

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2017
課題番号：16K19429
研究課題名(和文) iPS細胞の質を改善する新規樹立方法の開発

研究課題名(英文) Generation of higher-quality iPSCs

研究代表者

國富 晃 (Kunitomi, Akira)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：30570882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は分化細胞に4つの転写因子を導入することにより樹立され、現在iPS細胞を用いた様々な臓器再生の臨床応用が期待されている。しかしながら現状ではマウス、ヒトともにiPS細胞の樹立効率は低く、かつ樹立された細胞の分化能力などの幹細胞の性質も不均一であることがiPS細胞の臨床応用における重大な問題点となっている。当研究では卵母細胞特異的リンカーヒストンH1であるH1fooを上記転写因子と共に分化細胞に導入することで、従来の樹立方法と比較してより質の高いiPS細胞をマウスおよびヒト分化細胞から効率的に樹立できることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem cells (ESCs) are a hallmark of ideal pluripotent stem cells. Epigenetic reprogramming of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has not been fully accomplished. iPSC generation is similar to somatic cell nuclear transfer (SCNT) in oocytes, and this procedure can be used to generate ESCs (SCNT-ESCs), which suggests the contribution of oocyte-specific constituents.

Here we show that the mammalian oocyte-specific linker histone H1foo has beneficial effects on iPSC generation. Induction of H1foo with Oct4, Sox2, and Klf4 significantly enhanced the efficiency of iPSC generation. H1foo promoted in vitro differentiation characteristics with low heterogeneity in iPSCs. H1foo enhanced the generation of germline competent chimeric mice from iPSCs in a manner similar to that for ESCs. Furthermore, human H1FOO promoted the efficiency of human iPSC generation. These findings indicate that H1foo contributes to the generation of higher-quality iPSCs.

研究分野：幹細胞医学

キーワード：iPS細胞 リンカーヒストンH1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) は分化細胞に3つまたは4つの転写因子 (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を導入することにより樹立され、iPS 細胞はES 細胞が抱えていたヒトの初期胚が必要となる倫理的問題や、自己細胞由来ではないため移植に伴う免疫学的拒絶が生じうるなどの技術的問題を克服しており、再生医学の臨床応用において最も注目されている細胞の一つである。iPS 細胞の臨床応用においては、高い樹立効率はもとより、ES 細胞と同様に iPS 細胞が適切なタイミングで高い分化効率をクローン間で均一に示すことが望ましい。しかしながら現状では iPS 細胞の分化細胞からの樹立効率は極めて低く、また ES 細胞と比較して iPS 細胞の多分化能は劣る傾向にあり、かつクローン間での多分化能のバラつきも大きく、再生医療の臨床応用において大きな障壁となっている。このため再生医学の発展において iPS 細胞の樹立効率の向上と質の改善は急務である。

これまでに iPS 細胞の樹立効率を向上させた手法は数多く報告されているが、一方で iPS 細胞の質の改善に寄与したとする新規因子の報告は極めて少ない。iPS 細胞が ES 細胞よりも低い多分化能を示す傾向にある主たる原因の一つとして、iPS 細胞樹立後も残存するリプログラミング前の分化細胞の DNA メチル化パターン、いわゆるエピジェネティックメモリーの残存が報告されており、この除去がより質の高い iPS 細胞を樹立する上で重要と考えられている

(Polo, J. M., *Nature Biotechnology*, 2010)。

iPS 細胞の発見以前から体細胞のリプログラミングの手法として用いられてきた未受精卵への体細胞核移植は、iPS 細胞の樹立法と比較して格段に早く高効率にリプログラミングが行われ、かつ DNA メチル化パターンも ES 細胞に類似していることが報告されている (Ma, H., *Nature*, 2014)。このことから未受精卵に含まれる細胞質成分つまり母性特異的因子が、より理想的なリプログラミングに重要な役割を果たしていることが推察される。近年これを裏付けるように、母性特異的因子が分化細胞のリプログラミングに好影響を与えている報告が見られる。生殖細胞の細胞分裂過程のごく初期である未受精卵から1細胞期にかけて強発現する母性転写因子である *Glis1*

(Maekawa, M., *Nature*, 2011) や、卵母細胞および発生初期の受精卵に高発現しているヒストンバリエント *TH2A*, *TH2B*

(Shinagawa T., *Cell Stem Cell*, 2014) が iPS 細胞のリプログラミング効率を改善させることが報告されている。これらの背景をふまえ、今回我々は母性特異的クロマ

チンリモデリング因子である *H1foo* に着目した。

H1foo はリンカーヒストン H1 のサブタイプの一つで、成体で発現している体性 H1 と異なり、*Glis1* などと同様に生殖細胞の細胞分裂過程のごく初期である卵核胞期から1-2細胞期までの間にのみ特異的に強発現し (Tanaka M., *Development*, 2001)、マウスにおいて受精卵の成熟段階で必須の因子である (Furuya M., *J Reprod Dev.*, 2007)。また興味深いことに、アフリカツメガエルの未受精卵への体細胞核移植によるリプログラミングの過程において、移植細胞核内の体性 H1 が *H1foo* のアフリカツメガエルにおけるホモログであるリンカーヒストン B4 へ速やかに置換され、かつ B4 は *Nanog* や *Oct4* などの多能性関連遺伝子の転写活性を高めることでリプログラミングを促進させていることが報告されている (Julien J., *PNAS*, 2010)。更にマウスにおいても同様に移植細胞核でのリンカーヒストンの置換が確認されている (Teranishi T., *Dev. Biol.*, 2004)。またリンカーヒストン H1 の多数を占める体性 H1 はリンカー DNA 領域に結合しヘテロクロマチン構造を形成することで遺伝子の転写活性を全般的に抑制する方向に働くが、*H1foo* は体性リンカーヒストンとは異なり逆に選択的にクロマチン構造を緩め、ユークロマチン構造形成に寄与することが確認されており、その結果特定の遺伝子の転写活性を高めている可能性が報告されている (Kaneda Y., *PNAS*, 2005)。

これらの報告から、*H1foo* が iPS 細胞樹立過程においてもリプログラミング過程のエピジェネティックリモデリングに重要な役割を果たし、より理想的なリプログラミングを実現することでより質の高い細胞を樹立できる可能性が考えられたため本研究に着手した。

2. 研究の目的

卵母細胞特異的に発現しているリンカーヒストン *H1foo* をコードしている遺伝子である *H1foo* を、上記転写因子とともにマウスおよびヒト分化細胞に導入することで、より質の高い iPS 細胞を効率良く作製することができるかを検証する。

3. 研究の方法

再生医療の臨床応用を視野に入れ、癌原遺伝子である *c-Myc* を除いて iPS 細胞樹立を行う。レトロウイルスベクターを用いて *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* の3因子と共に *H1foo* を分化細胞に導入して iPS 細胞を作製し、従来の3因子のみを導入する方法と比較してより高効率で質の高い iPS 細胞が樹立できるかを検証する。iPS 細胞の樹立効率は、*Nanog*-GFP-IRES-Puromycin 耐性トランスジェニックマウス由来成体マウス尾部線維芽細胞を用いて、*Nanog*-GFP 陽性コロニー数

による比較検討を行う。現状では iPS 細胞の質の評価は、再生医療への臨床応用の観点から多分化能を比較検討することが最も適切と考えられ、*in vitro*, *in vivo* 両面において多分化能の評価を行い、*Hlfoo* がより高品質の iPS 細胞樹立に貢献するかを究明する。

以上の研究結果を基に、ヒト iPS 細胞の樹立にもヒト *HIFOO* を応用する。核内染色体改変のリスクのないセンダイウイルスベクターを用いて、*HIFOO* を含む遺伝子群を皮膚線維芽細胞や末梢血単核球に導入し、初期化因子の組み合わせなどの条件検討を経て新たなヒト iPS 細胞を樹立する。ヒト iPS 細胞の樹立効率の比較検討は基より、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によって、*HIFOO* がリプログラミング初期に及ぼすメカニズムを解明する。

これらの検証を経て異種由来成分不含有の培養環境で安全かつより高品質なヒト iPS 細胞を効率的に樹立、維持、分化誘導する方法を確立し、再生医療の臨床応用に繋げていく。

4. 研究成果

(1) *Hlfoo* の追加導入による iPS 細胞樹立と樹立効率の比較検討

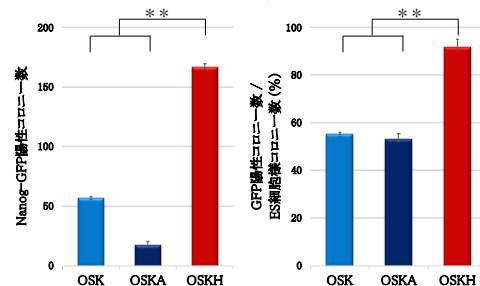
本研究はまずマウスにおける実験系で検証を行った。レトロウイルスベクターを用いて iPS 細胞樹立時に *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* (以下 OSK と記載) と共に *Hlfoo* を強制発現させてマウス iPS 細胞を樹立した。*Hlfoo* をマウス成体尾部線維芽細胞で強制発現させたところ、既存の報告と同様に核小体を除く核内での発現を確認した。次に

Nanog-GFP-IRES-Puromycin 耐性トランスジェニックマウスの成体尾部由来線維芽細胞に OSK と共に *Hlfoo* を導入 (以下 OSKH と記載) し、OSK のみと同様に *Nanog*-GFP 陽性つまり *Nanog* が発現している ES 細胞様 iPS コロニーの出現を認めた。iPS 細胞の樹立効率については *Nanog*-GFP 陽性 iPS コロニー数と、全 ES 細胞様コロニー中における *Nanog*-GFP 陽性 iPS コロニー数の割合を比較を行った。また他の体性リンカーヒストン H1 との比較検討も行うことが必要と考え、OSK に加えて体性リンカーヒストンの一つである *H1a* を加えた群 (以下 OSKA と記載) も対照群に加えて比較を行った。

その結果、OSKH 群は OSK/OSKA 群と比較して、*Nanog*-GFP 陽性コロニー数が最大で約 8 倍まで増加した。さらに全 ES 細胞様コロニーに占める *Nanog*-GFP 陽性コロニー数の割合を比較したところ、OSK/OSKA 群は平均 55% 程度であるのに対し、OSKH 群では平均 91% と著明に改善を認め、*Hlfoo* は不完全にリプログラミングされたコロニーの発生を抑制し、*Nanog*-GFP 陽性の iPS 細胞を対照群よりも有意に効率良く樹立させたことが判明した (図 1)。

体細胞核移植モデルにおけるリプログラミング効率はほぼ 100% と報告されているが (Julien, J., *PNAS*, 2010), *Hlfoo* は iPS 細胞のリプログラミング効率を体細胞核移植に匹敵する効率に改善するという非常に興味深い結果が得られた。

(図1) *Hlfoo* は *Nanog*-GFP 陽性 iPS 細胞の樹立効率を飛躍的に改善させる



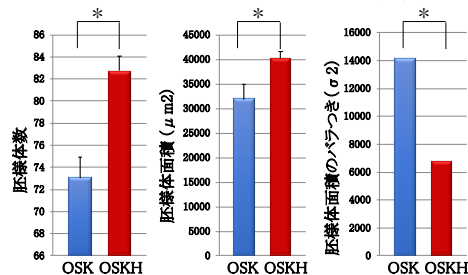
(2) OSKH-iPS 細胞の胚様体形成能の比較検討

次に iPS 細胞の *in vitro* 多分化能の評価として胚様体形成能の比較検討を行った。

分化誘導培地下に hanging-drop 法で分化誘導を行い、5 日目に胚様体数、デジタル光学顕微鏡による胚様体面積の定量測定 (胚様体は球体だが、体積測定は困難なため面積で近似) とそのバラつきについて比較検討を行った。

複数のクローン間で検証した結果、OSKH-iPS 細胞は OSK-iPS 細胞よりも有意に大きい胚様体をより多く形成し、クローン間における胚様体の大きさのバラつきも少ない傾向を示した (図 2)。

(図2) OSKH-iPS 細胞はより優れた胚様体分化能を示す



(3) OSKH-iPS 細胞の生殖系列キメラマウス形成能の比較検討

In vivo 多分化能の検証としてアグリゲーション法により ICR マウス由来 8 細胞期受精卵と B6J マウス由来の樹立 iPS 細胞を融合させてキメラマウス作製を行い、キメラ寄与率と生殖細胞系列への移行を比較検証した。

OSKH-iPS 細胞群は対照群と比較してキメラ寄与率が高い傾向を認め、特にクローンによっては ES 細胞を凌駕する数の 100% キメラマウスを得るなど興味深い結果が得られた。また生殖細胞系列への寄与も OSK-iPS 細胞と比較すると良好であった (図 3)。

Epigenetic barrier against the propagation of fluctuating gene expression in embryonic stem cells, ISSCR annual meeting, June 14-17, 2017, Boston, MA, USA

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：高品質な iPS 細胞の製造方法

発明者：湯浅慎介，福田恵一，國富晃

権利者：Heartseed 株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2016/003282

出願年月日：2016年7月11日

国内外の別：外国

〔その他〕

https://www.amed.go.jp/news/release_20160527.html

https://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2016/osa3qr000001q01k.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國富 晃 (KUNITOMI AKIRA)

京都大学 iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：30570882

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者