

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790271

研究課題名（和文） iPS 細胞誘導のための新規因子の網羅的探索

研究課題名（英文） High-throughput screening to identify novel factors for reprogramming

研究代表者

前川 桃子（MAEKAWA MOMOKO）

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：50528742

研究成果の概要（和文）：iPS 細胞の臨床応用に向けて残されている問題点として、iPS 細胞誘導に必要な因子には腫瘍関連因子が含まれることがあげられる。本研究では、iPS 細胞誘導に必要な腫瘍関連因子に代わる天然物・化合物・遺伝子を探索した。その結果、原癌遺伝子 Klf4 の代替として働く遺伝子を同定し、その遺伝子機能から分化細胞が初期化され、新たに分化多能性を獲得するメカニズムの一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Induced pluripotent stem cells (iPSC) are generated from somatic cells by the transgene expression of transcription factors containing protooncogenes. In this study, we screened natural product, chemical, and cDNA libraries for their ability to replace the protooncogenes. We identified novel factors for reprogramming and clarified reprogramming mechanism in part.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

分化多能性をもち、その性質を維持したままほぼ無限に増殖することができる ES 細胞は、細胞移植治療などの再生医療や創薬試験系への応用に大きな期待を寄せられてきた。しかし、倫理的問題、免疫拒絶問題を回避する必要がある、そのために患者自身の細胞から ES 細胞のような多能性と自己複製能、増殖能をもつオーダーメイド細胞を作り出すことが期待されていた。これまでに、複数の因子の組合せによってマウスの分化細胞に

おいて初期化を誘導し、ES 類似細胞、iPS(induced pluripotent stem)細胞が樹立されている。さらに、マウスと同じ因子を用いることで、ヒト繊維芽細胞からヒト iPS 細胞を樹立できることも報告されている。

ヒト iPS 細胞の樹立に成功し、臨床応用に向けて残されている問題点として、iPS 細胞誘導に必要な因子には c-myc、Klf4 の腫瘍関連因子が含まれること、そして、遺伝子導入法としてレトロウイルスを用いていることから、腫瘍発生の危険性が指摘されてきた。樹立された iPS 細胞では導入したレトロウイ

ルスの発現は抑制されているが、腫瘍組織では外来性の c-myc の再活性化がみられた。そこで、原癌遺伝子 c-myc を除いた 3 因子による iPS 細胞の作製を試み、4 因子での誘導に比較して時間はかかるが iPS 細胞を樹立できることが報告されている。この 3 因子で樹立した iPS 細胞を用いて作成したキメラマウスでは、腫瘍発生の増加は認められなかった。c-myc を除いた 3 因子により iPS 細胞を作製できることが示されたが、もう一つの原因遺伝子である Klf4 は現在のところ iPS 細胞誘導に必須である。

最近、レトロウイルスを用いずにプラスミドをトランスフェクションすることで iPS 細胞を誘導する方法が報告され、外来遺伝子のゲノムへの挿入は回避可能なことが示された。しかし、この新しいプラスミドトランスフェクション方法では、既存の方法に比較して iPS 細胞誘導効率が非常に低く、今後改善の必要がある。

一方、遺伝子を複数個使用している限り、iPS 細胞誘導に必要な全遺伝子が同じ細胞に必要な数導入され、十分量発現する確率は非常に低くなる。これは iPS 細胞誘導の効率が悪い大きな原因となっていると考えられる。もし iPS 細胞誘導に必要な遺伝子を天然物・化合物で置き換えることができれば、遺伝子を用いる場合と比較してより均一に効率的に初期化を誘導できると考えられる。最近、iPS 細胞誘導に遺伝子と化合物を併用することで、有意に誘導効率を上げることができるという報告が、いくつかの化合物について出されている。現在のところ遺伝子と併用することでその効率を上げる化合物は複数報告されているが、遺伝子の代替となる化合物はまだみつかっていない。

2. 研究の目的

本申請研究では、腫瘍関連因子 c-myc、Klf4 の代替りとして働き得る遺伝子を探索すること、iPS 細胞誘導に必要な遺伝子に代わる化合物・天然物を探索すること、また、遺伝子導入方法をさらに工夫することを研究目的とし、これまでに私達が確立させてきたハイスループットスクリーニングの系を用いて、様々な天然物・化合物・遺伝子ライブラリーを検討していく。具体的には次の 4 つの研究を行う。

(1) 遺伝子ライブラリーを用いて新因子の探索

(2) 遺伝子の代替となる天然物・化合物を探索

(3) レトロウイルスを用いない iPS 細胞誘導方法の効率を上げる天然物・化合物の探索

(4) iPS 細胞誘導のメカニズムの解明

3. 研究の方法

マウスの細胞を用いて、天然物・化合物・遺伝子のスクリーニングを行う。効率的に研究を進めるために、ヒトではなくマウスの細胞を用いてスクリーニングを行う。その後、マウスでのスクリーニングによるヒット天然物・化合物・遺伝子について、iPS 細胞の分化多能性の評価を行うとともに、ヒト分化細胞を用いてヒト iPS 細胞誘導への効果を検討する。

(1) 遺伝子ライブラリーを用いて新因子の探索

ES 細胞と異なり、iPS 細胞では、因子導入による原癌遺伝子 Klf4 や c-myc の活性化という腫瘍形成リスクがある。臨床応用を考えると、Klf4 や c-myc の代替りとなる、癌に関連しない遺伝子を用いて iPS 細胞を誘導する必要がある。c-myc なしの 3 遺伝子によって効率は低いながら iPS 細胞を誘導することが可能となったが、Klf4 は必須遺伝子である。遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、Klf4 の代替として働く遺伝子を探索する。また、iPS 細胞誘導に関与する遺伝子を見つけていくことにより、そのメカニズムを徐々に明らかにしていくことを試みる。

(2) 遺伝子の代替となる天然物・化合物を探索

レトロウイルスを用いて遺伝子を導入するという従来の iPS 細胞誘導方法では、レトロウイルスがゲノムに挿入され、遺伝子破壊とトランスジーンの再活性化による腫瘍化のリスクを上昇させることが分かっている。さらに、誘導効率が非常に低いことが問題点としてあげられている。これは、遺伝子を複数種類使用しており、一つの細胞に iPS 細胞誘導に必要な遺伝子全てが必要数導入される確率が非常に低くなり、誘導効率が悪くなっていると考えられる。全遺伝子を天然物・化合物に置き換えることが理想ではあるが、一つでも二つでも置き換えることができると、より均一に効率よく誘導できると考えられる。よって、上記 2 つの問題点の解決を目指し、遺伝子の代替物として iPS 細胞誘導に寄与できる天然物や化合物の探索を行う。iPS 細胞誘導に必要と報告されている 4 または 3 遺伝子の代替となる因子を一つずつ探索していき、最終的にはすべての遺伝子が天然物・化合物により置き換えられることを目指す。

様々なライブラリーを探索した結果、遺伝子の代替物として天然物がヒットした場合、活性物質の精製および同定作業を進める。

化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、ヒット化合物を得ることができた場合、

その化合物の誘導体を作製する。その誘導体をさらにスクリーニングにかけ、よりよいヒット化合物を探索する。

(3) レトロウイルスを用いない iPS 細胞誘導方法の効率を上げる天然物・化合物の探索

iPS 細胞誘導にレトロウイルスを用いると腫瘍化のリスクが上昇するという問題点があったため、レトロウイルスを用いない iPS 細胞誘導の方法が報告された。しかし、この新しい方法の iPS 細胞誘導効率は、従来のあまり効率の良くない方法に比較して、さらに低い。この新たな問題を克服するべく、新しい iPS 細胞誘導方法に加えることで効率を上げることができる天然物・化合物を探索する。また、このレトロウイルスを用いない iPS 細胞誘導方法は、マウスの胎児の細胞でしか成功していない。今後、大人のマウスやヒトでもできるかどうか検討が必要である。大人のマウスやヒトの細胞からレトロウイルスを用いない方法で iPS 細胞を誘導する際、それを助け、促進するような天然物や化合物を探索する。

様々なライブラリーを探索した結果、遺伝子の代替物として天然物がヒットした場合、活性物質の精製および同定作業を進める。

化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、ヒット化合物を得ることができた場合、その化合物の誘導体を作製する。その誘導体をさらにスクリーニングにかけ、よりよいヒット化合物を探索する。

天然物・化合物・遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行い、ヒットを得られた場合、それら新しい因子を用いた方法で iPS 細胞を樹立する。樹立した iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下へ注射することによって奇形腫形成を行い、分化多能性を検討する。また、培養皿上での胚葉体形成による三胚葉への分化誘導、キメラマウス作製、さらに生殖系列細胞への寄与による完全なリプログラミングの確認により、iPS 細胞の分化多能性を詳細に検討する。また、マウスの細胞を用いて行われたスクリーニングの結果、ヒット天然物、化合物、または遺伝子が得られた場合、ヒト iPS 細胞誘導にも用いてみる。ヒト由来の分化細胞から iPS 細胞を誘導する際、マウスと同様の効果がみられるかどうか検討する。ヒト細胞でもマウスの場合と同様の効果がみられることを期待するが、マウスとヒト ES 細胞が共通点と同時に多くの相違点も有することを考えると、マウスでの研究結果をヒトに応用するために、条件などを再検討する必要があるかもしれない。

(4) iPS 細胞誘導のメカニズムの解明

様々なライブラリーをスクリーニングし、ヒット天然物、化合物、または遺伝子を得られた場合、それらをヒントに iPS 細胞誘導のメカニズムを探っていく。天然物、化合物のヒットについては、まずそのターゲットを同定する。そのターゲット遺伝子、また遺伝子ライブラリーからのヒット遺伝子について、その機能からメカニズムを探る。現在までに iPS 細胞について多くの報告がなされているが、分化細胞が初期化され、新たに分化多能性を獲得するメカニズムは未だにほとんど解明されていない。その一端でも明らかにすることを試みる。

4. 研究成果

iPS 細胞では因子導入による原癌遺伝子 Klf4 や c-myc の活性化という腫瘍形成リスクがある。現在のところ、c-myc なしの 3 遺伝子によって効率は低いながら iPS 細胞を誘導することが可能だが、Klf4 は必須遺伝子である。遺伝子ライブラリーのスクリーニングにより、Klf4 の代替候補遺伝子を複数、同定することができた。そして、それら代替候補遺伝子について、さらに詳細な解析を進めた。具体的には、新因子を用いて樹立した iPS 細胞の分化多能性の評価を行った（奇形腫形成、キメラマウス作製、生殖系列細胞への寄与による完全なリプログラミングの確認など）。また、スクリーニングはマウスの細胞を用いたが、ヒト iPS 細胞誘導においてもマウスと同様の効果が得られることを確認した。現在までに iPS 細胞について多くの報告があるが、分化細胞が初期化され、新たに分化多能性を獲得するメカニズムについてはまだまだ不明な点が多い。スクリーニングによって同定された Klf4 の代替遺伝子の機能を調べることによって、iPS 細胞誘導のメカニズムに迫り、その一端を明らかにすることができた。

確立させたハイスループットスクリーニングの系を活かし、iPS 細胞誘導に関与する新規因子を見つけていくことによりメカニズムの一端を明らかにしていくとともに、将来の iPS 細胞の医療応用に向けてより適切なリプログラミング因子を見つけていくことは非常に重要なことである。

以上の研究成果について、2 つの特許を出願した。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

① 発表者：Momoko Maekawa

発表標題：Identification of novel

reprogramming factors for induced pluripotent stem cell generation.

学会等名：ISSCR 8th Annual Meeting

発表年月日：2010 年 6 月 18 日

発表場所：San Francisco

(2)研究分担者
()

研究者番号：

② 発表者：前川 桃子

発表標題：ハイスループットスクリーニングによる新規多能性誘導因子の探索

学会等名：第 9 回日本再生医療学会総会

発表年月日：2010 年 3 月 18 日

発表場所：広島国際会議場

(3)連携研究者
()

研究者番号：

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

①

名 称:Method of Efficiently Establishing Induced Pluripotent Stem Cells

発明者：山中伸弥/五島直樹/前川桃子/河村義史/望月宏美

権利者：国立大学法人京都大学/産業技術総合研究所/バイオ産業情報化コンソーシアム

種類：特許権

番号：61/379,949

出願年月日：2010 年 9 月 3 日

国内外の別：外国

②

名 称：Novel Nuclear Reprogramming Substance

発明者：山中伸弥/五島直樹/前川桃子/河村義史/望月宏美

権利者：国立大学法人京都大学/産業技術総合研究所/バイオ産業情報化コンソーシアム

種類：特許権

番号：PCT/JP2010/053024

出願年月日：2010 年 2 月 19 日

国内外の別：外国

○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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 桃子 (MAEKAWA MOMOKO)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：50528742