

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02651

研究課題名（和文）クロマチンリモデリング因子による高品質iPS細胞の作製方法の確立

研究課題名（英文）The development of high quality iPS cells by chromatin remodeling factors.

研究代表者

福田 恵一（Fukuda, Keiichi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：20199227

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 36,400,000円

研究成果の概要（和文）：人工多能性幹細胞（iPS細胞）の質に関しては、染色体の安定性、遺伝子変異の有無、分化多能性に関して議論がなされてきた。またマウスES細胞並みの高品質ヒトiPS細胞として、naive iPS細胞に関する研究もなされてきた。本研究においては、再生医療の実現を念頭に置き、通常の体細胞からiPS細胞を作製する方法に導入する遺伝子を追加することにより、iPS細胞の品質向上を行ってきた。マウス体細胞においてレトロウイルスベクターを用いてiPS細胞樹立時にOct4、Sox2、Klf4と共にH1fooを強制発現させてiPS細胞を樹立し、同iPS細胞の高品質の確認を行ってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞は分化細胞に転写因子を導入することにより樹立され、再生医療などが期待されている。しかし現状ではマウス、ヒトともに樹立されたiPS細胞の分化能などの幹細胞の性質・品質は不均一であり、臨床応用する際に重大な問題点となっている。本研究では、クロマチンリモデリング因子として知られているリンカーヒストンH1fooをコードしている遺伝子であるH1fooを、上記転写因子とともにマウスおよびヒト分化細胞に導入することで、より質の高いiPS細胞を安定的に効率良く作製する方法を確立する。高品質iPS細胞においては、安定的に高効率の心筋細胞分化が実現され、再生医療の発展に貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：In terms of the quality of iPS cells (induced pluripotent stem cells), there have been discussions regarding the chromosomal stability, inserted gene mutations, and pluripotency. In addition, research has been conducted on naive iPS cells as high-quality human iPS cells similar to mouse ES cells. In this study, for the realization of regenerative medicine, we have improved the quality of iPS cells by adding genes to the method for producing iPS cells from somatic cells. In mouse somatic cells, H1foo was introduced together with Oct4, Sox2, and Klf4 for the establishment of high quality iPS cells using a retrovirus vector, and the high quality of the iPS cells was confirmed.

研究分野：循環器

キーワード：iPS細胞 品質 クロマチンリモデリング因子

## 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) は、開発されて 10 年以上経過しているが社会的重要性はますます増しており、既に再生医療、病態解明研究や創薬など、様々な分野で用いられている。しかしながら、iPS 細胞そのものも未だ完全な細胞ではなく改善の余地が残されている。特に iPS 細胞に関する最も重要なこととして、培養皿上で体細胞から簡単に樹立することが可能であり、無限に増殖が可能であり、分化多能性が恒久的に維持され、いつでも再生医療などに用いることが可能であると一般的に思われているが、その点においても問題はあつる。すなわち iPS 細胞が樹立されたり、維持培養されている間にも様々な不均一性が生じている。iPS 細胞の質に関しては、染色体の安定性、遺伝子変異の有無、分化多能性などに関して多くの議論がなされてきた。またマウス ES 細胞並みの高品質ヒト iPS 細胞として、naïve iPS 細胞に関する研究もなされてきたが、一般的に樹立したり用いたりできるヒト型 naïve iPS 細胞は開発されていない。

## 2. 研究の目的

本研究においては、再生医療の実現を念頭に置き、通常の体細胞から iPS 細胞を作製する方法に導入する遺伝子を追加することにより、iPS 細胞の品質向上を行う。マウス体細胞においてレトロウイルスベクターを用いて iPS 細胞樹立時に Oct4、Sox2、Klf4 と共に H1foo を強制発現させて iPS 細胞を樹立し、同 iPS 細胞の高品質の確認を行う。iPS 細胞は分化細胞に 3 つまたは 4 つの転写因子 (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入することにより樹立され、現在 iPS 細胞を用いた再生医療などが期待されている。しかしながら現状ではマウス、ヒトともに樹立された iPS 細胞の分化能力などの幹細胞の性質・品質は不均一であり、iPS 細胞を臨床応用する際に重大な問題点となっている。本研究では卵母細胞特異的に発現し、クロマチンリモデリング因子として知られているリンカーヒストン H1foo をコードしている遺伝子である H1foo を、上記転写因子とともにマウスおよびヒト分化細胞に導入することで、より質の高い iPS 細胞を安定的に効率良く作製する方法を確立する。高品質 iPS 細胞においては、安定的に高効率の心筋細胞分化が実現され、再生医療の発展に貢献することができる。

## 3. 研究の方法

マウス細胞においてレトロウイルスベクターを用いて iPS 細胞樹立時に Oct4、Sox2、Klf4 (以下 OSK と記載) と共に H1foo を強制発現させて iPS 細胞を樹立する。H1foo をマウス成体尾部線維芽細胞で強制発現させ、ES 細胞様 iPS コロニーの出現を確認する。iPS 細胞の樹立効率を確認するため、同 iPS 細胞における Nanog 陽性コロニー数も確認し、高品質な iPS 細胞が効率的に作成されていることを確認する。また iPS 細胞の in vitro 多分化能の評価として胚様体形成能の比較検討を行い、胚様体数。デジタル光学顕微鏡による胚様体面積の定量測定とそのバラつきについて比較検討を行う。さらに分子生物学的解析を行い、良質な iPS 細胞が誘導できる詳細な分子機序に関する検討を行う。

## 4. 研究成果

マウス細胞においてレトロウイルスベクターを用いて iPS 細胞樹立時に Oct4, Sox2, Klf4 と共に H1foo を強制発現させて iPS 細胞を樹立した .H1foo をマウス成体尾部線維芽細胞で強制発現させたところ、ES 細胞様 iPS コロニーの出現を認めた。iPS 細胞の樹立効率は非常に高く、また同 iPS 細胞における Nanog 陽性コロニー数もおおく、高品質な iPS 細胞が効率的に作成されていることが示唆された。また iPS 細胞の in vitro 多分化能の評価として胚様体形成能の比較検討を行い、胚様体数、デジタル光学顕微鏡による胚様体面積の定量測定とそのバラつきについて比較検討を行った結果、ばらつきが少なく一様な分化傾向を示すことが示された。さらなる分子生物学的解析を行い、詳細な検討を行っている。作成された iPS 細胞をコントロールとともに、網羅的遺伝子解析による検討を行い、bioinformatics 解析を行い、詳細な分子機序を解析した。また同様の方法がヒト iPS 細胞を作製する際にも適応できるかを検討し、今後の再生医療開発へ応用していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitakata H, Kohno T, Kohsaka S, Fujino J, Nakano N, Fukuoka R, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K.	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 Patient confidence regarding secondary lifestyle modification and knowledge of 'heart attack' symptoms following percutaneous revascularisation in Japan: a cross-sectional study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMJ Open.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1136/bmjopen-2017-019119.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shoji S, Kanazawa H, Yanagisawa R, Tanaka M, Fukuoka R, Akita K, Kimura M, Arai T, Kawakami T, Hayashida K, Yuasa S, Tsuruta H, Itabashi Y, Murata M, Nishiyama T, Kohno T, Maekawa Y, Fukuda K.	4. 巻 11(2)
2. 論文標題 Percutaneous Occlusion of Patent Ductus Arteriosus for an Elderly Patient With Refractory Congestive Heart Failure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ Heart Fail.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004764.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inohara T, Numasawa Y, Higashi T, Ueda I, Suzuki M, Hayashida K, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K, Kohsaka S.	4. 巻 194
2. 論文標題 Predictors of high cost after percutaneous coronary intervention: A review from Japanese multicenter registry overviewing the influence of procedural complications.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am Heart J.	6. 最初と最後の頁 61-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.ahj.2017.08.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroda Y, Yuasa S, Watanabe Y, Ito S, Egashira T, Seki T, Hattori T, Ohno S, Kodaira M, Suzuki T, Hashimoto H, Okata S, Tanaka A, Aizawa Y, Murata M, Aiba T, Makita N, Furukawa T, Shimizu W, Kodama I, Ogawa S, Kokubun N, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Flecainide ameliorates arrhythmogenicity through NCX flux in Andersen-Tawil syndrome-iPS cell-derived cardiomyocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 245-256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrep.2017.01.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Y, Kunitomi A, Seki T, Tohyama S, Kusumoto D, Takei M, Kashimura S, Hashimoto H, Yozu G, Motoda C, Shimojima M, Egashira T, Oda M, Fukuda K, Yuasa S.	4. 巻 591(18)
2. 論文標題 Epigenetic barrier against the propagation of fluctuating gene expression in embryonic stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 2879-2889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/1873-3468.12791.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirota Y, Sawano M, Numasawa Y, Ueda I, Noma S, Suzuki M, Hayashida K, Yuasa S, Maekawa Y, Kohsaka S, Fukuda K.	4. 巻 33(2)
2. 論文標題 Characteristics and in-hospital outcomes in young patients presenting with acute coronary syndrome treated by percutaneous coronary intervention.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cardiovasc Interv Ther.	6. 最初と最後の頁 154-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s12928-017-0471-z.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikemura N, Sawano M, Shiraishi Y, Ueda I, Miyata H, Numasawa Y, Noma S, Suzuki M, Momiyama Y, Inohara T, Hayashida K, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K, Kohsaka S.	4. 巻 81(6)
2. 論文標題 Barriers Associated With Door-to-Balloon Delay in Contemporary Japanese Practice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 815-822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1253/circj.CJ-16-0905.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shinsuke Yuasa
2. 発表標題 Arrhythmic disease modeling using iPS cells
3. 学会等名 The 1st JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯浅慎介
2. 発表標題 iPS細胞を用いた心不全の診断
3. 学会等名 日本心不全学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinsuke Yuasa
2. 発表標題 Cardiac Arrhythmia Modeling by Induced Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 The 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session In Conjunction with the Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinsuke Yuasa
2. 発表標題 Disease modeling by iPS cells
3. 学会等名 The 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session In Conjunction with the Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湯浅慎介
2. 発表標題 iPS細胞を用いた循環器疾患の病態解明
3. 学会等名 日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湯浅慎介
2. 発表標題 iPS細胞を用いた心筋症の病態解明
3. 学会等名 第3回 日本心筋症研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	湯浅 慎介  (YUASA Shinsuke)  (90398628)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師   (32612)	
研究分担者	國富 晃  (KUNITOMI Akira)  (30570882)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教   (32612)	