

研究報告書

「任意細胞の樹立法開発」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：升井 伸治

1, 研究のねらい

分化は、何が決めるのだろうか？ 近年の報告から、少数の転写因子が大きな役割を果たすことがわかってきた。例えば、Oct3/4 を含む4因子の強制発現は誘導多能性幹 (iPS) 細胞を誘導し、Hnf4a を含む2因子の強制発現は誘導肝細胞 (iHep) を誘導する。こうした誘導活性をもつ転写因子 (誘導因子) を様々な細胞で同定できれば、試験管内作出法につながり、再生医療や疾患モデリングに大きく貢献するだろう。

そこで本研究では、任意細胞に適用可能な機能アッセイを構築し、これを用いた誘導因子同定法の開発を行った。

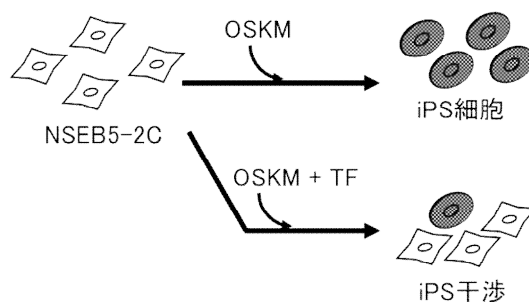
2, 研究成果

2-1 iPS 化を用いた機能アッセイ

ES/iPS 細胞は、分化すると、ES/iPS 細胞特異的な発現プロファイルを失う。逆に、分化細胞は、iPS 化すると、その特異的な発現プロファイルを失う。このことから、ES/iPS 細胞と分化細胞の発現プロファイルは、共存できないと考えられる。したがって、iPS 化と同時に、分化細胞の発現プロファイルを維持する因子を強制発現すると、iPS 化の効率を下げる、と予想できる (iPS 干渉)。逆に考えれば、iPS 干渉を指標に、分化細胞の発現プロファイルを維持する因子がとれるだろう。ちなみに、iPS 化を阻害する分子として、p53 や Ink4a/Arf など様々なものが既に知られていたが、本研究ではあらかじめそれらを除いて、細胞種特異的に発現する転写因子のみについて解析した。

まず扱いやすいセルライン (NSEB5-2C; neural progenitors に似た性質を部分的にもつ) を用いて、比較的高発現している転写因子158個を、1因子ずつ、iPS 化と同時に強制発現を行い、iPS コロニーの変動を解析した (OSKM; Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)。

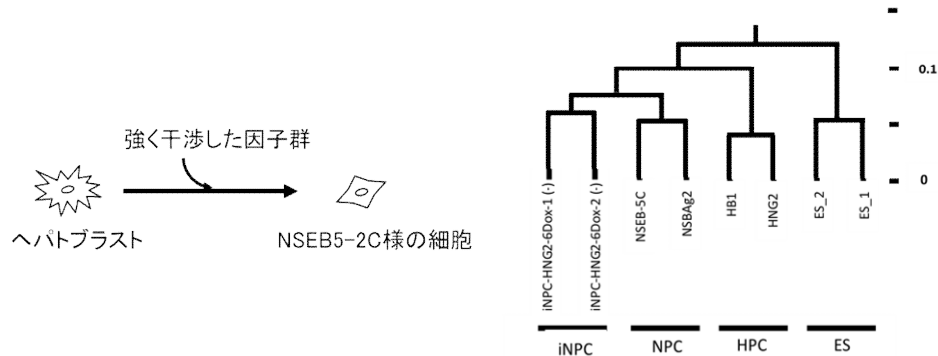
他の様々な実験の結果も合わせると、iPS 干渉の度合いによって、発現プロファイルの維持活性が測定できると考えられた。すなわち、最も強く干渉する因子は、最も強く発現プロファイルを維持すると予想できる。



2-2 NSEB5-2C における干渉因子は NSEB5-2C 様発現プロファイルを誘導できる

強い干渉がみられた因子は、発現プロファイルを強く維持するのならば、誘導因子として機能するのではないだろうか？ これを調べるために、最も強く干渉した6因子を別の細胞 (胎児肝由来ヘパトブラスト; HPC) へ共導入し、NSEB5-2C 様の発現プロファイルが誘導されるかを解析

した。結果として、NSEB5-2C 様の網羅的発現プロファイルをもつ細胞が誘導された（下図右：NSEB5-2C は NPC、誘導された細胞は iNPC と略記）。したがって、6 因子は誘導因子として機能したと考えられる。



2-3 HPC における干渉因子は肝細胞系譜の誘導因子を含む

iPS 干渉法を用いて、NSEB5-2C の誘導因子を同定できた。ではこの手法は、他の細胞にも使えるのだろうか？これを調べるために、HPCを用いて iPS 干渉アッセイを40 因子について行い、強く干渉する4 因子を同定した。この4 因子には、Hnf4a などの iHep 誘導因子が含まれていた。すなわち、肝細胞系譜の細胞において iPS 化に干渉する因子は、肝細胞系譜の誘導因子を含むといえる。まとめると、発現プロファイルが大きく異なる二種類の細胞で誘導因子を同定できたから、その他多くの細胞において、iPS 干渉法を用いて誘導因子を同定できると示唆される。

3、今後の展開

iPS 干渉法は、転写因子の機能知見の増大に貢献し、分化が関与する広い分野の研究を加速できるだろう。

誘導された細胞のエピゲノムを解析すれば、誘導因子の作用をエピゲノム変化で定義できるだろう。様々な細胞種を用いて誘導因子同定とエピゲノム解析を行えば、分化一般法則の構築につながり、誘導因子の予測法開発にもつながる。

転写因子以外の遺伝子についても iPS 干渉アッセイを行えば、分化維持への貢献度を測定できると考えられる。これを全てのシグナル伝達分子について行えば、分化維持に重要なシグナル経路が多く明らかになるだろう。誘導因子と共に用いれば、より高効率な分化法開発につながる。

がん細胞の誘導因子やシグナル伝達分子 (の組み合わせ) を同定すれば、その阻害剤 (の組み合わせ) を用いた除去法開発も期待できる。

4、自己評価

転写因子の種類は1000 以上あり、これらの組み合わせが様々な細胞の発現プロファイル構築に大きな役割を果たす。ターゲットの数は転写因子によって異なるから、「誘導 (分化転換／ダイレクトリプログラミング)」としてみている現象は、発現プロファイルへのコントリビューションが大きい転写因子の、累積的な作用と考えられる。すなわち、誘導／分化転換／ダイレクトリプログラミングにおいては、より強力な誘導因子を、より多く導入すれば、目的の細胞により近づくと考えられる。実際、MEF への OKM 導入では、iPS 細胞の発現プロファイルを部分的に

もつ細胞が得られる。そのため、本研究では「誘導された細胞を得ること」を目的とせず、発現プロファイル誘導活性(部分的にでも)をもつ因子の同定法開発に集中した。そのため、材料として(割り切って)扱いやすいセルラインを用いたが、これが功を奏し、当初目的を達成できた。

5, 研究総括の見解

良く言えば論理的、悪く言えば独断的な計画で、実際にどこまで研究が進むか懸念したが、予想以上の成功を収めたと評価している。残念ながら、論文を然るべき雑誌に発表するのに大変苦勞しているようであるが、彼なしには成し得ないオリジナルな研究であり、今後とも持論を大いに展開してってもらいたい。

6, 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Konno M, Masui S, Hamazaki TS, Okochi H. Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain. J Biotechnol. 154:298-303, 2011 |
| 2. Ura H, Murakami K, Akagi T, Kinoshita K, Yamaguchi S, Masui S, Niwa H, Koide H, Yokota T. Eed/Sox2 regulatory loop controls ES cell self-renewal through histone methylation and acetylation. EMBO J. 30:2190-204, 2011 |
| 3. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. J Biol Chem. 286:11593-603, 2011 |
| 4. Masui S. Pluripotency maintenance mechanism of embryonic stem cells and reprogramming. Int J Hematol. 91:360-372, 2010 |
| 5. Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. Stem Cells 27:1066-1076, 2009 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件

発 明 者: 升井伸治、大河内仁志、浜崎辰夫

発明の名称: 複数の遺伝子発現を行うための発現ベクター

出 願 人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出 願 日: 2008年10月7日

発 明 者: 升井伸治、引地貴亮

発明の名称: コアネットワーク構成転写因子の同定方法

出 願 人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出 願 日: 2009年10月14日

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Masui S. Functional analysis of Sox2 in differentiation of extra-embryonic endoderm

lineages, 2nd International SOX meeting, Japan, 2008.9.16.

2. 升井 伸治、「iPS 細胞が再生医療の扉を開く」、シーアンドアール研究所、2009 年 10 月 5 日 (単行本)