

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5日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790282

研究課題名（和文） 体細胞核リプログラミングにおける Myc の多面的機能の解明

研究課題名（英文） Analysis of Myc function during reprogramming of somatic cell nuclear

研究代表者

中川 誠人（NAKAGAWA MASATO）

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：10379539

研究成果の概要（和文）：

iPS細胞の腫瘍化の原因の一つである c-Myc の代替因子として L-Myc を発見した。L-Myc を用いて樹立した iPS 細胞における腫瘍化リスクは本と度認められなかった。詳細な検討から、c-Myc の強力な形質転換活性は iPS 細胞樹立初期には負に働き、形質転換活性をほとんど持たない L-Myc は線維芽細胞で高発現する遺伝子の発現抑制を効率的に行い iPS 細胞の樹立を促進していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

Previously c-Myc is thought to be one of the risks for tumorigenicity of iPS-derived chimera mice. To overcome this problem, we found that c-Myc can be replaced with L-Myc. From detailed study, a strong transforming activity of c-Myc negatively acted in the early establishment of iPS cells. On the other hand, little transforming activity of L-Myc efficiently inhibited the expression of a gene highly expressed in fibroblasts resulted in promotion of the establishment of iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学・リプログラミング・iPS細胞・ES細胞・癌

1. 研究開始当初の背景

胚性幹 (ES) 細胞を用いた再生医療は徐々に進んでいるが、ES 細胞の使用に関しての運用面での問題と、非自己 ES 細胞由来の分化細胞の移植による拒絶反応の問題が残ったままである。申請者の所属する研究室では、体細胞を直接初期化し、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作り上げ (Takahashi et al., 2006, Cell; Takahashi et al., 2007, Cell)、ES 細胞の問題点を解決することに成功した。iPS 細胞を樹立する際にレトロウイルスを用いて誘導因子を導入しており、それらはウイルスゲノムの一部と一緒に体細胞ゲノム中へ挿入される。誘導因子の中のひとつである、レトロウイルス由来の c-Myc の再活性化に伴う過剰発現が原因で iPS 細胞由来キメラマウスの 60% で腫瘍形成による死亡が観察された。申請者は樹立方法の改良を行ない c-Myc を用いずに iPS 細胞を樹立することに成功した (Nakagawa, 2007, Nat Biotech)。この iPS 細胞由来のキメラマウスにおいてはほとんど腫瘍の形成が認められなかったことから、c-Myc 依存的な腫瘍形成というリスクは回避できた。

しかし最近の我々の研究で、c-Myc を用いて樹立した iPS 細胞と、用いないで樹立した iPS 細胞の性質が異なることが分かってきており、前者の方がより ES 細胞に近いのではないかという結果が出てきている (未発表)。c-Myc は細胞内のクロマチンの状態を制御し、多数の標的遺伝子の発現を調節していることから、c-Myc を用いずに作った iPS 細胞では初期化が不十分なのではないかと考えた。

つまり、c-Myc を用いて樹立した iPS 細胞は腫瘍化リスクを有し、c-Myc を用いずに樹立した iPS 細胞は不完全な多能性を有しており、どちらも完全ではない (図 1)。腫瘍化リスクと不完全な初期化の問題を抱えたままでは iPS 細胞を再生医療へ応用できない。

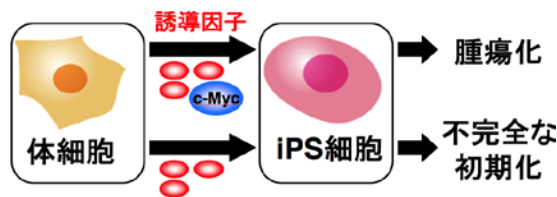


図 1 : iPS 細胞の誘導と Myc の関係

最近までの報告で、レトロウイルスを用いず体細胞ゲノムへの遺伝子挿入の無い iPS 細胞樹立の報告が他グループよりなされているが、それらの iPS 細胞が本当に ES 細胞と同様の多能性を有しているのか、腫瘍化リスクが無いのか、などの重要な点については解析されていない。

また、Myc には c-Myc の他に L-Myc や N-Myc といったファミリー遺伝子が存在する。これらは重要な活性中心ドメインの構造が良く保存されている。N-Myc は以前の報告で c-Myc の機能を補完できることが分かっており、機能的にはほぼ同じと考えられる。L-Myc については研究があまり進んでおらず、transformation 活性が c-Myc の 1/10 程度であることが報告されている程度である (Mukherjee, Genes Dev, 1992)。Myc ファミリー遺伝子の中で iPS 細胞誘導に最適なものを決定することも重要と考える。

本研究では、iPS 細胞誘導における Myc の多面的機能の役割を明らかにし、体細胞核リプログラミングのメカニズム解明を行なう。現状ではレトロウイルスを用い、誘導因子に c-Myc を含めた場合が iPS 細胞誘導の再現性や効率が一番良く安定しており、さらにはキメラマウスの長期観察データもあることから、申請者は現状の方法を基本的に用いて研究を行なう。

2. 研究の目的

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚などの体細胞に既知の因子を導入し体細胞核のリプログラミングを起こして作られる細胞である。胚性幹細胞 (ES 細胞) と同様に様々な細胞に分化できることから再生医療への応用が期待されている。しかしながら、iPS 細胞誘導のメカニズム、すなわち体細胞核リプログラミングのメカニズムは完全には分かっていない。

本課題では、リプログラミング因子のひとつである Myc の iPS 細胞誘導における多面的機能が果たす役割を明らかにし、体細胞核リプログラミングのメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

現在までに報告されている c-Myc の機能欠損型の変異体を作製し、transformation 活性と iPS 細胞の誘導効果についての関係を調べる。Transformation 活性は NIH3T3 細胞に発現させた場合の形態変化などを指標に検討する。iPS 細胞誘導効果についてはマウスとヒト両方の線維芽細胞を用いて誘導を行ない検討を行なう。既存の変異体を発展させたものも作製し同様の検討を行なう。樹立した iPS 細胞の性状解析も詳細に行なう。

腫瘍化リスク、多能性の検討は iPS 細胞を用いたキメラマウスの作製と生殖系列への寄与能を解析する。腫瘍形成は早い場合は生まれてから数ヶ月で腫瘍形成が観察されるが、詳細な検討を行なうには1～2年の長期観察が必須である。

4. 研究成果

平成 22 年度研究成果

iPS 細胞の樹立には Sox2, Oct3/4, Klf4 および c-Myc を用いてレトロウイルスによる感染・発現システムを行っていた。この方法で作られた iPS 細胞由来のキメラマウスにおいて高頻度に腫瘍を形成することが明らかとなってきた。この腫瘍形成の原因の一つが誘導時に用いているレトロウイルス由来 c-Myc の再活性化であった。c-Myc を用いずとも iPS 細胞を作製する方法を確立したが、この方法によって作られた iPS 細胞は質の点で劣ることが判明した。つまりこのままでは臨床応用で本当に使える iPS 細胞のレベルではないと考えられた。

そこで本研究では、c-Myc の代わりになる因子を探索し、L-Myc を同定した。c-Myc の代わりに Myc ファミリー遺伝子の中の L-Myc を用いることでマウスおよびヒト iPS 細胞の樹立をより効率的に行えることを明らかにした。また、マウス L-Myc iPS 細胞由来キメラマウスの実験から、L-Myc iPS 細胞の安全性(腫瘍形成がほとんど無い)も確認できた。さらに、キメラマウスを用いた iPS 細胞の質の検討から、L-Myc iPS 細胞は c-Myc iPS 細胞や野生型の ES 細胞と同等の性質を有していることが確認できた。

Myc の特徴である形質転換活性を検討したところ、c-Myc は非常に強い活性を示したのに対して、L-Myc はほとんど活性を示さなかった。以前の報告では L-Myc の形質転換活性は c-Myc の 10分の1程度であることと一致する。また、c-Myc の形質転換活性を欠損させた変異体は L-Myc と同様に高い iPS 細胞誘導活性を示した。このことから、c-Myc の形質転換活性がネガティブな機能を発揮していることが示唆された。

以上の結果から、L-Myc を用いることで効率的に安全な iPS 細胞を樹立できることを明らかにした。

平成 23 年度研究成果

昨年度において、c-Myc の代わりに Myc ファミリー遺伝子の中の L-Myc を用いることでマウスおよびヒト iPS 細胞の樹立を効率的に行えることを明らかにした。また、マウス L-Myc iPS 細胞由来キメラマウスの実験から、L-Myc iPS 細胞の安全性(腫瘍形成がほとんど無い)も確認できた。Myc の特徴である形質転換活性を検討したところ、c-Myc は非常に強い活性を示したのに対して、L-Myc はほとんど活性を示さなかった。このことから Myc の形質転換活性が iPS 細胞の機能と密接に関係していることが示唆された。

以上の結果から、本年度は c-Myc、形質転換活性欠損型 c-Myc、野生型 L-Myc の機能比較解析を行うことで iPS 細胞の樹立メカニズムなどの解明を進めた。まずは、ヒト線維芽細胞に iPS 細胞誘導因子の Sox2, Oct3/4, Klf4 (3 factors)と共に c-Myc、形質転換活性欠損型 c-Myc、L-Myc を導入し7日後に細胞を回収し RNA サンプルを調整した。この RNA サンプルを用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。c-Myc と L-Myc の場合を比較すると、L-Myc を導入した群において元々線維芽細胞で高発現していた遺伝子の発現抑制が強く認められた。また、c-Myc を導入した群においては細胞増殖を促進するような遺伝子発現の向上が L-Myc より強い傾向が認められた。つまり、L-Myc は iPS 細胞の樹立初期において線維芽細胞の性質を

キャンセルしその後の iPS 細胞化をスムーズに進めるように機能していることが推測された。フローサイトメーターによる検討からも L-Myc が線維芽細胞で高く発現する細胞表面マーカーの発現を効率良く低下させることが分かった。同様の実験系において形質転換活性欠損型 c-Myc を用いて解析を行ったところ、L-Myc と同様の機能を示すことが分かった。

以上の結果から、c-Myc の強力な形質転換活性は iPS 細胞樹立初期には負に働き、形質転換活性をほとんど持たない L-Myc は線維芽細胞で高発現する遺伝子の発現抑制を効率的に行い iPS 細胞の樹立を促進していることが考えられた。

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 8 件)

①Wang YC, Nakagawa M, Garitaonandia I, Slavin I, Altun G, Lacharite RM, Nazor KL, Tran HT, Lynch CL, Leonardo TR, Liu Y, Peterson SE, Laurent LC, Yamanaka S, & Loring. JF Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis. *Cell Res*, 査読有り、2011

②Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, & Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*, 査読有り、2011、8(5):409-412

③Nakamura T, Nakagawa M, Ichisaka T, Shiota A, & Yamanaka S. Essential roles of ECAT15-2/Dppa2 in functional lung development. *Mol Cell Biol*, 査読有り、2011

④ Hirano K, Nagata S, Yamaguchi S, Nakagawa M, Okita K, Kotera H, Ainscough J, & Tada T. Human and Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Are Differentially Reprogrammed in response to Kinase Inhibitors. *Stem Cells Dev*, 査読有り、2011

⑤Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K,

Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, & Yamashita JK. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. *PLoS One*, 査読有り、2011 6(2):e16734

⑥Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T & Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有、2010、107: 14152-14157

⑦Saunders LR, Sharma AD, Tawney J, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S, Willenbring H, & Verdin E. miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging (Albany NY)*, 査読有、2010、2: 415-431

⑧Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, Kajitani N, Hoshiya H, Hiramatsu K, Yoshino T, Kazuki K, Ishihara C, Takehara S, Higaki K, Nakagawa M, Takahashi K, Yamanaka S, & Oshimura M. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 査読有、2010、18: 386-393

[学会発表] (計 3 件)

①Nakagawa M, et al. Function of Myc for Reprogramming. 第 34 回日本分子生物学会年会 2010/12/13、横浜

②Nakagawa M, et al. Promotion of Direct Reprogramming by Transformation-deficient Myc. 第 33 回日本分子生物学会年会 2010/12/10、神戸

③Nakagawa M, et al. Generation of safer iPS cells by factor X instead of c-Myc. ISSCR 8th Annual Meeting 2010/6/17 San Francisco

[図書] (計 1 件)

①Nakagawa M, Yamanaka S. *Adv Exp Med Biol*. Reprogramming of somatic cells to pluripotency. 2010、215-224

[その他]

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 誠人 (NAKAGAWA MASATO)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：10379539

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：