

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15489

研究課題名(和文)幹細胞の若返りと組織および個体

研究課題名(英文)Rejuvenation of stem cells, tissues and individuals

研究代表者

高島 康弘 (Takashima, Yasuhiro)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師

研究者番号：70469930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、リプログラミングの技術を用いて、ヒトプライム型ES/iPS細胞をより未分化なヒトナイーブ型iPS細胞に若返らせることに成功した。このナイーブ化の過程において、iPS細胞は脱メチル化が進んでいく。プライム型からナイーブ型ES/iPS細胞へとリセットされていくタイムコースの詳細や遺伝子発現を解析した。その結果、より効率的で安定して誘導する方法を開発した。将来的にはここで得られた知見を体性幹細胞や体細胞におけるメチル化の進行と比較し、ナイーブ化時にみられた脱メチル化のプロセスを応用することで不要なメチル化を抑える手法の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in rejuvenating human primed ES/iPS cells to more undifferentiated human naive iPS cells using reprogramming techniques. In this naive process, iPS cells are demethylated. We try to analyze and clarify the process that is reset from primed type to naive type ES/iPS cells. Detailed time course and gene expression of resetting from primed type to naive type ES/iPS cells were analyzed. As a result, we developed a method to induce naive ES/iPS cells more efficiently and stably.

In the future, we will compare the findings obtained here with the progression of methylation in somatic stem cells and somatic cells, and apply a method of demethylation we find, which was observed at naive ES/iPS cells and resetting process, to suppress unnecessary methylation.

研究分野：発生

キーワード：多能性幹細胞 ナイーブ型 プライム型

1. 研究開始当初の背景

私たちの個体は幹細胞から新規細胞が供給され、古い細胞は取り除かれ、新陳代謝し、維持される。膵β細胞をはじめとした体細胞も加齢に伴い増殖能や分化能を失う。加齢に伴う機能低下も推測され、膵β細胞ではインスリン分泌能が低下するとされる。2型糖尿病では、インスリン抵抗性ととも、インスリン分泌が相対的に不足し、β細胞が疲弊していく。この老化、疲弊の根本には、エピゲノム修飾が関わっていると考える。そこで本研究では、DNAメチル化と遺伝子発現、non-coding RNAに着目し、発生の時間軸を巻き戻すことにより、microRNAがどのように変化するか解析する。

精子と卵子が受精し、受精卵となり、新たな生命が始まる。しかしながら、受精後は父親側と母親側のエピゲノムの記憶が残っている。すなわち、前世代のエピゲノムを引き継いでいる。卵割がはじまり、発生が進むにつれて、前世代のエピゲノムは消されていく。胚盤胞期のエピプラストにおいて、DNAメチル化は最も低くなり、エピゲノムのリセットが完了する。この後発生が進むにつれて、次第にDNAメチル化は進んでいき、発現する遺伝子は限定されていき、運命が決定される。以上からDNAメチル化が最も低いエピプラストはまさしく新しい生命が始まる時であり、このエピプラストに一致した多能性幹細胞がナイーブ型ES/iPS細胞である。一方、現在一般的に使用されているヒトES/iPS細胞は、より発生が進み、分化にコミットしたプライム型と考えられている。

我々は、リプログラミングの技術を用いて、ヒトプライム型ES/iPS細胞をより未分化なヒトナイーブ型iPS細胞に若返らせることに成功した。このナイーブ化の過程において、iPS細胞は脱メチル化が進んでいく。プライム型からナイーブ型ES/iPS細胞へとリセットされるプロセスを解析し、明らかにする。将来的にはここで得られたエピゲノムのコントロールに関する知見を体性幹細胞や体細胞に応用する。体細胞の老化に伴い起こるメチル化の進行と比較し、ナイーブ化時で見られた脱メチル化のプロセスを応用することでメチル化をコントロールし、老化し機能が落ちた細胞を脱メチル化させる。そして機能を回復させる方法の確立を目指す。

2. 研究の目的

我々は、リプログラミングの技術を用いて、ヒトプライム型ES/iPS細胞をより未分化なヒトナイーブ型ES/iPS細胞にリセットすることに成功している。ナイーブ型とプライム型は同じ多能性幹細胞であるが、発生の時間軸で見ると、ナイーブ型は子宮着床前胚に一致する

が、プライム型は子宮着床後胚に一致し、より発生の進んだ多能性幹細胞である。プライム型ES/iPS細胞をナイーブ型ES/iPS細胞にリセットすることによって、プライム型ES/iPS細胞を若返らせるととらえることができる。試験管内で解析可能なプライム型iPS細胞とナイーブ型iPS細胞を観察できる系を樹立し、細胞が若返るメカニズムを解析するモデルを立ち上げる。

3. 研究の方法

ヒトナイーブ型ES/iPS細胞を作成するために、まずヒトプライム型ES/iPS細胞にEOS-GFPベクターを導入した。転写因子OCT3/4はナイーブ型とプライム型で使用されるdistal enhancerが異なっている。ナイーブ型はproximal enhancerを利用し、プライム型はdistal enhancerを利用している。EOS-GFPはdistal enhancerが働くとGFPが発現する。すなわち、ナイーブ型になるとGFPが働く。ヒトプライム型多能性幹細胞(H9-EOS細胞、AiPS-EOS細胞)にHDAC阻害剤で処理し、t2iLGo培地(1μM PD0325901、1μM CHIR99021、5μM Go6983、LIFを加えた培地)で培養した。出現したEOS-GFP陽性細胞をセルソーターで純化し、ヒトナイーブ型ES/iPS細胞を樹立した(H9-naïve細胞、AiPS-naïve細胞)。また、表面抗原であるCD75も利用し、ナイーブ型ES/iPS細胞の樹立を試みた。

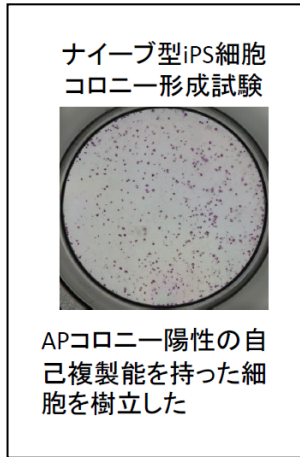
マイクロアレイを用いて樹立したナイーブ型ES/iPS細胞の遺伝子発現を比較した。研究の途上でヒトナイーブ型ES/iPS細胞は、脱メチル化が進行し、インプリト制御領域の脱メチル化も起こることが分かった。そこでヒトナイーブ型ES/iPS細胞の不安定性を解決するために、MEKの阻害剤であるPD0325901の濃度を検定し、より濃度の薄いPD0325901を使用し、ナイーブ型iPS細胞が維持できるかを解析し、改良型のナイーブ型ES/iPS細胞の樹立を試みた。また、MEKの阻害剤をPD0325901から異なるMEK阻害剤に変更し、ヒトナイーブ型iPS細胞が樹立できるか、試みた。

4. 研究成果

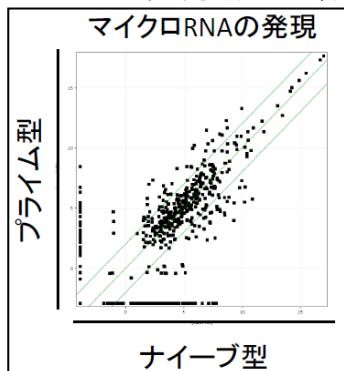
①ナイーブ型iPS細胞の誘導

我々は、プライム型ES/iPS細胞をHDAC阻害剤あるいは、NANOGとKLF2を過剰発現させ、1μM PD0325901、1μM CHIR99021、5μM Go6983、LIFを加えた培地、t2iLGo培地で培養した。EOS-GFP陽性細胞が出現することを追跡したところ、約一週間で約10%のEOS-GFP陽性細胞が出現し、2週間培養すると約30%のEOS-GFP陽性細胞が出現することが分かった。そこで、フローサイトメトリーを利用し、

EOS-GFP 陽性細胞あるいは CD75 陽性細胞を純化した。図に示すように、純化した細胞は、自己複製能を持っており、ナイーブマーカー遺伝子 (KLF4, KLF17) を強く発現しており、ヒトナイーブ型 iPS 細胞を樹立することに成功した。

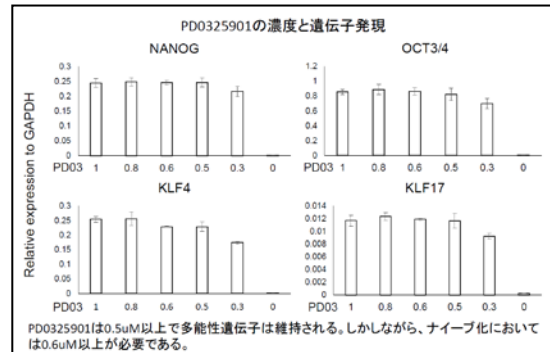


アジレント社のマイクロアレイを用いて、誘導した細胞の遺伝子発現を確認したところ、ナイーブ型の遺伝子発現を認め、プライム型関連遺伝子の発現は既報のように発現の低下を認めた。またプライム型表面抗原である CD57 や THY1 の低下を認めた。KLF17、TFCP2L1、DPPA3 (STELLA) といったナイーブ型特異的遺伝子の発現は、ナイーブ型のみで認められ、プライム型では発現していなかった。その他、樹立したナイーブ型 iPS 細胞は、プライム型 iPS 細胞に比べ着床前胚のエピブラストに同等の転写因子発現を示すこと、同等レベルまで脱メチル化していることを確認した。アジレント社のマイクロアレイを用いて、microRNA の発現比較を行った。多くはプライム型とナイーブ型は同じ発現レベルであるが、興味深いことに発現パターンが異なる miRNA が存在した (図)。横軸に沿って存在する microRNA はナイーブ型特異的に発現する microRNA であり、今後詳細を解析する。



②新規ナイーブ型 iPS 細胞維持培地の開発
また、他のグループからの解析により、ヒトナイーブ型 iPS 細胞において、脱メチル化が

進行すると、インプリント制御領域まで脱メチル化されてしまうことが報告された (Pastor et al. Cell Stem Cell 2016)。脱メチル化の程度が強すぎる可能性があり、脱メチル化を弱くする方法がないか、と考えた。FGF シグナルと MEK の阻害剤である PD0325901 は、メチル化に関与していることが示唆されている。そこで PD0325901 の濃度を薄めることで、脱メチル化の程度を弱くできるのではないかと考えた。我々は、PD0325901 の濃度とナイーブ型 iPS 細胞の維



持に関する実験を行った。PD0325901 の濃度を 1uM から段階に濃度を薄くしていった。0.5uM、0.3uM では多能性遺伝子の発現が低下し、ナイーブ型 iPS 細胞を維持できなかったが、0.6uM の濃度ではナイーブ型 iPS 細胞は維持できることを確認した (図)。

また、Dr Konrad Hochedlinger のグループと共同研究を行い Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) を用いて解析したところ、確かに PD0325901 の濃度を低くすると、通常量に比べて、脱メチル化が進行しないことが確かめられた。さらに他の MEK の阻害剤を用いてナイーブ化を誘導できるか、解析した。実際、TAK733, Refametinib, Cobimetinib を用いることで、ナイーブ型を誘導することに成功した。0.5uM の PD0325901 では、ほぼ EOS-GFP 陽性細胞は誘導されなかったが、TAK722, Refametinib, Cobimetinib では、0.5uM の濃度で EOS-GFP 陽性細胞を誘導することに成功した。

MEK 阻害とナイーブ型に関する新たな知見を Nature Methods に投稿し、受理されている。

今後、同定したマイクロ RNA の機能解析を行う。また、表面抗原よりも特異的なマーカーとして利用できる可能性もあり、マーカーとして使用する試みを行う。

さらに FGF シグナルを調整することによって、インプリンティング制御領域の維持がどの程度コントロールすることができるのかに関する研究へと展開する。また FGF シグナルがどのパスウェイを経て脱メチル化を引き

起こしていくのかの研究を行っていく。

我々の目的は、体性幹細胞や体性細胞におけるメチル化の抑制と脱メチル化の誘導および体細胞の若返りであるため、プライム型とナイーブ型のモデルで得られた結果に基づき、膵β細胞をはじめとした体細胞での解析に展開していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Stefano BD, Ueda M, Sabri S, Brumbaugh J, Huebner A, Sahakyan A, Clement K, Clowers KJ, Erickson A, Shioda K, Gygi SP, Gu H, Shioda T, Meissner A, Takashima Y, Kathrin Plath, Hochedlinger K. Reduced MEK inhibition confers a growth advantage and improves genomic stability in naïve human ES cells. *Nature Methods* in press 査読有
- ② Yu L, Li J, Hong J, Takashima Y, Fujimoto N, Nakajima M, Yamamoto A, Dong X, Dang Y, Hou Y, Yang W, Minami I, Okita K, Tanaka M, Luo C, Tang F, Chen Y, Tang C, Kotera H, Liu L. Low Cell-Matrix Adhesion Reveals Two Subtypes of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* in press 査読有
- ③ Karagiannis P, Takashima Y*. Surface markers guide the journey towards naïve pluripotency *Cell Stem Cell* 2017; 20(6) 237-238 (*corresponding author)
- ④ Honda A, Kawano Y, Izu H, Chojookhuu N, Honsho K, Nakamura T, Yabuta Y, Yamamoto T, Takashima Y, Hirose M, Sankai T, Hishikawa Y, Ogura A, Saitou M. Discrimination of Stem Cell Status after Subjecting Cynomolgus Monkey Pluripotent Stem Cells to Naïve Conversion. *Sci Rep.* 2017 Mar 28;7:45285. doi: 10.1038/srep4528 査読有
- ⑤ Ueda M, Takashima Y*. History of Pluripotent Stem Cells and Human Naïve Pluripotent Stem Cells. *Cytometry Research* 27 2017(1) 19-24
doi.org/10.18947/cytometryresearch.27.1_19 (*corresponding author) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高島 康弘: ヒトナイーブ型多能性幹細胞を用いた再生医療研究とヒト初期発生モデル Molecular Diabetology Conference 神戸 2018年3月24日
- ② 岸本 恵子、島田 亜樹子、高橋 司、篠原 春香、高島 康弘、佐々木 えりか: The novel embryonic stem cell lines established from common marmoset 第7回日本マーモセット研究会大会 京都 2018年1月17日
- ③ Yasuhiro Takashima, Katsunori Semi, Akiko Shimada, Erika Sasaki : Pluripotent stem cells in human and common marmoset” Japan Society for marmoset research, International symposium 2018年1月18日
- ④ 高島 康弘: ヒトナイーブ型多能性幹細胞と分化 第40回日本分子生物学会 (ConBio2017) 神戸 2017年12月08日
- ⑤ Yasuhiro Takashima: Differentiation competence in human naïve pluripotent stem cells” CiRA 2017 International Symposium Kyoto 2017年11月7日
- ⑥ 高島 康弘: 霊長類における初期発生と多能性幹細胞 第27回日本サイトメトリー学会学術集会 神戸 2017年6月10日
- ⑦ Yasuhiro Takashima, Erika Sasaki: DERIVATION OF COMMON MARMOSET PRIMED ES CELLS UNDER HUMAN PRIMED ES CELL CULTURE CONDITION” 15th ISSCR Annual Meeting, May 15, 2017, Boston, USA
- ⑧ Yasuhiro Takashima, Erika Sasaki: DERIVATION OF COMMON MARMOSET PRIMED ES CELLS UNDER HUMAN PRIMED ES CELL CULTURE CONDITION” CDB symposium, Mar 28, 2017, Kobe, Japan
- ⑨ 高島 康弘: iPS細胞の最前線と糖尿病治療への展開 第67回兵庫県糖尿病懇話会 2016年10月20日 神戸
- ⑩ 高島 康弘: ヒトナイーブ型多能性幹細胞 第26回日本サイトメトリー学会学術集会 博多 2016年7月23日
- ⑪ 高島 康弘: ナイーブ型多能性幹細胞 第63回日本実験動物学会総会 横浜 2016年5月20日

[図書] (計 3 件)

- ① 高島 康弘, 蟬 克憲, 上田 舞 ヒトナイーブ型 ES/iPS 細胞の性質と展開、細胞 2018 Vol50, No7 p363-366
- ② 高島 康弘, 山中伸弥 iPS 細胞の樹立とあらたな生命科学の開拓 「医学のあゆ

み」 Vol257 No13 2016 1333-1336

- ③ 高島康弘 iPS 細胞を用いた生活習慣病の解明と治療への応用 「Clinical CALCIUM」 医薬ジャーナル社 Vol126 N03 2016; p.93-99, doi: CliCa1603433439

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ナイーブ型多能性幹細胞からの原始内胚葉誘導方法

発明者：高島康弘、大久保 巧、蟬 克憲：

権利者：国立大学法人 京都大学

種類：特許

番号：特願 2017-215115

出願年月日：H29 年 11 月 7 日

国内外の別： 日本

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

アウトリーチ活動

高島 康弘 京都アスニーセミナー 一般教養講座 iPS 細胞の基礎から最前線まで 2018 年 2 月 9 日 京都

高島 康弘 NHK 文化センター京都 一般教養講座 ナイーブな iPS 細胞 2017 年 5 月 16 日 京都

高島 康弘、二木 陽子、上田 舞、大久保 巧、島田 亜樹子、高島 里香、中川 香澄 未来のサイエンティスト養成事業（京都市少年科学センター）中学生 2016 年 7 月 26 日 京都

高島 康弘 毎日小学生新聞 iPS 細胞の研究者 2016 年 4 月 28 日

高島 康弘 ナイーブ型 iPS 細胞の最前線 第 16 回 iPS 細胞実用化勉強会 2016 年 4 月 27 日 横浜

ホームページ

http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/takashima_summary.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 康弘 Yasuhiro Takashima

京都大学・iPS 細胞研究所・未来生命科学

開拓部門・特定拠点講師

研究者番号：70469930

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

上田 舞 Mai Ueda