

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618011

研究課題名(和文) iPS細胞の分化抵抗性解析による安全性の確保

研究課題名(英文) Quality control of iPS cells by studying differentiation resistance.

研究代表者

永松 剛 (Nagamatsu, Go)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70453545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞誘導の4因子とヒトあるいはラット由来の細胞表面抗原を2A配列でつないだレトロウイルスベクターの作成を作成した。このベクターを用いてiPS細胞の誘導効率と外来因子の量比の問題を検討したところ、Sox2の発現が低いこととOct3/4の高発現が多能性誘導に深くかかわることが明らかとなった。遺伝子発現解析から細胞外環境に対する反応性の違いが示唆され、ケモカインのCCL2を用いることでiPS細胞の樹立効率を上昇させることを見出した。また、核内因子に着目しWhsc111 variant1に3因子によるiPS細胞誘導の際に樹立効率を上昇させる活性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：A tagging system was developed to sort induced pluripotent stem (iPS) cells according to the expression levels of each of the four reprogramming factors. Using this system, the effective ratio (Oct3/4-high, Sox2-low, Klf4-high, c-Myc-high) was. To investigate the molecular basis, microarray analysis was performed. Pathway analysis revealed that the G protein-coupled receptor (GPCR) pathway was up-regulated significantly under the high efficiency condition and treatment with the chemokine, C-C motif ligand 2, a member of the GPCR family, enhanced somatic cell reprogramming. Furthermore, the genetic modifier, Whsc111 (variant 1), also improved the efficiency of somatic cell reprogramming.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：幹細胞 多能性 リプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

体細胞に特定の因子を導入することにより多能性幹細胞を誘導できることが示された。この iPS 細胞作製の技術は倫理的な問題と免疫拒絶の問題をととも回避することができ臨床応用への期待が非常に高い。実際に各種のモデルを用いて移植の実験が試みられている。その結果、iPS 細胞由来の細胞を移植した際に腫瘍化してしまう危険性が示唆されていた。そのメカニズムについては不明な点が多いものの、分化に際して抵抗性を示す細胞が存在し、そのような未分化状態を保っている細胞が腫瘍の原因となることが示唆されていた。同様のモデル系において ES 細胞を用いた際は腫瘍化の割合が非常に少ないことからこの現象は iPS 細胞特有のものと考えられる。

iPS 細胞由来の分化抵抗性を示す細胞の分子基盤の解明から iPS 細胞と ES 細胞の差異を明らかにすることは iPS 細胞を用いた再生医療への応用を考える際に安全性の確保の面で意義深いものと考えられる。

### 2. 研究の目的

iPS 細胞由来の細胞による腫瘍化の問題を解決するために分化抵抗性を示す細胞に着目し、その分子基盤の解明から iPS 細胞と ES 細胞の差異を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

iPS 細胞および ES 細胞をフィーダー細胞非存在下で無血清かつサイトカイン無添加（この条件を分化誘導条件とする）で培養したところ ES 細胞は維持することができないのに対して iPS 細胞は増殖・維持される（図 1 上段）。Nanog-GFP の発現を指標に分化誘導条件下で培養した iPS 細胞は陽性の細胞と陰性の細胞が混在していた（図 1 下段）。これらのことは ES 細胞と異なり、iPS 細胞には分化誘導条件下において分化抵抗性を示す細胞が現れることを示している。

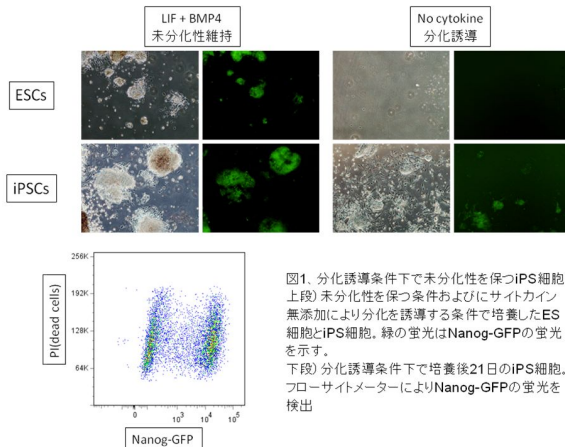


図1. 分化誘導条件下で未分化性を保つ iPS 細胞（上段）未分化性を保つ条件およびにサイトカイン無添加により分化を誘導する条件下で培養した ES 細胞と iPS 細胞。緑の蛍光は Nanog-GFP の蛍光を示す。  
下段）分化誘導条件下で培養後 21 日の iPS 細胞。フローサイトメーターにより Nanog-GFP の蛍光を検出

iPS 細胞と ES 細胞の最も大きな違いは外来因子を導入したことである。そのため外来因子の挙動は iPS 細胞と ES 細胞の差異を生み出す原因の有力な手掛かりとなることが考えられる。そこで外来因子の発現状態を生細胞においてシングルセルレベルでモニターするシステムを構築した。具体的には各因子と細胞表面抗原を 2A 配列でつないだレトロウイルスベクターの作成により、それぞれの因子の発現を細胞表面抗原に対する抗体とフローサイトメーターにより生細胞でモニターすることが可能となった（図 2）。これを用いて外来因子の不活性化の均一性や再活性化の有無そしてそれらと分化抵抗性との関係を解析した。

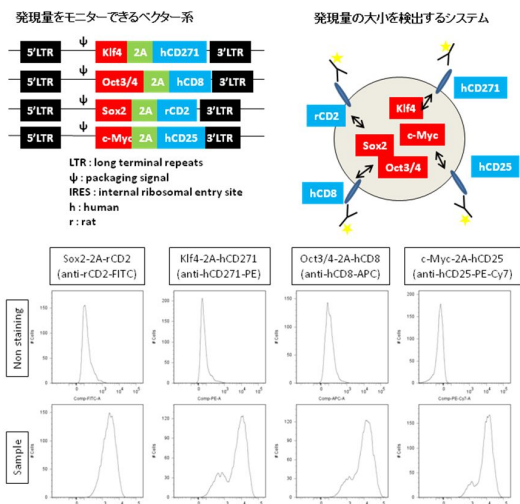


図2. iPS 細胞誘導時に導入する因子をモニターするシステムの開発（上段）およびフローサイトメーターによる可視化（下段）

### 4. 研究成果

構築した外来因子の挙動を生細胞においてシングルセルレベルでモニターするシステムを用いて外来因子の不活性化の均一性や再活性化の有無そしてそれらと分化抵抗性との関係を解析した。しかしながら外来因子の再活性化と分化抵抗性に関しては当初の予想に反して直接の関係を示唆するような結果は得られなかった。一方で構築したシステムを用いて iPS 細胞の誘導効率と外来因子の量比の問題を検討したところ、Sox2 の発現が低いことと Oct3/4 の高発現が多能性誘導に深くかかわることが明らかとなった（Nagamatsu G et. al. J Biol Chem 2012）。さらに、Sox2-high, Oct3/4-low の細胞集団（低効率）と Sox2-low, Oct3/4-high の細胞集団（高効率）を遺伝子導入後 2 日において分取しマイクロアレイをもちいて遺伝子発現を解析した。両者の比較から細胞外環境に対する反応性の違いが示唆され、特に GPCR のパスウェイが変動していることから GPCR ファミリーの一つであるケモカインに着目し、iPS 細胞の樹立効率を上昇させる因子として CCL2 の同定に成功した。さらに転写因

子とエピジェネティックモディファイヤーに着目して、高効率の細胞手段で発現の高い Whsc111 variant1 に 3 因子による iPS 細胞誘導の際に樹立効率を上昇させる活性があることを見出した。

このように外来因子のモニターシステムによりリプログラミング効率を上昇させる新たな因子の同定に成功した。

一方で腫瘍化に関しては、始原生殖細胞と体細胞リプログラミングの関係に着目し、始原生殖細胞からはリプログラミング因子のいずれの 1 因子でも多能性が誘導されることを明らかにした (Nagamatsu G et. al. Stem Cells 2012)。この培養系を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、c-Myc と L-Myc の違いを生み出す分子の候補遺伝子を同定した。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Telomerase Reverse Transcriptase has an Extratelomeric Function in Somatic Cell Reprogramming.

Kinoshita T, Nagamatsu G, Saito S, Takubo K, Horimoto K, Suda T.

J Biol Chem.

2014 in press

査読あり

2. Identification of drug candidate against prostate cancer from the aspect of somatic cell reprogramming.

Kosaka T, Nagamatsu G, Saito S, Oya M, Suda T, Horimoto K.

Cancer Sci.

2013 Aug;104(8):1017-26.

doi: 10.1111/cas.12183.

査読あり

3. Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by single reprogramming factors.

Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Honda H, Takubo K, Kinoshita T, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, Suda T.

Stem Cells.

2013 Mar;31(3):479-87.

doi: 10.1002/stem.

査読あり

4. Optimal ratio of transcription factors for somatic cell reprogramming.

Nagamatsu G, Saito S, Kosaka T, Takubo K, Kinoshita T, Oya M, Horimoto K, Suda T.

J Biol Chem.

2012 Oct 19;287(43):36273-82.

doi: 10.1074/jbc.M112.380683.

査読あり

5. Tracing the conversion process from primordial germ cells to pluripotent stem cells in mice.

Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, Suda T.

Biol Reprod.

2012 Jun 14;86(6):182.

doi: 10.1095/biolreprod.111.096792.

査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

#### 1. Go Nagamatsu

Conversion of Primordial Germ Cells to Pluripotent Stem Cells.

The 4th Symposium on Systems and Synthetic Biology (TriSys 2013)

Nov 7-8 2013 Hong Kong (China)

#### 2. Go Nagamatsu

Symmetric and asymmetric dimethylation of arginine for the regulation of pluripotent stem cells.

The International Symposium on CVM-CNU

Oct 29 2012 Gwangju (Korea)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 抗がん剤の効果増強剤

発明者: 永松剛、小坂威雄、齊藤秀、大家基継、堀本勝久、須田年生

権利者: インフォコム株式会社、学校法人慶應義塾、独立行政法人産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 2012-127405

出願年月日: 平成 24 年 6 月 4 日

国内外の別: 国内

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

[http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sakaguchi/scholar/g\\_nagamatsu/](http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sakaguchi/scholar/g_nagamatsu/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

永松 剛 (Nagamatsu Go)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70453545