

丹羽 仁史

(独)理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
多能性幹細胞研究プロジェクト・プロジェクトリーダー

分化細胞に多能性を誘導する転写因子ネットワークの構造解析

§1. 研究実施の概要

我々は本研究提案に於いて、従来の手法に iPS 的手法を組み合わせることにより、可逆的に多能性を喪失／獲得させ、この過程に於ける転写因子ネットワークの動的変化を解析することにより、より精緻にその構造を解明することを目指す。

研究計画は、以下の6つの部分から成る。

- (1) 多能性幹細胞の分化過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (2) 分化細胞における多能性誘導過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (3) ヒト型とマウス型多能性幹細胞の違いを規定する転写因子ネットワークの解析
- (4) 転写因子ネットワークのノード構造の解明
- (5) 多能性獲得の指標となる遺伝子の同定
- (6) 多能性転写因子ネットワークモデルの構築

本年度は主に上記(1)～(5)について研究を実施し、(1)では多能性転写因子ネットワークのゆらぎに関与すると考えられる転写因子 *Klf4* の誘導柄ノックアウト ES 細胞を樹立し、(2/5)では Piggy-Bac system を用いた簡便な 2 次 iPS 細胞誘導系を確立し、エピジェネティック因子のリプログラミング過程への関与を明らかにしつつある。また、(3)ヒト型多能性幹細胞を簡便に培養する方法を開発した。さらに、(1)、(3)に関連した解析として、雌 ES 細胞に於いて X 染色体はエピジェネティックに中立な状態に変換されていることを明らかにした。今後も当初の計画に沿って、粛々と研究を進めていく予定である。

§2. 研究実施体制

(1)「丹羽」グループ

- ① 研究分担グループ長: 丹羽 仁史 ((独)理化学研究所、プロジェクトリーダー)

② 研究項目

- (1) 多能性幹細胞の分化過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (2) 分化細胞における多能性誘導過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (3) ヒト型とマウス型多能性幹細胞の違いを規定する転写因子ネットワークの解析
- (4) 転写因子ネットワークのノード構造の解明
- (6) 多能性転写因子ネットワークモデルの構築

(2) 「長田」グループ

① 研究分担グループ長: 長田 智治 (三菱化学メディエンス株式会社、主任研究員)

② 研究項目

- (5) 多能性獲得の指標となる遺伝子の同定

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) 多能性転写因子ネットワークのゆらぎに対する LIF シグナル入力ゆらぎの影響

昨年度作製した LIF-Stat3 シグナル入力を可視化する Socs3-dCherry ノックイン ES 細胞を用いて、LIF シグナル入力のゆらぎの有無を検討した。様々な条件下で培養した Socs3-dCherry ノックイン ES 細胞をタイムラプス蛍光顕微鏡で継続的に観察したところ、Socs3-dCherry の発現は LIF 依存的ではあるものの、LIF 持続的存在下ではその発現の強弱は48-72時間の観察範囲では有意な変動を認めなかった。ただ、現在のシステムでは短周期の変動の検出可能性に問題があるとも考えられたので、現在、超短半減期 Cherry ないしは luciferase をレポーターとするシステムの構築を進めている。

(2) 多能性転写因子ネットワークのロバストネスの検証

昨年度明らかにした LIF シグナル入力の並列回路を機能的に検証するために、そのコンポーネントの一つである転写因子 Klf4 の誘導型ノックアウト ES 細胞を作製した。まず、野生型 ES 細胞に flox-KO vector を導入し、Klf4flox/+ES 細胞を作製した。次にこの ES 細胞を高濃度 puromycin 存在下で選別し、Klf4flox/floxES 細胞を得た。最後に、この ES 細胞にホルモン誘導型 Cre recombinase 発現ベクターを導入し、Klf4 の誘導型ノックアウト ES 細胞を作製した。この ES 細胞では、ホルモン投与後24時間以内に loxP の組み換え反応が完了し、Klf4 mRNA 発現量も投与前の1%以下に減少していた。細胞の形態には劇的な変化は認めないが、96時間後の観察では、マウス ES 細胞に特徴的なドーム型のコンパクトなコロニーの形成がほぼ完全に抑制されていた。しかし、これらのフラットなコロニーしか形成しない Klf4-/-ES 細胞は継代可能で、Oct3/4 の発現も正常であることから、多能性は喪失していないと考えられた。現在、この

Klf4⁻/ES 細胞の表現型をさらに厳密に検討すべく、**subpopulation** を識別するマーカーである **Rex1-EGFP** の導入を行い、その解析に着手している。また、並列回路がネットワークのロバストネスを保証している可能性を検討するために、並列回路のもう一方の回路のコンポーネントである **Tbx3** ないしは **Nanog** を、**Klf4** と同時に誘導的にノックアウトできる **ES** 細胞の作製を進めている。

(3) Piggy-Bac system を用いた 2 次 iPS 細胞誘導系の構築

Oct3/4-EgfpTg:Rosa26rtTA マウス胚から線維芽細胞を調製し、ここにテトラサイクリン誘導型 **Oct3/4, Sox2, Klf4, Myc** 発現 **Piggy-Bac** ベクターを導入して、1 次 iPS 細胞を作製した。次に、この 1 次 iPS 細胞を胚盤胞に注入してキメラ胚を作製し、そこから線維芽細胞を調製した。この 1 次 iPS 細胞由来胎児性線維芽細胞をテトラサイクリン存在下で培養すると、約 5% の細胞が 2 次 iPS 細胞化することを確認した。また、1 次 iPS 細胞にホルモン誘導型 **Gata6** を導入し、ホルモン依存性に 100% 胚体外内胚葉に分化誘導した。これらの胚体外内胚葉細胞をテトラサイクリン存在下で培養すると、約 3% の細胞が 2 次 iPS 細胞化することを確認した。これにより、**Piggy-Bac system** を用いた 2 次 iPS 細胞誘導系の基本形は確立を完了した。

(4) Oct3/4 プロモーター活性化機構の解析

昨年度同定した **Oct3/4** プロモーター活性化に必要な 5 つの転写因子をテトラサイクリン誘導性に強制発現可能な **293T** 細胞株を樹立した。次にこの細胞に **Oct3/4** プロモーター-luciferase カセットを **Piggy-Bac system** で導入し、その発現がテトラサイクリン誘導性に活性化される事を確認した。さらに、このプロモーター上に、誘導性に発現した転写因子が結合している事を、クロマチン免疫沈降法で検証した。現在、転写因子結合の階層性を詳細に検討すべく、5 つの転写因子を異なる組み合わせで発現する **293T** 細胞を順次作成中である。

(5) マウス型とヒト型の多能性幹細胞状態を移行させる実験系の確立

マウス **ES** 細胞から胚様体形成を経て、ヒト型多能性幹細胞である **EpiSC** へ移行させる事に成功し、この系を用いて、これまでに我々が作製した **Oct3/4** ならびに **Sox2** 誘導型ノックアウト **ES** 細胞を **EpiSC** 化した。現在、これらの **EpiSC** を用いて、ヒト型多能性幹細胞状態におけるこれら転写因子の機能解析を進めている。また、ヒト **ES** 細胞を、フィーダー細胞を用いずに培養できる方法を開発し¹⁾、これがマウス **EpiSC** の培養にも適用可能である事を確認した。さらに、様々な純系マウスから **ESC** ならびに **EpiSC** 株を樹立し、それらの比較検討を開始した。

(6) 多能性転写因子ネットワークが制御するエピジェネティック機構の解析

多能性幹細胞においては、そのクロマチンの大部分が所謂ユークロマチンの状態である事が特徴の一つとして挙げられる。このようなエピジェネティックな「白紙状態」が **X** 染色体の不活性化制御にも当てはまる事を、雄由来 **X** 染色体の **EGFP** マーカー遺伝子を持つ雌 **ES** 細胞などを用いて確認した²⁾。また、このような状態を生み出すエピジェネティック制御因子として、**Oct3/4** 標的遺

伝子候補から、ヒストンアセチル化因子を抽出し、その機能解析を行った。これらのうち、遺伝子甲はその強制発現が、LIF非存在下でマウスES細胞の多能性を長期にわたって維持できる事を見いだした。さらに、上述の2次iPS細胞誘導系を用いて、この遺伝子甲の発現が、山中4因子によるiPS誘導を増強できる事を確認した。現在、これらの点に関して、さらに詳細な解析を進めている。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kitajima, H. and Niwa, H.: Clonal expansion of human pluripotent stem cells on gelatin-coated surface. *Biochem Biophys Res Commun*, 396, 933-938, 2010 10.1016/j.bbrc.2010.05.026.
2. Murakami, K., Araki, K., Ohtsuka, S., Wakayama, T. and Niwa, H.: Choice of random rather than imprinted X inactivation in female ES cell-derived extra-embryonic cells. *Development*, 138, 197-202, 2011 10.1242/dev.056606.

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ② CREST研究期間累積件数(国内 0件)