

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791691

研究課題名(和文)着床前期胚特異的な遺伝子のiPS作成における機能解析

研究課題名(英文)generation of iPS cells by preimplantation specific genes

研究代表者

平田 哲也(Hirata, Tetsuya)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30431860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：Zscan4は24時間の活性化を行うだけで、iPSの作成効率が改善し、Zscan4を用いたiPS作製早期の遺伝子プロファイリングにより、Zscan4が、iPS細胞作製早期に着床前期特異的遺伝子プログラムを活性化することができる初めてのリプログラミング因子であることがわかった。すなわち、短期間の誘導でiPS作製効率を上げる。核型の維持に働くこと。着床前期特異的遺伝子プログラムを活性化することなどからiPS細胞作製において、Zscan4を用いることで、着床前期胚の発達や核移植に近い初期化条件を作り、作製効率を上げるのみならず、qualityの高いiPSの作製が可能となったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) by the forced expression of defined transcription factors in somatic cells holds great promise for the future of regenerative medicine. However, the initial reprogramming mechanism is still poorly understood. Here we show that Zscan4, expressed transiently in 2-cell embryos and embryonic stem cells (ESCs), efficiently produces iPSCs from mouse embryo fibroblasts when coexpressed with Klf4, Oct4, and Sox2. Interestingly, the forced expression of Zscan4 is required only for the first few days of iPSC formation. Microarray analysis revealed transient and early induction of preimplantation-specific genes in a Zscan4-dependent manner. Our work indicates that Zscan4 is a previously unidentified potent natural factor that facilitates the reprogramming process and reactivates early embryonic genes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：stem cell preimplantation gene iPS細胞 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、着床前期胚の潜在能力を用いることにより、発生工学、幹細胞研究が著しい進歩を遂げ、胚発生の遺伝子ネットワークの解析が重要な役割を果たしてきた。着床前期胚の各ステージにおける遺伝子発現プロファイリングの解析により、二細胞期に特異的に発現する遺伝子として Zscan4 が同定された。(Hamatani et al.) Zscan4 は、二細胞期胚と ES 細胞に特異的に発現する遺伝子である。(Falco et al.) ES 細胞において、テロメレーズに依存しないテロメアの伸長、ゲノムの安定性を維持しながら不死化を維持する重要な役割を果たしている。(Zalzman et al.)

さらに、新しいリプログラミングの技術として、山中らが、Myc(M)、Klf4(K)、Oct4(O)、Sox2(S)という ES 細胞に特異的に発現する 4 つの転写因子を用いることにより、体細胞が多能性幹細胞に誘導されるという衝撃的な事実を報告した (Takahashi et al. Cell 2006 126(4) 663-76)。この iPS の発見は、少なくとも遺伝子発現制御のみを契機としてリプログラミングを可能にしたという点で、今後の再生医療の可能性を感じさせる非常に大きい功績である。ただ、iPS においては、リプログラミングに数週間かかる。核移植が数日であることより、核移植と iPS のリプログラミングは異なることが推察される (Hanna et al. Cell 143(4), 508-525)。また、不完全なリプログラミングや iPS の作成過程において DNA の変異が見られること (Gore et al. Nature 471, 63-67) などから、iPS が quality の面で未だ ES 細胞に及ぶものではなく、iPS の臨床応用が困難であると想起させる。以上の事より、着床前期胚の発達、核移植の過程で存在する未知の iPS 因子が存在する可能性がある (Hanna et al. Cell 143(4) 508-525)。さらに、従来の iPS は、導入した c-Myc による影響と思

われる腫瘍形成の危険性を持つ。しかしながら、c-Myc なしでは iPS 細胞の作成効率は非常に低下してしまう。そこで、c-Myc のような癌遺伝子ではなく、着床前期胚、卵細胞に発現しているような新規の iPS 誘導因子、つまりは核移植の過程を模倣できる因子の発見が iPS の安全性と臨床応用を見据えたうえで非常に重要なことであると考えた。

我々は、Zscan4 がこの Factor X なのではないかと考え、quality の高い iPS 細胞作成を可能にするのではないかと考えた。

2. 研究の目的

近年、山中らが iPS を作成し、その後もこの領域は目覚ましい進歩を遂げているが、遺伝子、エピジェネティックの異常、腫瘍形成のリスクなどの問題も多く、臨床応用に耐えられる iPS が作成できているとは言えない。着床前期胚特異的な遺伝子である Zscan4 は、核型維持に働き、さらに私達はマウス iPS の作成効率を上げるという結果を得ている。Zscan4 を用いることにより、核移植後や正常な受精卵で起こるをリプログラミングを模倣するような形で high-quality な iPS の作成が可能なのではないかという仮説のもと、その理論的根拠を検証し、さらにヒトの iPS の作成にもつなげていく研究である。

3. 研究の方法

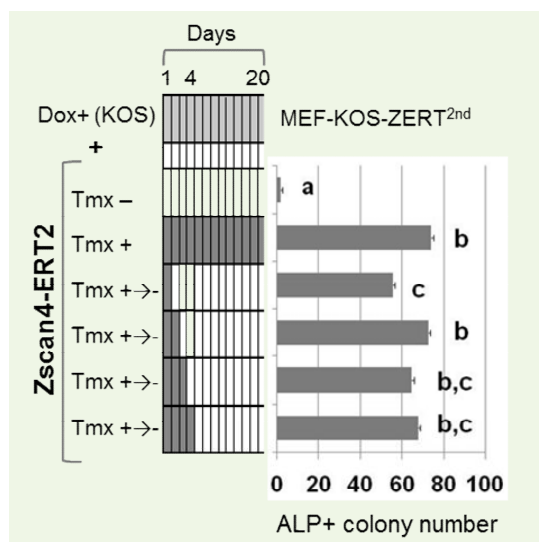
(I) Zscan4 の iPS 作成効率の上昇に関する kinetics の研究。

これまで報告されてきた iPS 誘導因子は、少なくとも 10 日程度の発現誘導が必要であった (Plath et al. Nat Rev Genet 12, 253-265)。そこで、iPS 作成効率を上昇させるのに、Zscan4 の誘導がどの時期にどれぐらいの期間必要であるかを検討す

る必要がある。また、KOS+Zscan4 による iPS の作成過程における経時的網羅的遺伝子動態の解析。これにより、何故 Zscan4 を iPS factor に加えることで効率が大幅に上昇するのかにつき検討した。

結果

下の図のように、Zscan4 は 24 時間の活性化を行うだけで、iPS の作成効率が上昇することが分かった。また、網羅的遺伝子解析により、KOS+Zscan4 と KOS のみで活性化して iPS を作成した iPS 作製早期の遺伝子プロファイリングにより、**Zscan4** が、iPS 細胞作製早期に着床前期特異的遺伝子プログラムを活性化することができる初めてのリプログラミング因子であることがわかった。すなわち、短期間の誘導で iPS 作製効率を上げること。核型の維持に働くこと。着床前期特異的遺伝子プログラムを活性化することなどから iPS 細胞作製において、Zscan4 を用いることで、着床前期胚の発達や核移植により近い初期化条件を作り出し、作製効率を上げるのみならず、quality の高い iPS の作製が可能となったと考えている。



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 9 件)

- (1) **Hirata T**, Amano T, Nakatake Y, Amano M, Piao Y, Hoang HG, Ko MS.

[Zscan4 transiently reactivates early embryonic genes during the generation of induced pluripotent stem cells.](#)

Sci Rep. 2012;2:208. doi:

10.1038/srep00208

- (2) Osuga Y, Hirota Y, Yoshino O, **Hirata T**, Koga K, Taketani Y.

[Proteinase-activated receptors in the endometrium and endometriosis.](#) Front Biosci (Schol Ed). 2012 Jun 1;4:1201-12. Review.

- (3) Urata Y, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Koga K, Nagai M, Harada M, **Hirata T**, Hirota Y, Yoshino O, Taketani Y.

[Interleukin-1 \$\beta\$ stimulates the secretion of thymic stromal lymphopoietin \(TSLP\) from endometrioma stromal cells: possible involvement of TSLP in endometriosis.](#) Hum Reprod. 2012

Oct;27(10):3028-35. doi:

10.1093/humrep/des291.

- (4) Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Hirota Y, **Hirata T**, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T, Taketani Y. [The](#)

[localization and regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin \(PCSK\) 6 in human ovary.](#) Am J Reprod Immunol.

2012 Dec;68(6):491-8. doi:

10.1111/aji.12003.

- (5) Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Izumi G, Urata Y, Hirota Y, **Hirata T**, Harada M, Koga K, Ogawa K, Kozuma S. [Follistatin is induced by IL-1 \$\beta\$ and TNF- \$\alpha\$ in stromal cells from endometrioma.](#) Reprod Sci.

2013 Jun;20(6):675-9. doi:

10.1177/1933719112463253

- (6) Zhao Y, Koga K, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, **Hirata T**, Hirota

- Y, Yoshino O, Fujii T, Kozuma S. [Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines and matrix metalloproteinase-1 in human uterine smooth muscle cells](#). Am J Reprod Immunol. 2013 Mar;69(3):240-7. doi: 10.1111/aji.12061
- (7) Zhao Y, Koga K, Osuga Y, Izumi G, Takamura M, Harada M, **Hirata T**, Hirota Y, Yoshino O, Inoue S, Fujii T, Kozuma S. [Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines and matrix metalloproteinases-1 \(MMP-1\) from human decidual cells, and the production was reduced by progesterone](#). Am J Reprod Immunol. 2013 May;69(5):454-62. doi: 10.1111/aji.12092
- (8) Urata Y, Osuga Y, Akiyama I, Nagai M, Izumi G, Takamura M, Hasegawa A, Harada M, **Hirata T**, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Kozuma S. [Interleukin-4 and prostaglandin E2 synergistically up-regulate 3β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in endometrioma stromal cells](#). J Clin Endocrinol Metab. 2013 Apr;98(4):1583-90. doi: 10.1210/jc.2012-3475.
- (9) Nishiyama A, Sharov AA, Piao Y, Amano M, Amano T, Hoang HG, Binder BY, Tapnio R, Bassey U, Malinou JN, Correa-Cerro LS, Yu H, Xin L, Meyers E, Zalzman M, Nakatake Y, Stagg C, Sharova L, Qian Y, Dudekula D, Sheer S, Cadet JS, **Hirata T**, Yang HT, Goldberg I, Evans MK, Longo DL, Schlessinger D, Ko MS. [Systematic repression of transcription factors reveals limited patterns of gene expression changes in ES cells](#). Sci Rep. 2013;3:1390. doi: 10.1038/srep01390.
- 〔学会発表〕(計 件)
- 〔図書〕(計 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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
平田哲也(Hirata, Tetsuya)
東京大学・医学部付属病院講師
研究者番号：30431860
- (2) 研究分担者 ()
研究者番号：
- (3) 連携研究者 ()
研究者番号：