

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06746

研究課題名(和文) 独自開発麻疹ウイルスベクターを用いて樹立したナীব型iPS細胞の分化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of human naive and primed induced pluripotent stem cells directly reprogrammed with measles virus vectors

研究代表者

廖 紀元 (Liao, Jiyuan)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90781857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は安全性に優れた遺伝子非挿入型麻疹ウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立法を独自に開発してきたが、得られるiPSコロニーにはnaive様のdome状とprimed様の平坦なiPSコロニーの両方が存在していた。本研究では両タイプのiPS細胞を比較し、タイプ間の移行過程における分子機構、特にDNAメチル化について詳細な解析を行った。その結果naive様iPS細胞ではエピブラスト幹細胞特異的関連因子群の発現量が増加しており、CpGメチル化の低下も認められた。本研究において明らかにされたiPS細胞のタイプ間の移行に重要な遺伝子発現の調節機構は再生医療開発において極めて重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A novel non-integrating measles virus vectors (MVV) have been developed in our laboratory to safely generated iPSCs. Two kinds of different iPSC colonies, which are naive-like iPSCs with dome shape morphology and conventional primed-like iPSCs with flat shape morphology, were directly generated via somatic cell reprogramming using our MVV system. In this study, we performed comparative analysis for molecular mechanisms including DNA methylation analysis in the conversion processes between the two types of iPSCs. The results showed that naive-iPSCs represented increased expression of early epiblast stem cell-related factors. Furthermore, the naive-like iPSCs showed low level of CpG methylation compared with primed-like iPSCs. In this study, we revealed regulation mechanisms of gene expression in conversion of the two types of iPSCs, and these findings were considered to be very important for the development of regenerative medicine.

研究分野：再生医学

キーワード：naive iPS細胞 麻疹ウイルスベクタ 幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

マウス ES/iPS 細胞が着床前の細胞に由来する性質 (naive) を保持しているのに対しヒト ES/iPS 細胞は着床後の細胞に由来する性質 (primed) を示すという概念が広く認識されるようになってきた (Hanna J et al., PNAS, 2010; Gafni O et al., Nature, 2013; Takashima Y et al., Cell, 2014 など)。マウス naive 型細胞は高い分化能・増殖能を示すため、ヒト細胞においても naive 型 ES/iPS 細胞に誘導すれば、従来型よりも優れた分化能・増殖能をもつ細胞を得られることが期待されている。また、従来型ヒト ES/iPS 細胞が着床後のマウスエピブラストより樹立されるマウスエピブラスト幹細胞 (Brons IG et al., Nature, 2007; Tesar PJ et al., Nature, 2007) に近い性質を示すため、ヒト ES/iPS 細胞は primed 型であると考えられている。マウス naive 型細胞において最も信頼性が高い分化能の評価系はキメラ形成・ジャームライントランスミッションであるが、ヒト naive iPS 細胞については倫理的な問題があるため、イスラエルのグループがマウス胚へ移植した一報があるのみである (Gafni O et al., Nature, 2013)。また、naive 型 iPS 細胞の誘導分子機構の理解が不足していることも、ヒト naive 型 iPS 細胞の研究推進における障害となっている。

### 2. 研究の目的

当研究室では、安全性に優れた遺伝子非挿入型麻疹ウイルスベクター (MVV) を用いた iPS 細胞樹立法を独自に開発した (特許申請済み、論文投稿中)。MVV は、パラミクソウイルス属に属するマイナス一本鎖 RNA ゲノムを持つ麻疹ウイルス (MV) を元に開発されたベクターで、一過性に複数のトランスジーンの発現を誘導することが可能で、ゲノムへの遺伝子挿入を起こさない。これまでに、リプログラミング遺伝子を搭載した MVV により、naive 様 iPS 細胞 (MV 陽性、GFP 強陽性およびドーム型形態) が誘導され、この naive 様 iPS 細胞を継代培養することによって primed 様 iPS 細胞株 (MV 陰性、GFP 陰性および扁平型形態) が誘導されることが分かっていた。本研究では、MVV を用いて樹立した naive 様と primed 様 iPS 細胞株を比較して naive 型 iPS 細胞誘導の分子メカニズムを明らかにする。さらに、樹立したヒト naive 様 iPS 細胞の分化能および安定性等を解析することにより、再生医療研究・創薬研究等での使用における適性を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Naive 様 iPS 細胞と primed 様 iPS 細胞の維持及び品質評価

MVV を用いて樹立した Naive 様 iPS 細胞の未分化維持培地について、従来のヒト ES 細胞基礎培地に CHIR99021 (GSK3 阻害剤)、PD0325901 (MEK 阻害剤)、LIF ('2i+LIF') を添加したナイーブ培地を使用した。一方、primed 型への変換については樹立した naive

様 iPS 細胞を低分子阻害剤非存在下で bFGF を加えた培地で培養することにより、primed 型 iPS 細胞を誘導した。フローサイトメトリーにより、両 iPS 細胞の未分化マーカー (Tra-1-60, Tra1-81, SSEA4) を継時的に測定した。また、naive iPS 細胞の発現マーカーである SOCS3, TBX3, KLF5, XIST 等の発現レベルを qPCR で調べた。

(2) in vitro 分化誘導による両細胞株多能性の比較評価

三胚葉の分化能の評価のため、iPS 細胞から細胞非接着性培養皿を用いて胚葉体 (Embryoid body) を形成した。14 日後、collagenase B を用いて胚葉体の細胞を単離し、解析を行った。まず、中胚葉マーカーの発現率をフローサイトメトリーで調べた。次に、外胚葉、中胚葉と内胚葉の分化能について調べるため、胚葉体由来の単離細胞をゼラチンコーティングディッシュの上に播き、翌々日にこの分化誘導過程未分化マーカー (SSEA4) 及び分化マーカー (PAX6, NESTIN, TUJ1, Brachyury, VEGF2, CK8, SOX17) の発現を免疫染色法で確認した。

(3) MV ベクターの高発現に伴う naive 様 iPS 細胞の分子機構の解析

従来の方法では、naive 様 iPS 細胞を樹立するために、細胞外マトリックス、増殖因子、化合物等の様々な組み合わせたナイーブ培地を用いて誘導および維持することが必要である。我々は、MVV を用いて naive 様 iPS 細胞を直接誘導することに成功したが、この naive 様 iPS 細胞は外来因子による影響がほとんどないため、ヒト iPS 細胞のナイーブ化における分子制御機構を正確に解析できると考えられた。Naive 様 iPS 細胞から primed 様 iPS 細胞に転換する際に関与する遺伝子発現調節機構を解析するため、両 iPS 細胞のマイクロアレイ及び全ゲノムバイサルファイトシーケンシングにより naive 状態維持に重要な遺伝子の発現と CpG 領域の DNA メチル化について比較検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) Naive 様 iPS 細胞及び primed 様 iPS 細胞の品質評価

まず、作製された iPS 細胞の多能性と自己複製能について検討したところ、SSEA4 の発現は両 iPS 細胞で同様であったが、TRA1-60 及び TRA1-81 多能性表面マーカーの発現には差が認められた。次に、マイクロアレイ解析より、ヒト naive および primed 様 iPS 細胞間で遺伝子発現パターンが異なることを明らかにした。既知の naive 様 iPS 細胞高発現遺伝子 TBX3, SOCS3, KLF5 などが、MVV で作製した naive 様 iPS 細胞でも発現量が高いことが示唆された。また、定量的 RT-PCR により、同様の結果が確認された。

(2) in vitro 分化誘導による両細胞株多能性の比較

両 iPS 細胞の三胚葉分化能を in vitro で検討したところ、外胚葉マーカー (PAX6,

NESTIN, TUJ1)、中胚葉マーカー(Brachyury, VEGF2)および内胚葉マーカー(CK8, SOX17)の発現が確認され、両 iPS 細胞株の三胚葉分化能が確認できた。研究当初は naive 様 iPS 細胞が高い多分化能を持つと仮説のもとに分化効率高いことを期待していたが、naive 様 iPS 細胞はリプログラミング遺伝子発現の遷延によって、中胚葉のマーカーの一つである CD71 陽性細胞の割合の低下傾向が FACS で確認された。また、分化させた細胞中の一部の細胞では未分化マーカー-SSEA4 の発現が続くことが確認された。以上の結果より、将来の臨床応用を考慮する際、リプログラミング遺伝子の発現をストップさせ、より安全な iPS 細胞株を樹立することが必要性であると考えられた。

(3) Naive 様 iPS 細胞の分子機構の解析  
全ゲノムバイサルファイトシークエンシング法により、naive 様 iPS 細胞株とこの細胞から誘導した primed 様 iPS 細胞株の CpG アイランドメチル化を比較した。過去の報告と同様に、両 iPS 細胞株では、CpG アイランドのメチル化率が異なることが明らかとなった。MVV から直接誘導した naive 様 iPS 細胞株は、既知の化合物誘導法で得られた naive 様 iPS 細胞株とメチル化パターンが異なっており、新規の naive 化制御因子を同定できたと考えられる。

本研究の結果をさらに解析することにより、MVV によるリプログラミングの分子機構だけではなく、naive から primed 様 iPS 細胞に変遷する過程における制御メカニズムを明らかにすることが期待される。

#### 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 1 件)

1. Xiong P, Shiratsuchi M, Matsushima T, Liao J, Tanaka E, Nakashima Y, Takayanagi R, Ogawa Y, Regulation of expression and trafficking of perforin-2 by LPS and TNF- $\alpha$ . Cell Immunol. 査読有, 2017 Oct;320:1-10. doi:10.1016/j.cellimm.2017.07.001.

[学会発表] (計 5 件)

1. Jiyuan Liao, Hiroshi Kohara, Takafumi Hiramoto, Maino Tahara, Yoshie Ogawa, Nobuaki Karasawa, Chika Sakamoto, Makoto Takeda, Kenzaburo Tani, Successful Reprogramming of Human Hematopoietic Subsets with Non-integrating RNA Measles Virus Vectors, 第8回 JSH 国際シンポジウム(宮崎)(国際学会), 2017年宮崎

2. Jiyuan Liao, Hiroshi Kohara, Takafumi Hiramoto, Maino Tahara, Yoshie Ogawa, Nobuaki Karasawa, Chika Sakamoto, Yuto Takashima, Shohei Miyamoto, Makoto Takeda, Kenzaburo Tani, The utility of a recombinant measles virus in

reprogramming with multiple human hematopoietic cells, 第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 2017年, 岡山

3. 廖紀元, 小原 洋志, 平本 貴史, 田原 舞, 小川 由恵, 唐澤 伸明, 坂本 千香, 滝島 佑人, 宮本 将平, 竹田 誠, 谷 憲三朗, Reprogramming efficiency of human hematopoietic subsets by measles virus vectors, 第17回日本再生医療学会, 横浜

4. Jiyuan Liao, Hiroshi Kohara, Takafumi Hiramoto, Maino Tahara, Yoshie Ogawa, Nobuaki Karasawa, Chika Sakamoto, Yuto Takishima, Shohei Miyamoto, Makoto Takeda, Kenzaburo Tani, Evaluation of measles virus vectors for reprogramming target human hematopoietic subsets, 第79回日本血液学会学術集会, 2017, 東京

5. Jiyuan Liao, Hiroshi Kohara, Takafumi Hiramoto, Maino Tahara, Ai Sugawara, Yoshie Miura, Lisa Hirose, Yuto Takashima, Shohei Miyamoto, Makoto Takeda, Kenzaburo Tani, Evaluation of Non-Integrating RNA Measles Virus Vectors for Reprogramming of Human Hematopoietic Subsets, 21st Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy, May 16-19, 2018, Chicago, IL, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

廖 紀元 (LIAO, JIYUAN)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：90781857

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )