

「iPS 細胞と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成24年度終了研究課題－

研究総括 西川 伸一

1. 研究領域の概要

本研究領域は、日本発となる iPS 細胞を樹立する技術によって大きなブレークスルーがもたらされと考えられる分野、すなわち、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学などを対象としている。また、これまでにない自由で創意に満ちた発想による基礎研究とともに、医療などに将来貢献できる基礎研究も対象としている。

具体的には、1)リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2)幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3)iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構解析、4)iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5)ヒト疾患モデルの構築などの研究を対象とする。

これら研究の成果は、疾患の原因の解明や新治療薬の開発に寄与するとともに、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現に向けて貢献できるものと信じている。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 8件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「iPS 細胞と生命機能」領域に設けた選考委員7名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryou4.html>) の他、特に下記二点を重視した。

①オリジナリティー： 研究提案が分かりやすく、十分に独創的である。

②実力・可能性： 研究提案書や過去の実績から考えて、テーマ遂行に十分な実力・可能性がある。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー7名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ2課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			11件	内 訳	3年型	8件
対象数	78件	22件			5年型	3件(1件)

()内は大挑戦型としての採択数。

備考：

1)平成 21 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・依馬研究者、大日向研究者、房木研究者

研究期間が 5 年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果：

http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/33iPS_H24mid_ev.pdf)

5. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議: 9回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究成果報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 25 年 1 月	評価会開催
平成 25 年 2 月	研究総括による事後評価
平成 25 年 3 月	被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

9. 事後評価

第二期・三年型の研究者8名については、総じてほぼ当初の期待通りの研究成果が得られたと感じる。今後は更なる研究進展を目指し、さががけの領域で得られたネットワークも大いに活用して精進していただきたいと考える。なお各研究者の研究成果とそれに対する事後評価を、以下に個別に記載する。

1. 片岡研究者「iPS 技術による血液、血管内皮細胞の誘導」

本来の目的は iPS 細胞から血液血管細胞を高効率に誘導する方法の開発であったが、残念ながらそこまでは到達できていない。ただ、これを可能にすると考えた Etv2 分子の研究については最高レベルの解析を行い、この分子の機能についてほぼ明らかにし、いくつかの論文にまとめている。また、同じさががけの依馬研究者などと共同研究を行い、論文作成にまで至っている。このように、productivity という面では高く評価できる。積み上げた膨大な解析データの全てをまだまだ論文に出来ていないようで、まずこれらを論文として発表する事を期待する。

2. 栗崎研究者「リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明」

網羅的解析から分子(TIF1b)を同定し、その分子の解析を通じて現象に迫ると言う極めてオーソドックスな手法で研究をしている。TIF1b がリン酸化される事でリプログラミングに関わる事を示し、論文にまでまとめた事は、iPS 研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。メカニズムについては、完全に明らかになった訳ではないが、オーソドックスな解析を地道に続ける事で進展すると予想する。希望としては、新しい展開のためには、これまでとは違ったスタイルの開拓も必要ではないかと思う。オーソドックス、地道に加えて、豊かな感性とか、豊富なアイデアなどの言葉が加わった研究者になってほしい。

3. 佐藤研究者「細胞リプログラミングの段階的制御」

これまで日本の貢献の多い両生類再生研究を担う若手として採択した。再生研究としての一定のレベルの業績を上げ、また専門誌に論文を発表しており、業績としては評価できる。本人の能力から考えると、当然の結果と言える。ただ、この分野の根本問題を整理し、それを独自の方法で解き、新しい分野を開拓すると言う点では、もう一度原点に戻って考え直してみる事も重要ではないかと思う。

4. 永松研究者「生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発」

iPS の多能性維持のメカニズムを生殖細胞との比較で考えようとするもので、プロジェクトとしては手堅いプランである。実際、様々な条件で始原生殖細胞から iPS 誘導を行う条件を確立し、この系を用いて様々な問題について検討し、多くの論文を発表した事は期待通りである。ただ、手堅い手法のみでは、より困難で根本的な問題を見つけ、それに挑戦する事は難しい。十分実力がある研究者であると期待しており、次は、このような問題にも積極的にチャレンジしてほしいと希望している。

5. 堀江研究者「順遺伝学による iPS 細胞生成機構の解析」

もともとES細胞を利用する順遺伝学システム作りを中心に研究を行っていたが、実際には突然変異形質をどう見つけるかに大きな課題を抱えていた。この問題を一定程度解決する可能性を iPS と分化抵抗性というフェノタイプに求め、いくつかの遺伝子同定にまで至った事は評価できる。解析が間に合わず、期限内に論文発表にまで至らなかったのは残念であるが、今回同定した遺伝子はこれまで調べられているものではない事から、地道に解析を進める事で重要な貢献が出来るのではと期待している。

6. 本多研究者「ウサギを用いた iPS 細胞総合(完結型)評価系の確立」

計画されたプロジェクトは比較的単純で、ウサギというモデル動物を iPS も含め、様々な胚操作が可能な系に仕上げるというものである。プロジェクトに参加する以前から ES 細胞樹立などを進めており、全体のシステムを構築するという長いスパンの期待を込めて採択している。期間中にウサギ iPS の樹立を行い、論文に報告した事、またナイーブ状態の iPS 作製への手がかりを得ている事、更にキメラ系性能を持つ iPS の作製のための準備など、着実に研究が進んでいる。今後も、ウサギの胚操作の中心研究者となるよう、これまでの研究を地道に進めることを希望する。

7. 李研究者「細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立」

生後すぐに増殖を停止し、そのまま活性化されるまで停止期を維持する卵子を試験管内で増殖させようとする、ある意味では大挑戦的、ある意味では独断的な計画である。残念ながら、期待通りに卵子を試験管内で増殖させるところまでには至らなかった。これは外側から見ると当然の事とも言える。しかし、この挑戦を通して本人は卵子の増殖と成熟という、あまりよく分かっていないが重要な研究分野へもう少し地道なアプローチをするための準備ができたのではないかと期待している。

8. 渡部研究者「リプログラミング技術を用いた遺伝性血管疾患の新規治療標的の同定」

現在国を挙げての研究が始まっている疾患 iPS 研究のさきがけとして、得意の血管分野と TGF シグナルを組み合わせた疾患を選び iPS を使って研究する手堅いプランといえる。期待通り、患者さん由来の iPS を作製するところまでは進んでいるが、病態と関連する現象を試験管内で得られるというところまでは進展しなかった。これについては、今後も解決すべき多くの問題が残っていると思う。時間がかかっても是非、疾患 iPS の有用性が示せるところまで研究を進展させてほしい。研究の過程で、TGFβ阻害剤が iPS 化を促進するという発見をし、これが KLF4 に媒介されている事を示した結果はこの分野の重要な貢献であると思う。早急に論文にする事を期待する。

10. 評価者

研究総括 西川 伸一 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
グループディレクター(副センター長)

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 25 年 3 月末現在)

石野 史敏	東京医科歯科大学 難治疾患研究所・教授
岡野 栄之	慶応義塾大学 医学部・教授
相賀 裕美子	情報-システム研究機構 国立遺伝学研究所・教授
中内 啓光	東京大学 医科学研究所・教授
丹羽 仁史	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター・プロジェクトリーダー
花園 豊	自治医科大学 分子病態治療研究センター・教授
春山 英幸	第一三共 RD アソシエ株式会社・代表取締役社長

(参考)

件数はいずれも、平成25年3月末現在。

(1)外部発表件数



	国 内	国 際	計
論 文	0	26	26
口 頭	11	18	29
その他	3	0	3
合 計	14	44	58

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
1	0	1

(3)受賞等

・本多 新 研究者

日本実験動物学会・奨励賞(H23.5)

(4)招待講演

国際 3 件

国内 5 件

「iPS 細胞と生命機能」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成25年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
片岡 宏 (専任)	iPS 技術による血液、血管内皮細胞の誘導 (独)理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター)	(独)科学技術振興機構 さきがけ研究者 (独)理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 研究員)	37
栗崎 晃 (兼任)	リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明 (独)産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター)	(独)産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター チーム長 (独)産業技術総合研究所 器官発生工学研究ラボ 主任研究員)	39
佐藤 伸 (兼任)	細胞リプログラミングの段階的制御 (岡山大学 異分野融合先端研究コア)	岡山大学 異分野融合先端研究コア 准教授 (岡山大学 異分野融合先端研究コア 助教)	47
永松 剛 (兼任)	生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発 (慶應義塾大学 医学部)	慶應義塾大学 医学部 助教 (慶應義塾大学 医学部 助教)	40
堀江 恭二 (兼任)	順遺伝学による iPS 細胞生成機構の解析 (大阪大学大学院 医学系研究科/奈良県立医科大学 医学部)	奈良県立医科大学 医学部 教授 (大阪大学大学院 医学系研究科 准教授)	41
本多 新 (兼任)	ウサギを用いた iPS 細胞総合(完結型)評価系の確立 (独)理化学研究所 遺伝工学基盤技術室/宮崎大学 テニュアトラック推進機構)	宮崎大学 テニュアトラック推進機構 准教授 (独)理化学研究所 遺伝工学基盤技術室 協力研究員)	41
李 知英 (兼任)	細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立 (東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE 拠点)	東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE 拠点 GCOE 特任講師 (東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE 拠点 GCOE 特任講師)	43
渡部 徹郎 (兼任)	リプログラミング技術を用いた遺伝性血管疾患の新規治療標的の同定 (東京大学大学院 医学系研究科)	東京大学大学院 医学系研究科 准教授 (東京大学大学院 医学系研究科 准教授)	39

研究報告書

「iPS 技術による血液、血管内皮細胞の誘導」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 片岡 宏

1. 研究のねらい

iPS 細胞の作成方法およびその効率化については種々の進歩が報告されているが、臨床応用のためには分化誘導技術の改良が必要である。血液、内皮細胞は治療上有用な細胞集団であり早くから ES 細胞を用いた分化誘導が研究されているが、実際のマウス胎児内での発生、分化過程が完全に理解されているわけではなく ES 細胞からの試験管内分化でも完全な方法は確立されていない。特に移植が可能な血液を ES 細胞から作るには特定の転写因子を遺伝子導入し強制発現させることが必要とされており、生理的に妥当な方法とはいいがたい。試験管内で生理的な造血が再構成できない原因としては未知の因子の機能が十分に解明されていないために至適な造血環境が再現できていない可能性が高い。血液、内皮細胞の分化過程を詳細に解析する目的で ES 細胞を中胚葉、血管内皮、血液に分化誘導し、その培養系において各分化段階の遺伝子発現解析を行った。この解析から内皮、血液分化を促進する必須因子として Ets ファミリーのひとつである Etv2 を見いだした。Etv2 を欠損させるとマウス胚で内皮、血液が完全に消失し、これらの細胞系譜を決定するマスター遺伝子であることがわかった。残念ながらこの劇的なノックアウトの表現型は我々の解析中にアメリカのグループから先に報告されたが、ES、iPS 細胞から中胚葉を経て内皮、血液を誘導する際には考慮すべき最重要因子であり、Etv2 を手がかりとした血液、内皮分化過程の解明、ES 細胞等での Etv2 発現の効果など検討した上で Etv2 を利用して幹細胞からの内皮、血液の効率的な誘導法の開発を目指して研究を進めた。

2. 研究成果

(1) 概要

1) Etv2 の血液、内皮細胞発生における役割の解析

Etv2 の発現をマーカー遺伝子ノックインマウス、ES 細胞にて解析し、機能的な意義を Etv2 欠損マウス、ES 細胞を用いて検討した。

2) Etv2 の一過性発現の必要性に関する検証

Etv2 の一過性発現の重要性をマウスの発生過程で検討した。Etv2 が持続発現するマウスでは正常の血管、血液の発生が阻害されることを示した。

3) 1. 造血に重要な初期中胚葉の検索。血液、内皮細胞発生に必須である Etv2 を指標にして造血に最重要である中胚葉の領域を検索した。

2. マウス胚での知見をもとにした試験管内での ES 分化で 1.に相当する細胞集団を解析した。

(2) 詳細

1) Etv2 の血液、内皮発生における役割の解析

ES 細胞から中胚葉、血液と分化誘導する培養系で各分化段階の細胞集団の遺伝子発現解析を網羅的に行い、血液、内皮の前駆細胞に相当する Flk-1 陽性集団に特異的に高発現する遺伝子として Etv2 を見いだした。ノックアウトマウスを作製したところ血管内皮、血液細胞が完全欠損し胎生9日目に致死であったため、血液、内皮細胞の分化、発生における最重要遺伝子であると考えさらに解析を進めた。Venus ノックインマウスで Etv2 の発現をみたところ初期中胚葉の Flk-1 陽性細胞に一致して発現が始まるがその発現は一過性で、内皮、血液を初期中胚葉から誘導した後は胎生10日目頃には発現がほぼ消失することがわかった(図1)。Etv2 欠損マウスおよび Etv2^{-/-} ES 細胞の解析から、初期の Flk-1 陽性細胞の誘導は Etv2 欠損状態でも可能であるが、Flk-1⁺/PDGFRα⁺の未分化中胚葉を Flk-1⁺/PDGFRα⁻の内皮、血液に特化した前駆細胞への分化させるのには Etv2 は必須であった。Etv2 は種々の内皮、血液に特異的で重要な転写因子等を誘導するが、Etv2 の標的となる遺伝子群の中でも Scl と Fli1 が Etv2 欠損状態からでも血液、内皮細胞誘導を rescue できることから最重要の因子と考えられた。さらに Flk-1 陽性初期中胚葉に Etv2 を発現誘導するうえで VEGF が強力に作用することを示した(図2)。

図1

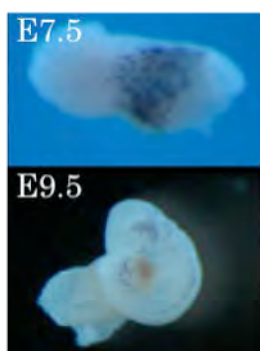


図2

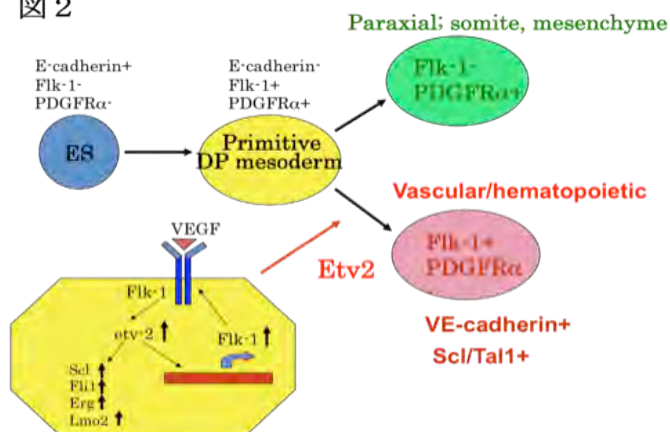


図1) Etv2 のマウス胚における発現。造血が始まる胚外中胚葉に胎生7日目に発現がみられるが、その発現は一過性で9日目には消失し、胚内の血管系に発現がシフトしている。

図2) ES 分化の中胚葉培養系では Flk-1⁺/PDGFRα⁺の未分化中胚葉が PDGFRα⁺の筋肉、間葉系の細胞と Flk-1⁺の内皮、血液になる細胞に分化する。Etv2 は未分化中胚葉の細胞集団を内皮、血液の方向に誘導するのに必須の因子である。VEGF が我々の検索した中では最も強力に Etv2 の発現を誘導した。

2) Etv2 の一過性発現の必要性に関する検証

Etv2 の発現が一過性であることが血液、内皮細胞の分化誘導に利用する際にも重要な検討した。この目的のため組織特異的 Cre トランスジエン依存性に Etv2 を恒常的に発現し続けるマウスの系統を作製した(図3A)。神経上皮、体節に Etv2 を持続発現させても発生は正常に進み明らかな表現型は認めなかったが、内皮、血液の強発現が持続すると血管系の異常

で胎生致死となった他、成体の造血も阻害された(図 3)。この結果から Etv2 は適切な発現調節により一過性にのみ発現し、内皮、血液細胞の分化後はその発現が低下する必要があること示唆された。

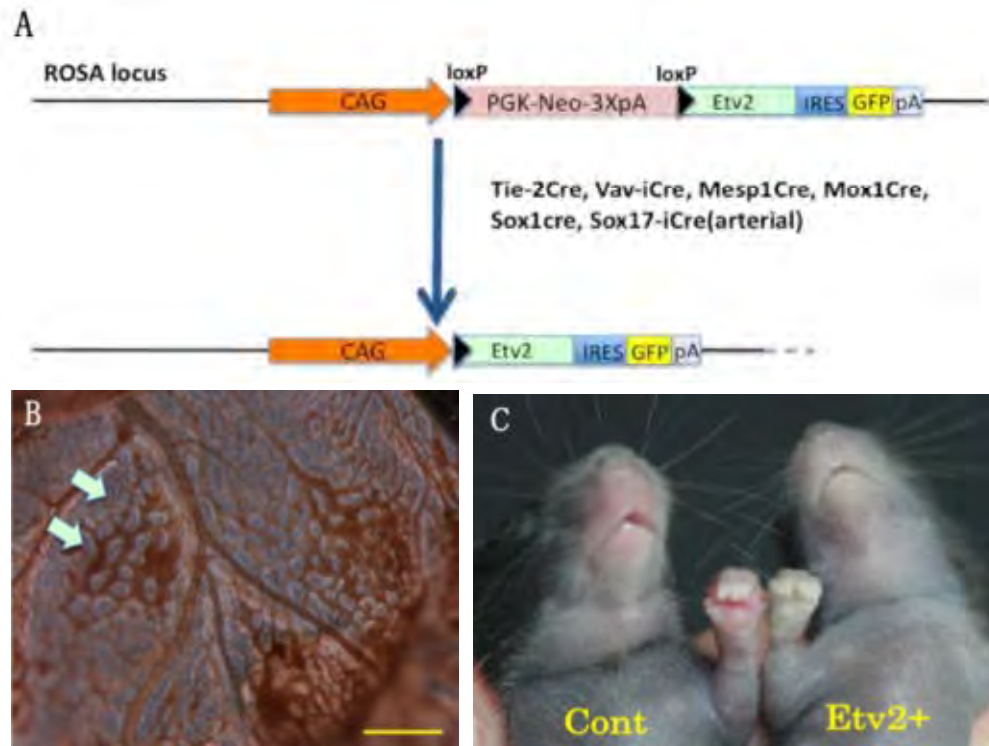


図3)A. 組織特異的に Etv2 の強発現を得るため ROSA26 に Cre 依存的に Etv2 transgene を発現するカセットをノックインした。B.Tie-2Cre により内皮細胞に強発現を誘導すると血管の一部が拡張し、マウス胎児は胎生11日目前後で致死となった。C. Vav-Cre により Etv2 を成体血液細胞に強発現した。Etv2 の発現が血液で持続すると骨髓細胞のコロニー形成能は著しく低下し、マウスは貧血を呈した。

3)

1.造血に重要な初期中胚葉の検索

Etv2 の欠損は内皮、血液分化を完全に阻害することおよび発現パターン等から示唆されるごとく中胚葉から血液をつくる過程でのみ必須であり以降の内皮、血液の機能にはほぼ不要である。この分子の特性を利用して、血液をつくれる内皮細胞(hemogenic endothelial cell)の由来を検討した。成体の血液に寄与できる細胞は Aorta-Gonad-Mesonephron(AGM)の hemogenic endothelial cell に由来するとされるが、その起源が初期中胚葉のレベルでは明らかにされていない。Cre を各中胚葉領域特異的に発現するマウスと Etv2 conditional マウスを掛け合わせて造血に重要な中胚葉の領域を検索した。体節や神経上皮由来の内皮細胞の血管、血液への関与も報告はされているがこれらを標的とする Cre で Etv2 を欠損させても発生は進み正常のマウス個体が得られた。使用した Cre マウスのうち Mesp1Cre, Hoxb6Cre, Hes7Cre マウスによる Etv2 欠損で血液発生の著しい阻害をみた。特に Hoxb6Cre による欠損

では血管の障害が尾部に局限しているにもかかわらず胎児は貧血様であり、AGM で c-Kit 陽性細胞が著減していた(図 4)。Hoxb6ERCre で同様の実験を行い Tmx で時期特異的な Etv2 欠損を誘導したところ胎生 7.5-8.5 日の Hoxb6 発現領域に相当する尾側の側板中胚葉が将来的な造血に最重要である中胚葉集団であることがわかった。

2. マウス胚での知見をもとにした試験管内での ES 分化

マウス胚で領域特異的に Etv2 を欠損させた結果から Hoxb6Cre の標的となる尾側側板中胚葉の胎生 7-8 日目に相当する部分が造血に最も重要な部位と判明した。この知見を試験管内での分化誘導に応用するため Hoxb6 に蛍光蛋白をノックインした ES 細胞を作製した。OP9 細胞、Embrioid Body を用いる方法で血液系に分化させたがこれらの従来の分化方法では Hoxb6 レポーター陽性細胞(Hoxb6+/Flk-1+)は Flk-1 陽性のうちの 0.3%前後であった。しかし Hoxb6+/Flk-1+の集団は gene expression profiling や T 細胞産生能から成体での造血細胞に近い特徴がみられている。現在移植実験、およびこの集団をより高率に誘導できる培養条件を検討している(図 5)。

図4

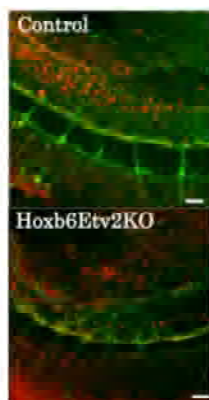


図5

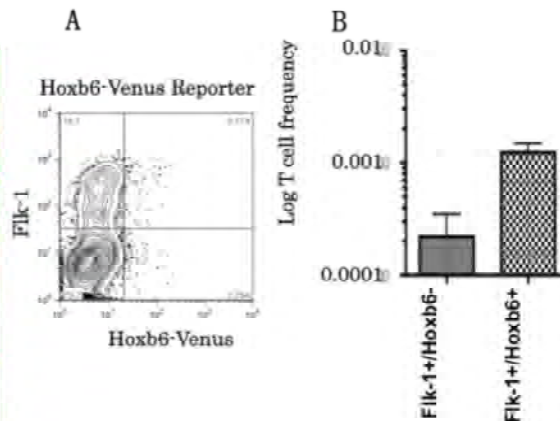


図4) Etv2 を Hoxb6-Cre が標的となる中胚葉で欠損させると Aorta(Green)内の c-Kit(Red)陽性細胞が減少し、AGM での造血能低下を示唆する。

図5) A. Hoxb6 promoter で蛍光タンパクを発現する ES 細胞を血液に分化させる条件で培養した。従来の培養法では Flk-1 陽性のうちの 0.3%くらいしか Hoxb6 reporter 陽性にならなかった。

B. Hoxb6+の細胞集団はより高い lymphoid potential を有している。Flk-1+の細胞で Hoxb6 陽性と陰性の集団を OP9-DL1 上で T 細胞を誘導した。Hoxb6+の細胞がより高頻度で T 細胞を産生した。

3. 今後の展開

Etv2 が血液および内皮細胞の発生に必須の因子でありその作用につき以下のことを解明した。

1) Etv2 の発現は一過性であり過剰に発現が持続することが血管系、血液系ともに正常発生を妨げる。2) Etv2 をマウス初期中胚葉で部位特異的に欠損させることで造血に最も重要な中胚葉の集団を同定できた。1)については Etv2 を試験管内造血に応用する上で一過性に発現を誘導できるベクターシステムの構築が必要であり、導入効率等の面からセンダイウイルスによる方

法を検討している。2)については現在頻用されている分化誘導法である embryoid body、OP9 ストローマ細胞上での培養法ともわずかしが該当する細胞集団が試験管内では誘導できていない。新たな増殖、分化誘導因子の組み合わせで Hoxb6 陽性となる Flk-1 陽性細胞の効率的な誘導法を検討する必要がある。

4. 自己評価

iPS 細胞、ES 細胞の有効な活用につながる研究として、血液細胞を効率よく得ることを目指したが特定の分子の機能解析が研究期間内では主な成果になってしまった。世界で数グループが競争するこの分野では最も興味深いターゲットであるので早めに出せる成果を追わねばならない状況にあったことは確かであるが、Etv2 をいかに試験管内の造血に利用すべきかという課題については十分な仕事できていない。期間内で得られた知見が今後の応用に生かされるような状況を期待したい。

5. 研究総括の見解

本来の目的は iPS 細胞から血液血管細胞を高効率に誘導する方法の開発であったが、残念ながらそこまでは到達できていない。ただ、これを可能にすると考えた Etv2 分子の研究については最高レベルの解析を行い、この分子の機能についてほぼ明らかにし、いくつかの論文にまとめている。また、同じさきがけの依馬研究者などと共同研究を行い、論文作成にまで至っている。このように、productivity という面では高く評価できる。積み上げた膨大な解析データの全てをまだ論文に出来ていないようで、まずこれらを論文として発表する事を期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1+PDGFR α + primitive mesoderm.
Kataoka H#, Hayashi M, Nakagawa R, Tanaka Y, Izumi N, Nishikawa S, Jakt ML, Tarui H, Nishikawa S. *Blood*. 2011 Dec 22;118(26):6975-86. (#Corresponding author)
2. Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse.
Ishitobi H, Wakamatsu A, Liu F, Azami T, Hamada M, Matsumoto K, **Kataoka H**, Kobayashi M, Choi K, Nishikawa S, Takahashi S, Ema M. *Development*. 2011 Dec;138(24):5357-68.
3. PKA/CREB signaling triggers initiation of endothelial and hematopoietic cell differentiation via Etv2 induction. Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, **Kataoka H**, Takayama N, Eto K, Nishikawa S, Yamashita JK. *Stem Cells*. 2012 Apr;30(4):687-96.
4. Endothelialization and altered hematopoiesis by persistent Etv2 expression in mice.
Hayashi M, Pluchinotta M, Momiyama A, Tanaka Y, Nishikawa S, **Kataoka H**#. *Exp Hematol*. 2012 Sep;40(9):738-750. (#Corresponding author)
5. PDGF receptor alpha+ mesoderm contributes to endothelial and hematopoietic cells in mice. Ding G, Tanaka Y, Hayashi M, Nishikawa SI, **Kataoka H** #. (#Corresponding author)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Hiroshi Kataoka. Role of Etv2 for the generation of hematopoietic and endothelial cells from mesoderm. 第8回 幹細胞シンポジウム, 淡路夢舞台国際会議場、2010.5
2. Hiroshi Kataoka. Embryonic Vasculogenesis ; Analysis using a Key Regulator. Gordon Research Conference, New England, USA, Aug. 2010
3. 片岡 宏 Specification of endothelial and hematopoietic cells by Etv2., 第 34 回日本分子生物学会、横浜、2011.12
4. Hiroshi Kataoka, Misato Hayashi, Shun-Ichi Nishikawa., Mesoderm compartmentalization for distinct endothelial contribution to embryonic vasculature. 10thISSCR, Yokohama, 2012.6
5. Ding Guo, Hiroshi Kataoka, Shin-Ichi Nishikawa Derivation of hematopoietic cells from PDGF receptor alpha mesoderm in mice. 10thISSCR,Yokohama, 2012.6
6. Ding Guo, Yosuke Tanaka, Misato Hayashi,Shin-Ichi Nishikawa, Hiroshi Kataoka., PDGF receptor alpha+ mesoderm contributes to hematopoietic and endothelial cells in mice. Hong Kong Society for Developmental, Biology Symposium, Hong Kong, 2012.11
7. Kumiko Kobayashi, Ding Guo, Shin-Ichi Nishikawa, Hiroshi Kataoka., Late stage Etv2 is required for the completion of vascular development., Hong Kong Society for Developmental, Biology Symposium, Hong Kong, 2012.11
8. Ding Guo, Yosuke Tanaka, Misato Hayashi,Shin-Ichi Nishikawa, Hiroshi Kataoka., PDGF receptor alpha+ mesoderm contributes to hematopoietic and endothelial cells in mice. 第 20 回日本血管生物医学会学術集会, 徳島、2012.12

研究報告書

「リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 栗崎 晃

1. 研究のねらい

体細胞から iPS 細胞を作り出すには長い培養時間を必要とし、その効率も低いことが問題となっている。研究者は最近、ES 細胞核の詳細なプロテオミクス解析から、特定のクロマチン因子群が多能性幹細胞で特異的に発現することを見出した。本研究では、それらのクロマチン因子群の中で、DNA の高次構造を緩めると考えられるクロマチンリモデリング様因子を利用し、リプログラミングに関わる転写因子を効果的に細胞内で働かせるための地ならしができると考えた。さらにこの作用を詳しく調べることによって、これまで未解明の iPS 細胞が作られるしくみの解明への応用も考えられる。また、このようなリモデリング様因子が成体においても機能する可能性が考えられることから、それらの発現についても検討した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、ES 細胞核のプロテオミクス解析で同定したクロマチン因子の中で、特に Transcriptional Intermediary Factor 1 β (TIF1 β) に着目して研究を進めた。TIF1 β は、ヘテロクロマチン形成に関与する転写抑制因子であるが、TIF1 β の C 末がリン酸化されるとクロマチンリモデリング様活性を示すことが報告されている。TIF1 β は ES 細胞で特異的にリン酸化されており、リン酸化に伴い未分化特異的転写因子群の発現を上昇させ、神経分化を抑制した。また、TIF1 β をノックダウンすると ES 細胞は原始外胚葉方向へと分化した。その後の解析から、本因子が Oct3/4 と結合し、Oct3/4 依存的な転写を促進させる因子であることを明らかにした。また TIF1 β は、iPS 細胞の樹立効率を向上させ、より安定した iPS 細胞の樹立を促進する因子であることが示唆された。今後、iPS 細胞の品質向上などの方面で応用が期待される。

(2) 詳細

2-1. マウス ES 細胞の未分化状態維持増強活性を示すクロマチン因子 TIF1 β の同定

マウス ES 細胞のプロテオミクス解析を行い、未分化 ES 細胞核で特異的に発現するタンパク質として同定したクロマチン因子群の中から、LIF 非存在下で未分化状態維持活性が見られる因子をスクリーニングしたところ、TIF1 β を見出した。マウス ES 細胞で TIF1 β を高発現すると LIF 非存在下で Nanog や SSEA1 の発現をしばらく維持できるが、TIF1 β をノックダウンすると顕著な増殖抑制を示し、主に原始外胚葉方向へと分化した。TIF1 β は、ヘテロクロマチン構成タンパク質 HP1 と結合してヘテロクロマチン形成を促進する転写抑制因子として知られており、また、SUMO E3 リガーゼ活性を示し、NuRD 複合体を呼び寄せてゲノムのヘテロクロマチン化を促進するコリプレッサーとして機能する。一方、TIF1 β は C 末付近のセリン残基 (Ser824) がリン酸化されるとクロマチンリモデリング様活性を示すことが知られている。

TIF1 β のリン酸化状態を確認したところ、未分化 ES 細胞で特異的にリン酸化されていることが確認された。

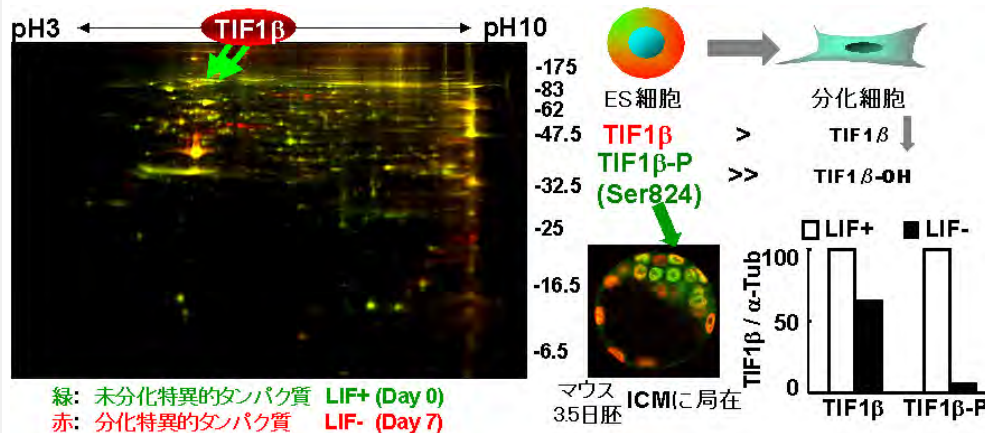


図1. 多能性幹細胞で TIF1 β は特異的にリン酸化されている。

2-2. リン酸化型 TIF1 β は iPS 細胞の樹立を促進する

リン酸化型 TIF1 β 変異体やリン酸化されない変異体を作製し、マウス ES 細胞で安定発現させるとリン酸化依存的に Nanog、Oct3/4、Sox2 などの未分化特異的転写因子群が顕著に発現上昇する一方で、リン酸化依存的に神経分化を抑制する効果が観察され、ES 細胞で TIF1 β がリン酸化依存的に未分化状態を正に制御する結果を得た。また、Oct3/4、Sox2、Klf4、cMyc の4因子と組み合わせてリン酸化型 TIF1 β 変異体を導入すると樹立される iPS 細胞数が増加し、各種未分化細胞マーカーの発現が安定して発現するが、リン酸化されない TIF1 β 変異体を発現させるとほとんど iPS 細胞が樹立されなかった。すなわち、TIF1 β のリン酸化は iPS 細胞の樹立過程でも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

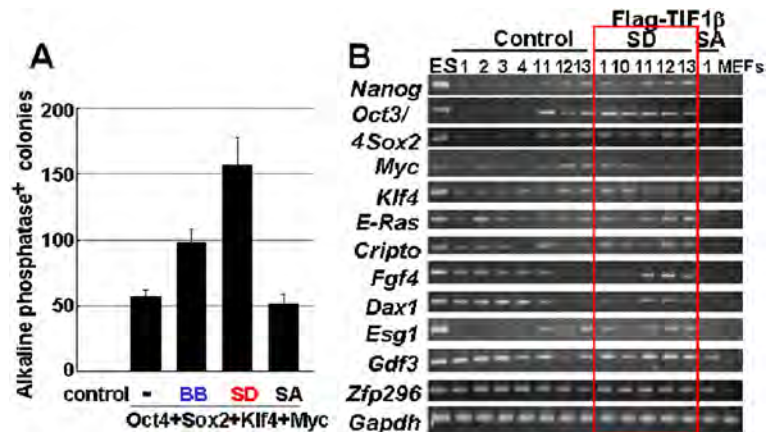


図2. リン酸化型 TIF1 β は iPS 化を促進し、良質の iPS 細胞を樹立しやすくする。

2-3. リン酸化型 TIF1 β の作用機序の解析

C末がリン酸化された TIF1 β に対する特異的抗体で免疫蛍光染色したところ、リン酸化 TIF1 β は核内でドット状に局在し、主に活性化クロマチンマーカーである H3K4me³ や H3K9Ac 抗体で染色されるクロマチン領域と部分的に共局在していた。また、TIF1 β をマウス ES 細胞でノックダウンするとヘテロクロマチンマーカー H3K9me³ のスポット数が上昇した。TIF1 β リン酸化変異体を安定発現させた ES 細胞から TIF1 β と相互作用する因子を免疫沈降により検討したところ、TIF1 β のリン酸化依存的に Oct3/4 が TIF1 β N 末部分に結合し Nanog 近位プロモ

ーター上にOct3/4 をリクルートして転写活性化することを見出した。マイクロアレイ解析により、TIF1 β のリン酸化依存的に変動するターゲット遺伝子を探索したところ、その約半数がOct3/4 のターゲット遺伝子であり、またSuz12、CHD9、Pcaf等のクロマチンリモデリングに関与する因子が転写活性化されることが明らかとなった。さらに、免疫沈降実験からTIF1 β が核内でBAF複合体というクロマチンリモデリング因子群と複合体を作っていることも確認され、ES細胞ではこれらの因子との複合体として機能している可能性が考えられる。

2-4. 成体におけるリン酸化型 TIF1 β の局在

TIF1 β は多くの組織で発現しているが、リン酸化型 TIF1 β は精巣や卵巣など限られた組織においてのみ発現が確認された。特に精巣の免疫組織化学染色の結果、リン酸化型 TIF1 β は精巣の精原細胞や精母細胞などでの比較的未分化な細胞で特異的な局在が観察された。

3. 今後の展開

iPS 細胞の樹立という体細胞のリプログラミング過程で、クロマチンリモデリング複合体を介した作用メカニズムを明らかにするとともに、成体内の未分化な組織細胞におけるリモデリング因子の意義の解明を目指す。

4. 自己評価

クロマチンリモデリング因子群をうまく活用することでクロマチン構造変化を強制的に引き起こし、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc などの転写因子のゲノムへのアクセスを改善し iPS 細胞の樹立過程を著しくスピードアップしうものとは当初予想していたが、これまで得られた結果は、むしろ転写因子と共同して働き、樹立された iPS 細胞がより安定化するのを早めるような効果に思える。クロマチン複合体との関係の解明はまだ道半ばであり、今後残された宿題を解決する必要がある。一方、成体におけるリン酸化型 TIF1 β は精巣組織などの未分化な細胞で特徴的な発現を示すなど、iPS 細胞のみならず成体組織の幹細胞における意義が示唆される結果を得た。今後、成体組織で起こっているリモデリング因子の機能の解明を糸口に、成体の組織幹細胞の制御を実現する方法にも挑戦したい。また、今回多くのさきがけ研究者の仕事やアドバイザーの先生方の率直な議論から、色々と参考になる考え方を知り、自分の中でいくつもの歯車が変わった点は大きな収穫である。これからも限られた能力や資金を、さきがけをはじめとする研究者のネットワークで補いつつ、自分の研究を発展させていきたい。

5. 研究総括の見解

網羅的解析から分子(TIF1b)を同定し、その分子の解析を通じて現象に迫ると言う極めてオーソドックスな手法で研究をしている。TIF1b がリン酸化される事でリプログラミングに関わる事を示し、論文にまでまとめた事は、iPS 研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。メカニズムについては、完全に明らかになった訳ではないが、オーソドックスな解析を地道に続ける事で進展すると予想する。希望としては、新しい展開のためには、これまでとは違ったスタイルの開拓も必要ではないかと思う。オーソドックス、地道に加えて、豊かな感性とか、豊富なアイデアなどの言葉が加わった研究者になってほしい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Induction of differentiation of undifferentiated cells into pancreatic beta cells in vertebrates. Hosoya M, Kunisada Y, **Kurisaki A**, Asashima M. *Int J Dev Biol.*, 56(5), 313-323, 2012.
2. Nishimura Y, **Kurisaki A**, Nakanishi M, Ohnuma K, Ninomiya N, Komazaki S, Ishiura S, Asashima M. Inhibitory Smad proteins promote the differentiation of mouse embryonic stem cells into ependymal-like ciliated cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 401(1), 1-6, 2010.
3. **Kurisaki A**, Ito Y, Onuma Y, Intoh A, Asashima M. In vitro organogenesis using multipotent cells. *Hum Cell*, 23(1), 1-14, 2010.
4. Seki Y*, **Kurisaki A***, Watanabe-Susaki K, Nakajima Y, Nakanishi M, Arai Y, Shiota K, Sugino H, Asashima M. TIF1beta regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107(24), 10926-10931, 2010.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. 栗崎 晃 A novel chromatin-related factor that regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner 第9回 日本再生医療学会総会、広島、2010年3月12日
2. 栗崎 晃 幹細胞の未分化状態や iPS 化を制御する新しいクロマチン因子 BioJapan 横浜 2010年10月1日
3. 栗崎 晃 ES 細胞の未分化性を制御する新規クロマチン関連因子 CREST/さがけ iPS 細胞 研究領域合同シンポジウム、東京、2011年1月14日

研 究 報 告 書

「細胞リプログラミングの段階的制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 佐藤 伸

1. 研究のねらい

分化細胞の一つ一つは、その発生過程をさかのぼれば未分化な細胞にあたる。発生過程をさかのぼって当たる「未分化細胞」とは、単に ES 細胞などだけを指すのではなく、器官・組織それぞれの幹細胞ともいべき未分化細胞をも意味する。例えば、四肢の皮膚繊維芽細胞は胎児期の「肢芽間充細胞」という未分化細胞から形成される。この未分化な肢芽間充細胞はごく初期の段階では「結合組織系の細胞種であれば何にでも分化できる」という多分化能を呈する。これが意味するところは、発生過程を少しだけ(段階的に)遡れば、器官組織に応じた“多分化能を有する細胞”は存在する(獲得できる)のである。組織・器官再生を考えたときに、発生時間をすべて巻き戻した iPS 細胞を使用しなくても、上記のような「未分化細胞」が得られれば解決するだろう。問題は、発生過程を少しだけ巻き戻すというリプログラミング機構があるかどうかである。

我々の使用する有尾両生類の四肢再生システムは、上記の「発生過程の段階的な巻き戻し」という現象を観察できる数少ない系である。有尾両生類の四肢再生プロセスにおいては、真皮を構成する皮膚繊維芽細胞が「脱分化」し、未分化な「幹細胞様」の細胞に変貌すると考えられている。この幹細胞様の細胞は「再生芽細胞」と呼ばれ、結合組織系の細胞種であれば“何にでもなりうる”という分化の多能性を呈する。しかも、この再生芽細胞は「四肢」としてのアイデンティティは有しており、他所へ移植しても四肢の構成成分にしか分化しない。つまりは、「位置情報は維持しつつ、分化状態だけ一定程度巻き戻す」という現象が起こるのである。実験的にも、この再生芽細胞が発生過程に形成される肢芽間充細胞に相当するものであることが示されている。そして、その再生芽細胞が再度発生過程を繰り返し、元の四肢を再生する。強調したいのは、このような分化の巻き戻しが「生体が持つ内在性のメカニズム」によって引き起こされている事である。この成体の持つ「内在的な分化リセット機構→再分化機構」(リプログラミング)を明らかにすることが本研究の目的である。

2. 研究成果

(1) 概要

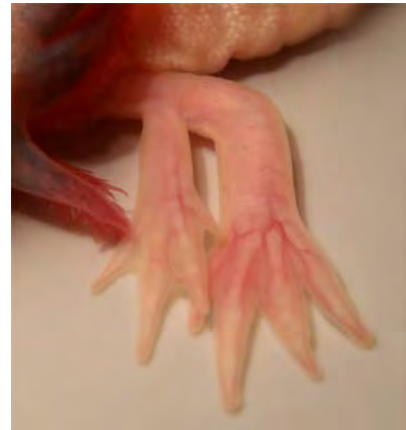
四肢の再生の開始システム、つまりは未分化細胞が現れるそのシステムが明らかではなかった。この謎は当該分野における長きにわたる謎として存在しているものであった。まずはこの問題に取り組むことから始めた。再生研究に非常に有用である新規研究系(過剰肢誘導モデル)を発展させ、これを使用し、非再生系と再生系との間で比較解析を行った。その解析の中から数個の重要と考えられるシグナルカスケードを拾い出すことができた。そのうち3つが再生反応の開始に重要な役割を果たすことが明らかになった。我々が明らかにしたその3つとは、1) FGF-Signaling 2) MMPによるECMの分解 3) 因子G である。この3者の活

性によって再生反応を人為的にコントロールすることができるようになった。言い換えれば、この3者を非再生系である「単純な皮膚損傷」に与えることで、「再生系」である四肢形成へ導くことができるようになった。これらの発見をもとに、細胞レベルでの分化のリプログラミングにアプローチできると考える。

(2) 詳細

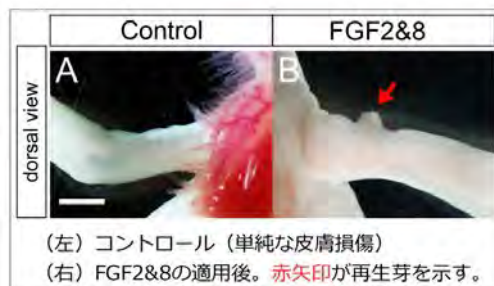
2-1. 四肢再生惹起システムの発見

なぜ有尾両生類は四肢の再生を惹起できるのか？この問い自体は 250 年にも長きにわたる謎として依然存在している。この謎に挑むべく、我々は独自に発達させてきた過剰肢付加モデルと呼ぶ研究システムを用いて研究を行っている。この研究システムを端的に示せば右図のようなものになる。もう一本の「過剰な腕をはやせる」実験系である。この過剰肢の形成に必要なのは ①皮膚損傷 ②神経の存在 の二つだけであることが分かっている。このたった二つの組織種の関係だけで四肢の再生(過剰肢形成)が惹起できることが明らかになったことは、当研究領域にとっては大きな成果であった。



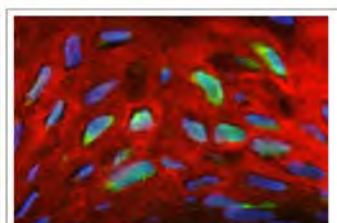
この二つの組織関係によって四肢再生が惹起可能であるとして、その分子生物学的な背景はおおよそどのような物であろうか？これを追求するため、次世代シーケンサーを用い、異なる条件下での比較解析を行った。ゲノム情報のない非モデル生物でのトランスクリプトーム解析であるため、今現在も綺麗なデータベースとは言えない状況であることは否めない。しかし、その中からでも再生惹起にかかわる候補となるキーワードを拾う事ができた。1. ECM の分解 2. FGF-Signaling である。

まず、シーケンシングの解析結果をもとに、ECM の分解酵素の発現や FGFR (FGF 受容体) の発現を解析した。結果、シーケンシングの結果を裏付けるように、探索した関連遺伝子の発現は再生条件下で高く、非再生条件下では低いことが明らかになった。この二つの条件 (ECM の分解と FGF-Signaling) が再生に必須かどうかを検討するために阻害剤を用いて、それぞれのシグナリングカスケードの阻害実験を行い、再生プロセスへの関与を検証した。確かに、それぞれの阻害剤によって再生プロセスは抑制されることが明らかになった。次に、この両者が再生の反応を惹起できるのかを検証した。非再生条件である「単純な皮膚損傷」を作成し、そ



こに ECM の分解活性と FGF-Signaling のインプット (FGF2 & FGF8 の添加) を行った。その結果、四肢再生時に形成される「再生芽」(再生芽細胞の集合体)と呼ばれるドーム状の構造の誘導に成功した(左図)。切片を作成し、より詳細な検証をしたところ、確かに形態的にも遺伝子発現パターンからも再生芽細胞と言えるであろう集団を観察すること

ができた。これが本当に再生芽細胞としての特性を備えるのであれば、繊維芽細胞に由来する再生芽細胞は結合組織系譜内での多能性を示すはずである。そこで、軟骨への分化転換能を検証するために、この誘導された構造の間充細胞を採取し骨の損傷部に移植した。骨の損傷部では高等脊椎動物同様に初めに活発な軟骨の増殖が起こる。このプロセスにおいて



FGF2&8によって誘導された構造の間充細胞を骨損傷部に移植。軟骨形成能を検証した。(赤)軟骨(T2コラーゲン) (緑)移植細胞。

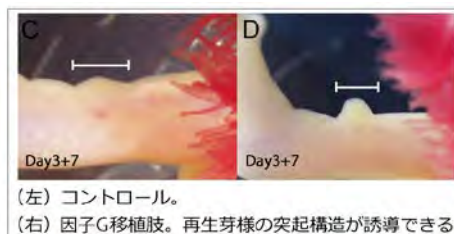
では皮膚繊維芽細胞を単に移植しても軟骨への分化転換は観察されないことは有尾両生類でも高等脊椎動物でも証明済みである。しかし、ECMの分解促進とFGFsの添加によって得られた構造の間充細胞を移植した場合は、移植細胞の軟骨への参加を観察することができた(左図)。これらのことから、FGF2&8インプットとECMの分解によって、非再生条件を再生条件に転換できることが強く示唆された。言い換えれば、in vivo レベルで繊維芽細胞らに少なくとも軟骨分化能を持たせる事ができる条件を発見したといえるだろう。

神経の参画なしに、再生反応を惹起するという事こそが長きにわたって求められている課題である。上記研究成果は、まさにその回答になりうるものであり、四肢再生領域における250年の謎の回答として非常に大きな進展であると確信している。

2-2 因子Gと FGF-Signaling が引き起こす「差」から、脱分化メカニズムに迫る

上記研究のプロセスにおいて、非常に面白い現象を発見した。それは因子Gというタンパク質をもちいても、上記同様に再生反応を惹起しているような現象を観察できた事である(右図)。

250年間探し求められてきた、再生反応惹起に関連する因子がかくも素早く複数見つかった事は、過剰肢付加モデルの優位性と我々の研究の方向性の正しさを改めて証明するものであると考える。この構造を解析してゆくうちに非常に興味深い事項が明らかになってきた。それは、「脱分化」してい



(左) コントロール。

(右) 因子G移植肢。再生芽様の突起構造が誘導できる

ないという事である。因子Gによって誘導される再生芽様の構造体は軟骨への分化ができないことが明らかになった。それだけではなく、軟骨への分化能を呈するような「普通」の再生芽で発現している遺伝子発現を欠くことも明らかになった。因子Gに加えてFGF2&8を添加した場合は、再生芽細胞の性質を有する細胞が現れることも確認している。FGF2&8も因子Gも同じような反応を引き起こせるものの、分化調節といった観点からは異なる反応を示すことが明らかになった。

これまでの研究は主に in vivo の結果であり、in vitro での観察のように個々の細胞の振る舞いを直接的に検証できた訳ではないことが大きな欠点である。これを現段階では完全に解決するところまでは残念ながら到達できなかった。しかし、in vivo と in vitro を組み合わせながら、細胞個々がどのような変遷をたどるのかを検証しようとする試みを始めている。残念なことに、さきがけ期間中には最適な培養条件を発見するには至らなかったが、～1週程度であれば培養細胞を維持することはできる。そこで、培養細胞を上記再生惹起物質(?)とともに培養し、その後 in vivo の条件に移して検証するという実験方法を考えた。皮膚繊維芽細胞を培養し、そこに FGF2&8 または因子Gを加えることで、皮膚繊維芽細胞に軟骨分化能を付与できるかと

うかを検証した。単なる皮膚の培養細胞は、軟骨の形成に参加できない。ところが、FGF2&8 とともに培養した皮膚繊維芽細胞は、移植先で軟骨の形成に参画できることが明らかになった。さらに、in vivo での解析結果に矛盾なく、因子G処理した繊維芽細胞は軟骨形成に参画しないことも明らかになった。これらの結果は、高等脊椎動物では非常に難しいとされる皮膚繊維芽細胞からの軟骨誘導が、「再生可能動物」である有尾両生類では比較的容易に行えることを示唆する。これが、両者の再生能力の差につながるのかどうかは今後の検討課題である。

これらの研究成果が、「発生時間の巻き戻し」に相当するかは、正直なところ全く答えられてはいない。確かに、四肢再生時に発生プロセスでは発現し正常(成熟)肢においては発現しない遺伝子などが再発現する事や、発生プロセスに生じるような分化可塑性を有する細胞は現れる様ではある。しかし、それが本当の意味で「巻き戻し」にあたるかどうかは今後の検討課題となることは自覚しており、鋭意努力したい。

3. 今後の展開

細胞一個単位での解析にたどり着くことが急務である。そうでない限り、幹細胞の関与など「脱分化ではない経路」の関与の否定ができないためである。培養系をより発達させ細胞個々の振る舞いを観察したい。

また、ここでの発見は当該領域内では非常に大きな発見にあたると考えている。240 年間解き明かされなかった再生惹起メカニズムが、少なくともその一側面を初めて見せたからである。今後は、この領域をリードするために国際的な研究体制を構築してゆきたいと考える。研究の方向性には自信を得たので、今の成果をより Precise(領域会議で繰り返し指摘されました)なものに昇華させてゆく努力を行う。

4. 自己評価

本研究期間において、自分なりに非常に満足いく成果を得たと確信している。確かに、研究としても未熟さを否定できない部分は自覚している。しかしながら、今後 5 年の足場を築くことは確実にできたと思う。少なくとも長きにわたって明らかにされなかった再生開始のメカニズムの一端を明らかにできたことは、(現在未発表ではあるが)海外からも大きな反響を得ている。今後は、自分に足りない部分は領域会議で十二分に痛感したので、いただいた数々のご助言を基に、より良い科学者を目指す。

5. 研究総括の見解

これまで日本の貢献の多い両生類再生研究を担う若手として採択した。再生研究としての一定のレベルの業績を上げ、また専門誌に論文を発表しており、業績としては評価できる。本人の能力から考えると、当然の結果と言える。ただ、この分野の根本問題を整理し、それを独自の方法で解き、新しい分野を開拓すると言う点では、もう一度原点に戻って考え直してみる事も重要ではないかと思う。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Spatiotemporal regulation of keratin 5 and 17 in the axolotl limb”, Moriyasu M., Makanae A, and Satoh A., *Dev. Dyn.*, 241(10):1616–24, 2012.
2. (Review) Early regulation of axolotl limb regeneration., Makanae A. and Satoh A., *Anat Rec (Hoboken)*, 295(10), 1566–74, 2012.
3. Collagen reconstitution is inversely correlated with induction of limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*., Satoh A., Hirata A and Makanae A., *Zoolog. Sci.*, 29(3), 191–197, 2012
4. Blastema induction in aneurogenic state and Prrx-1 regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration., Satoh A., Makanae A. Hirata A. and Satou Y., *Dev. Biol.*, 355(2), 263–274, 2011.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

2011、NHK BS 「いのちドラマチック、驚異の再生能力」に出演

研 究 報 告 書

「生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発」

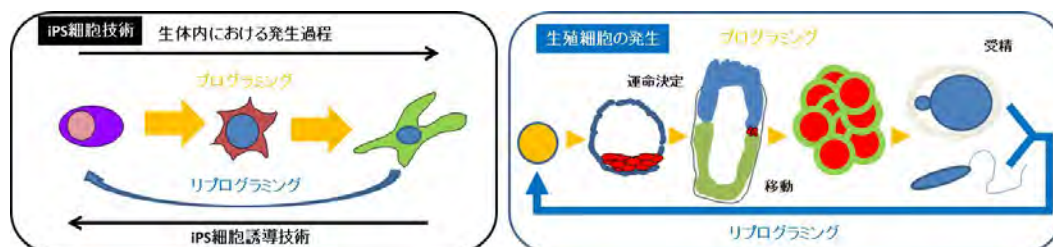
研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 永松 剛

1. 研究のねらい

体細胞をリプログラミングし多能性を付与された iPS 細胞が作成されてから多くの研究成果が発表された。低分子化合物による遺伝子導入の代替、より少ない因子で誘導できる細胞種の探索、アデノウイルスやプラスミドベクターによるゲノムへのインテグレーションのない誘導法の確立、そして各種分化細胞への誘導と腫瘍化の問題、といった安全性や樹立方法の改善に関するものが大多数であり、未だにどのようなメカニズムで細胞がリプログラミングされるのかについては不明な点が多い。リプログラミングのメカニズムを理解することは効率よく iPS 細胞を誘導するのみならず、樹立された iPS 細胞を目的の細胞へ分化させる際や腫瘍化を防ぐ安全性を考える際にも非常に有用と考えられる。しかしながら、メカニズムの解析には iPS 細胞の誘導は効率の低さや長期の培養日数が大きな障壁となっている。そこで、体細胞のリプログラミングの機構を解明するべく始原生殖細胞に着目した。生殖細胞は次世代に遺伝子を繋ぐ唯一の細胞であり、受精を経て再び全能性を獲得することができる。そのため生殖細胞は世代を超えてプログラミングとリプログラミングを繰り返している細胞と考えることができる。生殖細胞におけるリプログラミングと iPS 細胞誘導技術の体細胞リプログラミングとの関係に着目し両者を比較検討することからリプログラミングのメカニズムの解明を目指している。



2. 研究成果

(1) 概要

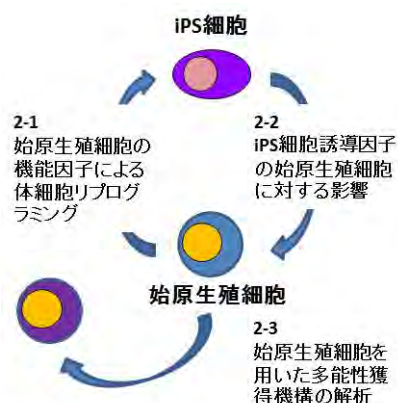
生殖細胞と体細胞リプログラミングの関係について以下の3つの観点から研究を進めた。

2-1. 生殖細胞の機能因子による体細胞リプログラミング

2-2. 始原生殖細胞と iPS 細胞誘導因子

2-3. 単能性の始原生殖細胞が多能性を獲得する過程の解析

これらの成果として、主に以下のような結果が得られた。



- ・生殖細胞の機能因子にはリプログラミング活性をもつものがあること。
- ・始原生殖細胞はリプログラミング因子を内在性に発現しているにもかかわらず単能性であること。
- ・始原生殖細胞が特定の増殖因子の存在下で多能性幹細胞へと脱分化する培養系において高効率化と純化の方法を確立したこと。

(2) 詳細

2-1. 生殖細胞の機能因子による体細胞リプログラミング

始原生殖細胞の運命決定のプロセスは体細胞系列の遺伝子発現の抑制や、多能性幹細胞における機能因子の再活性化が起こることが知られている。これらの現象は体細胞リプログラミングの過程で起こっている現象と似通っているという発想のもと、我々は生殖細胞の機能因子に着目し、体細胞をリプログラミングする活性を持つのではないかと推測した。そして、そのような因子の候補として以下の 3 つの条件から候補因子の抽出を行った。1) 始原生殖細胞で特異的に発現している分子、2) 生殖細胞の発生に重要な働きをしている分子、3) 生殖細胞から EG 細胞への転換や ES 細胞の多能性の維持に関わる分子。候補因子として抽出したのは Blimp-1, Prdm14, および Prmt5 である。そして、これらの因子を繊維芽細胞に導入してリプログラミングを誘導できないかを確認した。

その結果、Blimp-1, Prdm14, c-Myc の導入により ES 細胞様のコロニーが確認できた。しかしながら、このプライマリーコロニーは Nanog の発現を得ることは非常にまれであり、継続して培養することもできなかった。一方で、Prmt5, Klf4, Oct3/4 の導入によって Nanog の発現上昇を伴うコロニーが確認され、これらは安定して培養可能であることを見出した。この細胞は既存の ES 細胞や iPS 細胞と非常に似た遺伝子発現パターンを示し、ヌードマウスに移植すると三胚葉すべてを含むテラトーマを形成すること、キメラマウスの形成を経て生殖細胞へ分化することを確認しており、リプログラミングを受け多能性を獲得した細胞と考えられる (G Nagamatsu et.al. J Biol Chem. 2011)。

このことは生殖細胞で得られる知見は体細胞のリプログラミングに応用可能であることを示唆するものと考えている。

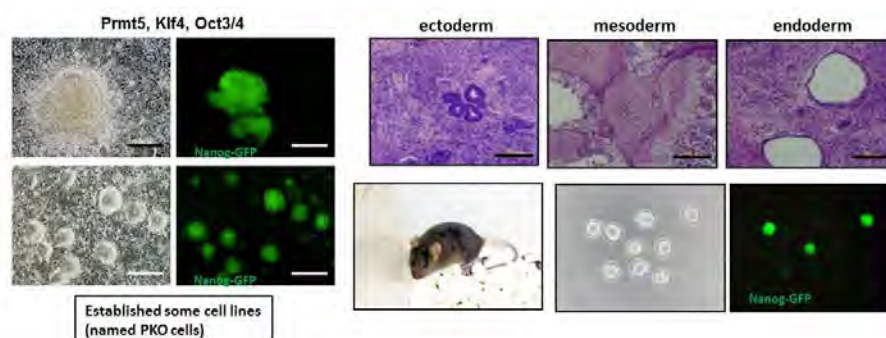


図1
Prmt5, Klf4 and Oct3/4の導入によりマウス繊維芽細胞(MEF)から誘導した多能性幹細胞。
左) マウス繊維芽細胞にPrmt5, Klf4 and Oct3/4を導入して得られたNanog-GFP陽性のコロニー
右上) Prmt5, Klf4 and Oct3/4の導入により得られた細胞をヌードマウスに移植して形成されたテラトーマ
右下) Prmt5, Klf4 and Oct3/4の導入により得られた細胞をもちいて作成したキメラマウスおよびキメラマウスの交配により得られた桑実胚
桑実胚のNanog-GFPの蛍光はPrmt5, Klf4 and Oct3/4の導入により得られた細胞に由来する。

2-2. 始原生殖細胞と iPS 細胞誘導因子

始原生殖細胞は Oct3/4 や Nanog といった多能性幹細胞で重要な遺伝子のいくつかを発現していることが知られている。にもかかわらず、生体内では生殖細胞のみに分化可能な単能性の細胞

胞である。そこで、多能性幹細胞誘導のリプログラミング因子と始生殖細胞との関係の解析を行った。始生殖細胞におけるリプログラミング因子の発現を検討したところ Oct3/4, Sox2, c-Myc の発現が認められた。Klf4 の発現は認められなかったもののリプログラミング過程において Klf4 を代替できることが知られている Klf2, Klf5 および Esrrb, Esrrg の発現についてはそのすべてが認められた。このことから始生殖細胞は内在性に多能性を獲得し得る因子を発現していると考えられる。そこで、始生殖細胞には多能性を抑制するようなメカニズムがあるのではないかと推測し、始生殖細胞にリプログラミング 4 因子の導入を行った。しかしながら予想に反して 4 因子のいずれの一つでも多能性幹細胞が誘導されることが明らかとなった (G Nagamatsu et.al. Stem Cells. in press)。メカニズムに関してはさらなる解析が必要であるが、この結果は始生殖細胞は内在性に Oct3/4, Sox2, c-Myc を発現しているにもかかわらず外来性にそれらの因子を導入することで多能性が誘導されることを示している。このことから多能性誘導の過程においてはリプログラミング因子の量比が重要なのではないかと推測した。このことを検討するためにリプログラミング 4 因子が発現するとそれぞれ異なる細胞表面抗原が発現するベクターを作成した。このベクターをもちろすることで導入後に特異的な抗体とフローサイトメトリーを用いた細胞分取によりそれぞれ異なる量比のリプログラミング 4 因子が導入された細胞を得ることができる。このシステムを用いてリプログラミングにおける 4 因子の量比を検討したところ、Oct3/4 が高発現であることと Sox2 が低発現であることが統計学的に優位であることが明らかになった (G Nagamatsu et.al. J. Biol. Chem. 2012)。

2-3. 単能性の始生殖細胞が多能性を獲得する過程の解析

始生殖細胞は通常は生殖細胞にのみ分化できる単能性の細胞であるが、特定の培養条件下において外来遺伝子の導入なく、体細胞からの iPS 細胞誘導に比べてより短期間で多能性幹細胞へと脱分化することが知られている。この単能性の始生殖細胞が多能性の EG 細胞へと脱分化する過程は多能性の獲得機構と考えることができる。始生殖細胞を用いて多能性の獲得過程を解析するために培養系の効率化と多能性獲得過程の細胞の純化の方法の確立を行った。その結果、MEK inhibitor, GSK3-beta inhibitor, そして TGF-beta signal inhibitor の 3 者を混合して作用させた時に従来の培養条件に比べて効率を 8 倍程度上昇させることができることを見出した。さらに、多能性獲得の過程にあると考えられる細胞を SSEA-1 と Nanog の発現を指標にフローサイ

トメトリーにより分取することに成功した (G Nagamatsu et.al. Biol. Reprod. 2012)。

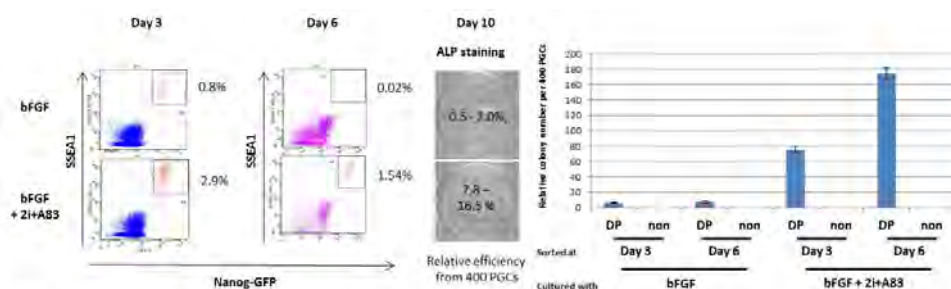


図3 多能性獲得過程の細胞の純化
左) Nanog-GFPの発光とSSEA-1の発現をフローサイトメーターにより検出
右) Nanog-GFP陽性、SSEA-1陰性(DP)細胞群とそれ以外の細胞群(non)をそれぞれ純化・分取し培養後のEG細胞コロニー形成数
DP細胞群からのEG細胞が形成されることからDP細胞群が多能性獲得過程にある細胞と考えられる

3. 今後の展開

生殖細胞と多能性幹細胞との関係に着目し引き続き研究をおこなっていく。特にアルギニンメチ

ル化についてと多能性の獲得過程のメカニズムについて着目している。

3-1. アルギニンメチル化修飾と多能性幹細胞

リプログラミング因子として見出した Prmt5 はアルギニンのメチル化酵素であり、アルギニンメチル化は未知の機能が多いエピジェネティック修飾として国内外の多分野にわたって注目されている現象である(Bedford MT and Clarke SG. Mol Cell. 2009)。Prmt5 は対称性のアルギニンジメチル化酵素であり、一方で体細胞リプログラミングの過程では非対称性のアルギニンジメチル化酵素の抑制が効果的であるとの報告がなされている(Yuan X et. al. Stem Cells 2011)。このことからアルギニンメチル化の対称性、非対称性のジメチル化修飾に着目し、対称性のアルギニンメチル化酵素が多能性を維持する方向性を持ち、非対称性のアルギニンメチル化酵素は多能性を阻害する方向性があるという予備的な知見を得ている。

3-2. 多能性獲得過程のメカニズム

始原生殖細胞から高効率で多能性幹細胞を誘導する培養系の検討を行ってきた。その結果 MEK, GSK-3 β および TGF β のシグナル阻害剤を添加することで効率を上昇させることを見出した。培養系のさらなる検討によって、飛躍的に高効率で脱分化を誘導することができることを見いだした。この培養条件を用いて、どのようにして単能性の始原生殖細胞が多能性幹細胞へと脱分化していくのか分子メカニズムの解析を行っている。また、この現象を逆にとらえて始原生殖細胞が始原生殖細胞の性質をどのようにして保っているのか、その分子メカニズムについてもアプローチしている。

4. 自己評価

さがけ期間中に研究総括やアドバイザーの先生をはじめとして多くの方から助言をいただけたことは今後の研究を進めるうえで貴重な経験となった。その結果、生殖細胞と体細胞リプログラミングの関係についていくつかの成果を上げ論文としてまとめることができた。今後は競争の激しい生殖細胞の分野でいかにして独自性や新規性を出していくかということが大きな課題であると考えている。

5. 研究総括の見解

iPS の多能性維持のメカニズムを生殖細胞との比較で考えようとするもので、プロジェクトとしては手堅いプランである。実際、様々な条件で始原生殖細胞から iPS 誘導を行う条件を確立し、この系を用いて様々な問題について検討し、多くの論文を発表した事は期待通りである。ただ、手堅い手法のみでは、より困難で根本的な問題を見つけ、それに挑戦する事は難しい。十分実力がある研究者であると期待しており、次は、このような問題にも積極的にチャレンジしてほしいと希望している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Nagamatsu G***, Kosaka T, Saito S, Honda H, Takubo K, Kinoshita T, Akiyama H, Sudo T,

Horimoto K, Oya M, and Suda T Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by single reprogramming factors. <i>Stem Cells</i> 2013 Mar;31(3):479–87. *corresponding author
2. Nagamatsu G #, Saito S#, Kosaka T, Takubo K, Kinoshita T, Oya M, Horimoto K, Suda T. Optimal ratio of transcription factors for somatic cell reprogramming. <i>J Biol Chem</i> . 2012 Oct 19;287(43):36273–82 #equally contribution *corresponding author
3. Nagamatsu G #, Kosaka T#, Saito S, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, and Suda T Tracing the conversion process from primordial germ cells to pluripotent stem cells in mice <i>Biology of Reproduction</i> 2012 Jun 14;86(6):182 #equally contribution *corresponding author
4. Kinoshita T#, Nagamatsu G #, Kosaka T, Takubo K, Hotta A, Ellis J, Suda T*. Ataxia–telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> . 2011 Apr 8;407(2):321–6.#equally contribution *corresponding author
5. Nagamatsu G #, Kosaka T#, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, Suda T*. A germ cell–specific gene, Prmt5, works in somatic cell reprogramming. <i>J Biol Chem</i> . 2011 Mar 25;286(12):10641–8. #equally contribution *corresponding author

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 永松剛、小坂威雄、田久保圭誉、大家基嗣、須田年生
第 10 回 日本再生医療学会 東京 2011 年 3 月
シンポジウム iPS・ES 細胞の万能性と維持機構の解明 ～Pluripotency の正体とは～
2. **Nagamatsu G**: Conversion of primordial germ cells to pluripotent stem cells and germline stem cells. Third Symposium on Systems and Synthetic Biology (TriSys 2011), Dec 9–11 2011 Suzhou (China)
3. **Nagamatsu G**: Symmetric and asymmetric dimethylation of arginine for the regulation of pluripotent stem cells. 'The International Symposium on CVM-CNU', Oct 29 2012 Gwangju (Korea)

研究報告書

「順遺伝学による iPS 細胞生成機構の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 堀江 恭二

1. 研究のねらい

本研究では、iPS 細胞の生成に関与する遺伝子群を、順遺伝学的手法により同定することを試みた。順遺伝学とは、多数の変異体の中から、目的の表現型を示す変異体を同定・解析する方法である。順遺伝学においては、はじめに変異体を準備する段階では、変異が導入される個々の遺伝子の機能は考慮せずに、可能な限り広範囲の変異導入を行う。このため、目的の表現型を示す変異体を特定した際に、全く予期せぬ遺伝子が原因であることが多く、ブレークスルーに結びつきやすい。しかし、ヒトやマウスを研究対象とする場合、表現型を露呈させるには、2コピー存在する遺伝子の両方を破壊した「ホモ変異体」を得る必要がある。通常の遺伝子破壊法で得られるのは、1コピーのみが破壊された「ヘテロ変異体」であり、ホモ変異体を得るには、さらに多くの労力を要す。このため、従来法では、ヒトやマウスの細胞に対して順遺伝学を適用するのは困難であった。

この問題点を解決するために、我々は、マウス ES 細胞において、ホモ変異体を迅速に単離する方法を開発してきた。多数のホモ変異体 ES 細胞を作製して、順遺伝学的手法により解析すれば、ES 細胞の未分化性を制御する新規遺伝子群を同定できると期待される。iPS 細胞研究の進展過程を振り返ると、ES 細胞の未分化性を制御する遺伝子が、iPS 細胞の生成においても重要な役割を果たす可能性は極めて高い。本研究では、ホモ変異体 ES 細胞バンクの構築と、その表現型解析を通じて、iPS 細胞生成に関する新たな知見を得ることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

独自に開発した方法を用いて、2000 株のヘテロ変異体マウス ES 細胞株を作製し、その中から、200 株のホモ変異体を作製した。これら変異体の中から、分化抵抗性、または、易分化性を示す細胞株をスクリーニングした。このような表現型を示す原因遺伝子は、iPS 細胞生成過程にも重要な役割を果たす可能性があると考えられる。そこで、分化細胞において、スクリーニングで特定した遺伝子の発現を変化させて、iPS 細胞生成への影響を解析し、リプログラミングの制御に関与する遺伝子を同定した。

iPS 細胞を臨床へ応用するには、種々の細胞系譜への分化誘導に関する基礎研究も重要である。そこで、ES 細胞の in vitro 分化誘導系を用いて、神経分化や造血系前駆細胞の生成に異常を来たす変異体を単離した。

(2) 詳細

研究テーマ A「変異 ES 細胞バンクの作製(図 1)」

マウス ES 細胞に対して、レトロウイルスやトランスポゾンを導入して、約 2000 株のヘテロ変

異体を作製し、凍結保存した。すべての変異株に対して、ベクターの挿入部位を決定し、破壊された遺伝子を特定してデータベース化した。その中から、文献的に機能が未知の遺伝子を特定し、順遺伝学のためのホモ変異体を作製した。ホモ変異体を作製するには、ヘテロ変異体を解凍後、Bloom 遺伝子の発現を一過性に抑制する。Bloom 遺伝子を可逆的に ON/OFF するために、我々が

用いた ES 細胞の親株では、Bloom 遺伝子を tet-system で制御可能なように改変している。Bloom 遺伝子の抑制下では、細胞周期の 4N の時期に、相同染色体間の組換えが亢進する。

このため、図 1 に示すように、細胞

分裂後にホモ変異体が効率的に得られると期待される。これまでに、約 200 個のホモ変異体を単離した(論文 1; 学会発表 1, 2; プレスリリース 1)。

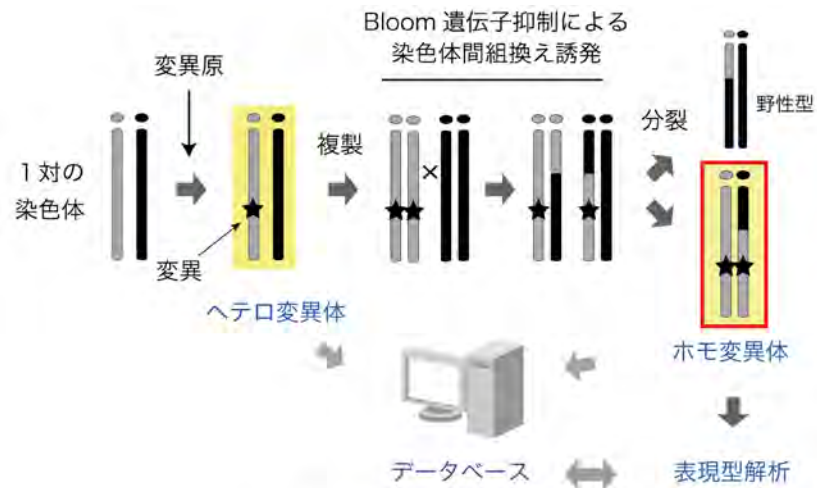


図1. 変異ES細胞バンクの構築

研究テーマ B「変異 ES 細胞バンクを用いた表現型解析」

ホモ変異体 ES 細胞を、様々な条件下で培養し、表現型の同定を試みた。まず、ES 細胞の培養条件として最も一般的な、血清入り培地での「LIF 有り、MEF 有り」の条件に加えて、「LIF 有り、MEF 無し」「LIF 無し、MEF 無し」で培養した。また、無血清培地 N2B27 において「LIF 無し、MEF 無し、2i 有り」の条件でも培養した。2i とは、Mek inhibitor と Gsk3 inhibitor を指す。2i 存在下では、野生型 ES 細胞は極めて未分化性の高い状態で培養できることが知られている。細胞は、6 穴プレート各 well あたり 500 個と、薄く播いた。これは、single cell からの増殖を観察する方が、表現型が露呈しやすいことによる。細胞の播種から1週間後に、細胞の形態を観察し、必要に応じて未分化・分化マーカーの染色を行った。図 2 は、血清入り培地で、LIF 存在下、MEF 非存在下で培養した例である。本実験では、既に分化抵抗性として報告のある3つの遺伝子に関するホモ変異体を、実験条件を評価するための positive control として用いた。図2に示すよう

に、3種類のホモ変異体のいずれも、野生型 ES 細胞と比べて分化抵抗性を示した。興味深いことに、3種類のホモ変異体は、分化抵抗性の程

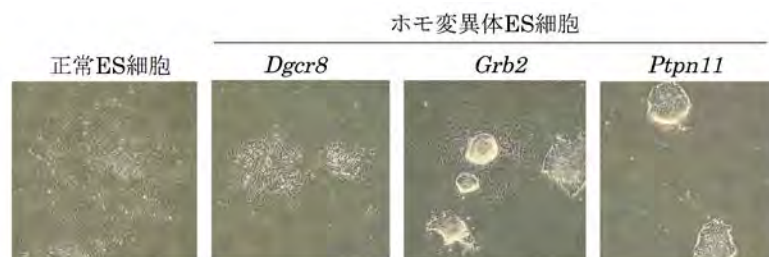


図2. 遺伝子を破壊したES細胞を分化誘導し、正常細胞と比較した。分化抵抗性の性質を持つ細胞の例を示す。

度は、大きく異なっていた。このことは、同一実験条件下で表現型解析を行うことで、各遺伝子の重要度を比較・評価できることを意味し、多数のホモ変異体を有す利点と考えている(論文 1)。

上記のスクリーニングで、易分化性を示した場合は、対象遺伝子が未分化性の維持に関与すると考えられるので、強制発現により iPS 細胞を誘導するための候補遺伝子となる。一方、分化抵抗性を示した場合は、対象遺伝子の機能を阻害することにより未分化性が高まると期待されるので、対象遺伝子の抑制による iPS 細胞の誘導を試みた。

研究テーマ C「iPS 細胞の生成に関与する遺伝子の同定」

分化抵抗性を示す変異体の中に、未分化 ES 細胞の培養条件において、野生型の ES 細胞と比べて、より均一かつ高い未分化性を示す変異体を同定した。これより、この原因遺伝子の機能を分化細胞で阻害すれば、細胞は未分化状態へシフトし、iPS 細胞生成も促進される可能性があると考えられる。そこで、本遺伝子産物を阻害する薬剤を用いて、リプログラミングへの影響を解析した。ES 細胞よりも発生段階が進行していると考えられる epistemic cell(EpiSC)を、無血清培地 N2B27+2i+LIF の条件で培養すると、細胞は、分化もしくは死滅した。それに対して、同じ培養条件で阻害薬を加えたところ、iPS 細胞様の形態を呈すドーム状のコロニーを得た。さらに、このコロニーを単離して培養すると、本阻害薬が無くても iPS 細胞様の形態が維持され、細胞の初期化が十分に行われたことが示唆された。さらに、この細胞をマウス胚盤胞へ注入すると、キメラマウスが得られたことから、細胞の初期化を証明できた(学会発表 3)。ただし、ヒト細胞への効果については、現時点では証明できておらず、さらに別の因子が必要であろうと考えている。

研究テーマ D「細胞分化を制御する遺伝子のスクリーニング」

本変異体 ES 細胞バンクは、iPS 細胞研究以外にも、様々な細胞生物学的解析に利用できる一般的なリソースである。これまでに、造血系や神経系への分化誘導系を適用することで、これらの系譜への分化異常を示す変異体を特定している。分化と未分化性は、表裏一体であることから、様々な系譜への分化誘導を試みる中で、未分化性への考察を深めて行きたい。

3. 今後の展開

本研究を通じて、マウス ES 細胞を用いた順遺伝学的な解析が可能なこと、および、iPS 細胞生成過程へ関与する遺伝子の同定が可能なが示された。上述の遺伝子以外にも、ES 細胞の表現型から、iPS 細胞生成過程への関与が推察される遺伝子を取得しており、今後も、それらの解析を、順次、進めていく。一方、本手法で解析できたのは、約 2 万個ある遺伝子のうちの極一部のみであり、包括的な順遺伝学を行うには、さらなる改良が必要である。最近になって、ヒトやマウスのゲノム改変法には大きな進展があった。ゲノムの特定部位を制限酵素で切断して効率的に変異を導入する方法や、マウスに関しては、染色体が1倍体の ES 細胞を樹立して1コピーのみの遺伝子破壊で表現型を得る方法が報告されている。我々が本研究で樹立した表現型解析プロトコルは、これらの新しい手法で得た変異体へそのまま適用でき、遺伝学的なアプローチをさらに進展させるために有効と考えている。

本研究を遂行する過程で、変異体解析の重要性を再認識するとともに、変異体解析のみに

留まっていたのは、細胞の多能性やリプログラミング機構を深く理解できないことも痛感した。本研究で得た知見をさらに発展させるために、今後は、多能性やリプログラミングの研究ならではの、細胞のダイナミックな状態変化を解析するための研究手法を積極的に取り入れて行きたい。

4. 自己評価

さがけ研究に参加するまでは、私は主に、ゲノム改変の技術開発に携わっていた。しかし、研究者として成長するには、技術開発に加えて、生命現象の根幹の解明に深く取り組むための能力と視野が必須と感じていた。そこで、本さがけ研究では、単にこれまでの技術を生かすのみならず、長期的に取り組むに値する、生物学的な研究テーマを模索することに努めて来た。この点に関しては、未だ論文という具体的な形で示すには至っていないものの、未公開のデータも蓄積しており、本さがけ研究の機会を得たことが、将来の発展のための契機になったと考えている。さがけ研究を通じて、多くの研究者と知り合えたことと、さがけ研究ならではのチャレンジ精神を学んだことを、今後の研究の財産にし、基礎医学の立場から医学の発展へ貢献したい。

5. 研究総括の見解

もともと ES 細胞を利用する順遺伝学システム作りを中心に研究を行っていたが、実際には突然変異形質をどう見つけるかに大きな課題を抱えていた。この問題を一定程度解決する可能性を iPS と分化抵抗性というフェノタイプに求め、いくつかの遺伝子同定にまで至った事は評価できる。解析が間に合わず、期限内に論文発表にまで至らなかったのは残念であるが、今回同定した遺伝子はこれまで調べられているものではないことから、地道に解析を進める事で重要な貢献が出来るのではと期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. **K. Horie**, C. Kokubu, J. Yoshida, K. Akagi, A. Isotani, K. Yusa, R. Ikeda, Y. Huang, A. Bradley, J. Takeda. A homozygous mutant embryonic stem cell bank applicable for phenotype-driven genetic screening. *Nat Methods* 12: 1071-1077, 2011.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[学会発表]

1. K. Horie, J. Yoshida, J. Takeda. A recessive genetic screen for pluripotency regulators using the homozygous mutant mouse embryonic stem cell bank and its application to reprogramming study. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan, June 14, 2011.
2. 堀江恭二、吉田純子、國府力、竹田潤二 哺乳動物細胞における各種トランスポゾンベ

クターの比較解析とゲノム改変への応用 第 84 回日本生化学会大会 京都 2011 年 9 月 23 日

3. 堀江恭二 両アレル変異導入法を用いた ES 細胞の未分化性制御機構の解析 第 10 回 日本再生医療学会総会 東京 2011 年 3 月 22 日

[プレスリリース]

1. 堀江恭二、竹田潤二 ES 細胞において遺伝子機能を迅速に解析する方法を開発
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20111024-2/index.html> 大阪大学・科学技術振興機構
2011 年 10 月 24 日

研究報告書

「ウサギを用いた iPS 細胞総合(完結型)評価系の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 本多 新

1. 研究のねらい

本研究は、多能性幹細胞を用いたヒト医療を開発することを最終目標として、倫理・安全性などの観点からヒトでは不可能もしくは困難な研究を『ウサギ』で行うことに特徴がある。マウスやラットのような扱いやすさと同時にヒトとの類似性をも兼ね備えたウサギで、ヒト多能性幹細胞研究を後押しする。

具体的な項目としては、

- ① ヒト型多能性幹細胞を生じるウサギで iPS 細胞を樹立する。
- ② 樹立した iPS 細胞を ES 細胞と比較することによりその相違を解析する。
- ③ iPS 細胞の質を高めるような処理を施し、キメラウサギ作製に挑む。
- ④ 質を高めた多能性幹細胞で体外分化誘導を行い、幹細胞の質的な評価法を確立する。
- ⑤ ウサギで得られた知見をヒト iPS 細胞研究へと応用し、病因の解明や新しい治療法の開発に役立てる。

2. 研究成果

(1) 概要

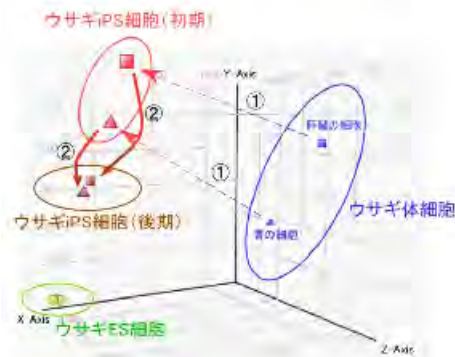
本研究課題採択当初、我々はすでにウサギ ES 細胞の樹立とその解析により、ウサギ多能性幹細胞が naïve ではなく primed(EpiSC タイプ)であることを掴んでいたことから、ウサギで iPS 細胞を樹立することが出来れば、ヒト多能性幹細胞のモデルとして、効果的な研究が展開できると考え研究を開始した。いくつかの試行錯誤の末に、世界初となるウサギ iPS 細胞(Honda et al. 2010)の樹立に成功し、マウスやヒトの多能性幹細胞との類似性や相違点に着目して解析した。実際には、網羅的な遺伝子発現解析から ES 細胞と iPS 細胞における質の相違などについても、確認することに成功した(Honda et al. 2011)。マウスと同様の扱いやすさを誇りながら、ヒト型多能性幹細胞を生じる実験動物はウサギだけと言って良く、ヒトでは不可能なキメラ作製実験や移植実験などもヒト型幹細胞モデルとして容易に展開できる。最近では、primed のウサギ多能性幹細胞をより質の高い幹細胞種(naïve-like)へと変換する技術開発にも成功し、iPS 細胞の質の低さを改善することにも成功している。

(2) 詳細

研究テーマ A「ウサギ iPS 細胞の樹立」

胚性および成熟ウサギの繊維芽細胞から iPS 細胞の樹立を試みたが、その非常に激しい増殖率のために成功には至らなかった。そこで、比較的増殖活性の低い成熟ウサギの胃と肝臓の細胞を用いたところ、ウサギ iPS 細胞の樹立に成功した。樹立した iPS 細胞は各種未分化マーカー陽性で体外および体内で三胚葉性の分化が可能であった。ウサギは

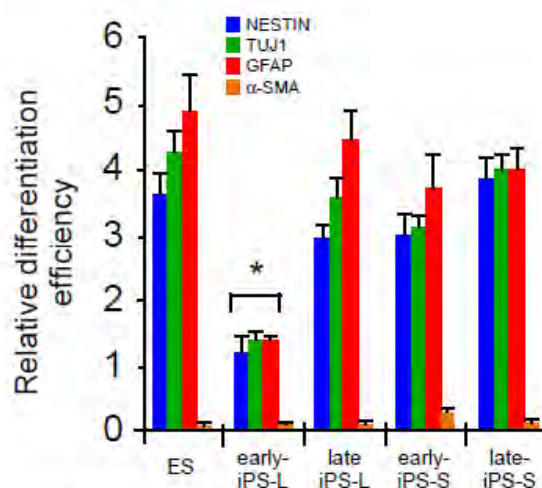
iPS 細胞の比較対象として ES 細胞も容易に樹立できることが特徴の一つであるため、iPS 細胞と ES 細胞との比較に焦点を当てた解析も進めた。ウサギ ES 細胞、肝臓由来の樹立初期・後期 iPS 細胞、および胃由来の樹立初期・後期 iPS 細胞における遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、iPS 細胞は継代などにより外来因子(山中因子)の発現が抑えられ安定化することにつれて、ES 細胞の発現状況に近づくものの、やはり ES 細胞とは質的に異なるということが明らかになった(図1)。これまでの世界的な研究から、ヒト iPS 細胞はその不完全な初期化により、ヒト ES 細胞に比べて質が劣る場合が多く、再生医療実現の懸念材料となっているが、ウサギ iPS 細胞にも同様の不安定性があることが判明した。このことから、ウサギは実験動物としてマウスと同様の扱いやすさと、ヒトと類似した ES/iPS 細胞を樹立できるという優れた特徴を合わせ持つことを証明できた。



(図1)ウサギES細胞とiPS細胞における遺伝子発現パターンの相違:iPS細胞は継代に伴いES細胞の遺伝子発現パターンに類似していく(②)が、安定化したiPS細胞でもES細胞とは明確な相違が残存した。

研究テーマ B「ウサギ iPS 細胞の神経分化誘導による比較」

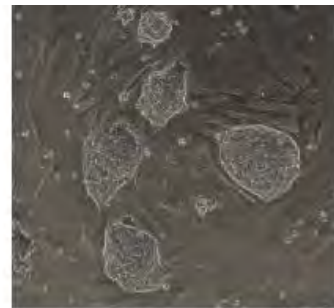
ウサギ iPS 細胞の樹立により、その遺伝子発現状況には ES 細胞との明確な相違が確認されたが、そのような相違が iPS 細胞の分化誘導能にどのように反映されてしまうのかを解析した。我々はヒトやマウスにおいて体外分化誘導システムが発達している神経系列細胞への誘導を、ウサギ多能性幹細胞に適用した。まずは、ウサギ ES 細胞を用いて、条件検討をすることにより、非常に定量性の高い神経幹細胞、神経繊維、アストロサイトなどへの体外分化誘導システムを構築した。続いて、各種 iPS 細胞における神経系列細胞への分化能を ES 細胞と比較したところ、肝臓由来の樹立初期 iPS 細胞において有意に分化能が劣ることが判明した。しかしながら、樹立後期の iPS 細胞であれば肝臓由来のものであっても ES 細胞と同様の分化能を獲得できることが明らかとなった(図2)。さらに、より分化誘導の困難なオリゴデンドロサイトへの分化を誘起したところ、樹立後期の iPS 細胞であっても ES 細胞と同様の効率で分化させることはできなかった。これは、ES 細胞と iPS 細胞の根本的な質的相違が、オリゴデンドロサイトのようなターゲットに分化誘導することにより顕在化したと言える。



(図2)神経系列への体外分化誘導能評価:神経系への分化能は肝臓由来樹立初期(early-iPS-L)で有意に低かった。

研究テーマ C「ウサギ iPS 細胞の naïve-like 変換」

多能性幹細胞にはキメラ形成能や生殖細胞への分化能を有する、非常に質の高い naïve と呼ばれるタイプ(おもにマウス・ラットから樹立される)と、三胚葉性の分化能は有するものの、キメラ形成能に乏しい primed と呼ばれるタイプ(マウス・ラット以外の動物種から樹立される)に分類できることが知られている。Naïve と呼ばれる多能性幹細胞は primed と呼ばれるものよりも質的に上位であると考えられており、もともと primed であるヒト多能性幹細胞を naïve タイプに変換することができれば、幹細胞としての質を土台から向上させることとなり、より複雑な細胞や組織への高効率の分化誘導さえ可能となると期待されている。しかし、「真の naïve」としての特徴を明らかにするためには、naïve タイプとして変換した細胞のキメラ形成能を評価することが必要不可欠であり、primed の多能性幹細胞を生じながらもキメラ作製実験を容易に展開できるウサギを用いることが有効である。そこで、ウサギで樹立した iPS 細胞を naïve タイプに変換することを試みた。Oct3/4 遺伝子の強制発現維持や培養環境の改変により、形態的にマウスの多能性幹細胞によく似たコロニーを形成することに成功した(図3)。現段階ではこの細胞を用いてキメラ産仔を得るに至っていないため naïve-like 細胞と命名した。この細胞は体外および体内での三胚葉性分化能も保持しているだけでなく、初期胚に注入すれば高効率で胚盤胞期胚の内部細胞塊に寄与することが確認された。さらに、神経系への分化誘導を行ったところ、胃由来の iPS 細胞を naïve タイプへ変換した場合、量的だけでなく質的にも ES 細胞を越えうる能力を獲得することが示唆された。



(図3) Naive-likeタイプへと変換したウサギiPS細胞

3. 今後の展開

今後も引き続き、ウサギ多能性幹細胞のキメラ形成能に重点を置いた研究を続ける。具体的には、導入遺伝子の検討や培養条件の改変により検討する。多能性幹細胞の質的な向上はキメラ形成能だけでなく、体外分化誘導能での評価も積極的に行う予定である。最終的には、ES細胞と相違のない iPS 細胞の質を獲得させることを目指す。ウサギ多能性幹細胞で得た知見は、サルやヒトの多能性幹細胞に応用する。疾患由来 iPS 細胞なども、naïve タイプなどへの変換により primed の際には見いだすことの出来なかった特徴を明らかにすることも可能であろう。ウサギだけでなくマウスやサルを含めた複数種類の動物を用いて、生命科学の発展だけでなくヒトの医療に発展するような研究で貢献したい。

4. 自己評価

本研究の最終目標はウサギからヒトへの研究展開であり、そのような観点から客観的に判断すると、まだヒトへの展開には時間がかかると言わざるを得ない。しかしながら、キメラ作製を基軸とした解析システムや、神経系への体外分化誘導による比較システムなどを構築することに成功しており、一步ずつ着実に前進している。また、疾患 iPS 細胞を用いた本研究領域研究者との共同研究も進み始めており、予想以上の発展も見込まれる。異動に伴い神経系への分化誘導とその評価に関する論文発表に時間がかかっていることも懸念材料であるが、追加実験の多くを異動先の宮崎大学で行うことができ、システムの構築にも役だった。今後は、本研究領域で培った人脈なども大切にしながら、トランスレーショナルリサーチの発展に貢献したい。

5. 研究総括の見解

計画されたプロジェクトは比較的単純で、ウサギというモデル動物を iPS も含め、様々な胚操作が可能な系に仕上げるというものである。プロジェクトに参加する以前から ES 細胞樹立などを進めており、全体のシステムを構築するという長いスパンの期待を込めて採択している。期間中にウサギ iPS の樹立を行い、論文に報告した事、またナイーブ状態の iPS 作製への手がかりを得ている事、更にキメラ系性能を持つ iPS の作製のための準備など、着実に研究が進んでいる。今後も、ウサギの胚操作の中心研究者となるよう、これまでの研究を地道に進めることを希望する。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. **Arata Honda**, Michiko Hirose, Masanori Hatori , Shogo Matoba, Hiroyuki Miyoshi, Kimiko Inoue, Atsuo Ogura. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285: 31362-31369

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 2012 年 9 月 10 日 Honda A, Hirose M, Hatori M, Ogura A. Development of ES/iPS cell research using rabbits. The 2nd Japan-Czech Joint Symposium(東京)
2. 2011 年 7 月 1 日 Honda A. Generation and quality assessment of pluripotent stem cells in rabbits. The 4th International rabbit biotechnology meeting (Hungary)

著作物

1. Arata Honda., Isolation and culture of rabbit embryonic stem cells. Methods in Molecular Biology “Epiblast Stem Cells: Methods and Protocols” (in press)

受賞

1. 平成 23 年 5 月 26 日 第 58 回日本実験動物学会総会
日本実験動物学会奨励賞(受賞者氏名:本多 新)
タイトル:実験動物の新規幹細胞の樹立技術と利用法の開発
表彰主催団体:(社)日本実験動物学会

プレス発表

1. 平成 22 年 8 月 6 日 ウサギ iPS 細胞の樹立に世界で始めて成功
ー再生医療研究に向け「ヒト型」の新細胞材料を提案ー



(<http://www.riken.go.jp/r-world/research/results/2010/100806/index.html>)

研 究 報 告 書

「細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研 究 者: 李 知英

1. 研究のねらい

一生に渡って新たな精子が作られる精巣と違って、卵巣では一回作られた卵子は排卵によって消耗されるのみならず、成体が年を取るにつれて卵子は退化し、高齢出産による突然変異率の増加などの危険性も存在する。したがって、生殖幹細胞の不妊治療材料としての有用性から着目して、本研究ではマウスの胎児期の雌性生殖巣と生後マウスの卵巣から、卵原幹細胞の増殖能力を高めるため細胞周期を操作する新たな方法を用いて卵原幹細胞の樹立を行う。さらに試験管内で卵原幹細胞から卵子様細胞を分化誘導し、最終的にはこれらの卵子様細胞から IVF による子孫作製を可能にすることを目指す。これらの研究が成功すれば、卵子形成に関するメカニズムを分子レベルで解明することが出来るとともに、試験管内で卵原幹細胞と卵子様細胞が培養出来ることで、不妊治療や再生医療にその技術が応用出来ると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

新規卵原幹細胞の長期培養と樹立のために、雌性生殖細胞の生物学的性質究明、新規卵原幹細胞の長期培養と樹立の試みおよび卵子形成の試験管内再構築のテーマについて研究を行ない以下のような成果が得られた。胎児期雌の生殖細胞と生後卵巣の生殖細胞において CD9 と CD49f が発現することが明らかとなり、胎児期 13 日目以降の生殖細胞にも細胞周期の G1 と S 期の細胞が存在することを見出した。また、MVH-Venus Tg マウスを用いて新生児卵巣から MVH 陽性細胞の培養を行ない、これらの細胞は試験管内で feeder 細胞なしの条件で非対称分裂することが明らかとなり、新生児卵巣細胞の培養や器官培養により新生児の未分化卵細胞を試験管内で分化させることに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「雌性生殖細胞の生物学的性質究明」

本研究の目標である新規卵原幹細胞の長期培養と樹立のために、胎児期の雌性生殖巣、新生児の卵巣、成体の卵巣やその中の細胞等を詳細に解析することは大変重要である。このため、卵原幹細胞の試験管内増殖のため卵子形成過程での細胞周期の変化パターン、または卵巣内細胞外環境関連遺伝子を見出すため胎児期 13 日から 17 日雌性生殖巣と卵巣を用いてマイクロアレイ解析を行なった。その結果、細胞周期関連遺伝子の Gadd45a と p27 の高発現が成体マウスの卵巣で見られることを確認した。p27 の核内局在で細胞周期が arrest され、p27 の核外移動で細胞周期が進行することから考えると、上記の結果は胎児期生殖巣や新生児卵巣で Gadd45a と p27 の低発現が生殖細胞の増殖に重要であることを示唆する。

次に、組織学的解析により胎児期雌性生殖巣と生後卵巢において幹細胞マーカーまたは生殖細胞マーカーの発現を確認した所、細胞表面抗原の CD9 が生殖細胞マーカーである MVH(Mouse Vasa homolog)と共発現することが分かった。興味深いことに生後6日目卵巢で見られている CD9 と MVH 陽性細胞は単独で顆粒膜細胞に囲まれているのに対して、生後1日目卵巢の CD9 と MVH 陽性細胞はまだ同一細胞の cluster として存在していたので、この時期の生殖細胞は幹細胞として培養できる(自己複製能を持つ)候補の一つと考えた。最終的に、細胞表面抗原パターンから、野生型マウス胎児期雌性生殖巣から細胞表面抗原の CD9 high/CD49f intermediate の細胞集団が MVH 陽性の生殖細胞であることが明らかとなった。また、胎児期 13-18 (12.5-17.5)日雌性生殖巣の CD9 high/CD49f intermediate 細胞集団を用いて細胞周期の DNA 合成期(S phase)の DNA に取り込む BrdU の取り込み実験を行ない生殖細胞の細胞周期パターンを詳細に調べることができた。その結果、胎児期 15(14.5)日までは生殖細胞の 20%以上が S phase の細胞であることが明らかとなり、G2 arrest 細胞が増加する後期胎児期 17, 18 (16.5, 17.5)日にも数%の S phase の細胞が存在することが明らかとなった。この結果は胎児期後期にも増殖能を持つ生殖細胞が存在することを示唆する。

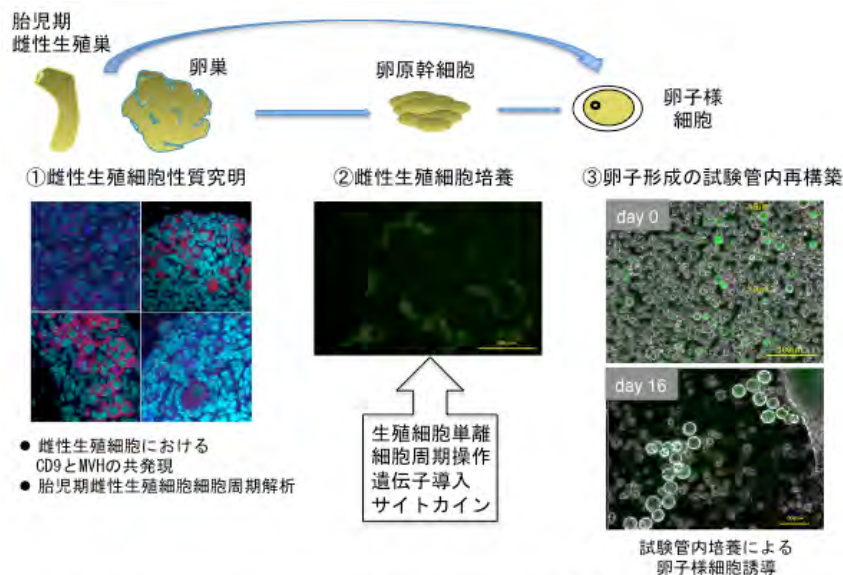


図1. 新規卵原幹細胞の樹立と卵子形成の試験管内再構築の概略図

研究テーマ B「新規卵原幹細胞の長期培養と樹立の試み」

卵原幹細胞の樹立法開発のために、最初に、研究テーマ A の結果から Gadd45a と p27 の高発現が成体マウスの卵巢で見られたため、p27 の核外移動を引き起こして細胞周期進行に役割を果たす Ras と CyclinD2/E を卵巢細胞へ遺伝子導入し、生殖細胞の増殖を試みた。その結果、遺伝子導入初期では分裂するコロニーが観察されたが、これらの細胞は長く培養できなかった。

次に、自己複製分裂する生殖細胞を単離するために、マウス卵巢の細胞を CD9 と MVH 抗体で反応したあと、ソーティングを行ない、CD9-intermediate/MVH 陽性集団を用いて培養を行った結果、これらの細胞集団は試験管内で凡そ2ヶ月間培養できた。これらの細胞は2ヶ月以上培養したあとでも CD9 と MVH を発現したが、長期培養までは至らなかった。CD9 と MVH

陽性の細胞が in vivo で growing oocyte へ分化できるのかを確認するために、これらの細胞を不妊マウス卵巣へ移植した。細胞が移植された卵巣が control より若干大きくなったのが移植 1 ヶ月後に観察され、免疫染色より MVH 陽性細胞が cluster を形成しているのが検出されたが成熟な卵は観察されてない。

最後に、MVH-Venus Tg マウスを用いて新生児卵巣から MVH 陽性細胞の培養を行なっている。これらの細胞は試験管内で feeder 細胞なしの条件で非対称分裂することが明らかとなった。また、培地にあるケモカインを添加することで生殖細胞の運動性が増加して細胞分裂が引き起こされる現象が確認された。細胞分裂する PGC は運動性を持っていることから、1) 胎児期の PGC で上記のケモカイン受容体が高発現し、生後の卵巣では発現が低下して細胞分裂が rare event になる、2) ケモカイン受容体は同様な発現を示すが生後卵巣では integrin-fibronectin adhesion が増加して生殖細胞は運動性を失い、顆粒膜細胞などに囲まれ分化(成熟)の過程へ入ることが考えられる。Stella-EYFP マウスを用いて新生児卵巣から Stella 陽性細胞を単離して上記の MVH 陽性細胞と同様な実験を行なった結果、Stella 陽性細胞も MVH 陽性細胞と同様に試験管内で feeder 細胞なしの条件で非対称分裂するのが確認された。長期に至る培養を可能にするための条件の最適化を今後とも継続して行う必要がある。

研究テーマ C「卵子形成の試験管内再構築」

MVH 陽性細胞の単離なしで雌性生殖幹細胞を増やす条件を見出すために、色々な培養条件を検討した結果、新生児卵巣細胞を培養すると大きくて丸い卵子様細胞が出現することが分かった。同一培養条件で野生型マウス(ICR)の新生児卵巣細胞を 15 日と 22 日間培養して大きくて丸い細胞を免疫染色するとこれらの細胞は MVH(生殖細胞マーカー)と ZP3(透明帯マーカー)を発現していたので卵子様細胞であると考えられた。この結果は新生児卵巣の未分化生殖細胞が試験管内で成熟・分化できたことを示唆する。

雌性生殖細胞系列において、哺乳類の発生に必須なゲノムインプリンティングの成立は卵の成熟過程で起こるため、試験管内で成熟された卵子のインプリンティング状態は大変重要である。本研究で、新規の新生児卵巣器官培養法から試験管内で成熟された卵子には PGC と未成熟卵には消去されていたインプリンティングが再び入っているのが確認された。これはこの器官培養系が卵の成熟に充分であることを示唆する。幹細胞の樹立後の培養にこの器官培養系を用いることで、in vivo の卵巣への移植なしで、試験管内で卵の成熟まで至ることが可能になると考えられる。

3. 今後の展開

試験管内卵子様細胞の分化誘導または卵巣器官培養に関しては有用な成果が得られた。しかし卵原幹細胞の樹立に関しては、MVH または Stella 陽性細胞は両方とも試験管内で feeder 細胞なしの条件で分裂するのが確認されたが、これらは長期間に渡る自己複製能は獲得できていないため、今後、長期培養のため持続した研究が必要である。雌性生殖細胞に自己複製能が獲得される機構が明らかとなれば将来的に医療への応用なども期待できる。

ICR マウス新生児卵巣細胞の培養で MVH と ZP3 が発現するある程度成熟・分化した卵細胞ができたことから、この細胞で IVF または ICSI ができるように GVBD を引き起こす刺激(FSH,

PKA inhibitor など)の添加を試みるなど、試験管内で誘導された卵子の受精能力獲得を測る研究を発展的に継続したい。さらにこれらの卵子の評価系としてインプリンティング領域と非インプリンティング領域のメチル化状態と遺伝子発現の網羅的(ゲノムワイド)解析を用いる。次世代シケンサーを用いて、微量サンプルからのRNA seq (遺伝子発現定量)やDNAメチル化解析(MeDIP, bisulfite sequencing)ができれば、試験管内卵子の性質評価による上質の卵子誘導方法が見出されると期待される。

4. 自己評価

新規の卵原幹細胞を樹立するのが本研究の目的であり、試験管内で卵巣からの生殖細胞を培養し、分裂することを確認したが、長期培養という目的の完全な達成には至っていない。しかし、技術中心の研究の進め方に偏っていた私に、もっと生物学的意義について考えるようにと助言を頂いたおかげで、本研究を通じて、異論の多い雌の生殖幹細胞の存在に関して新たな知見が見出されつつある。これらの成果をもとにこれからも本研究を発展的に継続したい。また、卵原細胞の試験管内分化を可能にする代替の方法を確立したのは一つの成果といえる。特に器官培養から得られた卵子にインプリンティング遺伝子領域にDNAメチル化が入っていたことは大変望ましく、これらの系と卵原幹細胞を組み合わせることで完全に試験管内で端子形成の再構築ができることが期待される。

5. 研究総括の見解

生後すぐに増殖を停止し、そのまま活性化されるまで停止期を維持する卵子を試験管内で増殖させようとする、ある意味では大挑戦的、ある意味では独断的な計画である。残念ながら、期待通りに卵子を試験管内で増殖させるところまでには至らなかった。これは外側から見ると当然の事とも言える。しかし、この挑戦を通して本人は卵子の増殖と成熟という、あまりよく分かっていないが重要な研究分野へもう少し地道なアプローチをするための準備ができたのではないかと期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Morimoto H, Lee J, Tanaka T, Ishii K, Toyokuni S, Kanatsu-Shinohara M and Shinohara T. In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection. *Biol. Reprod.* 2012, 86, 1-11.
2. Lee J § and Shinohara T. Epigenetic modifications and self-renewal regulation of mouse germline stem cells. *Cell Research* 2011, 21, 1164-1171. (§ corresponding)

(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、プレスリリース等)

1. Lee J et al. Alternative culturing method of in vitro oogenesis from postnatal mouse ovary.,

EMBO | EMBL Symposium: Germline – Immortality through Totipotenc, ドイツ、2012 年 10 月 13 日-16 日

2. Lee J: Establishment of germline stem cells and reconstruction of oogenesis in vitro., 東京医科歯科大学 第 88 回GCOE総合プレゼンテーション、東京、2011 年 11 月 7 日
3. 李 知英: 生殖幹細胞の樹立と利用について: 第12回REG (Reproduction technology, Embryo manipulation and Gene recombination) 部会、教育講演、順天堂大学医学部、東京、2010 年 11 月 13 日

研究報告書

「リプログラミング技術を用いた遺伝性血管疾患の新規治療標的の同定」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 渡部 徹郎

1. 研究のねらい

本研究の目的は Loeys-Dietz 症候群(LDS)など transforming growth factor (TGF)- β ファミリーシグナル伝達因子の遺伝子に異常がある遺伝性血管疾患の発症要因を明らかにすることである。そのために LDS 患者から iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞を用いて in vitro 分化系により得られた血管細胞の細胞生物学的性質を検討することを目指している。また線維芽細胞から iPS 細胞を樹立する過程の最初のステップにおいて、線維芽細胞が上皮細胞の性質を獲得していることが報告されているが、TGF- β ファミリーシグナルが発生過程やがんの浸潤・転移過程などにおいて上皮間葉移行(Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT)を誘導することから、iPS 細胞へのリプログラミング過程における TGF- β ファミリーシグナルの役割についても検討を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

人工多能性幹(iPS)細胞は成体の体細胞から作成できる胚性幹(ES)細胞のようにさまざまな臓器に分化する能力を有した細胞である。その分化能から遺伝性または後天的に機能不全な細胞を補う再生医療への応用が期待される中、疾患モデルがないために発症機構が不明の疾患の研究について、患者の細胞に由来する疾患特異的 iPS 細胞を用いる取り組みが進められている。本研究においては、まず Loeys-Dietz 症候群(LDS)という TGF- β シグナルに異常がある遺伝性血管疾患の発症要因を明らかにするために、LDS 患者から iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞を用いて in vitro 分化系により得られた血管細胞の細胞生物学的性質を検討することを試みた。TGFB2 (TGF- β タイプ 2 受容体)遺伝子に変異を有する LDS 患者の皮膚線維芽細胞から樹立された iPS 細胞の未分化性が各種未分化マーカーでの免疫染色ならびにアルカリフォスファターゼ染色で確認された。これら iPS 細胞における TGF- β シグナルの伝達を検討したところ、正常 iPS 細胞と比較して有意な変化は見られなかった。これらの iPS 細胞を LDS の発症に最も関与すると考えられる平滑筋細胞に分化させて、正常 iPS 細胞由来の平滑筋細胞と比較して相違があるか、また TGF- β シグナルの伝達において差があるか検討する予定である。

さらに本研究では安全な iPS 細胞を効率良く樹立するために、iPS 細胞の樹立過程における間葉上皮移行(Mesenchymal-to-Epithelial Transition: MET)と MET を調節する TGF- β シグナルの役割を検討した。線維芽細胞から iPS 細胞が作製される過程の最初のステップにおいて、線維芽細胞が MET を介して上皮細胞の性質を獲得しているが、私はまず山中因子の中で Klf4 が単独でマウス胎生線維芽細胞(MEF)の MET を誘導することを明らかにした。さらに MET を阻害する TGF- β シグナルを低分子化合物により抑制することで、リプログラミング

の初期段階において MET が誘導され、Klf4 なしで (Oct3/4、Sox2、c-Myc の 3 因子で) iPS 細胞が効率良く作成できることが示された。以上の結果から TGF- β シグナルの阻害が MET を誘導することにより、Klf4 の作用を代替し、効率良く iPS 細胞を樹立することが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A. 遺伝性血管疾患 iPS 細胞の樹立と解析

Loeys-Dietz 症候群(LDS)はマルファン症候群2型とも呼ばれ、大動脈の乖離や破裂が1型よりも早期に起こり、さらに口蓋裂や眼角乖離などの症状なども見られることが知られている。LDS の患者においては TGF- β シグナル伝達因子の遺伝子に異常が同定されている。TGF- β は細胞膜上の I 型 β R-I) ならびに II 型受容体 β R-II) からなる受容体複合体に結合する(図 1)。TGF- β の結合により活性化された I 型受容体は細胞内シグナル伝達因子である

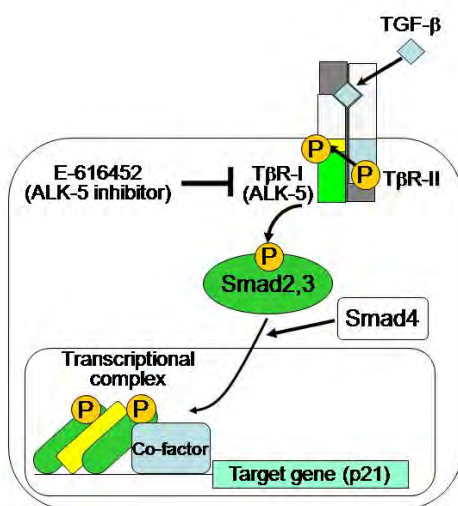


図 1. TGF- β シグナル伝達経路

Smad2 タンパク質のリン酸化を介して、そのシグナルを細胞内に伝達する、リン酸化された Smad2 は Smad4 と結合して核内に移行し、標的遺伝子の発現を調節する。LDS の患者においては I 型 β R-I) ならびに II 型受容体 β R-II) 遺伝子において変異が存在することが報告されており、TGF- β シグナルの変化が発症の要因であることが予測されている。我々を含む複数の研究室が LDS 患者において同定される TGF- β 変異受容体のシグナル伝達能力を検討したところ、これらの変異体は TGF- β シグナルを伝達できないことが見出された。

それに関わらず LDS 患者の血管平滑筋細胞において TGF- β シグナルの活性化の指標である Smad2 のリン酸化は上昇することが報告されており、LDS の発症機序については未解明な部分が多く残されている。

私は熊本大学の江良先生との共同研究で T β RII 遺伝子において変異が存在する LDS 患者の線維芽細胞から樹立した疾患 iPS 細胞を用いて、LDS の発症機構の解明を進めている。まず、樹立された iPS 細胞の未分化性を検討するために、各種未分化マーカーでの免疫染色ならびにアルカリフォスファターゼ染色を行ったところ、これら 2 ラインの iPS 細胞が未分化性を有していることが示された(図 2)。またこれら iPS 細胞における TGF- β シグナルの伝達を検討したところ、正常 iPS 細胞と比較して有意な変化は見られなかった。

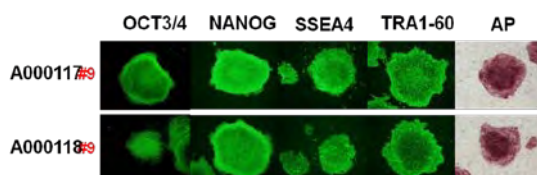


図 2. LDS 疾患 iPS 細胞の解析

そこでこれらの iPS 細胞を LDS の発症に最も関与すると考えられる平滑筋細胞に分化させて、正常 iPS 細胞由来の平滑筋細胞と比較して相違があるか、また TGF- β シグナルの伝達において差があるか検討している。

研究テーマ B. iPS 細胞の作製過程における TGF- β シグナルの役割の解析

iPS 細胞を再生医療などの目的に利用していくことを考えた場合に、現在 iPS 細胞を作成するために導入している外来性の Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc (山中因子)をいかに数を少なくしていくかが課題である。そのためにはこれらのリプログラミングを誘導する因子がどのように作用しているかについての分子機序を解明していくことが重要であるが、これら山中因子の作用については未解明な部分が多く残されている。

近年の報告により、線維芽細胞から iPS 細胞が作製される過程は多段階から構成されており、その最初のステップにおいて、線維芽細胞が上皮細胞の性質を獲得していることがあきらかになっている(図3)。



図 3. 線維芽細胞からの iPS 細胞樹立における多段階モデル

この現象は間葉上皮移行(Mesenchymal-to-Epithelial Transition: MET)と呼ばれており、腎臓の上皮細胞の形成などにおいてみられる現象である。私はまず山中因子の中で Klf4 が単独でマウス胎生線維芽細胞(MEF)の MET を誘導することを明らかにした。

一方がんの浸潤・転移過程などにおいて上皮細胞が間葉細胞へ移行(Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT)することもわかっており、TGF- β ファミリーシグナルが中心的な役割をはたしていることが示されている。TGF- β シグナルの阻害が iPS 細胞の樹立の効率を向上させることは報告があったが、リプログラミングの初期段階・MET における検討はされていなかった。私は TGF- β シグナル阻害剤(E-616452)がリプログラミングの初期段階において MET を誘導し、TGF- β シグナルを阻害すると Klf4 なしで (Oct3/4、Sox2、c-Myc の 3 因子で) iPS 細胞が効率良く作成できることを示した。以上の結果から TGF- β シグナルの阻害が MET を誘導することにより、Klf4 の作用を代替することが示唆された。

3. 今後の展開

本研究課題により、LDS という TGF- β 受容体遺伝子に変異がある遺伝性血管疾患において TGF- β シグナルの伝達能が変化していることが示された。これから LDS 患者由来の疾患 iPS 細胞を用いて疾患発症の機序が解明されていくことが期待される。

またTGF- β シグナルの阻害により、Klf4 の作用を代替できることが明らかになったことにより、より安全なiPS細胞の作成が可能になっていく可能性が示された。これからヒトiPS細胞の樹立においても同様の現象が観察できるか検討していくことが課題の一つである。

4. 自己評価

LDS 疾患 iPS 細胞の樹立と解析に時間がかかったために、血管平滑筋にまで分化させて解析をするまで至らなかったことは残念であったが、これからも解析を継続していく予定である。研究期間内に開始した iPS 細胞の作製過程における TGF- β ファミリーシグナルの役割の解析については堅実な進捗が得られたことは本研究課題における成果である。この成果を論文として報告するのみならず、実用につながるようにさらに発展させていきたい。

5. 研究総括の見解

現在国を挙げての研究が始まっている疾患 iPS 研究のさきがけとして、得意の血管分野と TGF シグナルを組み合わせた疾患を選び iPS を使って研究する手堅いプランといえる。期待通り、患者さん由来の iPS を作製するところまでは進んでいるが、病態と相関する現象を試験管内で得られるというところまでは進展しなかった。これについては、今後も解決すべき多くの問題が残っていると思う。時間がかかっては是非、疾患 iPS の有用性が示せるところまで研究を進展させてほしい。研究の過程で、TGF β 阻害剤が iPS 化を促進するという発見をし、これが KLF4 に媒介されている事を示した結果はこの分野の重要な貢献であると思う。早急に論文にする事を期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, **Watabe T**, Miyazono K. (2012) TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *J. Biochem.* 151:205-216.
2. Mihira H, Suzuki HI, Akatsu Y, Yoshimatsu Y, Igarashi T, Miyazono K, **Watabe T**. (2012) TGF- β -induced mesenchymal transition of MS-1 endothelial cells requires Smad-dependent cooperative activation of Rho signals and MRTF-A. *J. Biochem.* 143:199-206.
3. Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Mihira H, Itoh T, Suehiro J, Yuki K, Harada K, Morikawa M, Iwata C, Minami T, Morishita Y, Kodama T, Miyazono K, **Watabe T**. (2011) Ets family members induce lymphangiogenesis through physical and functional interaction with Prox1. *J. Cell Sci.* 124:2753-2762.
4. Suzuki Y, Ohga N, Morishita Y, Hida K, Miyazono K, **Watabe T**. (2010) BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* 123:1684-1692.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等

講演

1. **Watabe T**, Kamiya Y, Taguchi L, Miyazono K. Inhibition of endogenous TGF- β signals enhances the efficiency of the generation of induced pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts through inducing mesenchymal-to-epithelial transition. The 10th *Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Meeting* (横浜) 2012 年 6 月 13~16 日
2. **Watabe T**, Kokudo T, Mihira H, Yoshimatsu Y, Miyazono K. Activation of Signaling and Transcriptional Networks during TGF- β -induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndMT). *The 17th International Vascular Biology Meeting* (Wiesbaden, Germany) 2012 年 6 月 2~5 日
3. **Watabe T**. Roles of BMP-9 signals during the formation of lymphatic vessels. *Gordon Research Conference Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease* (Ventura, U. S. A.) 2012 年 3 月 4~9 日
4. **Watabe T**. Roles of TGF- β superfamily signals during the endothelial-mesenchymal transition. *TGF- β Meeting in Uppsala* (Uppsala, Sweden) 2011 年 8 月 18~20 日
5. **Watabe T**, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Miyazono K. BMP9 induces proliferation of mouse embryonic stem cell-derived endothelial cells. *The 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Meeting* (Toronto, Canada) 2011 年 6 月 15~18 日
6. **Watabe T**, Yoshimatsu Y, Mihira H, Itoh T, Yuki K, Harada K, Iwata C, Yamazaki T, Morikawa M, Miyazono K. Ets family members induce lymphangiogenesis via physical and functional interaction with Prox1. *The 16th International Vascular Biology Meeting* (Los Angeles, U.S.A.) 2010 年 6 月 19~23 日
7. **Watabe T**, Yoshimatsu Y, Mihira H, Itoh T, Yuki K, Harada K, Iwata C, Yamazaki T, Morikawa M, Miyazono K. Ets family members induce lymphangiogenesis via physical and functional interaction with Prox1. *Gordon Research Conferences Molecular Mechanisms in Lymphatic Function & Disease* (Lucca, Italy) 2010 年 6 月 13 日~18 日