

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. 研究実施体制

### (1)「奥田」グループ

① 研究代表者: 奥田 晶彦 (埼玉医科大学、教授)

#### ② 研究項目

- ・Max-null ES 細胞の機能的解析
- ・partial iPS 細胞の、2i 培養条件による真の iPS 細胞への変換の分子メカニズムの解明
- ・卵母細胞と ES 細胞に共通して発現している遺伝子を用いた iPS 細胞誘導の効率化

### (2)「岡崎」グループ

① 主たる共同研究者: 岡崎 康司 (埼玉医科大学、教授)

#### ② 研究項目

- ・Partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換過程、及びヒト iPS 細胞の naive 化の過程におけるマイクロアレイ、及びバイオインフォマティクス解析
- ・iPS 細胞の誘導促進における遺伝子群の機能解析、及びその作用の分子基盤の解明

### (3)「高橋」グループ

① 主たる共同研究者: 高橋 智 (筑波大学、教授)

#### ② 研究項目

- ・改変型 c-Myc/Max のペアーを用いて作製された iPS 細胞と、通常の iPS 細胞における癌発生率の比較
- ・キメラマウスを用いた Max-null ES 細胞の多分化能の解析
- ・Oct-3/4 コンディショナルノックアウト MEF 調製用のマウスの作製

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本プロジェクトでは、Myc タンパク質が持つ高度に iPS 細胞誘導効率を高めることができる能力を安全に利用することを主な目的としている。また、その他、partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換のメカニズムの解明、ES 細胞と卵細胞の両方で共通に発現している遺伝子を用いた iPS 細胞誘導効率の高度な向上を目指して研究を行っている。まず、Myc に関する研究について記載する。平成 23 年度には、Myc に対するパートナー因子である Max をコードする遺伝子をホモ欠失させると、ES 細胞が、未分化性を維持できなくなるだけではなくて、激しい細胞死を呈すること、及び、そのフェノタイプは、2i コンディションでは全く見られず、すなわち、この培養条件では、ES 細胞は、自己増殖性、及び分化多能性維持において Myc/Max 転写複合体を必要としないことを示した。平成 24 年度に行ったことは、様々な薬剤の中から、Sirt1 及び PARP1 に対する阻害剤であるニコチンアミドが、通常培養条件にある ES 細胞が Max 遺伝子の発現を消失させた際に起こす未分化性の喪失と細胞死の両方を抑え、また、p38MAPK と p53 に対する阻害剤が、細胞死に限って回避させることを明らかにし、論文を発表した<sup>(2)</sup>。なお、p53 に対する阻害剤ピフスリン α は、Max ホモ欠失 ES 細胞の未分化性維持に関しても、ある程度維持させる活性を有することも併せて報告した。なお、Max ホモ欠失 ES 細胞が激しいアポトーシスを起こすのに対して、米国の Stephen Dalton らは、Myc 活性を消失させるという同じ目的で c-Myc/N-Myc ダブルノックアウト ES 細胞を作製したが、その ES 細胞は、Max ホモ欠失 ES 細胞と同様に ES 細胞としての未分化性を維持できなくなるものの、アポトーシスのフェノタイプはほとんど示さないことを報告している(Cell Stem Cell 7, 343-354, 2010)。それ故、私たちは、これら 2 種類の ES 細胞株が、何故アポトーシスに関してこれほど異なるフェノタイプを示すかという点を様々な角度から検討し、その結果、Max ホモ欠失 ES 細胞に存在する c-Myc タンパク質が何らかのメカニズムでもって ES 細胞に対してアポトーシスを惹起していることを明らかにすることができた。Max ホモ欠失 ES 細胞を作製した理由は、様々な文献で報告されているデータから判断して、Myc タンパク質は、Max タンパク質非存在化では全く機能を持たないであろうと考えていたからであるが、実際は、何らかのメカニズムでもって、アポトーシスを誘導していることが分かったことになる。現在、そのアポトーシスが起こる分子メカニズムの解明に向けて研究を行っているが、まだ、その点に関しては解明できていない。但し、その c-Myc の過剰発現に伴って起こるアポトーシスのレベルを調節できる因子に関しては同定できており、それ故、平成 25 年度内には、その点について、論文を報告できると考えている。

Partial iPS 細胞に関しては、平成 23 年度までに、ゲノムワイドなスクリーニングにより、Cnot2 遺伝子が、partial iPS 細胞からの真の iPS 細胞への変換に関与する因子の一つとして同定することができていたが、平成 24 年度においては、ノックダウン実験からも Cnot2 の partial iPS 細胞からの真の iPS 細胞の変換への関与が確認できた。但し、強制発現実験からは、それを示唆するデータを得ることができなかった。その結果は残念な結果ではあったが、それでも、少なくとも Cnot2 強制発現 partial iPS 細胞は、遺伝子発現において、元々の partial iPS 細胞よりも真の iPS 細胞に近いのではないかと考え、DNA マイクロアレイ解析を行い、それに引き続き、そこから得られたデータを用いてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、興味深い結果を得

ることができた。Cnot2 遺伝子の強制発現により発現が低下した遺伝子群に関して、partial iPS 細胞と真の iPS 細胞における発現量を比較したところ、そのほとんどが真の iPS 細胞で低値を示すことが分かった。それらの遺伝子群に対して、Gene Ontology 解析を下したところ、発生・分化に関わる遺伝子群が強く濃縮されていることが分かった。従って、Cnot2 遺伝子の partial iPS 細胞から、真の iPS 細胞への変換における役割は、細胞分化に携わる遺伝子の発現を抑えることであることが示唆された。一方、Cnot2 遺伝子強制発現によって発現が上昇した遺伝子についても同様な解析を行ったが、特にどちらの細胞で発現が高いという傾向は見られず、Gene Ontology 解析からも、特に意味を持った遺伝子の集合体であるという示唆は得られなかった。

ES 細胞と卵母細胞の両方で共通に発現する遺伝子を用いた iPS 細胞誘導の効率化に関しては、今まで、iPS 細胞誘導の効率を 3 倍程度、向上させるものしか得られていなかったが、それらのいくつかを組み合わせることで、単純な相和的な効果を遥かに凌駕する効果が得られた。平成 25 年度においては、その驚異的な誘導促進効果の分子メカニズムの解明を目指す。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

1. Mariani J, Favaro R, Lancini C, Vaccari G, Ferri AL, Bertolini J, Tonoli D, Latorre E, Caccia R, Ronchi A, Ottolenghi S, Miyagi S, Okuda A, Zappavigna V and Nicolis SK. Emx2 is a dose-dependent negative regulator of Sox2 telencephalic enhancers. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6461-6476, 2012 (DOI:10.1093/nar/gks295)
2. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Iseki H, Katano M, Kamon M, Hirasaki M, Nishimoto M, Okazaki Y, Okuda A. Sirt1, p53 and p38MAPK are crucial regulators of detrimental phenotypes of ESCs with *Max* expression ablation. *Stem Cells*, **30**, 1634-1644, 2012 (DOI:10.1002/stem.1147)
3. Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* in press, (DOI:10.1073/pnas.1220200110)
4. Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A, Matsui Y. Max was identified as a repressor of germ-cell related gene expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Commun.* in press

#### (3-2) 知財出願

- ① CREST 研究期間累積件数(国内 1件)