

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615004

研究課題名(和文) iPS干渉の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of interference with iPSC induction

研究代表者

升井 伸治 (Masui, Shinji)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：20342850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：23年度以前の研究において、iPS誘導を阻害すること(iPS干渉)を指標に、分化を決める転写因子(マスター転写因子)がとれることがわかり、任意の細胞に使えると考えられた。本研究は、iPS干渉の分子機構を明らかにすることを目的とし、山中因子の一つであるOct3/4の働きを詳細に解析した。その結果、強制発現されたOct3/4は体細胞の高発現遺伝子に結合し、抑制することがわかった。これがiPS誘導の開始に必要で、マスター転写因子の強制発現などによって発現を維持すると、iPS誘導の阻害すなわちiPS干渉がみられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that master transcription factors tend to interfere with dedifferentiation triggered by iPSC induction technique in a given cell type. In this study we sought to elucidate the mechanism of the interference. Overexpression of Yamanaka factors including Oct3/4 repressed genes highly expressed in somatic cells. This repression was thought to be their direct effect, as chromatin immunoprecipitation indicated direct binding of Oct3/4 on genes highly expressed in somatic cells. On the other hand, overexpression of a master transcription factor in somatic cells during iPSC induction inhibited this repression and decreased iPSC induction efficiency. These data indicate that this repression is necessary for iPSC induction, and that the interference can be seen as the antagonism between Yamanaka factors and master transcription factors on genes highly expressed in somatic cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 マスター転写因子 ポリコーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 分化の研究は、いわゆる重要な転写因子(マスター転写因子)が同定されると大きく進む。例えば、筋肉における MyoD や、膵臓における Pdx1 は、その典型といえる。分化の理解が進めば、その応用にもつながる。例えば、Oct3/4 の同定は多能性の理解を進め、iPS 細胞の作出につながった。すなわち、重要な転写因子を多数同定していけば、理解と応用が進む。

(2) 一般に、ある転写因子が重要かどうかはノックアウトによって調べられてきた。しかし実際には、ノックアウトは時間と手間がかかるから、解析する遺伝子について発現特異性が低い重要な転写因子は、この時点でふるい落とされる(例えば、多能性幹細胞の重要な転写因子 Klf4、c-Myc は、マウス全身で広く発現する)。また、ノックアウトを行ったとしても、リダンダンシーによってフェノタイプが弱まる場合が多い(一般に、重要な転写因子は、進化的に保存されているから、遺伝子重複を起こしやすい)。とくに、「重要な働きをしているはず」と考えられていない細胞において、フェノタイプが出ていない場合は、二重・三重ノックアウトをしてその細胞を調べようとは思わないものだ(実際、Klf、Myc が多重ノックアウト解析されるまでには、多くの周辺データの蓄積が必要だった)。したがって、これまでに見落とされている重要な転写因子は非常に多いと予想される。

(3) 一方、強制発現ならば、リダンダンシーの影響を受けない。近年、重要な転写因子の強制発現によって、繊維芽細胞から神経細胞(Vierbuchen et al., Nature. 463:1035-41, 2010)や心筋細胞(Ieda et al., Cell 142:375-386, 2010)などが誘導されている。逆に考えれば、誘導活性を指標とすることで、重要な(発現プロファイルに大きな影響を与える)転写因子がとれるだろう(誘導活性をもつ転写因子を、誘導因子と定義する)。

(4) では、どうやれば誘導因子が同定できるのだろうか? Vierbuchen, Ieda 論文に代表される従来法では、少数の転写因子プール(発現特異性やノックアウトなどから「重要そうな」因子を選んだもの)を用いて、その中から誘導因子を同定している。この手法を、他の細胞一般に適用する場合を考えてみよう。

まず、「重要そうな」因子の数が、プールを作れるくらい報告されていなければならぬ。

また、プールを作れたとしても、誘導活性がみられなかった場合(プール中に入っている誘導因子数が、誘導活性検出に最低限必要な数に満たない場合)には、誘導因子を同定できないのが問題である。

加えて、誘導因子が同定できた場合においても、それらはあらかじめ重要と目されていたわけだから、実質的には大して進んでいないとさえいえる。

新規因子を同定するためには、プール中に機能未知の転写因子を多く入れる必要がある。予備知識無しの20程度のプールだと、誘導因子が含まれる可能性が低いから、100以上のプールを作るべきだろう。ところが、100因子をまとめて導入できる系は現在無い。仮に導入できたとしても、誘導に阻害的に働く因子がしばしば含まれるから(細胞の中ではポジティブ・ネガティブ制御因子が適切な量比で働くから、安定化している)、誘導される確率は非常に低くなる。

100因子から任意に3因子を選ぶとすると、その組み合わせ数は10の6乗で、しかも誘導実験はある程度の培養スケールと時間が必要だから、実際に実験するのは極めて困難だ。実験したとしても、誘導されなかった場合は、何の結果も残らない。

(5) 以上から、誘導因子の同定実験は、成功しても既知因子の重要性確認にとどまることがほとんどで、成功しなかった場合には何の結果も残らないから、「先に進まない」・「やる気がしない」実験となっている。確実に何らかの結果が残り、未知因子もとれる、つまり「先に進む」・「やる気がする」誘導因子同定法があれば、分化研究は大きく進み始めるだろう。

(6) そこで私は、新手法(iPS 干渉法)を開発した。この手法では、解析対象の細胞Aにおいて、大きな発現変動(iPS 誘導)を与える。同時に、その細胞で発現している転写因子を一つ、過剰発現させる。もし、その転写因子が、細胞Aの発現プロファイル維持に大きな役割を果たすならば、iPS 誘導に対する阻害効果(iPS コロニー数の減少; iPS 干渉)がみられる。この手法を用いれば、100因子以上(原理的には全遺伝子)について一因子ずつアッセイし、発現プロファイル維持活性をランク付けすることで、誘導因子をエンリッチできる。実施例として、神経系細胞と肝細胞において、最も強く iPS 干渉を起こす因子の中から、誘導因子を同定できた。大部分が、ノックアウトではフェノタイプが無い/弱いと報告されていた因子であった。この手法は、たとえ誘導ができなかったとしても、ランク付けの結果が残るから、強い干渉を示す未知因子について、ノックアウトなどの実験を「やる気になる」。つまり、先に進めることができる実験系といえる。

2. 研究の目的

23年度までに、発現プロファイル維持活性と、iPS 干渉強度が、リンクすることは証明したといえる。その分子機構については、iPS 誘導時の特徴的な遺伝子発現変化(MET 経

路；Wrana, Pei ら Cell Stem Cell, 2010) の阻害を見出ししている。しかし、どの細胞種においても誘導因子が直接 M E T 遺伝子群を抑制するとは考えにくく、他の研究者が納得するための障害になっていた。誰もが納得する証明を行えば、多くの研究者が iPS 干渉法を用いて誘導因子の同定を進めるから、多くの分野が大きく進む。そこで本研究では、iPS 干渉の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iPS 干渉時における遺伝子発現変化を解析する。材料は、マウス ES 細胞を試験管内分化させることで得られた神経系細胞(神経前駆細胞様の細胞)を用いる。この細胞に、ドキシサイクリン制御性山中因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) 発現ベクターを導入し、ドキシサイクリン添加によって効率よく iPS 誘導が起きることを確認した (N31 細胞)。神経系細胞のマスター転写因子は、23 年度までに同定していた Pax6, Hmga2, Etv6 を用いる。これらを N31 細胞において強制発現した株と、していないコントロール株を用いて iPS 誘導時における全遺伝子の発現変化を、マイクロアレイ法を用いて解析する。クロマチン免疫沈降と次世代シーケンスは、市販の抗体を用いて定法にて行った。

(2) 体細胞の高発現遺伝子を抑制した場合において、iPS 誘導が促進されるかをゲノムワイド shRNA スクリーニング法を用いて解析する。N31 細胞に、ゲノムワイド shRNA を導入し、iPS 誘導を行う。得られた iPS 細胞からゲノム DNA を抽出し、shRNA 領域を PCR 法にて増幅し、次世代シーケンサーを用いて shRNA の配列を決定する。すなわち、どの shRNA が iPS 誘導を促進する効果があったかを判定できる。

4. 研究成果

(1) まず N31 細胞のコントロール株を用いて、iPS 誘導時における遺伝子発現変化を解析した。その結果、山中因子強制発現の直後 (24 時間) の時点で、統計的に有意に多くの神経系細胞の高発現遺伝子 (ES 細胞と比較) が、抑制されていた。神経系の高発現遺伝子は、ES 細胞においてポリコーム複合体によって抑制されている遺伝子が多く含まれていた。これらの遺伝子は、発生制御因子 (分化を制御する) を多く含むことが知られる。また、ES 細胞においてポリコーム複合体をノックアウトすると、発生制御因子の発現上昇を介して分化することが知られる。すなわち、発生制御因子は、多能性を維持する遺伝子と相互に抑制する (図 1)。したがって、神経系細胞の高発現遺伝子の発現を維持すると、発生制御因子が多能性遺伝子の発現上昇を阻害するため、iPS 誘導を阻害するはずである。実際、N31 細胞にマスター転写因子を強

制発現した株において、iPS 誘導時における遺伝子発現変化を解析したところ、神経系細胞の高発現遺伝子の発現が維持されており、また多能性遺伝子の発現上昇は阻害されていた。

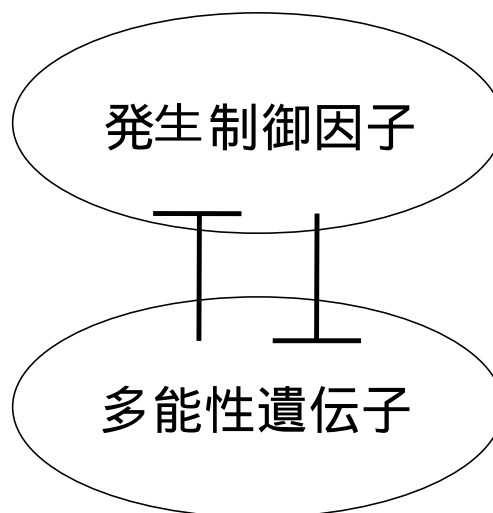


図 1. 発生制御因子と多能性遺伝子は相互に抑制する

これらがそれぞれの転写因子が直接に果たす機能であることを確認するため、ChIPseq 法を用いて Oct3/4, Pax6, Etv6 および活性化領域の指標である H3K4me2 のクロマチン上の局在をゲノムワイドに解析した。その結果、Oct3/4 は活性化領域に統計的に有意に多く結合し、おそらくこれを介して発現抑制を行うと考えられた。一方、Pax6 と Etv6 も活性化領域に多く結合しており、発現維持に働くと考えられた。したがって、活性化領域上における山中因子とマスター転写因子間の機能的拮抗が、iPS 干渉の分子機構と考えられる (図 2)。

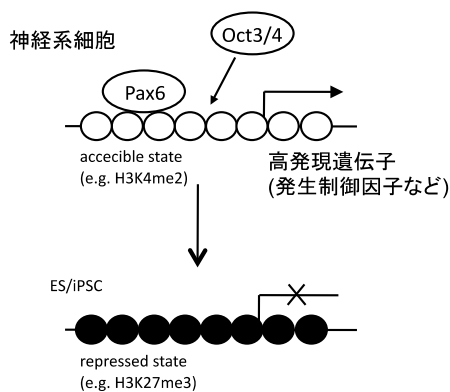


図 2. Pax6 などのマスター転写因子は体細胞の高発現遺伝子の発現を維持し、Oct3/4 などの山中因子はこれを抑制する

(2) 上の実験では、体細胞の高発現遺伝子をさらに高発現させることで、iPS 誘導を阻害した。では逆に、体細胞の高発現遺伝子を抑制した場合、iPS 誘導は促進されるのだろうか？これを解析するため、N31 細胞におい

てゲノムワイド shRNA スクリーニングを行った。その結果、多くの候補 shRNA が同定された。Gene Ontology 解析を行うと、神経系で機能する遺伝子が有意に多いことがわかった。この結果は、神経系細胞の高発現遺伝子は、iPS 誘導を阻害することを示唆しており、上記(1)の結果を支持する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有り、110(16):6412-7, 2013
DOI: 10.1073/pnas.1220200110

〔学会発表〕(計4件)

Masui S, Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles., ISSCR 11th annual meeting, 2013年6月13日、Boston (USA).

升井伸治、初期化を阻害する因子が分化を促進する、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸ポートアイランド(神戸市)

升井伸治、初期化を阻害する因子が分化を促進する、第13回日本再生医療学会総会 2014年3月5日、国立京都会館(京都市)

Masui S, Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles., 47th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN), 2014年5月29日、ウインクあいち(名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/masui/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

升井 伸治 (MASUI, Shinji)

京都大学・iPS細胞研究所・特定講師

研究者番号: 20342850