

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：32661
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658227
 研究課題名（和文） 全能性を持ったラット iPS 細胞の作製

研究課題名（英文） Generation of rat iPS cells

研究代表者

柳内 和幸 (YANAI KAZUYUKI)
 東邦大学・理学部・准教授
 研究者番号：30360704

研究成果の概要（和文）：我々が作成した遺伝子導入ラットを用いて iPS 細胞を樹立するとともに iPS 誘導メカニズムの解明を目指した。遺伝子導入ラットはホモ同士では交配ができず、また長期に飼育すると皮んを発生するため、まず、iPS 誘導のキーファクターであるラット Nanog 遺伝子の発現メカニズムを解析した。そして、既知の Oct4 結合部位以外に iPS 誘導に重要な役割を担っている 9 か所の新規 Oct4 結合配列を同定した。

研究成果の概要（英文）：We tried to generate iPS cells from our transgenic rat having drug-inducible reprogramming factors. However, there were some difficulties in mating. Then, as a first step to generate iPS cells and to analyze the reprogramming mechanisms, I focused on Oct4-binding sites in the nanog gene which is a marker gene of ES cells. I identified novel 9 novel Oct4-binding sequences in the rat nanog gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：発生工学

1. 研究開始当初の背景

再生医療の研究は、「いかに多能性幹細胞を得るか」という点が主題であったが、山中らが線維芽細胞に 4 つの転写因子、すなわち Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 を導入することにより、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS 細胞）を樹立できることを報告し、全世界的なターニングポイントを迎えている。これまでに、マウスにおいて、全能性を示す iPS 細胞の樹立が報告された。その後、様々な種において iPS 細胞の誘導が試みられているものの、これまでに全能性を持ったラットの iPS 細胞は樹立されていない。多能性幹細胞は疾病の治療などの再生医療に有用だけでなく、遺伝子欠損動物の作製に欠かせないもので、モデル動物

の作製を介して基礎医学の発展にも非常に有用な試料となる。現在までに安定した遺伝子欠損動物の作製が可能なのはマウスのみであり、マウスより一回り大きいためにモデル動物としての有用性が高いラットでは遺伝子欠損動物の作製が非常に困難な状況にある。その原因は、始原生殖細胞を含むすべての細胞に分化可能な多能性幹細胞が、ラットでは樹立されていないためである。

2. 研究の目的

これまでに我々は、iPS の誘導に重要な 5 つの遺伝子がテトラサイクリンによって誘導できる世界で唯一の遺伝子導入ラットの作製に成功している。このラットから調整した繊維芽細胞は、iPS 誘導実験においてウィル

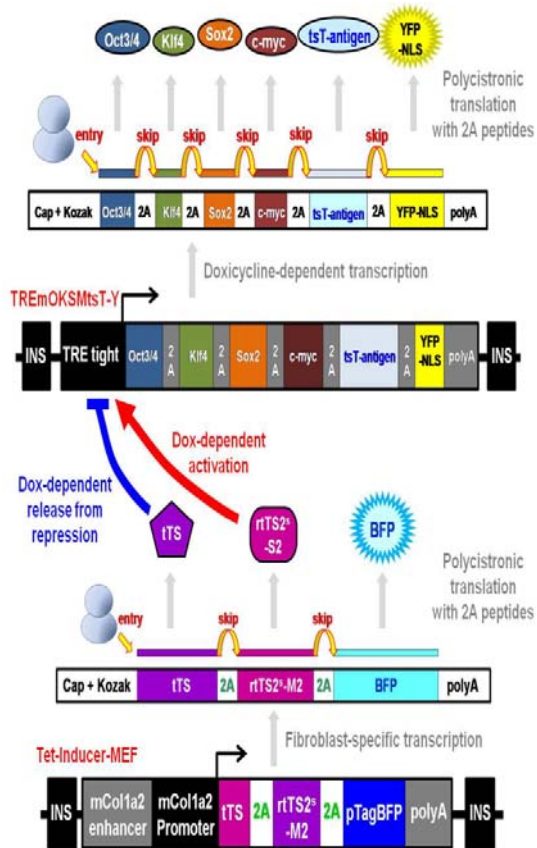
スペクターなどを必要とせず、培養液にテトラサイクリンを添加するだけで iPS を誘導でき、その質を上げるための薬剤スクリーニング系として非常に有用である。よって、本申請では、遺伝子欠損ラット作製のため、誘導型再生医療ラットを利用して全能性を持った iPS 細胞を樹立することと、iPS 細胞の誘導メカニズムの解析を目指した。

3. 研究の方法

本研究は以下の 2 つの戦略を併用して研究をすすめた。

(1) 誘導型再生医療ラットは、テトラサイクリンを培養液に添加するだけで iPS 細胞を誘導できるようにデザインした遺伝子導入ラットである。多能性幹細胞の樹立に重要な 4 つの転写因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4) と温度感受性の SV40 Large T antigen (tsT-antigen、T 抗原) をテトラサイクリンで厳密に発現コントロールできる新規の遺伝子誘導システムを用いている。この系を使って、テトラサイクリンで iPS 細胞を誘導する際に、同時に様々な化学物質を添加して質の高い iPS 細胞の樹立を試みる。

誘導型再生医療ラットから調整した胎児繊維芽細胞を培養し、テトラサイクリンで iPS 細胞を誘導する際に様々な化学物質を添加して質の高い iPS 細胞の樹立を試みる。



(2) ラット nanog 遺伝子のゲノムをクロニングし、新たな Oct4 結合部位を同定するためのプログラムを開発し、ゲルシフトにより結合を検証する。

4. 研究成果

これまでに我々は、iPS の誘導に重要な 5 つの遺伝子がテトラサイクリンによって誘導できる世界で唯一の遺伝子導入ラットの作製に成功している。よって、本申請では、遺伝子欠損ラット作製のため、誘導型再生医療ラットを利用して全能性を持った iPS 細胞を樹立することを目指した。

誘導型再生医療ラットは 3 系統樹立されており、この遺伝子のホモ化のための交配を進めた。しかし、ホモが数個体できたもののホモ同士では交配ができず、また長期に飼育すると皮膚がんを発生した。

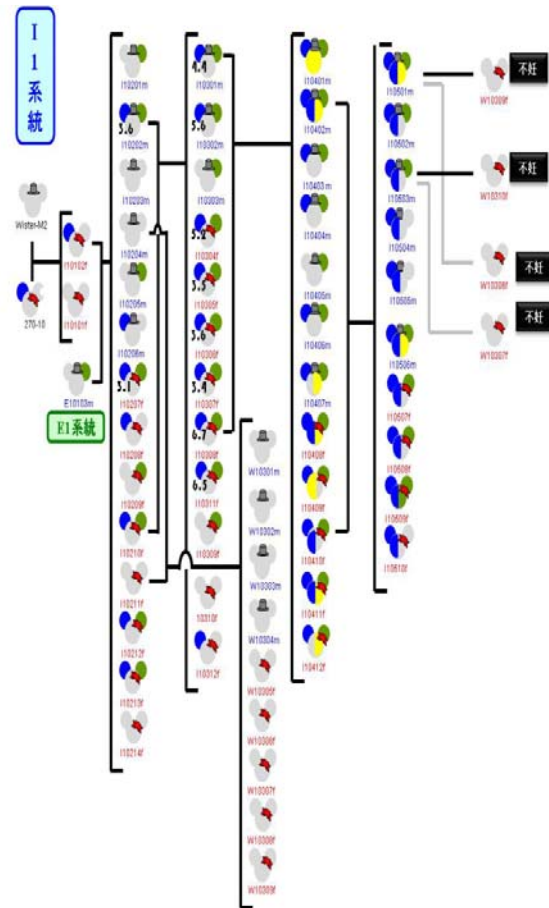


図 1. ラットの系統樹の一部

そこで我々は、iPS 誘導のキーファクターであるラット Nanog 遺伝子の発現メカニズムを解析した。一般的な転写因子結合部位予測プログラムを用いると、ラット Nanog 遺伝子上に数百個の結合部位が予測された。そこで、様々なプログラムを組み合わせて 23 か所の結合配列に絞り込んだ。

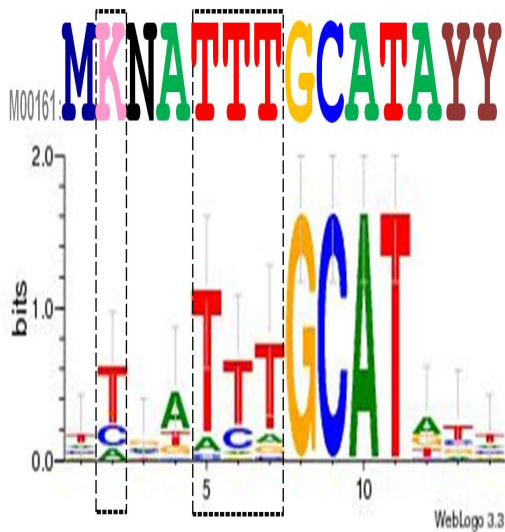


図2. Oct4 遺伝子の結合配列

絞り込んだ結合配列についてゲルシフトにより、直接的な結合を検証した。

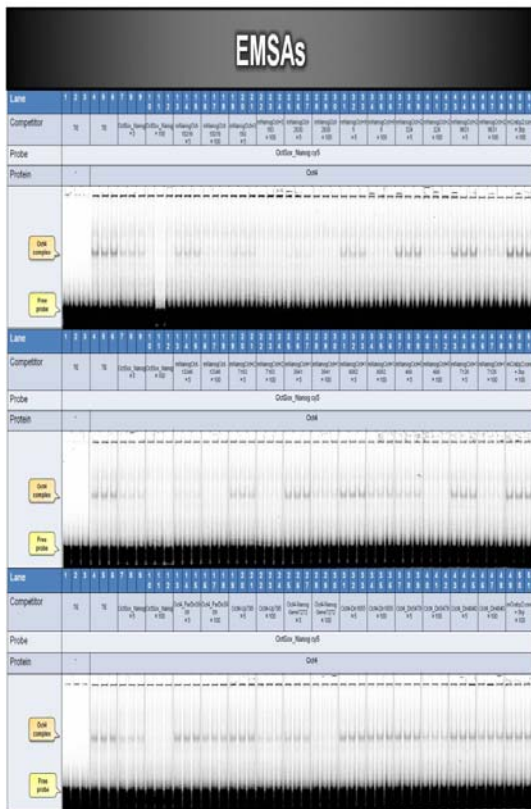


図3. ゲルシフトの検証の例

解析の結果、ラット Nanog 遺伝子周辺に9か所の新規 Oct4 結合配列を同定した。これまで知られていたプロモーター上の Oct4 結合部位以外に、多数の Oct4 結合領域が存在することが、iPS 誘導に重要な役割を担っていると考えられる。

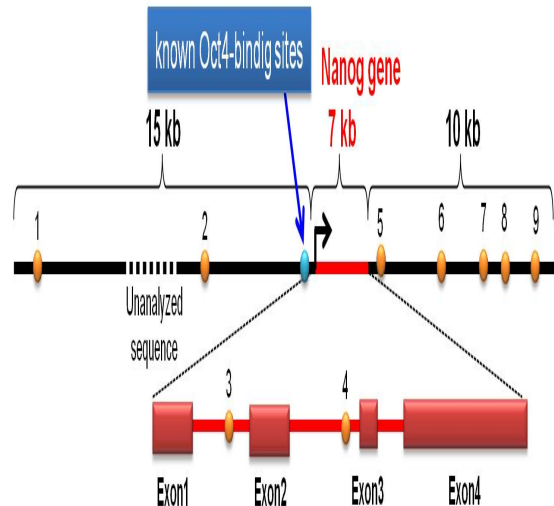


図4. ラット nanog 遺伝子上に同定した Oct4 結合部位。

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)

[学会発表] (計5件)

①村崎亜起子「ヒトゲノムにおけるアンドロゲンレセプターの結合配列の系統的な同定とその解析」第35回日本分子生物学会 2012年12月11日 福岡国際会議場(福岡県)

② Hiroki Saito "Genome-wide identification and characterization of Retinoid X Receptor homodimer binding sites by a genetic selection in yeast" 第35回日本分子生物学会 2012年12月11日 福岡国際会議場(福岡県)

③ Takatsugu Kosugi "Genome-wide identification and characterization of Retinoic Acid Receptor/Retinoid X Receptor

heterodimer binding sites by a genetic selection in yeast" 第35回日本分子生物学会 2012年12月11日 福岡国際会議場(福岡県)

④ Takatsugu Kosugi "Identification and Characterization of Human Genomic Binding Sites for Retinoic Acid Receptor/Retinoid X Receptor heterodimers" 生命医薬情報学連合大会 2012年10月25日 タワーホテル船堀(東京都)

⑤ Takatsugu Kosugi "Identification and characterization of retinoic acid receptor/retinoid X receptor heterodimers binding sites in human genome." 日本人類遺伝学会第57回大会 2012年10月15日 京

王プラザホテル（東京都）

(1) 研究代表者

柳内 和幸 (YANAI KAZUYUKI)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号：30360704

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし