

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462582

研究課題名(和文) 胚性幹細胞の新しいリプログラミング技術による高品質化と再生医学応用への基礎的研究

研究課題名(英文) Generation of high-quality embryonic stem cells by new reprogramming technique and a basic research for regenerative medicine

研究代表者

三浦 巧 (MIURA, TAKUMI)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・室長

研究者番号：60405355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞やヒトES細胞はナイーブ状態と呼ばれるマウスES細胞様の性質を獲得することがこれまでに報告されているが、このようなナイーブ状態のヒト多能性幹細胞はマウスES細胞と比較して極めて不安定な状態にあるため、本研究では、従来のヒトiPS細胞の樹立方法に基づいたリプログラミング技術を利用し、ナイーブ状態のヒト多能性幹細胞が樹立できるかを検討した。その結果、LIF存在下でリプログラミング因子依存性の非ナイーブ様幹細胞の樹立に成功し、この非ナイーブ様幹細胞は発生初期の神経幹細胞様の性質を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Several groups have recently reported that naive human embryonic stem cells (hESCs)/human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) cultured by the presence of LIF and 2i (two inhibitors) closely resemble the naive pluripotent state of inner cell mass-derived mouse ESCs (mESCs). However, many undefined differences may exist between mESCs and the naive human pluripotent stem cells. In this study, we tried to generate LIF plus 2i-dependent human stem cell-like cells from human fibroblast using iPS-reprogramming factors. As a result, we have developed a method for the conversion of human fibroblasts to LIF-dependent primitive neural stem cells (NSCs) using a strategy based on techniques for the generation of iPSCs. This method may facilitate the generation of patient-specific human neurons for studies and treatment of neurodegenerative diseases.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 幹細胞 リプログラミング ES細胞 初期化 神経幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS (induced pluripotent stem) 細胞が樹立されて以来、次なる目標としてヒト iPS 細胞を各組織由来の細胞へと分化させる試みが多くなされ始めている。しかしながら、ヒト iPS 細胞から目的の細胞を安定して得るには未だ至っていない。そのため、期待される再生医療や創薬分野へのヒト iPS 細胞の応用に遅れが生じ、「夢の再生医療」の早期実現に向けて大きな課題となっている。この分化誘導が安定しない理由の一つには、材料としてのヒト ES (embryonic stem cell) /iPS 細胞がマウス ES/iPS 細胞に比べて不均一な集団であることが想定されている。ヒト ES/iPS 細胞の不均一性としては、一部の未分化マーカーが、ヒト ES/iPS 細胞集団の中で不均一な分布を示すことが知られている。つまり、ヒト ES/iPS 細胞における未分化状態は、未分化能が低下した細胞が混入した状態であり、このような細胞集団の不均一性が特にヒト ES/iPS 細胞では顕著であるため、これらヒト ES/iPS 細胞の分化誘導をより難しくさせている要因であると考えられる。この分化状態の不均一性はマウスのエピプラスト由来のエピプラスト幹細胞 (epiblast stem cell, epi-stem cell, エピ幹細胞) でも観察されており、常に全体の約 20% の細胞が他の細胞系譜へと移行していることが報告されている。近年では、このエピプラストに近い未分化状態を“プライムド (プライムされた)”状態、胚盤胞における内部細胞塊 (ICM) に近い未分化状態を“ナイーブ”状態と分けて定義されている。通常の培養条件では、ヒト ES/iPS 細胞は“プライム”な状態で安定するため、近年、マウス ES/iPS 細胞と同レベルの未分化状態 (ナイーブ状態) へとヒト ES/iPS 細胞を移行させる試みがなされてきた。しかし、これらの報告では、リプログラミング因子 (OCT4, KLF2, KLF4, NANOG など) をプライム状態のヒト ES/iPS 細胞へ導入して過剰発現させなければ、ナイーブな状態で安定することができず、この操作により、ヒト ES/iPS 細胞は逆に分化抵抗性を獲得し、細胞が分化しづらくなる可能性が予想される。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞培養条件を工夫し、リプログラミング因子に依存しないナイーブ状態のヒト iPS 細胞を樹立することが可能か検討を行った。

2. 研究の目的

近年の国内外の報告により、ヒトとマウスの iPS 細胞は、その性質が大きく異なることが解ってきた。具体的には、マウス iPS 細胞の方がヒト iPS 細胞より初期 (ナイーブな) 状態に近く、ヒト iPS 細胞はマウス iPS 細胞と比較して不完全なリプログラミング状態にある。本研究では、ヒト iPS 細胞をより初期状態にもちこむことで、ヒト iPS 細胞の高品質化を図ることを目指す。これは、多能性幹細胞の研究分野において解明すべきテ

マの一つでもあり、ヒト iPS 細胞の高品質化が実現すれば、ヒト iPS 細胞の単細胞分散大量培養や遺伝子相同組換えによる遺伝子改変などを行うことが可能となる。つまり、ナイーブ状態のヒト iPS 細胞を樹立することは、細胞治療や創薬スクリーニングのための高品質なヒト iPS 細胞を準備することを意味する。

3. 研究の方法

(1) リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞の体細胞からの直接誘導

リプログラミング因子 (OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, NANOG) の発現を人為的に制御できるようにするために、ドキシサイクリン誘導型のプロモーターで制御されたリプログラミング因子を、レンチウイルスベクターを用いて線維芽細胞に導入し、ERK1/2 阻害剤 PD0325901 (PD)、GSK3 阻害剤 CHIR99021 (CH) および LIF を含む無血清 N2B27 培地中で培養し、マウス ES 細胞様のコロニーを形成する細胞を取得した。

(2) ナイーブ状態の検証

リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞が、マウス ES 細胞と同様に、bFGF と Activin/Nodal シグナリングの阻害もしくは BMP4 の添加に非感受性であること、また、単細胞に分散した後でも安定的に増殖できるかを評価した。また、未分化マーカーおよび分化マーカーについて、PCR 法、DNA マイクロアレイ、TaqMan Human Stem Cell Pluripotency Array および免疫組織化学法などにより、その発現を観察した。さらに、ナイーブ型ヒト iPS 細胞が LIF シグナリング依存性であるかを検証するために、LIF 除去により Stat3 のリン酸化を阻害し、細胞の未分化維持状態を評価した。また、X 染色体の活性化状態も FISH 法により確認した。

4. 研究成果

(1) プライム型ヒト iPS 細胞をナイーブ状態へと初期化させる誘導法の検証

リプログラミング因子非依存性プライム型ヒト iPS 細胞をナイーブ状態へ誘導するために、ヒト iPS 細胞に PD/CH/LIF、および、PD/CH/LIF にさらにフォルスコリン、p53 阻害剤を添加したところ、マウス ES 細胞様の形態を示すコロニーの出現は認められたが、単離後維持できないことが判明した。次に、リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞を樹立するために、ドキシサイクリンによってリプログラミング因子が恒常的に発現する細胞の樹立を試みた。OCT4, SOX2, KLF4, L-MYC, NANOG を強制的に発現させた細胞を、PD/CH/LIF 存在下で培養したところ、ナイーブ状態のマウス ES 細胞様の形態を示すコロニーが出現し、このナイーブ型ヒト幹細胞は、少なくとも 50 継代以上にわたって PD/CH/LIF 存在下で維持できることを確認し

た(図1)。以上の結果は、PD/CH/LIFを含む培養環境下でナイーブ化を実現するには、少なくともリプログラミング因子の強制的な発現が要求されることを示唆している。次に、このリプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞の性質を解析する目的で、その未分化性および分化能の検証を行った。まず、リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞が未分化マーカーを発現しているかを解析した。その結果、未分化時に特異的に発現する遺伝子(Oct3/4、Sox2、Nanog、Rex1など)を、定量的PCR法により確認した結果、Sox2遺伝子のみが発現していた。上述の未分化マーカータンパク質の発現を、免疫組織化学法により検出した結果、遺伝子発現と同様にSox2の発現が観察された。加えて、SSEA4の発現も陽性であった。また、未分化時に特異的に活性が認められるアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性化状態を、高感度の化学発光基質を用いて解析した結果、リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞はALP陽性細胞であることが観察された。一方で、リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞が多能性幹細胞の特性の一つである「多分化能」を保持しているかについても解析を行ったところ、分化誘導三次元培養法により、胚様体(EB: embryoid body、三胚葉[内胚葉・中胚葉・外胚葉]が誘導された状態)の形成を試みたが、分化誘導用の培地ではEBが形成されないことが判明した。さらに、免疫不全マウスの皮下にリプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞を移植させたところ、テラトーマ形成能(三胚葉系列の細胞への分化能)を保持しないことが確認された。以上の結果より、リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞は、多能性幹細胞としての特性を一部失っており、ナイーブ状態よりも下位に位置する幹細胞であることが示唆された。

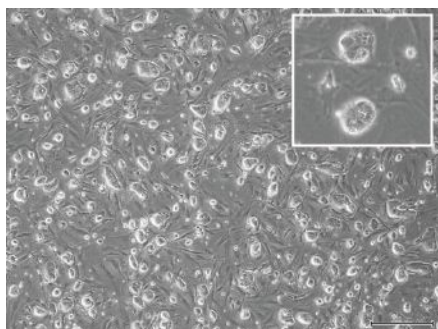


図1. リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞のコロニー形態

(2) リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞における性質の解析

リプログラミング因子依存性ナイーブ型ヒト幹細胞において、ナイーブ状態よりも下位に位置する幹細胞(非ナイーブ様幹細胞)の初期化機構を解明する目的で、非ナイーブ様幹細胞におけるトランスクリプトーム解

析およびメチル解析を以下の通り実施した。まず、遺伝子発現パターンの評価においては、非ナイーブ様幹細胞、プライム型ヒトiPS細胞および神経幹細胞における遺伝子発現パターンを、DNAマイクロアレイやTaqMan Human Stem Cell Pluripotency Arrayにより網羅的に解析し、遺伝子発現レベルから見たこれら細胞株間の類似性または相違性を評価した。クラスタリング解析の結果、非ナイーブ様幹細胞と神経幹細胞の遺伝子発現パターンが類似していることが明らかとなった。次に、エピジェネティクス解析においては、非ナイーブ様幹細胞におけるリプログラミング状態を評価するために、非ナイーブ様幹細胞とプライム型ヒトiPS細胞における未分化マーカーのプロモーター領域のDNAメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法により解析し、両細胞株の相違性を評価した。さらに、メチル化状態とDNAマイクロアレイで得られたトランスクリプトーム解析の結果との関連性についても検証した。その結果、NanogおよびRex1遺伝子のプロモーター領域のメチル化パターンは、遺伝子発現パターンと一致して両細胞株において著しく異なっていた。興味深いことに、Oct4の発現は非ナイーブ様幹細胞では発現が認められないにも関わらず、Oct4遺伝子プロモーター領域のメチル化パターンは、非ナイーブ様幹細胞とプライム型ヒトiPS細胞はともに低メチル化状態にあり(図2)、非ナイーブ様幹細胞は部分的にリプログラミングされていることが示唆された。

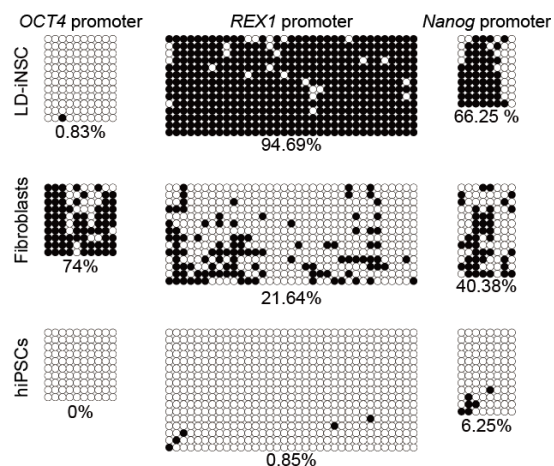


図2. 非ナイーブ様幹細胞の未分化マーカー遺伝子プロモーター領域のメチル化状態

(3) 非ナイーブ様幹細胞は未分化神経幹細胞様の性質を優位に獲得

上述の遺伝子発現及びDNAメチル化解析の結果から、非ナイーブ様幹細胞は発生初期の神経幹細胞様の性質を持つことが判明した。そこで次に、非ナイーブ様幹細胞の神経幹細胞としての機能を解明するために、種々の神経細胞への分化能について以下の通り評価を行った。神経幹細胞は、その未分化性のレ

ベルから順に、LIF-dependent primitive NSC (LIF 依存性未分化神経幹細胞)、FGF2-dependent definitive NSC (FGF2 依存性神経幹細胞)、EGF-dependent definitive NSC (EGF 依存性神経幹細胞)と段階的に発生していくことが知られている。我々によって樹立されたこの非ナープ様幹細胞は、LIF 存在下で高い可塑性と増殖能を維持しており、LIF 依存性未分化神経幹細胞に極めて近い性質を保持していると推察された。また、非ナープ様幹細胞はドーパミン産生神経細胞および運動神経細胞などのニューロンへ高効率で分化することが確認でき、ES 細胞から分化誘導させた FGF2 依存性神経幹細胞よりも高い分化能を持つことが示された(図3)。加えて、非ナープ様幹細胞はグリア細胞(アストロサイト、オリゴデンドロサイト)への分化能を持つことも観察された。また、非ナープ様ヒト幹細胞は単細胞からも高い増殖能を維持して増やすことが確認できたことから、効率的な遺伝子編集が可能であることが判明した。これらの成果は、非ナープ様幹細胞を用いることにより神経疾患モデル細胞を人工的に作製できることにも繋がり、神経疾患における病態解明や創薬研究にも多大に貢献できると考えられた。

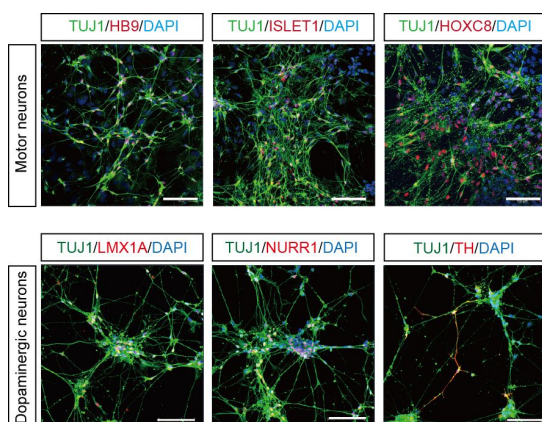


図3. 非ナープ様ヒト幹細胞のドーパミン産生神経細胞および運動神経細胞への分化誘導

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Machida M, Tamoto R, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H. Generation of primitive neural stem cells from human fibroblasts using a defined set of factors. *Biol Open*, 4, 1595-1607, 2015.

[学会発表](計1件)

Miura T, Sugawara T, Fukuda A, Machida M, Tamoto R, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H. Generation of committed neural progenitors from human fibroblasts by defined factors. 第12

回 国際幹細胞学会(バンクーバー),
2014年6月18日-21日(ポスター発表)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称:iPS前駆細胞及びiPS細胞

発明者:三浦巧、梅澤明弘、阿久津英憲

権利者:(財)ヒューマンサイエンス振興財団

種類:特許

番号:特願2013-082731号

出願年月日:2013年4月11日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 巧 (MIURA TAKUMI)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・室長

研究者番号:60405355

(2)連携研究者

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)

国立成育医療研究センター研究所・生殖医療研究部・部長

研究者番号:50347225

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)

国立成育医療研究センター研究所・再生医療センター・再生医療センター長

研究者番号:70213486

(3)研究協力者

菅原 亨 (SUGAWARA TOHRU)

福田 篤 (FUKUDA ATSUSHI)