

研究報告書

「iPS法と核移植法の比較による初期化機構の解明」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：荒木 良子

1, 研究のねらい

iPS細胞樹立は、再生医療のみならず、発生分化の理解および応用において多大なる可能性を有する発見であり、その機構の分子レベルでの理解は極めて重要である。本課題では、iPS細胞樹立の過程でいつどのような反応が生じ、どのような分子が関与するのか明らかにすることを目標とする。この目標を達成するため、樹立した細胞の多能性の実験的証明、更には体細胞核移植法によるリプログラミングの実験も可能なマウスの系を用いて、iPS細胞及びその樹立過程の分子解析を試みる。

2, 研究成果

2-1 体細胞から iPS 細胞化への劇的な変化は遺伝子導入後3日以内に始まっている

まず初めに、体細胞への Yamanaka4 因子導入後、どの細胞が、いつどのような変化を経て iPS 細胞の特徴を獲得するか、単一細胞レベルでの形態学的観察を試みた。iPS 細胞が樹立できる確率は 1000 細胞に 1 個程度であることに加え、細胞の移動・分裂が激しいことから、iPS 化の開始から完成までの一連の経過を捉えることは予測通り困難を極めた。我々は、当時長期間連続撮影に適応していなかったインキュベータ内でのタイムラプス顕微鏡撮影システムを改良し、単一細胞レベルで追跡できる広視野(数mm四方)、高解像度(対物レンズ10倍)での短インターバル(7.5min)でかつ長期(2週間)の連続撮影(明視野および蛍光)記録に成功した。この様にして記録した個々の画像を2次元、時間軸でつなぎ合わせ、14日目にはっきり確認出来た iPS 細胞コロニーから最初の体細胞迄を「遡り追跡」するシステムを構築した。解析の結果、iPS 細胞の一部の特徴を有する細胞が4因子感染後3日以内には既に出現し、その後段階的に変化しながら iPS 細胞に至っていることを明らかにした(図1, Stem Cells, 2010)。今後行う、新たな iPS 細胞誘導因子等の解析も含め、iPS 細胞機構の理解において本システムは強力なツールとなる。

2-2 比較解析に最適な近交系 C57BL/6 マウス iPS 細胞株の樹立

iPS 細胞樹立効率に関わる因子、樹立された iPS 細胞の質の評価等を正しく行うためには、多くの場合比較する細胞の遺伝的バックグラウンドを統一させること

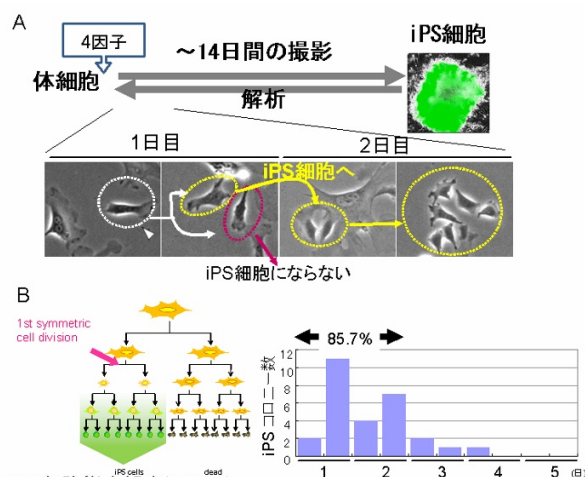


図1 iPS細胞樹立観察システム
(A) iPS細胞の出現の瞬間を解析するアッセイ系 (B) 1つのiPS細胞のコロニーを形成する細胞が出現した時間(1st symmetric cell divisionの時間)を示した。

が必要となる。そこで種々の近交系マウス線維芽細胞について樹立効率の比較を行い、全ゲノムプロジェクトの対象にもなり最も広く研究に使われている C57BL/6 マウスにおいて iPS 細胞形成効率が高いことを明らかにした。この結果に基づき、C57BL/6 マウスの線維芽細胞を用いて種々の条件において iPS 細胞樹立を行ったところ、(効率が低くなる) c-Myc を除く 3 因子のみでも、ゲノムへのインテグレーションの無い iPS 細胞樹立に初めて成功した(J Biol Chem, 2010)。

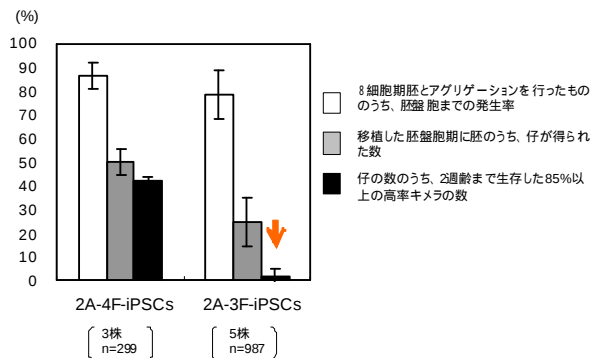


図2 外来性c-Myc遺伝子のiPS細胞の個体発生に与える影響
すべて、genomic integration無いiPS細胞のみで解析を行った。

2-3 外来性 c-Myc の導入は、樹立効率の上昇だけでなく、幹細胞の多能性、即ち質の向上に決定的な役割を有する

iPS 細胞形成の効率は、外来性 c-Myc の導入により 10 倍以上上昇することが知られているが、レトロウイルスベクター等でゲノムに癌遺伝子である c-Myc が残ってしまい、iPS 細胞由来の個体で後に再活性化し、癌化の危険性を高めることなどから、再生医療を目的とする場合、はじめから導入を避けるか、後に除去する必要があると考えられている。

我々は、c-Myc を除く 3 因子の一過性発現で樹立した C57BL/6 iPS 細胞 (genomic integration 無し) を詳細に調べ、個体への寄与が著しく低下しており、多能性が低下することを明らかにした (図 2)。更にこの多能性の低下は樹立後に HDAC 阻害剤処理により改善された (Stem Cells, 2011)。これらの結果は、c-Myc の機能が、iPS 細胞樹立効率の上昇だけでなく、多能性の獲得という細胞の「質」に深く関わっていることを示していた。多能性の獲得が完全ではない iPS 細胞を用いた場合、ある細胞には分化できても他の細胞には分化できない、という場合が生じる可能性がある。更には、完全ではない iPS プログラミングから、思わぬ異常が将来出現する可能性は否定できない。これらのデータから、キメラ実験を行えないヒト iPS 細胞樹立においても、本当に c-Myc が頻度への影響だけに限定できるのか、慎重に検討を行う必要があると考えている。

2-4 iPS 細胞におけるゲノム変異の解析 (iPS vs ES 細胞)

iPS 細胞の「質」の確認は再生医療において極めて重要な問題である。最近になり、iPS 細胞と ES 細胞の違いがクローズアップされ、それらの中には iPS 細胞の臨床利用にブレーキをかける内容も含まれている。しかし、多くの場合、比較に用いられてきた iPS 細胞と ES 細胞は、別の場所、別の目的で作出され、遺伝的背景、培養条件、樹立後の継代数等、様々なファクターが大きく異なっており、正確な比較解析は困難に見える。我々はこれらの諸問題を解決するため、近交系マウス C57BL/6J から、多数の ES 細胞、およびゲノムへの外来遺伝子挿入の無い iPS 細胞株を、培養方法、培養期間なども極力同一になるよう配慮し樹立し、キメラマウス作製、ジャーミングライントランスミッション実験により多分化能が確認されたクローンのみを用いて、ゲノム全体 (エクソンだけでなく) における point mutation の頻度に違いがあるか否か比較を試みた。ゲノム

変異の検出のため、iPS細胞を樹立したまさにその個体のゲノム、また、ES細胞の場合は、樹立に用いた胚盤胞の両親ゲノムを保存しておき、実験に用いた (parental genome の確保)。イルミナ HiSeq2000 による whole genome sequencing を行い、公共データベース上の C57BL/6 リファレンスゲノム配列に mapping 後、single nucleotide variation を抽出し、parental genome に存在しない変異候補を絞り込んだ。その結果、iPS細胞ゲノムではES細胞に比べ、5 から 20 倍の点突然変異が高頻度に生じており、一つの iPS 細胞株で 1000 箇所以上の変異の存在が示唆された。

3, 今後の展開

これまでの解析から、c-Myc が iPS 細胞化におけるヒストン修飾制御において重要な役割を担っている可能性を示唆するデータを得ている。ヒストン修飾の更なる解析を行い、リプログラミング機構の理解にトライしたい。また、4 因子導入後 3 日までに生じる分子変化を明らかにするため、この間に誘導される遺伝子群の同定を行い、iPS 細胞形成に影響を与える分子をコードする遺伝子の同定にも成功している。今後、これらの遺伝子について、リプログラミングにおける役割の詳細を明らかにする。また、mutation が生じる機構について解析する必要があると考えている。

4, 自己評価

さがけ期間中、iPS 細胞化のメカニズム理解に向けて、アッセイ系の確立、オリジナルの材料の作製、そしてそれらの validation などに注力した。その過程で、1) iPS 細胞の特徴を獲得する極早期のステップを同定、2) 誘導因子の一つである c-Myc は多能性の獲得に極めて重要であり、そしてその効果は HDAC 阻害剤にて代替可能であること、3) iPS 細胞の樹立過程にゲノム変異が生じやすいステップが存在する可能性があることを示すことに成功した。これらの結果より、リプログラミングのどこのステップに研究を集中すべきか、混沌の中から突破口を発見できたことに大きな意義があり、目標の一部を達成した。今後リプログラミング機構の反応の特異性の解明に到達できるよう進めて行きたい。

5, 研究総括の見解

初めての分野で、また準備もなく最初は苦労したと思われる。ただ、最終的に上手く纏めて、iPS についての論文を3報も発表したのは評価できる。ただ、この分野をリードする業績を上げる事が出来たかと言う点では、まだまだである。幸い、このプロジェクトが始まるまで研究を進めていた本来の専門分野との接点が見つかって来ているようなので、独自の分野を切り開く事を期待したい。

6, 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Araki R, Hoki Y, Uda M, Nakamura M, Jincho Y, Tamura C, Sunayama M, Ando S, Sugiura M, Yoshida MA, Kasama Y, Abe M. Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**. 2011 29:1362-70.
2. Jincho Y, Araki R, Hoki Y, Tamura C, Nakamura M, Ando S, Kasama Y, Abe M.

Generation of genome integration-free induced pluripotent stem cells from fibroblasts of C57BL/6 mice without c-Myc transduction. **J Biol Chem.** 2010 285:26384-9.

3. Araki R, Jincho Y, Hoki Y, Nakamura M, Tamura C, Ando S, Kasama Y, Abe M. Conversion of ancestral fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Stem Cells.** 2010 28:213-20.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1: c-MycはiPS細胞の多能性獲得において重要な役割を担っている

宇田 昌広, 荒木 良子, 法喜 ゆう子, 中村 美樹, 安藤 俊輔, 神長 祐子, 杉浦 真由美, 砂山 美里, 笠間 康次, 安倍 真澄

第34回日本分子生物学会、横浜、2011

2: マウスiPS細胞およびES細胞における点突然変異のゲノムワイド解析

杉浦 真由美, 荒木 良子, 笠間 康次, 砂山 美里, 安藤 俊輔, 法喜 ゆう子, 宇田 昌広, 中村 美樹, 安倍 真澄

第34回日本分子生物学会、横浜、2011

3: iPS細胞誘導初期に関与する遺伝子のスクリーニング

安藤 俊輔, 藤森 ゆう子, 神長 祐子, 宇田 昌広, 中村 美樹, 砂山 美里, 笠間 康次, 荒木 良子, 安倍 真澄

第34回日本分子生物学会、横浜、2011

4: c-Myc plays a crucial role in generating full developmental potential of iPSCs

Hoki-Fujimori Y, Araki R, Jincho Y, Uda M, Nakamura M, Ando S, Sunayama M, Kasama Y, Abe, M. ISSCR 9th meeting, Toronto 2011

5: A-large number of point mutations in mouse iPS cells

Abe M, Hoki-Fujimori Y, Jincho Y, Kasama Y, Ando S, Sunayama M, Uda M, Nakamura M, Araki R. ISSCR 9th meeting, Toronto 2011

6: Positive effect of c-Myc transduction in iPS generation

Hoki-Fujimori Y, Araki R, Jincho Y, Uda M, Nakamura M, Ando S, Abe M. ISSCR 8th meeting, San Francisco 2010

7: A mouse strain that is sensitive for iPS generation: C57BL/6

Jincho Y, Araki R, Hoki-Fujimori Y, Uda M, Nakamura M, Ando S, Abe M. ISSCR 8th meeting, San Francisco 2010

8: Identification of the genes which are induced at the initial step of iPS cells generation from mouse fibroblasts

Abe M, Ando S, Hoki-Fujimori Y, Jincho Y, Araki R. ISSCR 7th meeting, Barcelona 2010