

平成 25 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	<p>研究代表者：医学部附属病院高度先端総合医療センター・再生医療部 教授 福田 寛二</p> <p>共同研究者：医学部ゲノム生物学教室 教授 西尾 和人 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室 講師 荒尾 徳三 医学部附属病院高度先端総合医療センター・再生医療部 医学部講師 寺村 岳士</p>	

1. 研究目的・内容

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は神経、心筋や骨など体を構成する全ての細胞に分化できる能力をもつ人工的な幹細胞である。皮膚の一部や血液などから作成可能であること、一度作成すれば、老化することなく無限に増殖させることが可能であることから、次世代の再生医療資源として大きな注目を集めている。2007 年に iPS 細胞の作成方法が初めて報告されて以降、iPS 細胞の樹立 (作成) や利用方法に関する様々な研究が進められ、近く臨床応用も開始される見込みである。しかし一方で、1)作成効率の改善、2)作成された iPS 細胞の品質保証 (即ち、作成された iPS 細胞が真に未分化な細胞であって、目的細胞への効率的な誘導が期待できる細胞かどうかの判定)、3)iPS 細胞の未分化/分化の適切なコントロールと腫瘍化する細胞の排除、など臨床応用を検討する上で早期に解決されるべき多くの課題がある。

本研究では、「1」作成効率の改善と「2」品質保証 (改善) に関わる研究を行う。iPS 細胞は、皮膚繊維芽細胞などの遺伝情報 (DNA およびヒストン) が、多能性幹細胞 (万能細胞) の状態まで初期化 (リプログラミング) されることで作成される。リプログラミングの完全性と iPS 細胞の品質とは直接関連しており、不完全なリプログラム状態の iPS 細胞は分化能力が低く、腫瘍化をコントロールすることも困難である。iPS 細胞の作成過程では、リプログラミングは少数の候補細胞においてランダムな確率かつ様々なレベルで生じるため、完全なリプログラミングが成立した高品質な iPS 細胞が得られる率は低い。そこで、リプログラミングの律速になる因子あるいは分子経路が明らかになれば、課題 1)作成効率の改善、および課題 2)作成された iPS 細胞の品質保証の解決策となる。

現在、iPS 細胞の作成過程で生じる「初期化」は、いくつかの段階で生じることが明らかとなっている。その初期化段階において我々は、線維芽細胞状態から上皮細胞状態への切り替え (間葉-上皮転換 (MET) の過程) に着目した。もし、MET を誘導する分子経路を特定し、これを制御することができれば、iPS 細胞を効率よく作成することができるはずである。

そこで、本研究では腫瘍制御学、発生学、幹細胞学を専門とする研究者で共同研究班を組織し、EMT/ MET 制御を中心に、新規 iPS 細胞作成法および制御法の開発を行う。

2. 研究経過及び成果

本研究では、人工多能性幹細胞:iPS 細胞の作製過程で生じる「初期化」における繊維芽細胞状態から上皮細胞状態への切り替え：間葉-上皮転換現象 (MET) に着目し、その分子経路の解明及び、これを制御する技術の探索を目的に研究を進めた。MET や、逆の反応である上皮-間葉転換(EMT)は生物の発生過程で通常に生じる細胞現象であり、発生学における重要な研究領域の一つである。我々は、近年、胚性幹細胞(ES 細胞)の EMT/ MET の制御に関する研究を行い、専門誌に報告した。一方、MET/ EMT は癌細胞の悪性化・転移能力にも直結する現象である。現在、多くの抗癌剤が EMT/ MET 制御を標的として開発されており、腫瘍制御学研究分野には多くの知見が蓄積されている。しかしながら、iPS 細胞におけるこれら EMT/MET の制御に関する研究は未だに少なく、分子経路の解明等が必須である。そこで、本年度では、マウス ES 細胞を材料に多能性幹細胞における EMT/MET の制御、特に EMT/MET に関連するカドヘリンの発現がどのように多能性幹細胞における未分化維持にどのように影響を及ぼすのか研究を行った。研究材料として用いたマウス多能性幹細胞には、naïve 型と呼ばれる ES 細胞と、primed 型と呼ばれる EpiS 細胞がある。ヒト ES/iPS 細胞の性質は、primed 型の EpiS 細胞と非常に類似しているとされており、これらの細胞は、安定的に維持するのが難しく、また分化能についても naïve 型の ES 細胞と比べて低いとされている。これらの細胞間の性質の違いを調べることで、iPS 細胞のさらなる性質改善や、維持に必要な条件等を明らかにできると考えられる。

本年度では、まずマウス ES 細胞及び EpiS 細胞の間におけるカドヘリンの違いについて検討を行った。通常上皮細胞では Ecadherin、繊維芽細胞や神経細胞では Ncadherin の発現が高いとされている。Realtime-PCR 法及び Westernblot 法解析を用いることで、mRNA 及びタンパク質の発現解析により、ES 細胞では Ecadherin、EpiS 細胞では Ncadherin を強く発現していることが明らかとなった。次に cadherin の発現の違いまたは細胞特異的な cadherin 型の発現が及ぼす影響について検討をおこなった。まず、EpiS 細胞における Ncadherin の発現の減少が未分化状態に及ぼす影響を調べるため、Ncadherin siRNA を細胞内へ導入した。その結果、未分化マーカー遺伝子である Oct4 及び Nanog 遺伝子の減少が認められ、さらに primed 型 ES 細胞における未分化維持シグナル経路の一つである FGF 経路の下流遺伝子として知られている cMyc 遺伝子の発現減少が認められた。このことから、Ncadherin は FGF 経路を介した未分化維持経路に何らかの役割を果たしていることが示唆された。次に、これらの現象に対してタイプの違う cadherin として Ecadherin を人為的に強制発現させ、Ncadherin の現象に伴う細胞の変化を補助できないか検討を行った。しかしながら、Ecadherin 過剰発現させた EpiS 細胞においても同様に、Ncadherin 発現の減少に伴って未分化状態の低下が引き起こされることが明らかとなった。

本年度で得られた知見は、多能性幹細胞として維持または誘導する際に、cadherin の発現が積極的にその性質に影響することを示唆しており、iPS 細胞の誘導時における EMT/MET の制御が必須であることが考えられる。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

本年度における研究結果から、iPS 細胞を代表とする多能性幹細胞において cadherin 型の発現の違いが多能性幹細胞の性質にたいして大きく影響を及ぼすことを明らかにしたことから、EMT/MET の制御による iPS 細胞作製技術をはじめとする重要な技術開発と知見が得られた。今後の研究では、さらに EMT/MET 現象が多能性幹細胞にどのように関連しているかを naïve 型 ES 細胞における cadherin の機能解析を行う。また、Snail や Twist といった異なる遺伝子にも焦点を当て、過剰発現またはノックダウン・ノックアウトの実験系を利用し、iPS 細胞の樹立または維持においてどのように機能しているのかを多方面から解析を行い、EMT/MET 制御が iPS 細胞の作製に鍵となる分子機構であることを証明する。また、実際に得られた知見を利用し、iPS 細胞の作製効率及び質の改善が行えるか検討を実施する。

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)
ISSCR(国際幹細胞学会)	学会発表:ポスター	2014年6月18日