

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04036

研究課題名(和文) iPS細胞誘導過程でのKlf4による細胞形態と細胞機能のリプログラミング機構

研究課題名(英文) Reprogramming of cell morphology and functions by Klf4 during iPSC generation

研究代表者

久武 幸司 (Hisatake, Koji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：70271236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、Klf4の発現量を調節すると、リプログラミングが種々の段階で一時停止したPaused iPSC細胞を誘導できることを報告した。本研究ではPaused iPSC細胞を利用し、MET(間葉上皮転換)のメカニズム、ミトコンドリアの酸化的リン酸化から解糖系への代謝変換のメカニズム、レトロウイルスのサイレンシング及びX染色体の再活性化に關与する因子とその作用機構、Klf4による遺伝子発現制御の機構について多くの結果を得た。これらの解析から得たリプログラミングの分子機構は再生医療の促進に貢献できることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Klf4の発現量を調節するとリプログラミングが種々の段階で一時停止したPaused iPSC細胞を誘導できる。このPaused iPSC細胞を利用すると、リプログラミングの分子機構の解析が容易となる。本研究では、リプログラミング過程でのMET(間葉上皮転換)、代謝変換、レトロウイルスのサイレンシング及びX染色体の再活性化について、そのメカニズムと關与する分子を同定した。本研究で明らかにした因子はリプログラミングの効率に大きな影響を及ぼすので、これらを操作することによって、より効率の良いiPS細胞の誘導方法を開発し再生医療を促進することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed Paused iPSCs, which can be induced to pause during reprogramming by manipulating the amount of Klf4. Using this novel system, we have identified factors involved in mesenchymal-epithelial transition, metabolic shift from mitochondrial oxidative phosphorylation to glycolysis, retroviral silencing, transcriptional regulation by Klf4, and reactivation of the inactive X chromosome. In addition, we have clarified the molecular mechanisms behind these phenomena. The mechanistic understanding on the reprogramming process obtained from these studies is expected to contribute to promotion of regenerative medicine in the future.

研究分野：生化学

キーワード：再生医学 iPS細胞 センダイウイルス 代謝 X染色体 レトロウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は体細胞に 4 つの転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入して得られた多能性細胞で、再生医療への応用が期待されている。しかし体細胞が iPS 細胞に変化する過程、すなわちリプログラミングの分子機構については未だ不明な点が多い。

リプログラミングでは、特定の転写因子を過剰発現させて細胞の性質を変換するが、その過程は時間がかかり複雑であるため、過剰発現させた転写因子が、どの様にして細胞内の遺伝子発現パターンを変換させ、さらにその過程で細胞の形態や機能の変化がいかに制御されているかはよく分かっていない。

リプログラミングの分子機構の解析は、主にレトロウイルスを用いた iPS 細胞誘導系で行われている。この系では、初期化誘導遺伝子の発現バランスが細胞毎に異なり、不均質な細胞が混在した状態でリプログラミングが進行する。そのため分子機構の解析では、細胞表面マーカーにてセルソーティングし、中間体細胞を分取する方法が一般的に行われる。しかし、セルソーティングのみでは十分に均質化した細胞は得られず、リプログラミングの中間段階の詳細な解析が進んでいないのが現状であった。

この iPS 細胞誘導系を用いて Klf4 遺伝子の発現量を抑えた状態でリプログラミングを行うと、初期化が途中で一時停止した均質な細胞が得られることを見出した。この系では、Klf4 に不安定化ドメイン (DD) を融合させており、Shield1 という低分子化合物で DD を安定化することにより Klf4 のタンパク量を調節できる。実際、Shield1 で Klf4 の発現量を増減させると、Klf4 の発現量に依存して、様々な段階でリプログラミングが一時停止した細胞を再現性良く得ることに成功し、我々はこの細胞を、Paused iPS 細胞と名付けた。Paused iPS 細胞では、リプログラミング過程を幾つかの段階で一時停止させることが可能であるため、ある段階から次の段階までの現象を個別に解析できる。この系を利用した解析の第一歩として、Shield1 濃度を 0, 30, 100nM と変えて、Klf4 濃度を変化させてリプログラミングを行い、色々な段階の Paused iPS 細胞を調製した。

上記の各細胞について DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、データを比較することにより、各段階で重要な役割を果たす遺伝子の候補をスクリーニングしており、これらの遺伝子について解析を始めた。本研究では、この解析をさらに進め、iPS 細胞誘導過程で起こる細胞形態と細胞機能の変化の分子メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

我々は、Klf4 の発現量を調節すると、リプログラミングが種々の段階で一時停止した Paused iPS 細胞を誘導できることを報告した。本研究では、この Paused iPS 細胞を利用し、リプログラミングの分子機構の解明を目指して、Klf4 の主要な標的遺伝子を抽出し、Klf4 支配下にある細胞機能の変化とその分子機構を捉える。具体的には、(1) Klf4 と MET (間葉上皮転換) の機能的関係、(2) Klf4 による代謝変換の機構、(3) Klf4 による遺伝子発現制御の機構について解析する。これら一連の解析により多能性獲得の分子機構を明らかにし、高い多能性を有する iPS 細胞を効率良く誘導する方法に繋げ、iPS 細胞の再生医療への実用化を促進させる。

3. 研究の方法

(1) MET の解析

リプログラミング初期での Klf4 による MET の解析

Low-K 細胞から Med-K 細胞への移行期では、N カドヘリン、Zeb1, Zeb2, Twist1 などの EMT を促進する遺伝子の発現低下が起こり、EMT (上皮間葉変換) の逆現象である MET (間葉上皮変換) が起こる。リプログラミング時の MET に重要な新規の転写因子を同定するため、Low-K 細胞から Med-K 細胞への移行期で遺伝子発現が低下し、リプログラミング因子の結合部位をもつ 9 個の転写因子を得ている。

レトロウイルス発現系により、候補因子の過剰発現及び siRNA や shRNA によるノックダウンを行ったマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を準備する。これらの MEF をセンダイウイルスにてリプログラミングし、アルカリホスファターゼ (AP) 陽性コロニー数、細胞形態、N 及び E カドヘリンの発現、多能性関連遺伝子の発現等にて解析する。また、9 個の遺伝子について内因性の遺伝子の発現を定量的 RT-PCR で測定する。

EMT のモデル系である NMuMG (Normal Mouse Mammary Gland) 細胞を用いた解析

NMuMG 細胞を TGF- β により刺激すると MET の逆現象である EMT が起こる。候補遺伝子群の多くは MET を阻害するので、この逆現象である EMT では、発現が増加し、EMT 関連遺伝子の発現を制御する可能性がある。候補因子の過剰発現及びノックダウンを行った NMuMG 細胞を準備し、形態変化、EMT 関連遺伝子の発現、タンパク質発現 (N 及び E カドヘリン) を検討し、TGF- β で誘導される EMT と候補遺伝子の関係を明らかにする。

EMT での転写因子ネットワークの解析

今までの結果で見出した多くの EMT 関連転写因子が、EMT 誘導後に間葉系細胞の性質を維持す

るために、相互に制御するネットワークを形成しているかどうかを検討する。上記の実験で、転写因子相互間の転写による制御関係を明らかにし、EMT を誘導できる最小数の転写因子の組み合わせを見つける。また、これらの転写因子を NMuMG 細胞に導入し、TGF- β に依存しないで EMT を起こすかどうかを検証する。

(2) Klf4 による代謝変換機構の解析

代謝解析系の確立

Klf4 が代謝変換をいかにして引き起こすかを明らかにするために、Med-K 細胞と High-K 細胞の遺伝子発現の違いと定量的 RT-PCR による発現解析を行い、標的候補遺伝子をスクリーニングした。その結果、Apoc1, Dmt1, Foxh1, Mapt, Tc11, Tmem8 及び Rex1 を同定した。これらに遺伝子を Med-K 細胞にレトロウイルス発現系で導入して、グルコース消費と酸素消費量を計測した所、Tc11 のみが代謝の変化を引き起こした。Tc11 は Akt を活性化するコアクチベーターとして知られており、Akt はガン細胞でワールブルグ効果に関与することが知られている。以上の準備状況をもとに、Klf4 が Tc11 や Akt を介して、リプログラミングの過程において解糖系の亢進等を含む代謝変換をどの様に引き起こすのかを明らかにする。

Med-K 細胞から High-K 細胞への移行で見られる解糖系の変化の解析

まず Med-K 細胞から High-K 細胞に移行する際の解糖系促進に、Tc11 や Akt が関与するかどうかを検討する。Med-K 細胞と High-K 細胞で、Tc11 の過剰発現やノックダウンを行い、グルコース消費量、乳酸生成量と酸素消費量を計測する。また、Akt 量及び活性型 Akt (リン酸化 Akt) 量を免疫プロットで定量する。さらに、低酸素応答遺伝子やガンのワールブルグ効果に関与する解糖系酵素群の遺伝子の発現を定量的 RT-PCR で解析する。

Med-K 細胞から High-K 細胞への移行で見られる呼吸 (ミトコンドリア) の変化の解析

Med-K 細胞から High-K 細胞に移行する際に呼吸 (ミトコンドリア) が変化するかどうかを解析する。MitoTracker で Med-K 細胞と High-K 細胞のミトコンドリアを染色・定量し、酸素消費量を測定する。次に、Med-K 細胞で Tc11 の過剰発現やノックダウンを行い、Med-K 細胞から High-K 細胞へのミトコンドリア量や酸素消費量の変化がどうなるかも検討する。

Med-K 細胞から High-K 細胞への移行で見られるミトコンドリアの減少の解析

MitoTracker でミトコンドリアの減少が確認できたら、リプログラミング過程でミトコンドリア減少に関与する遺伝子の検索を行う。データベースでの遺伝子発現パターンから候補遺伝子を抽出するのみならず、ミトコンドリアのオートファジーに関与する因子 (PINK1 や Parkin など) についても、過剰発現やノックダウンにより、リプログラミングでの役割を検討する。

(3) Klf4 による遺伝子発現活性化の解析

Klf4 の発現量変化に伴う Klf4 結合の変化

マウス胚性繊維芽細胞 (MEF), Low-K 細胞, Med-K 細胞, High-K 細胞及び iPS 細胞にて、クロマチン免疫沈降-次世代シーケンシング (ChIP-seq) を行い、Klf4 の全ゲノムでの結合を解析する。また、RNA 発現解析 (RNA-seq) も全ゲノムレベルで併せて行う。ChIP-seq と RNA-seq のデータを比較して、数万個あると予想される Klf4 結合部位について、Klf4 結合部位の同定、Gene Ontology 解析や Pathway 解析、Klf4 結合部位内でのモチーフ解析等を行う。

Klf4 の新たな標的遺伝子の検索

DNA マイクロアレイの代わりに、より精度の高い ChIP-seq と RNA-seq のデータから、新たな Klf4 の標的遺伝子を検索する。上記のデータから、Klf4 結合量と遺伝子発現が変化する遺伝子を選択し、各候補遺伝子について、過剰発現及びノックアウトを行い、リプログラミングの抑制や促進を評価する。上記で利用した DNA マイクロアレイのデータは精度が低かったため、新規の候補遺伝子が見出せる可能性が十分期待できる。

Klf4 の発現量変化に伴うエピゲノムの変化

マウス胚性繊維芽細胞 (MEF), Low-K 細胞, Med-K 細胞, High-K 細胞及び iPS 細胞のヒストンの修飾状態を解析するために、H3K4me3, H3K27me3 及び H3K27ac の抗体を用いて ChIP-seq を行い、平成 29 年度に得られた Klf4 の結合変化と全遺伝子の発現変化のデータベースと照合する。これにより、Klf4 結合がどの様にヒストン修飾を変化させるのかを明らかにする。

ヒストン修飾による Klf4 の DNA 結合への影響

逆にヒストン修飾が Klf4 の DNA 結合に及ぼす影響を調べるため、これまでのデータを別の角度より見直し、クロマチンの状態 (ヒストン修飾) と Klf4 結合の関係を明らかにする。これにより、Klf4 が低濃度で結合する部位と、高濃度になって初めて結合する部位について、そのヒストン修飾状態の差を見出す。

4. 研究成果

(1) リプログラミング初期の MET の解析

ゲノムワイドな発現解析から、iPS 細胞初期に発現が低下する遺伝子スクリーニングし、1787 個の遺伝子を同定した。この中から転写因子を選択し、さらにその遺伝子の制御領域に Oct4,

Sox2, Klf4, c-myc の結合部位があるものをスクリーニングした。この中で、細胞周期、細胞分化、EMT に関連する遺伝子が 10 個あった。これらの遺伝子の発現を RT-PCR で検討すると、8 個の遺伝子 (*Ebf1*, *Ebf3*, *Meox2*, *Meox1*, *Meox2*, *Osr2*, *Prrx1*, *Smarcd3*, *Zic1*) で発現低下が確認できた。これらの遺伝子のリプログラミングに対する影響を検討するため、MEF で発現させると細胞毒性が認められた。そこで、発現レベルを内在性のものと同程度に下げるベクターの開発を行った。具体的には、サイトメガロウイルス由来の upstream open reading frame (uORF) をベクターに導入し、発現レベルを数十分の 1 に下げたベクターを開発した。このベクターを用いて上記遺伝子の再評価を行うと、これらの遺伝子の中で、*Osr2* は低発現でも iPS 細胞誘導での EMT を阻害し、コロニー数を減少させることが確認できた。*Osr2* を発現させた MEF をリプログラミングすると、細胞の形態が異なることが観察された。細胞間の接着が不十分で、紡錘形をしており、リプログラミングによっても上皮系細胞への形態変化が十分に起こっていないことが示唆された。実際に間葉系の遺伝子 (*Cdh2*, *Snai2*, *Zeb2*, *Tgfb3*, *Fn1*, *Vim*) の発現低下がほとんどみられなかった。また、上皮系の遺伝子 (*Chd1*, *Ocln*) の発現上昇もほとんど起こらなかった。これらのことより *Osr2* の発現によって、MET が起こっていないことが強く示唆された。実際 *Osr2* を siRNA でノックダウンした後で MEF のリプログラミングを行うと、アルカリホスファターゼ陽性の細胞が増加した。

Osr2 と MET 及びその逆の減少である EMT の関係をより詳細に検討するために NMuMG 細胞を使用した。NMuMG 細胞は、TGF- β によって効率良く EMT が誘導される。*Osr2* は、TGF- β と同様に NMuMG 細胞にて EMT を誘導した。しかし *Osr2* による EMT 誘導は TGF- β に比較して遅れて起こることが分かった。RNA-seq 解析によって、遺伝子発現の変化を解析すると、TGF- β と細胞内シグナル伝達経路を共有しているが、それとは別の経路もあることが示唆された。特に、*Osr2* によって転写や DNA 複製、代謝関連の遺伝子が一過性に誘導されることが分かった。また、*Osr2* は TGF- β 関連の遺伝子を誘導することも分かった。

TGF- β と *Osr2* の関係を明らかにするために、*Osr2* を発現させた NMuMG 細胞に TGF- β 阻害剤を入れると、EMT でみられる形態変化、遺伝子発現変化、細胞遊走が減少した。このことより、TGF- β を介して EMT を制御する因子であることが明らかとなった。*Osr2* は細胞の増殖を促進した後で、TGF- β を介して EMT を起こすため、TGF- β 単独の EMT とかなり様相が異なる。また、リプログラミング早期に *Osr2* が低下することはリプログラミングにとって重要であり、*Osr2* の低下によって初めて TGF- β のシグナル伝達系が抑制されることが分かった。

さらに *Osr2* のリプログラミングでの機能解析を行った。TGF- β の阻害剤を用いた実験から、*Osr2* の発現低下が TGF- β 系のシグナル減少に必須であることが分かったが、この TGF- β 系のシグナルは Smad を介する canonical pathway を介しているが、non-canonical pathway は殆ど関与しないことが明らかとなった。また、TGF- β 系の各種の阻害剤によって *Osr2* によるリプログラミング効率低下が完全に回復しないことより、*Osr2* の発現低下が TGF- β 系以外の経路にも作用している結果を得た。この経路を明らかにするために、*Osr2* を発現する細胞に TGF- β 阻害剤を加えた上でリプログラミングを行い、RNA-seq で解析を行った。この際に *Osr2* 発現の有無、TGF- β 阻害剤の有無によって 4 種類の細胞を用意し、DEG からパスウェイ解析を行った。その結果、Wnt 経路が関与する可能性を見出した。TGF- β 阻害剤と Wnt 経路を活性化する薬剤を同時に添加してリプログラミングを行うと、*Osr2* が発現していてもリプログラミングが起こることが分かった。これらの結果より、リプログラミングの初期で *Osr2* の発現が低下すると、Smad を介する TGF- β のシグナル伝達が低下し MET を引き起こすことが明らかとなった。また、Wnt 経路のシグナルも活性化され、多能性獲得が促進される。*Osr2* の発現低下によって、TGF- β と Wnt の 2 経路のシグナル伝達の変化が、リプログラミングの進行に寄与することが明らかとなった。

(2) リプログラミングに伴う代謝変化の制御メカニズム

リプログラミングが進むと、細胞の培地が早く黄色くなる（酸性になる）ことより、リプログラミングの途中で代謝が変化することが推測された。これはリプログラミング時に、ガン細胞でみられるワールブルグ効果と類似の現象が起こり、代謝が大きく変換することを示唆する。Klf4 がこの代謝変換をいかにして引き起こすかを明らかにするために、Low-K 細胞と High-K 細胞の遺伝子発現の違いと定量的 RT-PCR による発現解析を行い、標的候補遺伝子をスクリーニングした。その結果、*Apoc1*, *Dmt1*, *Foxh1*, *Mapt*, *Tcl1*, *Tmem8* 及び *Rex1* を同定した。これらに遺伝子を Med-K 細胞にレトロウイルス発現系で導入して、グルコース消費と酸素消費量を計測すると、*Tcl1* のみが代謝の変化を引き起こした。

まず Low-K 細胞から High-K 細胞に移行する際の解糖系促進に、*Tcl1* や Akt が関与するかどうかを検討した。Low-K 細胞と High-K 細胞で *Tcl1* を過剰発現すると、グルコース消費量と乳酸生成量が増加し、酸素消費量が低下した。また、免疫プロットによって、Akt 量は変化しないが、活性型 Akt (リン酸化 Akt) 量が増加していた。さらに、低酸素応答遺伝子やガンのワールブルグ効果に関与する解糖系酵素群の遺伝子 (*Glut1*, *Hk2*, *Pdk1*, *Pkm2*, *Ldh* など) の発現も増加しており、*Tcl1* が Akt を介して解糖系を促進することが分かった。また、Low-K 細胞から High-K

細胞に移行する際に呼吸（ミトコンドリア）が変化するかどうかも解析した。MitoTracker で Low-K 細胞と High-K 細胞のミトコンドリアを染色・定量すると、リプログラミングによって酸素消費量が低下した。次に、Low-K 細胞で Tc11 の過剰発現を行うと、ミトコンドリア量や酸素消費量が減少した。逆に、Low-K 細胞で Tc11 のノックダウンを行うと、ミトコンドリア量や酸素消費量の減少は起こらなかった。

さらに、Tc11 の発現と iPS 細胞誘導時の代謝変換の関係を乳酸産生量やミトコンドリア量で解析すると、iPS 細胞誘導時の代謝変換は、Tc11 誘導前と誘導後の 2 段階で起こることが分かった。Tc11 に依存しない初期の代謝変換では、一時的にミトコンドリア活性が上昇しており、活性酸素がその後の代謝変換に関係する報告と一致する結果が得られた。

(3) リプログラミングで Klf4 と同時に重要な作用をする因子の探索

マウス胚性繊維芽細胞 (MEF), Low-K 細胞, High-K 細胞及び iPS 細胞を用いてクロマチン免疫沈降-次世代シーケンシング (ChIP-seq) を行い, Klf4 の全ゲノムでの結合を解析し, RNA 発現解析 (RNA-seq) も全ゲノムレベルで併せて行った。その結果をもとに, Klf4 結合部位の周囲に存在し, Klf4 と協同的に作用する因子の探索を行った。Klf4 結合部位近傍でのモチーフ解析等を行うと, E2F ファミリーの転写因子が高頻度に結合していることが分かった。E2F ファミリーのノックアウトを行うと, 遺伝子によりリプログラミング効率の低下するものと増加するものとみられ, E2F ファミリーの転写因子がリプログラミングに関与することが分かった。

MEF, Low-K, High-K 細胞及び iPS 細胞に対して Klf4 と H3K4me3 について ChIP-seq や RNA-seq も行った。Klf4 の発現量増加に伴って Klf4 がゲノム DNA に結合している部位が増加しており, High-K 細胞の多くの部位では Klf4 の結合によって H3K4me3 の増加や遺伝子発現の誘導も確認された。特に多能性遺伝子上で, Klf4 のエンハンサーやプロモーターへの結合増加に伴い H3K4me3 の増加が顕著であった。また, Klf4 の結合が増加すると Oct4 の結合部位に変化がみられ, Oct4 が遺伝子プロモーター近傍により多く局在することを見出した。

上記の研究とは別に, ES 細胞を用いて iCAPTURE 法などの最新手法によってリプログラミング因子 (Nanog) のプロモーターで作用する因子を探索した。この解析からリプログラミング因子と協同で作用する転写因子群を十数個同定した。その中には RNA スプライシング因子が数個含まれており, 多能性維持との関係を解析中である。

(4) リプログラミング過程でのレトロウイルスのサイレンシング機構

リプログラミング時に起こるレトロウイルスのサイレンシングを解析するため, 蛍光タンパク質を発現するレトロウイルスを MEF に感染させたあとリプログラミングを行い, 蛍光タンパク質の発現する細胞を FACS にて定量した。変異レトロウイルスを用いた解析より, リプログラミングでのレトロウイルスのサイレンシングには, PBS の配列が重要であることが分かった。また, これまでの報告とは異なり, レトロウイルスのサイレンシングはリプログラミングの早期から始まることを見出した。色々な組み合わせで 4 個のリプログラミング因子を発現するセンダイウイルスベクターを使ってリプログラミングを行い, Klf4 はレトロウイルスのサイレンシングに必要なことが分かった。

そこで, iChIP 法を応用してレトロウイルスのプロウイルス状に結合する因子を網羅的に同定した。同定された因子の中で, TAF-I がリプログラミング過程でのレトロウイルスに関与することを見出した。特に ES 細胞で発現する TAF-I のアイソフォームの発現がリプログラミング過程で上昇し, 早期のサイレンシングに関与することを明らかにした。また, TAF-I 以外に ILF2/ILF3, cnpb などサイレンシングに関与していることを見出している。EC 細胞にレトロウイルスが感染した際に, ILF2/ILF3 が非常に初期のサイレンシングを行っていることを見出しており, そのメカニズムをさらに解析する予定である。

(5) リプログラミングでの X 染色体の再活性化

リプログラミング過程でおこる XCR の解析を, センダイウイルスによる MEF のリプログラミングの系で解析を進めた。*Mus musculus* と *Mus spretus* の交配によって得たメスの MEF を取得し, HAT 又は 6-TG での薬剤選択によって不活性型 X (Xi) が *Mus musculus* 由来の MEF と *Mus spretus* 由来のものを別々に取得した。*Mus musculus* と *Mus spretus* は遺伝学的には慣れており, 1%程度の塩基配列の違いがあり, *Mus musculus* の X 染色体と *Mus spretus* の染色体上の多くの遺伝子は SNP 等によって区別することができる。まず X 染色体の 3 種類の遺伝子 (*Lamp2*, *Msn*, *Atrx*) を選択し, TaqMan によって *Mus musculus* と *Mus spretus* の対立遺伝子からの mRNA を区別できるようにした。この MEF のリプログラミングの解析から, XCR はリプログラミングの初期に起こることを見出した。リプログラミングの幾つかのタイミングで RNA-seq を行い, X 染色体の遺伝子の mRNA を *Mus musculus* と *Mus spretus* 由来の対立遺伝子に対応させた。mRNA の発現パターンの解析から, Xi 染色体のセントロメア近傍から数個の遺伝子が早期に再活性化されることを見出した。この過程では転写抑制に関与するヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の局在や活性が Xi 上で変化することも見出した。さらに, LSD1 の阻害剤を添加してリプログラミングを行うと, これらの遺伝子の Xi での再活性化が促進された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yamaki Yuni, Fukushima Takashi, Yoshida Naomi, Nishimura Ken, Fukuda Aya, Hisatake Koji, Aso Masayuki, Sakasai Tomoki, Kijima-Tanaka Junko, Miwa Yoshihiro, Nakanishi Mahito, Sumazaki Ryo, Takada Hidetoshi	4. 巻 113
2. 論文標題 Utilization of a novel Sendai virus vector in ex vivo gene therapy for hemophilia A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 493 ~ 499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03059-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Ken, Fukuda Aya, Hisatake Koji	4. 巻 20
2. 論文標題 Mechanisms of the Metabolic Shift during Somatic Cell Reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2254 ~ 2254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20092254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bui Phuong Linh, Nishimura Ken, Seminario Mondejar Gonzalo, Kumar Arun, Aizawa Shiho, Murano Kensaku, Nagata Kyosuke, Hayashi Yohei, Fukuda Aya, Onuma Yasuko, Ito Yuzuru, Nakanishi Mahito, Hisatake Koji	4. 巻 29
2. 論文標題 Template Activating Factor-1 Regulates Retroviral Silencing during Reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1909 ~ 1922.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Aya, Honda Shiho, Fujioka Norie, Sekiguchi Yuya, Mizuno Seiya, Miwa Yoshihiro, Sugiyama Fumihiro, Hayashi Yohei, Nishimura Ken, Hisatake Koji	4. 巻 14
2. 論文標題 Non-invasive in vivo imaging of UCP1 expression in live mice via near-infrared fluorescent protein iRFP720	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0225213 ~ 0225213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tran Thi Hai Yen, Fukuda Aya, Aizawa Shiho, Bui Phuong Linh, Hayashi Yohei, Nishimura Ken, Hisatake Koji	4. 巻 15
2. 論文標題 Live cell imaging of X chromosome reactivation during somatic cell reprogramming	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 86 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2018.07.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Ken, Ishiwata Hiroshi, Sakuragi Yuta, Hayashi Yohei, Fukuda Aya, Hisatake Koji	4. 巻 9
2. 論文標題 Live-cell imaging of subcellular structures for quantitative evaluation of pluripotent stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37779-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 西村健、久武幸司	4. 巻 265
2. 論文標題 Tcl1による代謝リプログラミングがiPS細胞誘導を促進する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 293 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西村健, Nhi TVK, 久武幸司	4. 巻 17
2. 論文標題 新規ベクターシステムを利用した高純度分化細胞単離法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PHARMASTAGE	6. 最初と最後の頁 11-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura K, Ohtaka M, Takada H, Kurisaki A, Tran NVK, Tran YTH, Hisatake K, Sano M, Nakanishi M	4. 巻 23
2. 論文標題 Simple and effective generation of transgene-free induced pluripotent stem cells using an auto-erasable Sendai virus vector responding to microRNA-302.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 13-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2017.06.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Yamanaka T, Nishimura K, Hisatake K
2. 発表標題 Analysis of KLF4 dose dependent iPSC generation in early stage of reprogramming
3. 学会等名 Tsukuba Global Science Week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Aizawa S, Bui PL, Nishimura K, Hisatake K
2. 発表標題 Reactivation of X chromosome might start from the identical region during mouse iPSC generation
3. 学会等名 ISSCR2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村健, 石渡裕, 久武幸司
2. 発表標題 PD imaging systemを用いて生きたまま幹細胞の多能性を定量的に解析する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Kumar AB, Nishimura K, Hisatake K
2 . 発表標題 Dose dependent transcriptional regulation of KLF4
3 . 学会等名 Tsukuba Conference 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nishimura K, Ishiwata H, Sakuragi Y, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K
2 . 発表標題 Quantitative Assessment of Pluripotent Stem Cells by an Improved RM-DIC Imaging System
3 . 学会等名 2018 TERMIS World Congress (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Chiu CH, Nishimura K, Hisatake K
2 . 発表標題 Isolation of a pure population of differentiated cells using auto-erasable vector
3 . 学会等名 Tsukuba Global Science Week 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Anh LPH, Nishimura K, Kato T, Nguyen TL, Fukuda A, Hisatake K
2 . 発表標題 Analysis on transcriptional regulation in the early phase of somatic cell reprogramming
3 . 学会等名 Tsukuba Global Science Week 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishimura K, Kumar BA, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K
2. 発表標題 KLF4-dose dependent metabolic shift through TCL1 during iPSC generation
3. 学会等名 ISSCR2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石渡裕, 西村健, 久武幸司
2. 発表標題 RM-DIC顕微鏡を用いた無染色・非侵襲な多能性幹細胞の評価手法
3. 学会等名 第43回光学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Bui PL, Nishimura K, Hisatake K
2. 発表標題 Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors
3. 学会等名 The Exploring identity: lessons from genomes and epigenomes meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加納英明, 丸山拓史, 米山弘亮, 西村健, 久武幸司
2. 発表標題 非線形光学イメージングを用いた iPS 細胞のリプログラミング過程の研究
3. 学会等名 平成30年度 日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相澤志穂, 西村健, Nugroho FL, 櫻木佑太, 大高真奈美, 林洋平, 福田綾, 中西真人, 久武幸司
2. 発表標題 Klf4による多能性獲得はTcl1を介した代謝変化により起きる
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相澤志穂, Bui PL, 西村健, 久武幸司
2. 発表標題 X染色体の再活性化をモデルとしたエピジェネティクス転写制御機構の解明
3. 学会等名 超異分野学会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村健, 相澤志穂, 櫻木佑太, 林洋平, 福田綾, 久武幸司
2. 発表標題 Tcl1による代謝リプログラミングはiPS細胞の多能性を向上させる
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 相澤志穂, Bui PL, 西村健, 久武幸司
2. 発表標題 iPS細胞誘導におけるX染色体再活性化機構の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bui PL, Nishimura K, Hisatake K
2. 発表標題 Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bui PL, Nishimura K, Hisatake K
2. 発表標題 Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors
3. 学会等名 Tsukuba Global Science Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yen THT, Fukuda A, Hayashi Y, Nishimura K, Hisatake K
2. 発表標題 Analysis of X Chromosome Reactivation During Reprogramming
3. 学会等名 Tsukuba Global Science Week 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福田 綾 (Fukuda Aya) (50436276)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 健 (Nishimura Ken) (80500610)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	
研究分担者	林 洋平 (Hayashi Yohei) (90780130)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関