

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 24 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：2010～2011

課題番号：22790286

研究課題名（和文） 体細胞からの人工多能性幹細胞樹立過程における細胞間シグナリングの
解明研究課題名（英文） Analyses of intercellular signaling during generation
of induced pluripotent stem cell from somatic cells

研究代表者

青井 貴之 (AOI TAKASHI)

京都大学・iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：00546997

研究成果の概要（和文）：体細胞からの人工多能性幹（iPS）細胞樹立過程における遺伝子発現の変化をマイクロアレイによって調べたところ、細胞間シグナリングに関わる多くの遺伝子の発現変動がみられた。これらの多くは NF- κ B シグナルによって制御されるものであった。そこで、NF- κ B シグナルの抑制実験を行い NF- κ B シグナルが iPS 細胞樹立に与える影響を調べたところ、NF- κ B シグナルは、iPS 細胞誘導に正の効果をもつことが明らかになった。一方、樹立後の iPS 細胞の維持には、NF- κ B シグナルは影響を与えないことが分かった。

研究成果の概要（英文）：Microarray analysis showed the expression level of many genes involved in intercellular signaling changed during generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from somatic cells. The genes included diverse downstream targets of NF- κ B signal. To address the function of NF- κ B signaling during iPS cell generation process, we conducted loss-of-function experiment and demonstrated that NF- κ B signaling have positive effect on the reprogramming process, but not maintenance of established iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：人工多能性幹細胞、細胞間シグナリング、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

（1）【自己複製能を有する幹細胞には生理的に存在するものと非生理的なものがある】幹細胞とは、未分化状態を維持したままに自己複製能を有する細胞である。生体内に生理的に存在する幹細胞は、組織の発生、維持および損傷後の修復に関与している。一方、非生理的な幹細胞として、初期胚を培養することで樹立される胚性幹細胞や、体細胞に初期

化因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc など）を導入することで得られる人工多能性幹（induced Pluripotent Stem, iPS）細胞（Takahashi et al., Cell 2006, 2007）、そして、癌幹細胞が挙げられる。

【癌細胞と iPS 細胞には共通点が多い】

癌細胞と iPS 細胞はともに、対称性分裂による複製能力を有し、無限に増幅する。一方、生理的に存在する幹細胞の増幅は発生段階

や損傷組織の修復時など一時的なものであり有限である。

これを言い換えると、癌細胞と iPS 細胞はともに未分化を維持しながらの無限の対称性分裂能を獲得した幹細胞であるといえることができる。

体細胞の初期化による iPS 細胞樹立の過程におけるそのような能力の獲得においては、Myc や Klf ファミリーなどの癌関連遺伝子の活性化が必要であることも、癌細胞と iPS 細胞の成立過程の共通性を示唆するものである。

(2) 【発癌や生体内での幹細胞増幅制御には細胞外シグナルと p53 が重要である】

損傷組織の修復において生体内でおこる幹細胞の増幅制御には、サイトカインなど細胞外シグナルによる制御が重要である。それ以外に、生体内で自己複製能を有する細胞の増幅が起こるのは、癌細胞である。しかし、Ras などの癌遺伝子の活性が起こった際には、Oncogene Induced Senescence (OIS) と呼ばれる発癌抑制機構が働き、細胞周期が停止することが知られている。OIS では p 5 3 が重要な役割を担っている(Chen et al., Nature, 2005)ほか、多くの分泌性タンパク産生をともない、そのうち IL-6 や IL-8、IGFBP7 などが細胞周期停止に寄与することが示されている。興味深いことに、OIS に寄与する分泌タンパクが、同時に、癌化した細胞の増殖促進に働くことも知られている(Kuilman et al., Cell, 2008)。さらに、マウス乳腺幹細胞の対称性分裂を p 5 3 が抑制することが報告された(Cicalese et al., Cell, 2009)。

(3) 【iPS 細胞樹立過程にも抑制機構が存在する】

初期化因子が導入された細胞のうち、多くの細胞は、p 5 3 を中心とした抑制機構により細胞周期の停止が起こり、それを何らかの理由で回避した一部の細胞のみが iPS 細胞になることである。この抑制機構回避のメカニズムについては、分かっていない。また、我々が行った予備的検討では、細胞周期をとどめる p 1 6 の発現量は、マウス繊維芽細胞に初期化因子を導入しすると上昇し、最終的に樹立された iPS 細胞では、元の繊維芽細胞よりも低下していた。p 1 6 は癌細胞においては発現が低下していることはよく知られている。

(4) 【体細胞初期化のプロセスにおいては、細胞外シグナルの役割は明らかにされていない】

以上から、体細胞初期化における p 5 3 を中心とする抑制的な細胞内ネットワークと、一部の細胞によるその回避という現象は、発癌課程における抑制機構と一部の細胞によるその回避という現象と対比することができる。

一方、体細胞初期化における細胞外シグナルの意義については現時点では不明である。培養条件については、同一実験内で初期化因子が導入された全ての細胞およびそれに由来する細胞で一様であることから、細胞-細胞間相互作用が、初期化の成立に関与しているとの仮説をたてた。

(5) 【iPS 細胞の樹立過程においても細胞-細胞間相互作用の重要性が示唆されている】
実際、iPS 細胞を樹立する際に、細胞密度が濃すぎると適切な初期化が起こらずに形質転換した細胞が優勢となり iPS 細胞は樹立できなくなるので、適切な細胞密度での培養を行う必要がある。このことは、iPS 細胞樹立過程における細胞間相互作用の重要性を示唆するものである。

また、我々の予備的検討から、OIS への寄与が報告されている IL-6 の発現が、初期化因子を導入したマウス線維芽細胞では上昇し、iPS 細胞では再び低下しているとの知見を得ている。興味深いことに、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 因子を導入した線維芽細胞においてよりも、c-Myc を除く 3 因子を導入した線維芽細胞の方が、IL-6 の発現量は多かった。初期化が成立し樹立される iPS 細胞の数は 3 因子を導入したものの方が少ないことから、IL-6 が初期化に抑制的に働く可能性が示唆される。

2. 研究の目的

iPS 細胞樹立過程における、細胞間相互作用を解析すること。

その為に

(1) ヒト、マウスの体細胞に初期化因子の導入によって変動する細胞間シグナル伝達に関与する分泌因子やその受容体遺伝子を同定する。

(2) そこで同定された因子の、ヒトおよびマウス体細胞初期化過程における機能を明らかにする。

(3) 初期化抑制機構を回避した iPS 細胞における上述の因子の機能を解析する。

3. 研究の方法

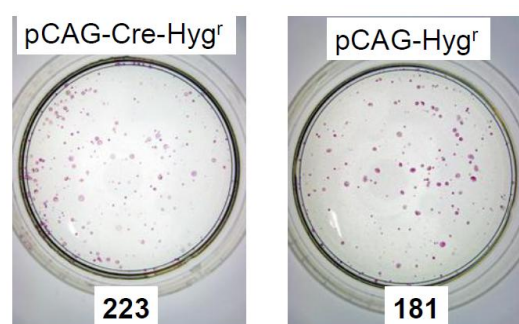
I : 体細胞初期化の過程で変動する細胞間シグナルに関与する分泌または細胞表面タンパクおよびその受容体を同定する。

(1) 体細胞初期化の過程で発現が変動する分泌タンパクや細胞表面タンパクおよびその受容体を、遺伝子発現の網羅的解析から抽出する。

ヒトおよびマウス線維芽細胞に①Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 つ、または②c-Myc を除く 3 つの初期化因子、③コントロールベクターのみ、を導入したのから RNA を回収し、マイクロアレイを行う。ヒト、マウスそれぞれで、①—③における発現を比較し “①

(5) それをさらに検証するため、IKK-B のホモ floxed マウスと Nanog-GFP レポーターマウスを交配し、マウスを作成した。このマウスにおいては、Cre リコンビナーゼの発現によって、NF-kB の活性化が起こらず、かつ、多能性幹細胞特異的マーカー遺伝子である Nanog の発現の有無を確認できることから、いわゆる partial reprogrammed cell と、真の iPS 細胞を区別することができる。このマウスの線維芽細胞にレトロウイルスを用いて初期化因子に加え、Cre リコンビナーゼを発現させたもの（すなわち IKK-B が欠失し、NF-kB の活性化が起こらない）と、発現させないものを比較した。すると、出現する Nanog-GFP 陽性コロニーの数は前者において有意に少なかった。

(6) このマウスの線維芽細胞から Cre リコンビナーゼを用いずに樹立した iPS 細胞（すなわち IKK-B は intact）株に Cre 遺伝子をエレクトロポレーションにて導入し、コロニー形成率や増殖速度、遺伝子発現を調べたところ、Cre 導入細胞と非導入細胞で、有意な差は認めなかった。



(7) また、樹立された IKK-B ノックアウト iPS 細胞は、形態や増殖速度、コロニー形成能、未分化マーカー遺伝子の発現において、IKK-B-flox iPS 細胞と比較して、明らかな違いは見られなかった。

以上の事から、NF-kB シグナリングは、マウス iPS 細胞の誘導過程を促進する効果をもつが、樹立された iPS 細胞の維持には関与しないと結論づけた。

(8) 同様のことがヒト iPS 細胞においても当てはまるかを調べる為に、ヒト線維芽細胞からの iPS 細胞誘導の過程で NF-kB シグナル阻害剤を用いた実験を行ったところ、NF-kB シグナル阻害剤は iPS 細胞の樹立効率を減ずる効果が認められた。また、樹立されたヒト iPS 細胞は同阻害剤存在下でも、明らかな変化を認めなかった。従って、ヒト iPS 細胞においても NF-kB シグナリングは、その誘導過程に正の効果があり、樹立後の維持には寄与していないと考えられた。

NF-kB シグナリングの iPS 細胞誘導過程における下流因子を探索するために、ヒト iPS

細胞誘導途中の細胞から RNA を回収し、マイクロアレイによる発現解析などを行っている。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 青井貴之、iPS 細胞の現況と展望、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、2011.11.22、京都

② 青井貴之、iPS 細胞研究の現状と課題、第 29 回日本ヒト細胞学会学術集会、2011.8.21、富山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青井 貴之 (AOI TAKASHI)

京都大学・iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：00546997

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：