

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21590089

研究課題名（和文） 内胚葉特異的遺伝子の発現調節に関わる新規遺伝子の単離

研究課題名（英文） Identification of a gene that can control expression of endoderm-specific genes

研究代表者 川端健二 (KENJI KAWABATA)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：50356234

研究成果の概要（和文）：ヒト iPS 細胞の内胚葉分化誘導系を用いて内胚葉分化に関与する新規遺伝子の単離を試みた。その結果、Runx1 遺伝子の発現が中内胚葉から内胚葉への分化過程で消失し、内胚葉特異的遺伝子である Foxa2 および Sox17 の転写調節領域（プロモーター領域）に実際に結合し、その転写を負に制御していることが示された。同時に、Runx1 遺伝子の転写能を阻害することにより、Foxa2、Sox17、GATA4 等の内胚葉関連遺伝子の転写が活性化された。したがって、Runx1 は中胚葉形成に重要であることは既に知られているが、本研究により内胚葉への分化も積極的に抑制していることも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We explored a novel gene that is involved in endodermal differentiation by using a human iPS cell-differentiation system. We found that expression of Runx1 gene was disappeared when cells were differentiated from the mesendoderm stage to definitive endoderm stage. Also, Runx1 could negatively regulate the expression of endoderm-specific genes, such as Foxa2 and Sox17, by directly binding the regulatory regions of their genes. In contrast, when the function of Runx1 was inhibited by its dominant-negative mutant, expression levels of Foxa2, Sox17, GATA4 genes were increased. Therefore, Runx1 is important for not only mesoderm differentiation but also endoderm differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22年度	1,400,000	420,000	1,820,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の発生では受精卵から三胚葉（中胚葉・外胚葉・内胚葉）に分化した後、特定の組織や臓器が形成されていく。これらの発生は様々な遺伝子が発現上昇あるいは発現抑

制しながら進行していくと考えられているが、その分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。なかでも、将来に肺・膵臓・肝臓が形成されるもととなる内胚葉の分化については、分化誘導系が長らく確立されな

ったこともあり、分子機構の解明が三胚葉の中で最も遅れている。しかしながら、近年、胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた *in vitro* 内胚葉分化誘導系が報告され、我々の研究室でも、適当な培養条件下においてヒト ES 細胞とほぼ同等の性質を有するヒト iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) から内胚葉マーカーを発現する細胞群へ分化誘導可能であることを見出している。そこで、本研究では、ヒト ES 細胞や近年注目を浴びているヒト iPS 細胞の内胚葉分化系を用いて内胚葉分化に関与する新規遺伝子の単離を試みた。

## 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞の分化誘導系を用いて内胚葉分化に関与する新規遺伝子を単離する。

## 3. 研究の方法

アクチビン A および塩基性線維芽細胞増殖因子を用いてヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞を分化誘導する。本分化誘導系を利用して、発現増加あるいは減少する遺伝子を探索する。さらに、こうして得られた新規遺伝子を過剰発現あるいは阻害することにより、内胚葉分化における役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

Runx1 遺伝子の発現が中内胚葉から内胚葉への分化過程で消失し、内胚葉特異的遺伝子である Foxa2 および Sox17 の転写調節領域 (プロモーター領域) に実際に結合し、その転写を負に制御していることを見出した。同時に、Runx1 遺伝子の転写能を阻害することにより、Foxa2、Sox17、GATA4 等の内胚葉関連遺伝子の転写が活性化された。したがって、Runx1 は中胚葉形成に重要であることは既に知られているが、本研究により内胚葉への分化も積極的に抑制していることも明らかとなった。

## 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 3 件)

1. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 $\alpha$  transduction. *Mol. Ther.*, 20, 127-137 (2012)
2. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Tashiro K., Katayama K.,

Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS One*, 6, e21780 (2011)

3. Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, 19, 400-407 (2011)

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: FOXA2・HNF1 $\alpha$  遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日
- 2) 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江(楠田)美保、川端健二、水口裕之: 3 次元共培養法によるヒト ES・iPS 細胞由来肝細胞の効率的な分化誘導法の開発、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月 28-31 日
- 3) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: EFFICIENT GENERATION OF MATURE HEPATOCYTES FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 $\alpha$  TRANSDUCTION, 第 26 回日本薬物動態学会年会、広島、2011 年 11 月 16-18 日
- 4) 高山和雄、稲村 充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: HNF4 $\alpha$  遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導、第 18 回肝細胞研究会、東京、2011 年 6 月 24-25 日
- 5) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho

- Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: HNF4 $\alpha$  promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts., The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul, Korea, June, 2011
- 6) Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Kazufumi Katayama, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: EFFICIENT GENERATION OF FUNCTIONAL HEPATOCYTES FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 $\alpha$  TRANSDUCTION., International Society for Stem Cell Research, Tronto, June, 2011
- 7) 川端健二、水口裕之、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日
- 8) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、HNF4 $\alpha$  遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日
- 9) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日
- 10) 稲村充、川端健二、高山和雄、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導、第 16 回肝細胞研究会、秋田、2010 年 6 月 18-19 日
- 11) 高山和雄、稲村充、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 16 回肝細胞研究会、秋田、2010 年 6 月 18-19

日

〔図書〕 (計 3 件)

- 1) Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. Methods Mol Biol., 826:115-124. (2012)
- 2) 高山和雄、川端健二、水口裕之; 多能性幹細胞から肝細胞への分化誘導、再生医療業書、印刷中
- 3) 川端健二、田代克久、水口裕之、iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、薬学雑誌、130、1527-1534 (2010)

〔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

<http://www.nibio.go.jp/Proj3HP/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川端 健二 (KAWABATA KENJI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号: 50356234

### (2) 研究分担者

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)

大阪大学大学院薬学研究科・准教授

研究者番号: 70370939

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

