

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790283

研究課題名（和文） リプログラミング過程における細胞増殖の重要性

研究課題名（英文） The role of cell proliferation in cellular reprogramming

研究代表者

高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)

京都大学・iPS 細胞研究所・講師

研究者番号：80432326

研究成果の概要（和文）：転写因子による体細胞核の初期化は核移植や細胞融合と比較して長い時間を要する。その過程で細胞は活発に増殖しており、その重要性が予想されたが、いったいどのように関与しているのかは不明である。本研究では、体細胞に特定の転写因子を導入することで、初期化を引き起こす過程で細胞増殖がどのように働き、どの程度重要であるのかについて解析した。細胞増殖は初期化の開始には必須ではないが、その後の成熟過程においては必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Transcription factor-induced reprogramming requires relative longer time compared to those by nuclear transfer and cell fusion. Since cells actively proliferate during this period, we can imagine its importance in reprogramming process. However, the role of cell proliferation was unclear. In this study, we demonstrated that cell proliferation is dispensable for the initiation of reprogramming but essential for the maturation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：iPS 細胞、リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

核の初期化（リプログラミング）は時計の針を強制的に逆回転させ、細胞を若返らせるようなものである。リプログラミングを受けた細胞はエピジェネティックな修飾などの記憶を消去され、多能性細胞として生まれ変わる。

申請者らはこれまでに体を構成するあらゆる細胞系譜に分化できる胚性幹

(Embryonic stem; ES) 細胞で重要な働きをする遺伝子群の解析を行ってきた (Takahashi, K. et al., Nature 423, 541-545, 2003)。それらの結果をもとに4種類の転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc) を分化した体細胞に強制発現させることで、ES 細胞に類似した性質を持つ多能性幹細胞を樹立することに成功した (Takahashi, K. & Yamanaka, S., Cell 126, 663-676, 2006)。申請者らはこの人工的に作出

した ES 様細胞を induced Pluripotent Stem cell; iPS 細胞と名付け、翌年にはヒト細胞においても成功した (Takahashi, K. et al., Cell 131, 861-872, 2007)。

少数の既知因子による核の初期化は、様々な遺伝的および疾患的背景を持つ個人からの多能性幹細胞の樹立を可能とするため、この iPS 細胞技術を応用して難病の原因解明、創薬スクリーニング、移植医療の実現が期待されている。しかし、iPS 細胞技術はまだ成熟しておらず、改善の余地が多く残されている。遺伝子導入法やリプログラミング効率の低さといった技術的な点とともに、分子機構の解明という大きな課題も残されたままである。分子機構が不明なため現時点で思い通りにリプログラミングを制御することは困難である。一方で、iPS 細胞の樹立 (人為的なリプログラミング) は、これらの応用研究とは別の側面も有している。これまでに体細胞のリプログラミング過程をリアルタイムで観察できる実験系は他に存在せず、使い方によってはこれまで見ることが出来なかった現象の解明に役立つと考えられる (図 1)。

ES 細胞は受精卵から多能性幹細胞を取り出し培養系に持ち込むことで樹立される。しかしそのままの状態では ES 細胞として増殖できるわけではない。もともと分化多能性を有する細胞集団のうちのごく一部が不死性を獲得し、自己複製のサイクルへ入ることで ES 細胞になることができる。つまり受精卵由来の細胞も何らかの形でリプログラミングを受けて初めて ES 細胞になることができるのである。しかし、なぜ染色体異常を伴わず半永久的な増殖能を獲得しうるのかという疑問は、25 年前に初めて ES 細胞が樹立されて以来解決されていない。一方で、iPS 細胞の樹立におけるリプログラミング過程では、もともと分化多能性を持たない細胞が分化多能性を獲得すると並行して不死化が起こる (図 1)。ES 細胞と iPS 細胞、出来てしまえば区別がつかないほど良く似た細胞である。しかし、樹立の過程で起こるイベントには大きな違いがある。本研究では両者の樹立時における違いである分化多能性の獲得ではなく、共通点である不死化に焦点を当てる。

申請者が細胞の増殖および不死化に着目する理由について述べる。不死化とは老化することなく細胞増殖を続ける性質を獲得することを示す。マウス細胞を用いた iPS 細胞の作製実験から、成体由来の細胞よりも胎児由来の細胞のほうがリプログラミングの効率が高いことが示唆されている。こ



の場合に成体のほうがエピジェネティックな修飾が強固であるという可能性を持って説明されるケースがあるが、果たして本当にそうだろうか? 同じ皮膚の細胞ならば、異なるのはエピジェネティック状態よりもむしろテロメア長や増殖能などを含む細胞の若さであるように思われる。ES 細胞の核を受精卵に核移植した場合、体細胞核を移植した場合と比べてリプログラミング効率が飛躍的に上昇する。もともと ES 細胞は分化多能性を有しており消去されるべき記憶が少ないという説もあるが、未だに証明は成されていない。ES 細胞が不死性を有する未熟な細胞であるという点に関して言及した研究はほとんどない。つまり現状では増殖能の高い細胞もしくは状態においてリプログラミングが効率よく起こりうると示唆されるが明確な証拠はなくまたそれを証明する実験系も存在していなかった。通常の iPS 細胞を樹立する過程でおこるリプログラミングは非常に確率の低い現象である (~1%)。しかし、最近の報告では遺伝子発現系を改良することにより約 80% の高効率でリプログラミングを引き起こすことに成功している (Woltjen et al., Nature 458: 766-70, 2009)。本研究ではこのシステムを取り入れ、iPS 細胞を作製する目的ではなく、リプログラミング過程における細胞増殖の重要性について解析を行う。

2. 研究の目的

細胞の状態が変化するには増殖を伴う場合が多い。体細胞核が初期化され多能性幹細胞へと変化する場合においても同様である。これまでに核の初期化という現象を人為的に操作することはできず、細胞の状態変化と増殖を切り離して考えることができなかった。本研究課題は人為的な核の初期化によって引き起こされる iPS 細胞の樹立過程をツールとして、核の初期化と細胞増殖の関係を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

本研究課題は「リプログラミングと細胞増殖の関係」を明らかにすることを目的とする。そのための方法として、増殖を停止させた細胞においてリプログラミング誘導因子を発現させることにより遺伝子発現の変化を経時的に解析する手法を用いる。まずは、最適な増殖停止法や遺伝子発現法などの検討を行うとともに、実際に増殖する細胞との比較を行う。

次により詳細な解析を目的として、シングルセルレベルでの遺伝子発現変動を解析する。これにより、一部の細胞で確率的に変化が起きるのか、または全体的に緩やかな変動が起きるのかを判定することができる。

そして、これまでマウスで行った結果がヒ

ト細胞においても同様であるかを検討する。マウスとヒトでは同じ因子でリプログラミングが起きるが、その機構が同一であるかは不明であるため、両者の比較は重要である。

4. 研究成果

本研究では主にヒト線維芽細胞から iPS 細胞になる過程に着目した。ヒト線維芽細胞にリプログラミング因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入して最終的に iPS 細胞になることができる細胞は 1%程度である。そのため iPS 細胞になれない残りの 99%の細胞が存在することで様々な解析において膨大なノイズを生み出していた。結果として、iPS 細胞になる過程でいったい何が起きているのかをとらえることが非常に困難であった。

そこで本研究では、まず将来 iPS 細胞になる細胞だけを純化する系を立ち上げることを目指した。複数の表面抗原に対する抗体を評価した結果、TRA-1-60 抗体が一部の iPS 細胞になる細胞を特異的に認識することがわかった。この抗体を用いて、iPS 細胞になる過程の細胞を純化し、その細胞増殖について検討した。

リプログラミング過程における TRA-1-60 陽性細胞の細胞増殖を BrdU 残り込み実験を用いて調べた結果、リプログラミングの初期においては TRA-1-60 陰性と比較して同等であった。しかし、時間が経過し iPS 細胞へと近づいていく過程で、S 期の割合が著しく増加した。このことにより、iPS 細胞になる TRA-1-60 陽性細胞もリプログラミングの過程で活発に増殖していることがわかった。

そこで次に、細胞増殖がリプログラミング過程のどのステージで重要であるのかを調べた。初期化因子導入直後に、マイトマイシン C で細胞を処理することにより細胞増殖を停止させた。その後は通常通り、培養を継続し、TRA-1-60 陽性細胞の出現頻度や遺伝子発現を解析した。マイトマイシンで細胞増殖を停止した状態において、TRA-1-60 陽性細胞の出現頻度を確認した結果、確率は減少するものの、TRA-1-60 細胞は存在していることがわかった。これらの細胞においては多くの線維芽細胞特異的遺伝子が低下し、一部の多能性マーカーの発現が上昇していた。以上の結果より、細胞増殖はリプログラミングの開始においては必須ではないと考えられた。さらに、時間経過を追って遺伝子発現解析を実施した結果、細胞が増殖する通常の状態では、多くの多能性マーカー遺伝子が上昇し、iPS 細胞へと変わっていくのに対し、マイトマイシン C で増殖を停止させた状態においては、それらは部分的であり、その後の成熟が著しく阻害されていることがわかった。これらの結果から、細胞増殖はリプログラミングの開始には必須ではないが、その後の成熟過程におい

ては必須であると考えられた。

さらに上記の知見をもとに、これまでにリプログラミング効率を促進すると知られている因子の機能解析を行った。Cyclin D1 や p53 shRNA (p53 遺伝子のノックダウン) は iPS 細胞の樹立効率を著しく亢進させるが、これらのリプログラミング促進効果は、マイトマイシン C で増殖を停止した場合には全く見られなかった。つまり、Cyclin D1 や p53 shRNA の効果においては細胞増殖が重要な部分を占めていたと考えられる。一方で、LIN28 も iPS 細胞の樹立効率を改善する因子であるが、これについてはマイトマイシン C で増殖を停止させた状態においても、TRA-1-60 陽性細胞の割合を著しく増加させる効果が見られた。この結果より、LIN28 のリプログラミング促進効果は増殖とは独立した部分があることがわかった。

以上の結果より、細胞増殖は全体でみると iPS 細胞の樹立に必須であるといえる。しかし、本研究ではリプログラミングの開始には必須ではなく、その後の成熟過程に重要であることを明らかにした。この知見は今後、リプログラミングの分子機構を解明するうえで重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

①Tomoda, K., Takahashi, K., et al. (計 15 名、2 番目) Derivation conditions impact x-inactivation status in female human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 査読有、2012、11 : 91-99
DOI:10.1016/j.stem.2012.05.019

②Takahashi, K. Cellular reprogramming: Lowering gravity on Waddington's epigenetic landscape. *Journal of Cell Science*, 査読有、2012、125 : 2553-2560
DOI:10.1242/jcs.084822

③Tanaka, T., Takahashi, K., et al. (計 22 名、2 番目) Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood*, 査読有、2012、120 : 1299-1308
DOI:10.1182/blood-2012-03-417881

④Tamaoki, N., Takahashi, K., et al. (計 11 名、2 番目) Dental Pulp Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. *J Dent Res*, 査読有、2010、89 : 773-778
DOI:10.1177/0022034510366846

[学会発表] (計 8 件)

① Takahashi, K. Evaluation of human pluripotent stem cells for clinical use. The New York Stem Cell Foundation 2012/10/10 New York, USA

② 高橋和利 細胞の運命変化とその可能性 第 48 回日本小児循環器学会総会・学術集会 2012/7/5 京都

③ 高橋和利 ヒト多能性幹細胞が抱える不具合について 第 11 回日本再生医療学会総会 2012/6/13 横浜

④ Takahashi, K. What is the bug in the program of pluripotency. 10th ISSCR Annual Meeting 2012/6/13 横浜

⑤ 高橋和利 iPS 細胞の安全性に対する取り組み 日本組織培養学会第 85 回大会 2012/5/17 京都

⑥ Takahashi, K. Evaluating the safety of human induced pluripotent stem cells. AACR Special Conference on Stem Cells, Development, and Cancer 2011/3/5 Vancouver, Canada

⑦ Takahashi, K. Evaluation of human induced pluripotent stem cells. Royal Society Discussion Meeting 2010/10/18 London, England

⑧ 高橋和利 iPS 細胞の安全性に対する取り組み 第 7 回自治医科大学国際シンポジウム 2010/10/8 栃木

[その他]

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/ktakahashi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)

京都大学・iPS 細胞研究所・講師

研究者番号：80432326

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：