

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

,平成25年 4月 1日現在

機関番号：32659

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2012～2013

課題番号：23659146

研究課題名（和文） iPS 細胞への誘導を阻害する TGF- $\beta$  シグナルの分子メカニズム解明研究課題名（英文） Molecular mechanisms of TGF- $\beta$  signaling for reprogramming

研究代表者

伊東 史子 (ITO H FUMIKO )

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70502582

研究成果の概要（和文）：iPS 細胞の臨床応用に向けて、樹立効率やスピードの改善が求められている。iPS 細胞への誘導が開始された初期段階では、まず細胞の間葉—上皮転換が誘導されるが、この過程は TGF- $\beta$  によって負に制御されているため、TGF- $\beta$  シグナルを抑制すると樹立効率を改善することが報告されている。そこで、本研究では、間葉—上皮転換に関与する分子群の詳細な検討により確実な iPS 細胞の誘導技術の開発を目指した。

TGF- $\beta$  シグナルを完全にシャットダウンさせるために、TGF- $\beta$  受容体のコンディショナルノックアウトマウスと、CAG-CreER マウスを交配させたマウスより、MEF 細胞を樹立し、Tet-on システムを利用した iPS 細胞の誘導系を樹立した。MEF-iPS 細胞間の変遷を可能にするためである。樹立してきた iPS 細胞の遺伝子変異について検討を行ったが、コロニー間のばらつきが大きいことが問題として挙がってきた。今後は、iPS 細胞の継代を繰り返すことにより、より安定な iPS 細胞へと変化させて解析を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：It is required for the improvement and process of establishment efficiency induced pluripotent stem (iPS) cells. Reprogramming of the cells involves an intermediate mesenchymal-epithelial transition (MET)-like process that is also regulated by TGF  $\beta$ . In this study, we have tried to find out the molecular mechanisms in MET process regulated by TGF- $\beta$ .

We used mouse embryonic fibroblast (MEF) cells from TGF- $\beta$  receptors conditional knockout mice crossing with CAG-Cre Tg mice. Then we generated iPS cells from the MEF cells by lentivirus vectors which encode Nakayama factors under the control of doxycycline dependent expression system. These iPS cells showed clonal variety and required longer passage for stabilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医科学一般

科研費の分科・細目：

キーワード：iPS 細胞、遺伝子改変マウス、TGF- $\beta$ 、インヒビター、CAG-Cre

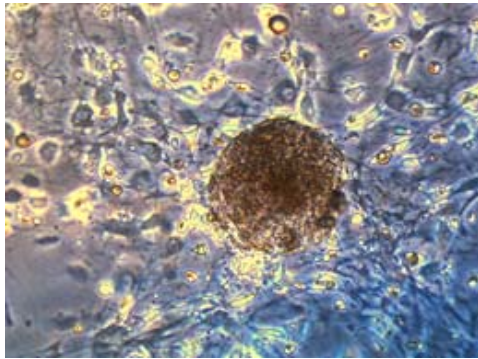
## 1. 研究開始当初の背景

わずか 4 因子の導入により作製できる iPS 細胞は、ES 細胞が抱えていた倫理的問題や拒絶反応の問題を回避できるため、再生医療への期待が高い(*Cell* 2006. 126:663)。しかし、

iPS 細胞樹立効率の改善、ウイルスによらない方法の確立等、臨床応用に向けて改善が求められている。

TGF- $\beta$  は多様な作用をもつサイトカインである。TGF- $\beta$  シグナルインヒビターにより

iPS 細胞の樹立効率が改善することが報告され、TGF- $\beta$  シグナルが iPS 細胞誘導を負に制御することが示された。これは iPS 細胞の誘導初期において、間葉—上皮転換 (MET) の誘導が必要であるためである (*Cell Stem Cells* 2010. 7:64)。TGF- $\beta$  シグナルは上皮—間葉転換 (EMT) を促進するため、TGF- $\beta$  シグナルインヒビターが EMT を阻害し、MET を促進して iPS 細胞化を促進することは非常に合理的である。しかし、TGF- $\beta$  シグナルインヒビターは TGF- $\beta$  受容体 (ALK5) だけに選択的に抑制するものではない。それゆえ、インヒビターを利用した研究では、iPS 細胞への初期化を促進する分子メカニズムの詳細については明らかにできない。面白いことに、TGF- $\beta$  シグナルを伝達する Smad2 と Smad3 は、EMT において作用が異なる。Smad3 は EMT を促進するのに対し、DNA 結合力を持たない Smad2 は抑制的に作用する (*J. Clin. Invest* 2008. 118:2722)。



## 2. 研究の目的

iPS 細胞の樹立効率やスピードの改善が、臨床応用に向けて求められている。「TGF- $\beta$  シグナルインヒビターは樹立効率・スピードを改善する」ことが報告され、TGF- $\beta$  シグナルは iPS 細胞誘導を抑制していると考えられる。しかし、インヒビターの作用スペクトルは TGF- $\beta$  受容体に選択的に作用するものではないため、インヒビターを用いた研究では TGF- $\beta$  シグナルの作用を検証することは難しい。そこで TGF- $\beta$  シグナル系のノックアウトマウスを用いて TGF- $\beta$  シグナルを亢進・遮断した細胞を用いて iPS 細胞樹立を樹立し、その過程における TGF- $\beta$  シグナルの分子メカニズムを明らかにし、iPS 細胞の樹立効率・スピードを改善する新規技術の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

TGF- $\beta$  シグナル系 KO マウス由来細胞を用いて、TGF- $\beta$  シグナルを亢進/遮断した条件下 iPS 細胞を樹立し、樹立過程における変動遺伝子群を網羅的・経時的に同定する。変動遺伝子群の機能と iPS 細胞樹立効率への影響

と検証し、iPS 細胞樹立の分子メカニズムを明らかにするとともに、確実な iPS 細胞樹立方法の確立を目指す。DNA マイクロアレイ解析を行えるように iPS 細胞誘導を Dox 制御するとともに、タモキシフェンによる遺伝子破壊も制御して解析を行う。

iPS 細胞の樹立効率、スピードに影響があった KO マウス由来細胞を用いて、遺伝子を過剰発現またはノックダウンさせ、その役割について明らかにし、iPS 細胞誘導の分子メカニズムを解明するとともに、樹立効率・スピードを改善する技術、miRNA を利用した樹立技術開発を行う

## 4. 研究成果

iPS 細胞への誘導が開始された初期段階では、まず細胞の間葉—上皮転換が誘導されるが、この過程は TGF- $\beta$  によって負に制御されているため、TGF- $\beta$  シグナルを抑制すると樹立効率を改善することが報告されている。そこで、本研究では、間葉—上皮転換に関与する分子群の詳細な検討により確実な iPS 細胞の誘導技術の開発を目指した。

TGF- $\beta$  シグナルを完全にシャットダウンさせるために、TGF- $\beta$  受容体のコンディショナルノックアウトマウスと、CAG-CreER マウスを交配させたマウスより、MEF 細胞を樹立し、Tet-on システムを利用した iPS 細胞の誘導系を樹立した。MEF-iPS 細胞間の変遷を可能にするためである。樹立してきた iPS 細胞の遺伝子変異について検討を行ったが、コロニー間のばらつきが大きいことが問題として挙がってきた。今後は、iPS 細胞の継代を繰り返すことにより、より安定な iPS 細胞へと変化させて解析を行う予定である。

## 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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Itoh F, Itoh S, Adachi T, Ichikawa K, Matsumura Y, Takagi T, Festing T, Watababe T, Weinstein M, Karlsson S & Kato M. Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. *Blood* 119: 5320-5328 (2012)
2. Itoh S & Itoh F. Implication of TGF- $\beta$  as a survival for during tumor development. *J. Biochem.* 151; 559-562 (2012)
3. Watanabe T, Sato K, Itoh F, & Iso Y. Pathogenic involvement of heregulin- $\beta_1$  in anti-atherogenesis. *Regul. Pept.* 175, 11-14 (2012).

4. Watanabe T, Sato K, Itoh F Wakabayashi K, Shichiri M, & Hirano T. Endogenous bioactive peptides as potential biomarkers for atherosclerotic coronary heart disease. *Sensors (Basel)* 12, 4974-4985 (2012).
5. Yang W#, Itoh F#, Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S & Kato M. Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. *Cancer Sci.* 102(10):1808-1814 (2011)
6. Itoh F. & Itoh S. Inhibitory machinery for the TGF- $\beta$  family signaling pathway. *Growth Factors*, 29(5):163-73 (2011)

[学会発表] (計5件)

1. Itoh, F., Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. 17th International Vascular Biology Meeting, 2012/6, Wiesbaden, Germany
2. Itoh, F., Ichikawa, K., Itoh, S., Oliver, G., and Watanabe, T., TGF- $\beta$  signaling regulates lymphangiogenesis in mice development. 17th International Vascular Biology Meeting, 2012/6, Wiesbaden, Germany
3. Ichikawa, K., Takahiro, T., Itoh, F., Itoh, S., Oliver, G., and Watanabe, T., TGF- $\beta$  signaling regulates lymphangiogenesis in vivo. 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vasuclar Biology, 2012/12, Tokushima, Japan
4. Takagi, T., Ichikawa, K., Itoh, S., Fruttiger, M., Itoh, F., and Watanabe, T., TGF- $\beta$  signaling inhibit tumor angiogenesis in vivo. 10th Korea-Japan Joint Symposium on Vasuclar Biology, 2012/12, Tokushima, Japan
5. Itoh, F., Hazome, S., Fruttiger, M., Itoh, S., and Watanabe, T., Dicer-dependent miRNA pathway is important for vascular development. 10th Ko

[図書] (計1件)

伊東史子、血管新生と腫瘍血管、がんの増殖と悪性化の分子機構、宮澤恵二、伊東進編、化学同人 67-77 (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：ミオスタチン阻害ペプチド  
 発明者：林 良雄、伊東 史子 他  
 権利者：東京薬科大学  
 種類：特許特願 2013-17540  
 番号：特願 2013-17540  
 出願年月日：2013年1月31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]  
 ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 史子 (Itoh Fumiko)  
 東京薬科大学・生命科学部・准教授  
 研究者番号：

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし