

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390067

研究課題名(和文) ゲノム再プログラム化分子機構 体細胞から多能性幹細胞へ

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of genome reprogramming; Somatic cell into pluripotent stem cell

研究代表者

多田 高 (TADA, TAKASHI)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：30188247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,300,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞がiPS細胞を含む多能性幹細胞に変化する現象が再プログラム化である。本研究では、iPS細胞誘導とES細胞と体細胞の細胞融合技術により再プログラム化分子機構の解明を目指した。その結果、再プログラム化における、Sox2, Nanog, Tet1, Tet2遺伝子の機能、X染色体の再活性化機構、iPS細胞のゲノム編集応用、グラウンド状態培養条件におけるヒト/マウスiPS細胞の違いなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Reprogramming generates conversion of somatic cell into pluripotent stem cell. Molecular mechanisms of somatic reprogramming is explored by iPS cell induction and cell fusion between somatic and ES cells. Here, we demonstrated function of the Sox2, Nanog, Tet1, and Tet2 genes in reprogramming mechanisms, molecular events in X-chromosome reactivation in reprogramming of female somatic cells, applications of the technique of genome editing in iPS cells, differential response between human and mouse iPS cells to culture under the ground state.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 ES細胞 多能性幹細胞 再プログラム化 細胞融合 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 24 年 (2012 年) 当初、ヒト iPS 細胞樹立が報告されてから 5 年経過し、様々な樹立方法が報告されていた。一方で、体細胞が iPS 細胞に再プログラム化される頻度が 1/100-1/1000 と低い事から、再プログラム化分子機構の解明は困難を極めていた。

マウス体細胞の再プログラム化では、再プログラム化の各段階で発現するマーカー遺伝子を目印に、再プログラム化途中の細胞を FACS ソーティングにより抽出して、遺伝子発現解析が行われてきていた。

ヒトとマウス iPS 細胞では、ヒト iPS 細胞が Primed 状態にあるのに対して、マウス iPS 細胞は Naïve 状態にある。マウスはヒト iPS 細胞に比べて多能性が高く、より未分化な状態にある。

ヒト体細胞の iPS 細胞化の効率は、マウスと比較して、10 倍以上低いため分子機構の解明は進んでいない。

2. 研究の目的

ヒト体細胞から iPS 細胞へ一方通行の道筋をたどる細胞株を樹立し、その結果を他の再プログラム化誘導法である細胞融合と比較することで共通のメカニズムを浮き彫りにする
I) ヒト体細胞が iPS 細胞に再プログラム化する過程をヒストン修飾の側面から明らかにする

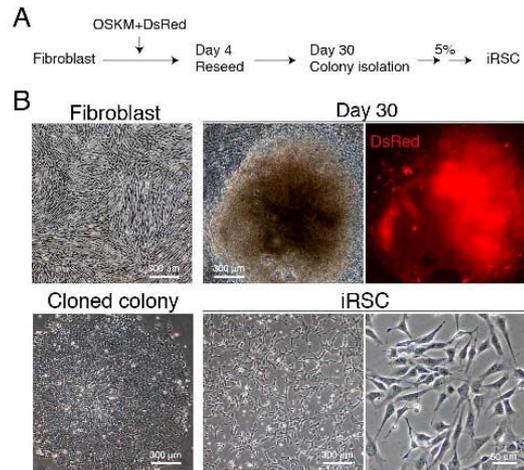
II) ヒト体細胞が iPS 細胞に再プログラム化する過程を網羅的遺伝子発現から明らかにする
III) 再プログラム化分子機構の相違点を細胞融合と iPS 細胞実験系で比較する。

3. 研究の方法

I) ヒト体細胞から iPS 細胞への再プログラム化中間状態にある間葉系幹細胞、iRS (intermediately Reprogrammed Stem) 細胞の樹立

Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM) および DsRed 遺伝子を導入し、iPS 細胞樹立過程でのコ

ロニーをクローニングする。DsRed (OSKM 活性化状態) の間葉系細胞の細胞株 (iRS 細胞株) の樹立。

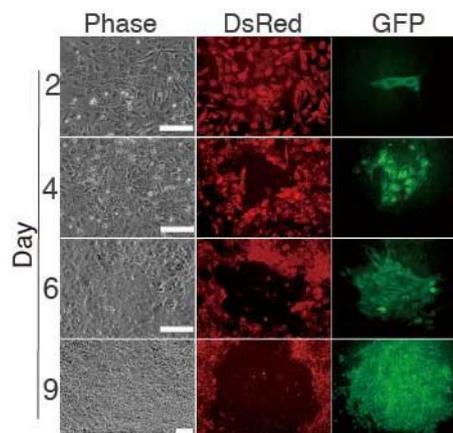


間葉系幹細胞, iRS 細胞の樹立

ヒト iRS 細胞の高密度培養による iPS 細胞への (iRS-iPS 細胞) 再プログラム化の再開。iRS 細胞由来 iPS 細胞の特性解析

II) ヒト iRS 細胞から iPS 細胞への再プログラム化に伴う遺伝子発現およびエピジェネティクスの解析

iRS-iPS 細胞への再プログラム化の各段階の細胞の 1 個の細胞から cDNA ライブラリーを作製して、網羅的遺伝子発現を解析
iRS-iPS 細胞への再プログラム化の各段階の細胞をヒストン修飾特異的な抗体を用いて免疫染色して、エピジェネティクス変化を解析。



再プログラム化過程における内在性 OCT 4 活性の可視化

III) ヒト iRS 細胞のゲノムエディティングによる、遺伝子改変 iPS 細胞の作製

CRISPR/Cas9 システムを応用して、ヒト iRS 細胞の内在性 OCT4 の活性をレポーター遺伝子の GFP で可視化。

iRS-iPS 細胞への再プログラム化過程における内在性 OCT4 遺伝子の発現を解析。

IV) iPS 細胞化と細胞融合による体細胞再プログラム化の比較検討

体細胞の iPS 細胞化と細胞融合再プログラム化でのメチル化 DNA 関連遺伝子の機能を解析。

体細胞の iPS 細胞化と細胞融合再プログラム化での不活性 X 染色体の再活性化を解析。

4. 研究成果

I) iRS 細胞株の樹立に成功

低密度細胞培養により、40 継代以上安定に維持可能な細胞株を樹立。

iRS 細胞は高密度細胞培養により、iPS 細胞への再プログラム化を再開する。iPS 細胞化には MET (Mesenchyme-Epithelial-Transition) を経る。

iRS-iPS 細胞再プログラム化では OSKM の発現抑制、内在性 OCT4 の活性化が起こる。

iRS 細胞由来 iPS 細胞は通常の iPS 細胞と同様の遺伝子発現および多能性特性をもつ。

II) iRS-iPS 細胞の再プログラム化における遺伝子発現およびエピジェネティクス解析

再プログラム化過程の単一細胞由来の cDNA ライブラリーを作製し、遺伝子発現チップ解析により、経日的遺伝子発現の変化を明らかにした。

ほぼ同時に再プログラム化を再開する iRS 細胞のヒストン修飾抗体により追跡し、変化を明らかにした。

III) ヒト iRS 細胞を用いたゲノムエディティング

iRS 細胞の内在性 OCT4 遺伝子の 5' 末端に、CRISPR/Cas9 システムを用いて 2A-GFP 遺伝子を導入することに成功した。内在性 OCT4 の活性が生きた細胞で GFP 観察が可能になった。

iRS-MET-iPS 細胞再プログラム化の過程で、内在性 OCT4 の活性化が MET に先んじて起きることが明らかになった。MET 後のコロニーで OCT4 の発現が一時的に不安定であることが明らかになった。

IV) iPS 細胞化と細胞融合での再プログラム化の比較

再プログラム化の DNA 脱メチル化における脱メチル化酵素 Tet1 及び Tet2 の機能を明らかにした。

再プログラム化における不活性 X 染色体の再活性化の仕組みを明らかにした。

5. 主な発表論文等

Pasque, V., Tchieu, J., Karnik, R., Uyeda, M., Dimashkie, A.S., Case, D., Papp, B., Bonora, G., Patel, S., Ho, R., Schmidt, R., McKee, R., Sado, T., Tada, T., Meissner, A., and Plath, K*: X Chromosome Reactivation Dynamics Reveal Stages of Reprogramming to Pluripotency. **Cell** **159**, 1681-1697 (2014).

Matsumura, T., Tatsumi, K., Noda, Y., Nakanishi, N., Okonogi, A., Hirano, K., Li, L., Osumi, T., Tada, T., and Kotera, H*: Single-cell cloning and expansion of human induced pluripotent stem cells by a microfluidic culture device. **Biochem Biophys Res Commun** **453**, 131-137 (2014).

Sun, L. T., Yamaguchi, S., Hirano, K., Ichisaka, T., Kuroda, T., and Tada, T.*: Nanog co-regulated by Nodal/Smad2 and Oct4 is required for pluripotency in developing mouse epiblast. **Dev Biol** **392**, 182-192 (2014).

Terao, K., Gel, M., Okonogi, A., Fuke, A., Okitsu, T., Tada, T., Suzuki, T., Nagamatsu, S., Washizu, M., and Kotera, H*: Subcellular glucose exposure

biases the spatial distribution of insulin granules in single pancreatic beta cells. **Sci Rep** **4**, 4123 (2014).

Piccolo, F. M., Bagci, H., Brown, K. E., Landeira, D., Soza-Ried, J., Feytout, A., Mooijman, D., Hajkova, P., Leitch, H. G., Tada, T., *et al.*: Different Roles for Tet1 and Tet2 Proteins in Reprogramming-Mediated Erasure of Imprints Induced by EGC Fusion. **Mol Cell** **49**, 1023-1033 (2013).

Nagata, S., Hirano, K., Kanemori, M., Sun, L. T., and Tada, T.*: Self-renewal and pluripotency acquired through somatic reprogramming to human cancer stem cells. **PLoS One** **7**, e48699 (2012).

Okamura, D., Mochizuki, K., Taniguchi, H., Tokitake, Y., Ikeda, M., Yamada, Y., Tournier, C., Yamaguchi, S., Tada, T., Scholer, H. R., and Matsui, Y.*: REST and its downstream molecule Mek5 regulate survival of primordial germ cells. **Dev Biol** **372**, 190-202 (2012).

Cheng, L. T., Sun, L. T., and Tada, T.*. Genome editing in induced pluripotent stem cells. **Genes Cells**, **17**, 431-438 (2012).

Takehashi, M., Tada, M., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Oshimura, M., Tada, T., and Shinohara, T.*: Hybridization of Testis-Derived Stem Cells with Somatic Cells and Embryonic Stem Cells in Mice. **Biol Reprod**, **86**, e178, 1-9 (2012).

Hirano, K., Nagata, S., Yamaguchi, S., Nakagawa, M., Okita, K., Kotera, H., Ainscough, J., and Tada, T.*: Human and mouse induced pluripotent stem cells are differentially reprogrammed in response to kinase inhibitors. **Stem Cells Dev** **21**, 1287-1298 (2012).

Cheng, L. T., Nagata, S., Hirano, K., Yamaguchi, S., Horie, S., Ainscough, J., and Tada, T.

*: Cure of ADPKD by Selection for Spontane

ous Genetic Repair Events in Pkd1-Mutated iPS Cells. **PLoS One** **7**, e32018 (2012).

Yamaguchi, S., Hirano, K., Nagata, S. and Tada, T.: Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. **Stem Cell Research** **6**, 177-186 (2011).

〔雑誌論文〕(計 12件)

〔学会発表〕(計 8件)

〔図書〕(計 9件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 1件)

名称:新規初期化細胞/Novel Reprogrammed Cell

発明者:多田 高・長田翔伍・平野邦生

権利者:京都大学

種類:特願

番号:61/749,069

出願年月日:2013年1月4日

国内外の別:米国

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es03/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 高 (TADA TAKASHI)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号:30188247

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし