

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462477

研究課題名(和文) 着床前期胚特異的遺伝子を用いたiPS細胞のpotencyと安全性に関する検討

研究課題名(英文) potency and safety of iPS cells using preimplantation embryo specific genes

研究代表者

平田 哲也 (HIRATA, TETSUYA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30431860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：c-Mycのような癌遺伝子ではなく、着床前期胚に発現している新規のiPS誘導因子が安全性に重要なことである。Zscan4は胚性遺伝子が活性化される2細胞期に特異的な遺伝子の一つである。私達は、このZscan4を用いることで、マウスiPS細胞の作製効率が、短期間で大幅に改善することを示した。今回は、このZscan4を用いて作製したiPS細胞を用い、臨床応用が可能な安定的でhigh-qualityのiPS細胞を得るべく研究を行った。Zscan4ERT2をES細胞に導入することで、内因性のZscan4陽性となる頻度が上がり、幹細胞のゲノムの安定性やpotencyの維持に効いていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is not an oncogene like c-Myc but a new iPS inducer expressed in preimplantation embryo is important for safety. Zscan4 is one of the genes specific to the 2 cell stage in which embryonic genes are activated. We showed that by using this Zscan 4, the production efficiency of murine iPS cells greatly improves in a short period of time. In this study, we conducted research to obtain stable, high-quality iPS cells that can be clinically applied using iPS cells prepared with this Zscan4. Introduction of Zscan4ERT2 into ES cells increased the frequency of endogenous Zscan4 positivity and suggested that it is effective in maintaining the genome stability and potency of stem cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：iPS 着床前期胚 potency

### 1. 研究開始当初の背景

結婚年齢の高齢化、少子化に伴い、不妊治療の重要性は社会的にも益々増大しているが、補助生殖医療を用いても妊娠率は30%程度に留まっている。この状況にブレークスルーをもたらすには、初期胚発生における初期化の理解が必須である。初期化の理解は、近年、発生工学の進歩と相まって大きく進歩している。すなわち、着床前期胚の潜在能力を利用して核移植により初期化の技術が発展してきた。体細胞の核を除核した卵子に移植を行うことにより、卵細胞、受精卵、2細胞期胚に存在する何らかの機構により、数日という短期間で多能性への初期化が可能である (Egli et al. Nature commun.2:488)。さらに、新しい初期化の技術として、2006年に山中らが、Myc、Klf4、Oct4、Sox2というES細胞に特異的に発現する4つの転写因子を用いることにより、体細胞が多能性幹細胞に誘導されるという衝撃的な事実を報告した (Takahashi et al. Cell 2006 126(4) 663-76)。このiPS細胞の発明は、少なくとも遺伝子発現制御のみで初期化を可能にしたという点で、非常に大きい功績である。ただ、iPSにおいては、初期化に**数週間**を要する。核移植が**数日**で初期化を達成することと比較すると、核移植とiPSの初期化は異なることが推察される (Hanna et al. Cell 143(4), 508-525)。また、核移植ES細胞と胚盤胞由来のES細胞(通常のES細胞)のDNAメチル化パターンは類似しているが、iPSはこれらのES細胞と異なる (Kim et al. Nature 467(7313)285-290)。さらに、iPSの作製過程においてDNAの変異が見られることも分かった (Gore et al. Nature 471, 63-67)。これらの事実は、iPSがqualityの面で未だES細胞に及ぶものではなく、iPSの臨床応用が困難であると想起させる。一方で、核移植においてはこれらのことが問題にならない。したがって、核移植の過程で存在するが、iPSの作製過程で存在しない因子がある可能性がある (Hanna et al. Cell 143(4) 508-525)。以上とは別の問題として、従来のiPSは、導入したc-Mycによる影響と思われる腫瘍形成の危険性を持つ。しかしながら、c-MycなしではiPSの作製効率は非常に低下する。そこで、c-Mycのような癌遺伝子ではなく、着床前期胚、卵細胞に発現しているような新規のiPS誘導因子、つまりは核移植の過程を模倣できるような因子の発見がiPSの安全性と臨床応用を見据えたうえで非常に重要なことである。

### 2. 研究の目的

Zscan4は胚性遺伝子が活性化される2細胞期に特異的な遺伝子 (Zygotic genome)

(activation gene)の一つであり、ES細胞においては、テロメアの伸長、ゲノムの安定に働き、ES細胞の不死性を担保する重要な遺伝子である。さらに私達は、このZscan4を用いることで、マウスiPS細胞の作製効率が、短期間の刺激で、大幅に改善することを示しており、さらに作製初期に着床前期胚に特異的な遺伝子プログラムを活性化していることを示した。さらに我々は、最近の内因性のZscan4発現を上げることで、最も厳しいといわれる4倍体胚補完法 (tetraploid complementation assay)において、ES細胞由来の胎児獲得率を上昇させ、ES細胞のpotencyを上げると報告した。今回は、このZscan4を用いて作製したiPS細胞と、従来のiPS細胞のqualityとpotencyの比較を行い、臨床応用が可能な安定的でhigh-qualityのiPS細胞を得るべく研究を行う。

### 3. 研究の方法

Mouse embryo fibroblast (MEF)を用い、piggybacベクターでZscan4+Klf4、Oct4、Sox2を導入し、iPS細胞を作成した。これらのiPS細胞の分化能、多能性について検討した。

ES細胞 (MC1) にZscan4ERT2を導入し、ES細胞のpotencyの維持に関して検討した。

### 4. 研究成果

Zscan4を用いたiPS細胞は、胚胞体を形成し、多分可能を持つことが免疫染色などで示された。また、このiPS細胞の作製効率も高確率であった。また、reprogramming早期にこれまでと同様に、Pat12などの着床前期胚特定な遺伝子が上昇することが分かった。

また、ES細胞 (MC1, pZscan4-Emerald) にZscan4ERT2を導入したところ、Emerald+細胞が3倍に増えたことから、内因性のZscan4陽性細胞の効率が上がったことが示された。Zscan4は、核型の維持や、キメラマウス作成時の寄与率を高めることなどから、potencyの維持を促すことがわかっている。Zscan4ERT2を幹細胞に導入することで、内因性のZscan4陽性となる頻度が上がり、幹細胞のゲノムの安定性やpotencyの維持、改善に効いている可能性があることが示唆された。

### 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26件)

- Oil-Soluble Contrast Medium (OSCM) for Hysterosalpingography Modulates Dendritic Cell and Regulatory T Cell Profiles in the Peritoneal Cavity: A Possible Mechanism by Which OSCM

- Enhances Fertility. Izumi G, Koga K, Takamura M, Bo W, Nagai M, Miyashita M, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Yoshino O, Fujii T, Osuga Y. *J Immunol*. 2017 Jun 1;198(11):4277-4284.
2. Preoperative assessment of factors associated with difficulty in performing total laparoscopic hysterectomy. Saito A, [Hirata T](#), Koga K, Takamura M, Fukuda S, Neriishi K, Pastorfide G, Harada M, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017 Feb;43(2):320-329.
  3. Drospirenone reduces inflammatory cytokines, vascular endothelial growth factor (VEGF) and nerve growth factor (NGF) expression in human endometriotic stromal cells. Makabe T, Koga K, Miyashita M, Takeuchi A, Sue F, Taguchi A, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *J Reprod Immunol*. 2017 Feb;119:44-48.
  4. A Potential Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Progesterone Deficiency in Obese Women. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Azhary JM, Yoshino O, Izumi G, [Hirata T](#), Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *Endocrinology*. 2017 Jan 1;158(1):84-97.
  5. Dienogest reduces proliferation, NGF expression and nerve fiber density in human adenomyosis. Takeuchi A, Koga K, Miyashita M, Makabe T, Sue F, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016 Dec;207:157-161.
  6. Assisted reproductive technology pregnancy complications are significantly associated with endometriosis severity before conception: a retrospective cohort study. Fujii T, Wada-Hiraike O, Nagamatsu T, Harada M, [Hirata T](#), Koga K, Fujii T, Osuga Y. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016 Nov 3;14(1):73.
  7. Mannose receptor is highly expressed by peritoneal dendritic cells in endometriosis. Izumi G, Koga K, Takamura M, Makabe T, Nagai M, Urata Y, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. *Fertil Steril*. 2017 Jan;107(1):167-173.e2.
  8. Development of ovarian cancer after excision of endometrioma. Haraguchi H, Koga K, Takamura M, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Urata Y, Izumi G, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Wada-Hiraike O, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. *Fertil Steril*. 2016 Nov;106(6):1432-1437.e2
  9. Neutrophil depletion reduces endometriotic lesion formation in mice. Takamura M, Koga K, Izumi G, Urata Y, Nagai M, Hasegawa A, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *Am J Reprod Immunol*. 2016 Sep;76(3):193-8.
  10. Effects of 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 on Endometriosis. Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Jun;101(6):2371-9.
  11. A potential role of endoplasmic reticulum stress in development of ovarian hyperstimulation syndrome. Takahashi N, Harada M, Hirota Y, Zhao L, Yoshino O, Urata Y, Izumi G, Takamura M, [Hirata T](#), Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Jun 15;428:161-9.

12. Resveratrol Enhances Apoptosis in Endometriotic Stromal Cells. Taguchi A, Koga K, Kawana K, Makabe T, Sue F, Miyashita M, Yoshida M, Urata Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *Am J Reprod Immunol*. 2016 Apr;75(4):486-92.
13. Vaginal Stenosis After Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Therapy During Treatment for Acute Lymphoblastic Leukemia. Sato M, Harada M, Oishi H, Wada-Hiraike O, [Hirata T](#), Nagasaka K, Koga K, Fujii T, Osuga Y. *J Low Genit Tract Dis*. 2016 Apr;20(2):e11-3.
14. Elective single-embryo transfer improves cumulative pregnancy outcome in young patients but not in women of advanced reproductive age. Fujimoto A, Morishima K, Harada M, [Hirata T](#), Osuga Y, Fujii T. *J Assist Reprod Genet*. 2015 Dec;32(12):1773-9.
15. Simultaneous Detection and Evaluation of Four Subsets of CD4+ T Lymphocyte in Lesions and Peripheral Blood in Endometriosis. Takamura M, Koga K, Izumi G, [Hirata T](#), Harada M, Hirota Y, Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *Am J Reprod Immunol*. 2015 Dec;74(6):480-6.
16. Evidence of the activation of unfolded protein response in granulosa and cumulus cells during follicular growth and maturation. Harada M, Nose E, Takahashi N, Hirota Y, [Hirata T](#), Yoshino O, Koga K, Fujii T, Osuga Y. *Gynecol Endocrinol*. 2015 Oct;31(10):783-7.
17. Four Cases of Postoperative Pneumothorax Among 2814 Consecutive Laparoscopic Gynecologic Surgeries: A Possible Correlation Between Postoperative Pneumothorax and Endometriosis. [Hirata T](#), Nakazawa A, Fukuda S, Hirota Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. *J Minim Invasive Gynecol*. 2015 Sep-Oct;22(6):980-4.
18. Drospirenone induces decidualization in human eutopic endometrial stromal cells and reduces DNA synthesis of human endometriotic stromal cells. Miyashita M, Koga K, Izumi G, Makabe T, Hasegawa A, Hirota Y, [Hirata T](#), Harada M, Fujii T, Osuga Y. *Fertil Steril*. 2015 Jul;104(1):217-24.e2.
19. Laparoscopic excision of ovarian endometrioma does not exert a qualitative effect on ovarian function: insights from in vitro fertilization and single embryo transfer cycles. Harada M, Takahashi N, [Hirata T](#), Koga K, Fujii T, Osuga Y. *J Assist Reprod Genet*. 2015 May;32(5):685-9.
20. Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines, matrix metalloproteinases, and activin in human endometrial stromal cells. Izumi G, Koga K, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, [Hirata T](#), Hirota Y, Ogawa K, Inoue S, Fujii T, Osuga Y. *Am J Reprod Immunol*. 2015 Jun;73(6):501-6.
21. The outcome of infertility treatment in patients undergoing assisted reproductive technology after conservative therapy for endometrial cancer. Fujimoto A, Ichinose M, Harada M, [Hirata T](#), Osuga Y, Fujii T. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Sep;31(9):1189-94.
22. IL-1 $\beta$  increases expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and stimulates tryptophan catabolism in endometrioma stromal cells. Urata Y, Koga K, Hirota Y, Akiyama I, Izumi G, Takamura M, Nagai M,

- Harada M, Hirata T, Yoshino O, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. Am J Reprod Immunol. 2014 Nov;72(5):496-503.
23. Efficacy of dienogest in the treatment of symptomatic adenomyosis: a pilot study. Hirata T, Izumi G, Takamura M, Saito A, Nakazawa A, Harada M, Hirota Y, Koga K, Fujii T, Osuga Y. Gynecol Endocrinol. 2014 Oct;30(10):726-9.
24. Dienogest reduces proliferation, aromatase expression and angiogenesis, and increases apoptosis in human endometriosis. Miyashita M, Koga K, Takamura M, Izumi G, Nagai M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Fujii T, Osuga Y. Gynecol Endocrinol. 2014 Sep;30(9):644-8.
25. Concomitant ovarian drilling and oocyte retrieval by laparoendoscopic single-site surgery led to live birth using in vitro maturation of oocyte and transfer of frozen-thawed blastocyst in woman with polycystic ovary syndrome. Hirata T, Fujimoto A, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. J Obstet Gynaecol Res. 2014 May;40(5):1431-5.
26. The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S. Reprod Sci. 2014 Jun;21(6):772-7.

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者 平田 哲也  
(HIRATA, Tetsuya)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30431860