

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. 研究実施体制

(1)「丹羽」グループ

① 研究代表者: 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

- ・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
- ・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
- ・ヒト型多能性幹細胞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
- ・転写因子ネットワークのノード構造の解明
- ・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 主たる共同研究者: 長田 智治 (三菱化学メディエンス(株)、主任研究員)

② 研究項目

- ・多能性獲得の指標となる遺伝子の同定

§ 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)

(1) 当該年度における研究の進め方

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つの部分から成り、各部分ごとの本年度の計画を示す。

(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

【内容】(i) マウス ES 細胞は、Oct3/4 と Sox2 の発現を外来性遺伝子発現により人為的に維持しても、LIF 除去により自発的に分化する。我々はこれがこの2つの転写因子に並ぶ第三のコア因子の存在を示唆していると考え、その同定を試みる。

(ii) マウス ES 細胞における、多能性維持に関わる転写因子の不均一な発現の原因と機能的意義を検討する。

【本年度の実施内容】昨年度までに作成した誘導型 Klf2, Klf4, Tbx3, Klf2;Klf4,Klf2;Tbx3, Klf4;Tbx3, Klf2;Klf4;Tbx3 欠損 ES 細胞に加え、Klf5 ならびに Klf2;Klf4;Klf5 誘導型欠損 ES 細胞を、遺伝子標的組み換えにより作製した。これらのうち、Klf2;Klf4;Tbx3 欠損 ES 細胞と Klf2;Klf4;Klf5 欠損 ES 細胞が ES 細胞として自己複製できないという表現型を示した。次に、これらの誘導型欠損 ES 細胞の機能補償実験を行い、Esrrb などの転写因子の人為的発現が Klf2;Klf4;Tbx3 欠損 ES 細胞の自己複製を維持できる事、Klf family member 以外のいかなる転写因子も Klf2;Klf4;Klf5 欠損 ES 細胞の自己複製を維持できないことを確認した。

(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

【内容】我々はこれまでに、Piggy Bac vector system を用いた高効率2次 iPS 細胞作成系の構築を進めてきた。今後はこれを完成させ、iPS 細胞誘導において、我々がこれまでに多能性維持に機能的に関与する事を同定してきたエピジェネティック因子 (Myst2, Myst4 etc) について、多能性誘導への機能的寄与を検討したい。

【本年度の実施内容】2次 iPS 誘導システムを用いて、Myst2 ならびに Myst4 が reprogramming 過程を促進することを確認した。このとき、iPS 細胞の誘導効率の増加のみならず、より早期にキメラ寄与能を持つ iPS 細胞が誘導された事から、エピジェネティック因子の協調効果の特異性が明らかになった。

(3) ヒト型多能性幹細胞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

【内容】これまでに、着床前胚(主に胚盤胞)から樹立されたマウス ES 細胞とヒト ES 細胞は、共通の多能性関連転写因子群を発現しているにもかかわらず、液性因子依存性 (LIF vs FGF2+Activin)、増殖速度(速い vs 遅い)、コロニー形態(多層性 vs 単層性)などの点で著しく異なる特性を示すことが知られている。これらの特性の差は、同じ遺伝子セットで誘導したマウス iPS 細胞とヒト iPS 細胞でも同様であることから、マウスとヒトの遺伝的な差により規定されているとも考えられる。しかし、着床後マウス胚から樹立された多能性幹細胞である EpiSC は、上記特性においてヒト ES 細胞に近い性質を示す。従って、「マウス型」多能性幹細胞と「ヒト型」多能性幹細胞の差は絶対的なものではなく、基本的には培養中で安定化した多能性状態の発生段階の差を反映しており、「マウス型」での安定化能が遺伝的にマウスではヒトより高いと推測される。この仮説を検証するためには、まずマウスの「マウス型」多能性幹細胞(=ES 細胞)と「ヒト型」多能性幹細胞(=EpiSC)をより厳密に識別出来るシステムの構築が必要となる。我々は、X 染色体不活性化がこの識別のよいマーカーになりうる事を見出し、これを可視化するシステムの構築を目指す。

【本年度の実施内容】雌マウス ES 細胞の X 染色体に挿入するべき蛍光マーカー遺伝子の発現制御システムとして、Gal4TD-UAS 転写活性化システムを構築し、その動作を確認した。さらに、この

発現システム(CAG-Gal4TD ならびに UAS-CMVp-dEgfp-IH)を Hprt 遺伝子標的組み換えベクターに挿入した。また、Oct3/4 誘導型欠損 EpiSC の解析から、EpiSC では Oct3/4 の発現抑制は栄養外胚葉分化プログラムを起動させるものの、その動作は不完全であり、栄養外胚葉幹細胞への分化は誘導できない事を明らかにした。

(4) 転写因子ネットワークのノード構造の解明

【内容】iPS 細胞誘導の場合に見られるように、複数種の転写因子が協調的に働くとき、これらが具体的にどのように機能しているのかは、これまで明らかにされていない。我々はこれまでの解析から、Oct3/4 と Sox2 が直接の結合を介して遠隔制御配列に協調的に結合し、これによる転写活性化が、プロモーター近傍に結合した Klf4 により媒介されることを、Lefty1 遺伝子の発現制御機構の解析から明らかにした。しかし、一方で、Cdx2 遺伝子の発現制御機構の解析から、7~8個の転写因子が主として蛋白質相互作用を介して協調的に転写活性化能を発揮することを見出した。このことは、実際の転写活性化の機能単位としては、Oct3/4, Sox2, Klf4 に加えて、幾つかの内在性転写因子が複合体形成に寄与し、標的遺伝子の転写活性化を協調的に司っている可能性を示唆する。事実、これまでに同定されてきた Oct3/4+Sox2 の標的遺伝子プロモーター (Oct3/4 promoter, Sox2 promoter を含む)は、分化細胞においては Oct3/4+Sox2 だけでは弱い活性化しか認められない。そこで、これらのレポーター遺伝子を用いて、複数個の多能性関連転写因子発現ベクターの共導入による転写活性化を検討し、Oct3/4+Sox2 と協調的に機能しうる多能性関連転写因子の組み合わせを同定する。次に、これらをレトロウイルスを用いて分化細胞に導入し、iPS 細胞誘導効率への影響を検討する。また、この協調できる多能性関連転写因子の組み合わせに関する知見を転写因子ネットワークモデル構築に反映させ、その構造解明を目指す。

【本年度の実施内容】これまでに同定した Oct3/4luciferase reporter を協調的に活性化出来る転写因子の多くが、Klf2:Klf4:Tbx3 欠損 ES 細胞の自己複製を維持できることを見いだした。

(5) 多能性獲得の指標となる遺伝子の同定

【内容】多能性誘導に機能的に重要な役割を果たす内在性遺伝子は、誘導過程の初期に活性化されると考えられる。しかし、現在の方法による iPS 細胞の誘導では、その効率の低さゆえに、初期の過程を解析することは極めて難しい。我々は、上述の高効率2次 iPS 細胞誘導系を用いて、多能性誘導過程の初期に活性化される遺伝子をリストアップし、その誘導状態を、分化細胞からの iPS 細胞誘導過程で解析することにより、多能性獲得の指標となる遺伝子の同定を目指す。また、より直接的な方法として、遺伝子トラップ法の応用も検討する。即ち、まずマウス ES 細胞において、プロモータートラップ型遺伝子トラップベクターを導入し、ES 細胞で発現している遺伝子をトラップしたクローンのプールを作成する。次に、これらのトラップクローンのプールをレチノイン酸処理などの手法により強制的に完全に分化させ、トラップした遺伝子の発現が消失する(=レポーター遺伝子の発現が分化誘導により消失する)細胞を FACS で選択する。そして、これらのクローンに Oct3/4, Sox2, Klf4 を発現させ、3日以内にトラップした遺伝子の発現が活性化する(=レポーター遺伝子の発現が誘導される)細胞を再び FACS で選択し、これらをその後 iPS 誘導条件で培養することにより、iPS 細胞を得る。このとき、これらの iPS 細胞は複数の異なる遺伝子をトラップしたクローンに由来するが、その遺伝子を早期に発現した細胞が高い効率で iPS 細胞になれるものが濃縮されているはずである。この過程をもう一度繰り返し、その後得られた iPS 細胞において、トラップされた遺伝子群を解析することにより、多能性獲得の指標となる遺伝子の同定を目指す。これらの

手法により同定された遺伝子について、その発現制御機構を詳細に解析し、多能性誘導過程における多能性関連転写因子群の機能を明らかにする。

【本年度の実施内容】薬剤耐性遺伝子 neo をマーカーとするトラップベクターを、ホルモン誘導型 Gata6 により胚体外内胚葉に分化誘導可能な2次 iPS 細胞誘導システムに導入し、未分化細胞で G418 耐性で、分化細胞では G418 感受性となり、reprogramming 誘導2日目から再び G418 耐性となるトラップクローンを30個以上得た。また、上述の Gal4TD-UAS 転写活性化システムが顕著な転写活性増幅能を有する点に注目し、これを応用した表面マーカーThy-1 をレポーターとする新たなトラップベクターを構築し、その動作を確認した。

(6) 多能性転写因子ネットワークモデルの構築

【内容】上記研究結果を総合的に解釈して、機能的に実証された多能性転写因子ネットワークモデルの構築を行う。具体的には、我々がえる全ての動的变化に関する結果を説明しうるような、ゲノムを網羅したモデルというよりも、限定された数の転写因子で構成されたネットワークモデルの構築を目指す。最終的には、これを極めて単純化した形へと還元し、一般に直感的に理解可能なものとする。

【本年度の実施内容】誘導型欠損 ES 細胞における内在性遺伝子発現パターンに基づき、ブーリアン型ネットワークモデルの構築を試みた。この結果、genotype-gene expression pattern の組み合わせを増加させれば、これに基づく転写因子ネットワークモデルの構築が可能である事を失する予備的知見を得る事が出来た。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Gottgens, B., Niwa, H. and Smith, A.: Esrrb is a pivotal target of the GSK3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, **11**, 491-504, 2012 (DOI:10.1016/j.stem.2012.06.008)
2. Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S. and Niwa, H.: E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS One*, **7**, e45220, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0045220)
3. Iwafuchi-Doi, M., Matsuda, K., Murakami, K., Niwa, H., Tesar, P. J., Aruga, J., Matsuo, I. And Kondoh, H.: Transcriptional regulatory networks in epiblast cells and during anterior neural plate development as modeled in epiblast stem cells. *Development*, **139**, 3926-3937, 2012. (DOI:10.1242/dev.085936)