

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 5 月 31 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：22790287

研究課題名（和文） iPS細胞における個性の評価法の開発

研究課題名（英文） Development of the evaluation method for individual iPS cells

研究代表者

山本 拓也（YAMAMOTO TAKUYA）

京都大学 iPS 細胞研究所 助教

研究者番号：60546993

研究成果の概要（和文）：

体細胞にごく少数の遺伝子を導入することで得られる iPS 細胞は、多能性幹細胞である ES 細胞とほぼ同等の性質を持つ。iPS 細胞の技術を用いた再生医療は大いに期待される一方、応用へ向けた大きな課題の一つとして、高品質な iPS 細胞を安定的に樹立する必要がある。そのためには、樹立された iPS 細胞の分化能や癌化リスクを高精度で評価する方法の確立が必要である。本研究では、性質の異なる iPS 細胞の遺伝子発現解析を単一細胞レベルで行うことによって、iPS 細胞の新たな評価方法の開発を行なった。

研究成果の概要（英文）：

Forced expression of a set of transcription factors induces somatic cells into pluripotent stem cells (iPS cells). Their morphology, differentiation capacity and gene expression profile are almost exactly equivalent to those in embryonic stem (ES) cells. In order to apply iPS cell technology in regenerative medicine, high-quality iPS-cells should be stably generated. To achieve this, high accuracy evaluation methods are needed to assess the differentiation capacity and tumorigenesis risk in generated iPS cells. In this study, we performed gene expression analysis at the single cell level and developed the novel evaluation method for iPS cells quality.

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

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は、再生医療の切り札として大いに期待されている一方、実用化にはまだまだ多くの課題が山積している。課題の一つは、

高品質な iPS 細胞を安定的に効率よく樹立できないことである。もともになる体細胞の違いや樹立方法によって、癌化リスクや分化能に違いがある。さらに、同一の体細胞から同

一の方法で樹立された iPS 細胞であっても、性質の異なる iPS 細胞が生じる。したがって、樹立された iPS 細胞の品質を高精度で評価する方法の開発が必要である。現在まで、細胞集団における遺伝子発現解析による評価マーカーの同定が精力的に試みられているが、未だに有効なマーカーは報告されていない。ES 細胞は、着床前胚（胚盤胞）の内部細胞塊（inner cell mass, ICM）から樹立される。ES 細胞は均一な細胞集団であると考えられてきたが、単一の ES 細胞から増殖した細胞集団の中であっても性質が異なる細胞が混在する（不均一な細胞集団である）ことが明らかとなった。例えば、Rex1、stella、Nanog、Pecam1、Hes1 といった遺伝子の発現量が、個々の細胞で大きくばらついているという事実が観察されている。特に、Rex1、stella、といった遺伝子の発現量が低い細胞は、着床後胚のエピブラストから樹立される EpiS (epiblast stem cells) 細胞に非常に近い性質を持つことが示唆されている。このことは、ES 細胞が単一種の細胞として増殖するのではなく、複数の細胞種の集団として相互に影響を与えながら増殖することを意味すると考えられる。これらは、単一細胞レベルでの解析を行うことにより初めて明らかとなった。以上より、iPS 細胞における単一細胞レベルでの発現解析を行えば、細胞集団の解析からは明らかにされなかった iPS 細胞の新たな評価方法に繋がると考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、様々な組織から樹立された iPS 細胞の単一細胞における遺伝子発現を網羅的に解析することによって、個々の iPS 細胞における不均一性の違いを明らかにし、iPS 細胞の個性を規定するマーカーを探索し、

iPS 細胞の評価マーカーを同定することを目指した。

3. 研究の方法

iPS 細胞の単一細胞における遺伝子発現の解析を行い iPS 細胞の個性を規定する遺伝子群および転写因子の同定を試みる。さらに、各々の iPS 細胞の癌化リスクや分化能と比較することによって、iPS 細胞の評価マーカーになる因子を特定する。種々の iPS 細胞株を用いて、FACS による単一細胞の分離を行い、単一細胞から RNA を精製し、定量的 RT-PCR 解析による遺伝子発現解析を行う。遺伝子発現解析の結果をもとに、各々の iPS 細胞で、発現がばらつく遺伝子群を同定し、クラスタリング解析を行い、iPS 細胞の種類によって、いくつの集団に分類できるのか、またそれぞれの集団に属する細胞の割合はどのようになるのかを明らかにする。さらに、プロモーター解析等によりそれぞれの集団を規定する転写因子の同定を試みる。また、iPS 細胞特異的なスプライシングバリエーションの解析も同時に行なうことで、転写後修飾と発現制御機構がどのように共役して遺伝子の発現レベルを制御しているのかを解析する。

4. 研究成果

(1) 単一細胞における遺伝子発現解析

セルソーターでトリプシン処理した iPS 細胞を一細胞ずつソートし、単一細胞由来の RNA より、逆転写反応によって cDNA を合成した。その後、PCR 反応 (pre-amplification) を経て、Fluidigm 社の BioMark システムで定量的 RT-PCR を行った。まず、多能性マーカーや分化マーカーを含む 48 遺伝子について解析を行なった。結果、ハウスキーピング遺伝子はどの細胞でもほとんど同じ発現量を示したにもかかわらず、多くの多能性幹細胞

特異的マーカーは細胞毎に大きく変動することがわかった。また、興味深いことに、いくつかの分化マーカーは、低発現ながら一部の細胞で発現していることが明らかとなった。このことは同じクローン内の細胞であっても、細胞内の状態は異なり、不均一な細胞集団であることを意味する。

(2) iPS 細胞毎の単一遺伝子発現

iPS 細胞は、もともとなった体細胞の種類によって性質が違ふことが報告されている。また、同じ由来の細胞から同じ方法で作製された iPS 細胞であっても性質が異なる iPS 細胞が生み出されることが知られている。そこで、異なる細胞株毎に単一細胞における遺伝子発現を調べた。結果、多能性マーカー各種は、前項と同様に単一細胞毎に大きく変動していた。それらの変動割合を癌化リスクや分化能との関係を解析した。細胞株毎の大きな違いを観察することはできなかったが、生殖細胞系列に寄与する iPS 細胞株特異的に発現変動割合が異なる遺伝子群が一部存在した。今後、これら遺伝子群の変動が分化能へ与える影響を解析する予定である。

(3) 単一細胞におけるスプライシングバリエーションの解析

我々が独自に見出している iPS 細胞特異的なスプライシングパターンについても同様に、単一細胞解析を行なった。結果、同一の遺伝子から選択的スプライシングによって生み出される 2 つの転写産物の発現量の比は、多くの場合単一細胞レベルで変化が見られなかったが、一部の転写産物の比は同一の細胞株内であっても大きく変動することが明らかとなった。このことは、選択的スプライシングも遺伝子発現と同様に細胞間でゆらぎ、細胞内の状態をその都度ダイナミックに

変化させる要因となっていることを示唆する。現在、細胞株間において、単一細胞でのスプライシングバリエーションのゆらぎがどのように違うのかを解析中であり、今後、多能性マーカーや分化マーカーの遺伝子発現のゆらぎとどのように関係するのかを調べていく予定である。

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)

[学会発表] (計 6 件)

① 山本拓也 「次世代シーケンサーを用いた iPS 細胞研究」第 57 回日本生化学会近畿支部例会 2010 年 5 月 22 日 奈良先端科学技術大学院大学

② 山本拓也 「次世代シーケンサー SOLiD を用いた iPS 細胞研究」第 43 回日本発生物学会ランチョンセミナー 2010 年 6 月 23 日 国立京都国際会議場

③ 山本拓也 「次世代シーケンサー SOLiD を用いた iPS 細胞研究」Japan Sequencing Forum 2010 2010 年 9 月 30 日 東京 丸ビル ホール & コンファレンススクエア

④ 山本拓也 「次世代シーケンサーを用いた iPS 細胞研究」第 35 回近畿肉腫研究会 2010 年 12 月 18 日 京都大学 iPS 細胞研究所

⑤ 太田翔、西田栄介、山中伸弥、山本拓也 「体細胞初期化過程における選択的スプライシング制御機構の解明」第 84 回日本生化学

学会大会 2011年21-24日 国立京都国際会館

⑥ Sho Ohta、Eisuke Nishida、Shinya Yamanaka、Takuya Yamamoto

「Global changes of splicing regulation in the reprogramming process」 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 パシフィコ横浜

〔図書〕(計1件)

① 山本拓也 「iPS細胞におけるレトロウイルス挿入部位の網羅的同定法」細胞工学 学研メディカル秀潤社 2011年8月号 p835-p840

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 拓也 (YAMAMOTO TAKUYA)

京都大学 iPS細胞研究所・助教

研究者番号：60546993

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし