

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650587

研究課題名(和文) iPS細胞を利用した新規抗癌剤シース化合物の探索系の樹立

研究課題名(英文) Establishment of screening system for the candidate compounds for anti-cancer drugs with iPS cell

研究代表者

福田 智一 (Fukuda, Tomokazu)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40321640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞と悪性腫瘍の共通性に注目し、転写制御領域の脱メチル化を誘導する低分子化合物を探索する実験系を試みた。E6/E7によって不死化されたマウス胎児由来線維芽細胞に対して4因子を発現させた。感染後に立体的なコロニーの出現を認め、出現したコロニーをpick upし立体的なコロニーを形成した。樹立後の合計6回のパッセージにおける培養上清のルシフェラーゼ活性は全てのクローンでPassage 2よりルシフェラーゼ活性は下降、1/1000以下にまで低下した。レポーター遺伝子のサイレンシングが行われていることを意味する。サイレンシング状態のプロモーター活性を回復させる薬剤をスクリーニング中である。

研究成果の概要(英文)：We focused on the common biological feature between cancer and iPS cell, and tried to establish the screening system for de-methylating agents for the genome. We introduced reprogramming four factors into E6/E7 immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEF). The infected MEF showed iPS trans formation. We successfully established mouse iPS cells, and found that reported activity is dramatically dropped down. We are trying to screen the new molecular compounds, which causes the re-activation of the promoter activity.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における悪性腫瘍による死亡は年々増加している。一方、近年開発されている分子標的治療薬はほぼ全て欧米で開発されており、我が国の化学療法のための薬剤の開発は大きく遅れている。具体的には近年開発された分子標的治療薬であるアービタックス、イレッサなどは全て欧米のメガ・ファーマと言われる大規模な会社で開発された薬剤である。我が国で開発された分子標的治療薬はほぼ皆無に等しい。欧米のこのような薬剤のコストは莫大で、悪性腫瘍の患者やその家族の方々に大変大きな負担となっている。化学療法のための化合物を見いだすことは、従来より膨大な数の化合物の生理活性をスクリーニングすることが必要である。このために候補化合物を効率よくスクリーニング出来る実験系を樹立することは急務と考えられる。

一方、我が国の京都大学 iPS 研究センターに所属する山中伸弥教授により、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)が樹立された。人工多能性幹細胞とは人為的に数種の遺伝子を導入し、終末分化した体細胞を生殖細胞を含む全ての組織に分化出来る幹細胞へリプログラミングする技術である。本技術によって作られる iPS 細胞は免疫不全動物に移植した場合、奇形腫という悪性腫瘍を発生させることが知られている。加えて悪性腫瘍の病理診断において、未分化度という言葉によって悪性のグレードが診断されている。悪性腫瘍と iPS 細胞との間には生物学的な共通点が多く、iPS 細胞は悪性腫瘍の研究に有効な研究対象になると考えられる。

興味深いことに iPS 細胞や胚性幹細胞(ES 細胞)において、導入遺伝子の不活性化(サイレンシング)が観察される。iPS 細胞を誘導するには Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc の 4 種類の遺伝子を導入することが必要であるが、導入された遺伝子は LTR(Long Terminal Repeat)プロモーターを用いて導入した場合、高頻度に遺伝子発現が OFF になる現象が観察されている。

そこでこの LTR プロモーターのサイレンシング現象を利用すれば、一度サイレンシングした LTR プロモーターの発現を戻す活性を持つ低分子化合物をスクリーニング出来るのではないかと発想した。従来までこのようにサイレンシングしたプロモーター活性を戻す低分子化合物は脱メチル化化合物と呼ばれている。脱メチル化化合物の代表的なものに、5-aza-deoxycytidine (5-aza-dC)がある。5-aza-dC はゲノムの維持メチル化機構に重要な酵素である DNMT1 に結合し、活性を抑制、その結果ゲノムの脱メチル化が発生して、様々な遺伝子のプロモーター活性が回復すると考えられている。

このような 5-aza-dC の脱メチル化活性は悪性腫瘍にも劇的な効果をもたらす。具体的には 5-aza-dC は米国 FDA(Food and

Drug Administration)において多発性骨髄腫の治療薬として認可された。従ってこの 5-aza-dC のような脱メチル化活性を持つ化合物は有効な化学療法のリード化合物になる可能性が高い。しかし細胞内における脱メチル化活性を検出する方法が未だ確立されていない。

そこで本研究ではまず細胞内のゲノムに対する脱メチル化活性を鋭敏かつ簡便に検出できる実験系を構築することを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究は iPS 細胞と悪性腫瘍の性質の共通性に注目し、iPS 細胞を利用して転写制御領域の脱メチル化を誘導する低分子化合物を探索する実験系を樹立することを試みた。研究を開始するに当たって、以下の点を考慮した。

iPS 細胞にはマウスのような立体的なコロニーを形成する naive 型と呼ばれる幹細胞と、ヒト ES および iPS 細胞のように平面的なコロニーを形成する primed 型と呼ばれる 2 種類が存在する。ヒト ES および iPS 細胞のような primed 型幹細胞は単一細胞に分離させると高頻度にアポトーシスを生じること、加えて培養維持が難しいことが知られている。この研究上の特性から、本研究では研究対象をマウスの細胞とした。

マウス iPS 細胞において効率的に導入遺伝子のサイレンシングおよび発現の回復を検出するためには、分泌型ルシフェラーゼを使用することとした。分泌型ルシフェラーゼは検出する対象の細胞を破壊することなく、発現された酵素が培養細胞の上清に放出される。このために細胞をそのまま維持しながら、経時的に検出が可能になるため、労力が大幅に削減される。加えてルシフェラーゼは検出感度に優れ、数十分子/ml の濃度で検出が可能である。さらにルシフェラーゼはルミノメーターを使用することで定量性に優れている。

この組み合わせを用いて、本研究ではマウス線維芽細胞をまず不死化し、その後リプログラミングカセットを導入することとした。

## 3. 研究の方法

ヒトパピローマウイルス由来の E6/E7 遺伝子を導入し不死化したマウス胎児由来線維芽細胞を材料として用いた。この細胞へまずレトロウイルスベクターによって分泌型ルシフェラーゼ、EGFP, G418 耐性遺伝子を 2A ペプチドによって連結したレポーターカセットを導入した。このレポーターの導入により挿入されたカセットの発現を培養上清中のルシフェラーゼ活性もしくは蛍光蛋白質の発現によって迅速に検出することが出来る。マウス iPS 細胞を誘導するにあたって、山中教授が用いたように iPS リプログラミングに必要な 4 因子を別々に導入するのではなく、

4 因子が連結された **STEMCCA** という発現システムを用いることにした。マウス iPS 細胞の細胞学的性質を確認するため、幹細胞のマーカーとして、アルカリフォスファターゼ染色を行った。ゲノム中のリプログラミングカセットの検出のため、**STEMCCA** カセットに相補的な 1 組のプライマーを用いて PCR 法にて検出を行った。さらに免疫蛍光染色を行い、**Nanog**, **Oct3/4**, **SSEA1** の発現を検出した。

樹立したマウス iPS 細胞の培養上清におけるルシフェラーゼ活性を **Ready to Glow** およびルミノメーターによって検出を行った。iPS 細胞コロニーが得られてから、**passage 1** から **6** のそれぞれの培養上清におけるルシフェラーゼ活性を検出した。さらに薬剤耐性遺伝子由来の蛋白質に対する抗体を用いて **western blot** を行った。さらに樹立したマウス iPS 細胞における内在性 **Nanog**, **Oct3/4**, **Sox2**, **Tbx3** 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて検出した。マウス ES 細胞のこれらの発現レベルを 1 とし、相対的な発現レベルの検出を行った。

#### 4. 研究成果

マウス胎児由来線維芽細胞 (MEF) に対して、不死化させることを目的に E6/E7 を発現するレトロウイルスの感染を行った。本レトロウイルスは E6/E7 遺伝子に加えてハイグロマイシン耐性遺伝子を発現する。Figure 1 において示すように、遺伝子導入を行わなかった MEF においては生存する細胞はなかったが、E6/E7 遺伝子を導入された細胞は高い薬剤耐性を示した。さらに Figure 1 に示すように山中 4 因子を発現する **STEMCCA** カセットの導入を行った。感染後約 3 週間後に立体的なコロニーの出現を認めた。

実体顕微鏡下で出現したコロニーを pick up し、継代したところ Figure 2 の A および B に示すような立体的なコロニーを形成した。これらのコロニーは Figure 2 の C および D に示すようにアルカリフォスファターゼ陽性を示した。さらに得られたクローンの全てのゲノム DNA から **STEMCCA** カセット由来の PCR 産物が確認された。このことから我々はマーカー遺伝子を導入した細胞からマウス iPS 細胞を樹立に成功したと結論した。合計 Clone 2 から 5 の 4 つの iPS クローンの樹立に成功した。

樹立後の合計 6 回のパッセージにおける培養上清のルシフェラーゼ活性を検出したものが Figure 4 の A である。全てのクローンで Passage 2 よりルシフェラーゼ活性は下降し、1/1000 以下にまで低下した。このことは Clone2 から Clone4 までのクローンで効率的にレポーター遺伝子のサイレンシングが行われていることを意味する。一方、Clone5 においてはレポーター活性の定価を認めなかった。その結果をさらに確認するために、薬剤耐性遺伝子産物に対する抗体を用いて

western blot を行った。Figure 4B に示すように positive control および clone5 において遺伝子産物が検出され、ルシフェラーゼ活性の結果が正しいことが確認された。

得られたマウス iPS 細胞の Clone2 から 5 の幹細胞としてのマーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて検出した所、Clone2 から Clone4 においてはマウス ES 細胞と比較して、**Nanog**, **Oct3/4**, **Sox2**, **Tbx3** の高い発現が検出された。一方、Clone5 においては **Sox2**, **Tbx3** の ES 細胞と比較して低いレベルの発現が検出された。以上のことから Clone5 では部分的なリプログラミングが細胞内で行われており、そのことがマーカー遺伝子の不完全なサイレンシングに繋がっていると予想された。

次に我々は樹立した Clone2 から 4 を用いて、5-aza-dC の効果を検討した。様々な濃度および暴露時間で 5-aza-dC の暴露を行ったが、プロモーター活性の回復は検出されなかった。このことは LTR プロモーターの iPS 細胞におけるサイレンシングはメチル化非依存的にサイレンシングされていることを意味する。近年、マウス ES 細胞における LTR プロモーターのサイレンシング機構の一部の分子メカニズムが明らかになっている。すなわちマウスの ES 細胞においては LTR プロモーターのサイレンシングは ESET と呼ばれる転写因子を媒介して行われるとの研究発表が行われた。本研究においても ESET の発現低下を誘導することによって、プロモーター活性が回復する可能性がある。本研究によって鋭敏なプロモーターのサイレンシングが培養上清中から検出出来る実験系が確立された。これは将来的な薬剤スクリーニングを含めて有用な実験系であると考えられる。

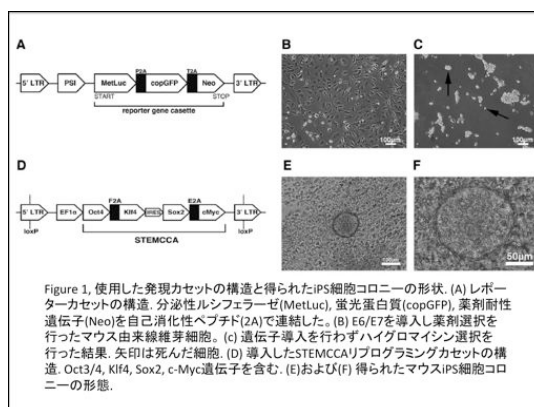


Figure 1. 使用した発現カセットの構造と得られた iPS 細胞コロニーの形状。(A) レポーターカセットの構造。分泌性ルシフェラーゼ (MetLuc)、蛍光蛋白質 (copGFP)、薬剤耐性遺伝子 (Neo) を自己消化性ペプチド (2A) で連結した。(B) E6/E7 を導入し薬剤選択を行ったマウス由来線維芽細胞。(C) 遺伝子導入を行わずハイグロマイシン選択を行った結果、矢印は死んだ細胞。(D) 導入した **STEMCCA** リプログラミングカセットの構造。Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc 遺伝子を含む。(E) および (F) 得られたマウス iPS 細胞コロニーの形態。

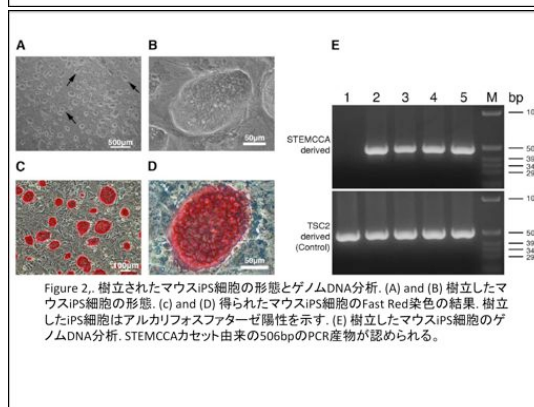


Figure 2. 樹立されたマウス iPS 細胞の形態とゲノム DNA 分析。(A) and (B) 樹立したマウス iPS 細胞の形態。(C) and (D) 得られたマウス iPS 細胞の Fast Red 染色の結果。樹立した iPS 細胞はアルカリフォスファターゼ陽性を示す。(E) 樹立したマウス iPS 細胞のゲノム DNA 分析。**STEMCCA** カセット由来の 506bp の PCR 産物が認められる。

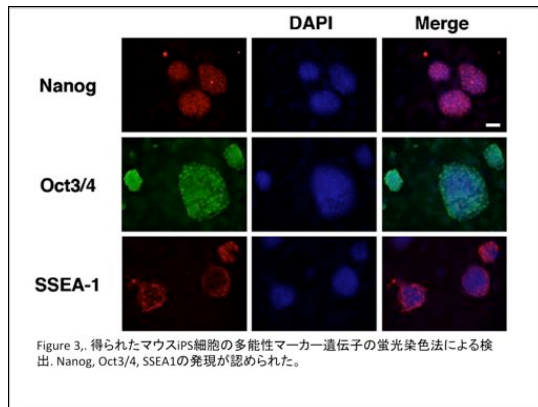


Figure 3. 得られたマウスiPS細胞の多能性マーカー遺伝子の蛍光染色法による検出。Nanog, Oct3/4, SSEA1の発現が認められた。

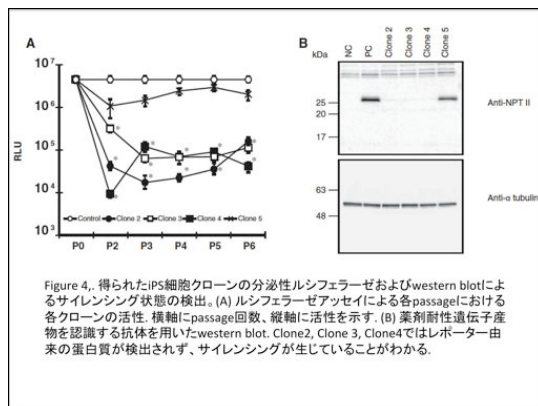


Figure 4. 得られたiPS細胞クローンの分泌性ルシフェラーゼおよびwestern blotによるサイレンシング状態の検出。(A) ルシフェラーゼアッセイによる各passageにおける各クローンの活性。横軸にpassage回数、縦軸に活性を示す。(B) 薬剤耐性遺伝子産物を認識する抗体を用いたwestern blot。Clone2, Clone 3, Clone4ではレポーター由来の蛋白質が検出されず、サイレンシングが生じていることがわかる。

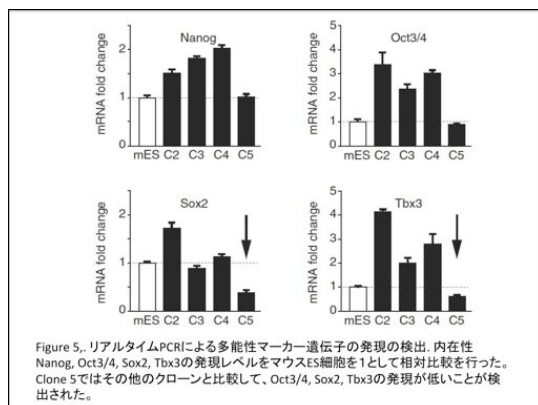


Figure 5. リアルタイムPCRによる多能性マーカー遺伝子の発現の検出。内在性Nanog, Oct3/4, Sox2, Tbx3の発現レベルをマウスES細胞を1として相対比較を行った。Clone 5ではその他のクローンと比較して、Oct3/4, Sox2, Tbx3の発現が低いことが検出された。

## 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2件)

- ① Donai K, Inagaki A, So KH, Kuroda K, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T (2014) Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions. *Cytotechnology*. in press. DOI, 10.1007/s10616-013-9686-8, 査読あり

- ② Donai K, Kuroda K, Guo Y, So KH, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T (2013) Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. *Anal Biochem* 443: 104-112. DOI, 10.1016/j.ab.2013.08.014, 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

- ①土内憲一郎, 黒田健吾, 郭燦浩, 蘇敬夏, 小林正之, 西森克彦, 福田智一. 人工多能性幹細胞におけるLTRプロモーターのサイレンシング状態を培養上清から簡便にモニタリングできるレポーターシステムの樹立. 日本繁殖生物学会総会. 2013年9月12日~14日, 東京農工大学

- ②Donai K., Kuroda K., So KH., Inagaki A., Nishimori K., Fukuda T. Establishment of induced pluripotent stem cell lines that allow monitoring of the re-programming status of genomes. Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology. 2012年11月27日-30日, Nagoya.

- ③Fukuda T. Application of induced pluripotent stem cells for the screening of low molecular demethylating compounds Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology. 2012年11月27日-30日, Nagoya.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 智一 (FUKUDA TOMOKAZU)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 40321640