

平成 27 年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の新規作成方法および未分化制御法の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部高度先端総合医療センター再生医療部 教授 福田寛二 共同研究者：生物理工学部遺伝子工学科 教授 細井美彦 医学部ゲノム生物学 教授 西尾和人	

1. 研究目的・内容

2007 年に iPS 細胞の作成方法が初めて報告されて以降、臨床応用に向けた研究が精力的に進められている。現在、iPS 細胞の実用化にむけ障壁となっているのが 1)作成効率の改善 と 2)作成された iPS 細胞の品質改善 である。これには iPS 細胞が形成されるメカニズムの解明と培養系の改良等が必要である。本研究では、iPS 細胞が誘導されるリプログラミング過程には癌の転移時に認められる上皮間葉転換 (EMT) あるいは間葉上皮転換 (MET) 様の細胞動態が認められるという点に着目し、最新の腫瘍細胞生物学と幹細胞生物学の知見を融合し、新規の iPS 細胞作成、培養技術を開発することを目的とした。

2. 研究経過及び成果

本研究では、EMT/MET という現象を出発点として iPS 細胞の『多能性』成立を理解するという研究プロセスを計画した。具体的には

1. 多能性幹細胞で見られる 2 つの未分化状態 (Primed-state と Naïve-state) において EMT 関連遺伝子がどのようなパターンを示すのか、またその状態にあることがどういった意味を持つのかを解明する
 2. EMT を成立させるマスター因子と多能性との関連性について明らかにする
 3. EMT 関連分子を制御することによる分化あるいは未分化の誘導
- の 3 つの研究を実施した。

<研究 1 >

近年の研究で、iPS 細胞をはじめとする多能性幹細胞には 2 つの状態：着床直前胚の状態を反映する Naïve 型、着床後の胚を反映する Primed 型があることが分かっている。歴史的に、マウス ES/iPS 細胞は Naïve 型を表し、ヒト ES/iPS 細胞は Primed 型を表すと考えられてきた。取扱の容易さや分化能力の高さから Naïve 型ヒト幹細胞を確立することの要求は高い。本研究では Naïve 型、Primed 型を相互転換する系の開発を行った。また、Naïve 型、Primed 型細胞を規定している分子、またその特徴を EMT 関連分子を中心に観察した。

着床の前後では、環境中の酸素濃度が急激に変化すると考えられる。我々は着床後胚すなわち Primed 型では低酸素状態に適応した状態になっていると考え、マウス ES/iPS 細胞を低酸素環境下で培養し変化を観察した。その結果、マウス ES/iPS 細胞は低酸素下で Naïve 型特異的な特徴を喪失することを見出した。この知見を応用し、マウス ES/iPS 細胞を Primed 型幹細胞 (EpiSC) に転換する技術を開発した (Takehara et al., Stem Cells Dev 2012)。また、EpiSC と ES 細胞を比較し、Naïve 型幹細胞では Twist、Snail、Cdh2 といった EMT を誘導する遺伝子の発現が高いことを発見した。

Naïve 型幹細胞で間葉型遺伝子の発現が高いことの意味を解明するため、間葉型細胞最大の特徴の一つである Cdh2 の発現に着目した。マウス EpiSC をモデル細胞として解析したところ、EpiSC で Cdh2 の発現を抑制すると未分化状態が不安定になること、その背景として Basic fibroblast growth factor (bFGF) による MAPK 活性が短期化することを見出した (Takehara et al., Scientific Reports 2015)。

<研究 2 >

研究 1 において、多能性の切り替えには EMT 因子が重要な役割をはたすことが示唆された。そこで EMT のマスター転写因子である Twist に着目し、Twist がどのような分子と相互作用しうるのかを検討

した。米国スクリプス研究所においてマイクロアレイ解析をはじめ詳細な解析を行い、Twist が TET タンパク質の発現誘導ならびにタンパク質間相互作用を介して、細胞のエピジェネティックな状態を変化させることで分化状態に影響していることを明らかにした (Hasei and Teramura et al., 投稿中)。この成果は全く新規の知見であり、幹細胞研究領域、腫瘍細胞研究領域において非常に重要であると考えられる。

さらに、多能性幹細胞における Twist の高発現状態を利用することで間葉系幹細胞に誘導できることを発見した。間葉系幹細胞は現在もっとも臨床応用が進んでいる幹細胞であり、効果、安全性の高さゆえに期待度が高い。EMT の制御による間葉系幹細胞誘導の改善がえられるという成果は、再生医療の新技术開発にも貢献すると考えられる。

<研究3>

上記の研究成果から、Naive 型の幹細胞を効率良く誘導し安定的に培養維持するためには EMT 関連分子の制御が重要であることが示唆された。そこで上皮細胞や癌細胞における代表的な EMT 誘導分子である TGF β 経路の制御に着目した。TGF β は Smad 経路と非 Smad 経路の 2 通りの伝達経路を介して遺伝子発現を調節している。Smad 経路についてはこれまで多くの報告があり、実際に幹細胞の作成や培養に応用されている。一方で非 Smad 経路については不明な点が多い。本研究では非 Smad 経路における最上流分子のひとつ TAK1 に着目し、EMT における意義と幹細胞制御における可能性について検討した。その結果、EMT の過程で TAK1 が強くリン酸化されること、TAK1 の抑制により ES 細胞の未分化性を向上させられることを発見した。より詳細な解析を行うため、ゲノム編集技術をもちいて TAK1 欠損株を作成し解析をおこなったところ、TAK1 欠損株では腫瘍形成能力、間葉系細胞の派生能力が著しく抑制されていることが明らかとなった。最後に、本研究最大の目的であった iPS 細胞の樹立効率の改善に取り組んだ。TAK1 の抑制はマウス iPS 細胞の作成効率を有意に改善し、かつ樹立後の培養においても Nanog の発現を上昇させることで未分化性の安定化に寄与した。

<まとめ>

本研究では、多能性における EMT 現象とその意義、EMT 制御による幹細胞制御技術の開発に取り組んだ。研究1では多能性幹細胞の2つの状態 (Naive、Primed 型) の成立は EMT 関連分子が深く関わっていることを発見した。研究2では、EMT 誘導転写因子である Twist の詳細な解析を行い、Twist がエピジェネティックな状態変化に重要な役割を担っているという新知見を得た。研究3では、EMT 現象を誘導するカスケードにおいて上流分子として機能する TAK1 に着目し、TAK1 の抑制によって iPS 細胞の作成効率を改善することに成功した。今後はヒト iPS 細胞への同技術の応用、ヒト Naive 型幹細胞の誘導に取り組んでいく予定である。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本研究プロジェクトでは、iPS 細胞の新しい制御方法や培養方法の開発に直接結びつく重要な知見を複数得ることができた。実際の再生医療あるいは幹細胞産業においては、「高品質な iPS 細胞を高効率に作成する」ことに加え「ヒトにおける Naive 型幹細胞の樹立」が望まれている。本研究ではこれを達成する上で重要な成果を得られたが、ヒト細胞での応用には至らなかった。現在、細胞の代謝など異なる視点から新技术の開発に取り組んでおり、今後はこれらを統合したいと考えている。また、本研究で明らかになった知見について細胞内シグナル伝達機構の整理など、基礎的な検討も引き続き継続していく予定である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Sci Rep	雑誌	2015 Sep
Environ Sci Pollut Res Int.	雑誌	2015 Nov
FEBS Open Bio.	雑誌	2015 Jun
FEBS Open Bio	雑誌	2015 May
Stem Cells Dev.	雑誌	2013 Mar
Cell Transplant.	雑誌	2013 Jan
Geriatr Gerontol Int.	雑誌	2015 Dec
第27回日本軟骨代謝学会	口頭 (シンポジウム)	2014年2月28日
第31回日本整形外科学会基礎学術集会	口頭 (シンポジウム)	2016年10月13日