、他のグループにより、Oct-3/4とKlf4のみによるiPS細胞の樹立が達成されてしまったので、それらのデータを追試するに留まった。但し、その2因子の一方(Klf4)をIntegration defectiveなウイルスと置き換え可能であることを示唆するデータが得られた。研究項目の4に関しては、各種遺伝子改変マウスの作製が必要となるが、それらのマウスのキメラマウス作製の段階まで進めることができた。この研究テーマに関しては、平成21年度の後半から、本格的に研究を遂行することができると考えている。

### 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は4.(1)に対応する)

本研究プロジェクトでは、4つの研究項目の実施を計画し、遂行している。その中で、「c-Myc 遺伝子によるiPS細胞誘導促進活性の解明」の研究項目においては、明確な成果が得られた。遺伝子操作により、c-Mycタンパク質が機能を抑制するとES細胞が致死的なフェノタイプをもたらすことは、本プロジェクト発足以前から確認できていた。なお、その細胞では、c-Mycタンパク質の機能抑制細胞とほぼ同時期に樹立したNucleostemin抑制細胞<sup>1)</sup>と同様に、Oct/3/4などのpluripotencyマーカー遺伝子の発現においては変化がなかった。また、やはり、Nucleostemin抑制細胞と同様に、アポトーシスのレベルは亢進していた。但し、これら2種類の細胞に関して、

各種伝達シグナルを司る **kinase** に対するインヒビターを用いて処理したところ、フェノタイプにおいて明確な差が見られた。すなわち、**c-Myc** 抑制 **ES** 細胞においては、ある特定のインヒビターを用いた場合、コロニーの成長は極めて遅いものの、肉眼でも確認できる程度のコロニーを得ることができた。このことは、**c-Myc** の機能を完全に抑制した場合に 10 日以内に、全ての細胞が死滅することと比べると大きな違いである。また、この細胞コロニーは、少なくとも 3 回以上の継代は可能であった。

一方、DNA マイクロアレー解析から、**c-Myc** タンパク質の機能抑制に伴い発現が顕著に低下する 20 個の遺伝子をレンチウイルスを用いて発現させた。すると、この場合でも、この **ES** 細胞は、致死性を免れることがわかった。現在、導入した 20 種類の遺伝子の中で、どの因子がレスキューする上でキーとなる因子であるか、検討を行っているところである。

神経幹細胞を出発材料としたリプログラミング因子による **iPS** 細胞樹立の試みに関しては、プロジェクト発足の時点で、他の研究者により、**Oct-3/4**、及び **Klf4** の 2 因子で **iPS** 細胞が樹立されることが発表され、それ故、私たちは、まず、そのことの再現性を確認した。そして、その次のステップとして、**Oct-3/4** は通常のレトロウイルスで、そして、**Klf4** は染色体非挿入型レンチウイルスを用いた **iPS** 細胞の樹立を試みた。その結果、**iPS** 細胞の形態を示すコロニーが 4 つ得られたが、いずれの場合においても、**iPS** 細胞からのゲノム DNA をテンプレートとした PCR により、**Oct-3/4** **cDNA** を持つレトロウイルスのみならず、染色体非挿入型レンチウイルスに関しても染色体に導入されていることがわかった。染色体非挿入型ウイルスといえども、極めて低い頻度で染色体に導入されることが知られており、**iPS** 細胞樹立という選択の中で、ウイルスが染色体に挿入された細胞のみを選択的に回収したと考えられる。現在は、**Wnt** 遺伝子発現細胞からのコンディショナル培地を用いる、あるいは、**Sall4**、**Nanog** 等、および当研究室で最近、ヒト・マウス **ES** 細胞の両方で未分化状態特異的な発現を示す遺伝子として同定された **Dual specificity phosphatase** 遺伝子<sup>2)</sup> 等に関しても染色体非挿入型ウイルスを用いて導入するといったことより、**iPS** 細胞の樹立効率を上げることで、ウイルスゲノムが細胞のゲノムに挿入されていない **iPS** 細胞の樹立を目指したいと考えている。研究項目 4 の **iPS** 細胞になる為の前段階の状態に安定に維持できる **pre-iPS** 細胞の樹立、及びその細胞を用いた解析に関しては、各種遺伝子改変マウスの作製を試み、いずれのマウスに関しても、マウスがキメラの状態にあり、平成 21 年度の後半からは、本格的な研究が開始できると考えている。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「奥田」グループ

①研究分担グループ長:奥田晶彦(埼玉医科大学、教授)

#### ②研究項目

DNA マイクロアレー解析、及び、**Oct-3/4** コンディショナルノックアウトマウス作製を除き、研究実施内容に記載したすべての研究。

#### (2)「岡崎」グループ(埼玉医科大学ゲノム医学研究センター ゲノム科学部門)

①研究分担グループ長:岡崎康司(埼玉医科大学、教授)

## ②研究項目

Max 遺伝子の発現に関して、Tet off システムを取り入れた Max ホモ欠失 ES 細胞を用いた DNA マイクロアレー解析。また、Rock inhibitor を用いて部分的にレスキューされた Max ホモ欠失 ES 細胞と Doxycycline 非存在下により、Max の発現が保たれている ES 細胞の間での遺伝子発現の類似性、及び相違点を明らかにする為の DNA マイクロアレー解析に関しても、現在、進行中である。

## (3)「高橋」グループ

①研究分担グループ長:高橋 智(筑波大学、教授)

## ②研究項目

Oct-3/4 コンディショナルノックアウトマウスに関して、キメラマウス作成。また、iPS 細胞のキメラマウス解析に関しては、研究代表者グループからの iPS 細胞の供給に伴い、速やかに、blastocyst injection を実施。

## 4. 研究成果の発表等

### (1) 論文発表 (原著論文)

1. Nomura J, Maruyama M, Katano K, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, and Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in ES cell and neural stem cell viability. *Stem Cells*, in press
2. Zhang J, Nomura J, Maruyama M, Nishimoto M, Muramitsu M, Okuda A. Identification of an ES cell pluripotent state-specific DUSP6 enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378: 319-323, 2009.