

平成 26 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

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は次世代の再生医療材料として注目されている。しかし、依然として作成効率が低く、iPS 細胞を用いた再生医療の普及における重要な課題となっている。

再生医療においては、患者から作成した iPS 細胞を目的の細胞に分化誘導したのち、損傷を受けた組織に移植するという方法が考えられている。現在までに様々な細胞を分化誘導するためのプロトコルが開発されているが、未分化細胞の混入あるいは、不十分な分化による移植細胞からの癌化が重大な問題であり、これを解決する決定的な方法は未だ開発されていない。

本研究では 1)iPS 細胞の作成効率の改善、2)未分化性制御法の開発を目的に、iPS 細胞の多能性制御に関する研究を行う。

現在までの研究で、iPS 細胞の作成過程、あるいは分化過程では、発癌ならびに転移悪化時に認められる上皮-間葉転換 (EMT) 様の現象を伴うことが明らかとなりつつある。EMT は細胞の形質が大きく変動する重要なプロセスであり、iPS 細胞の多能性制御メカニズムと深く関わっている可能性が大きい。そこで我々は本研究を通し、EMT 関連分子経路が iPS 細胞の未分化性にどのように関わりうるのかを解明する。

2. 研究経過及び成果

研究 1. マウス多能性幹細胞の未分化性維持機構と EMT 関連分子 Cdh2 の関与に関する研究

EMT に伴う重大な変化として、細胞接着因子が Cdh1 (E カドヘリン) から Cdh2 (N カドヘリン) に切り替わる。この変化は、マウス多能性幹細胞においても見られ、極めて未分化性の高い基底状態 (胚、iPS など) からすこし分化した状態 (Epiblast) への変遷の過程で顕著になる。しかし、その意義は不明であった。我々はマウス ES 細胞、マウス Epiblast 幹細胞 (EpiSC) において Cdh2 の遺伝子発現を変化させ、Cdh2 がマウス EpiSC の未分化性維持に重要であることを明らかにした。詳細な検討により、マウス EpiSC において Cdh2 は FGFR1 と相互作用しており、FGFR1 を細胞膜につなぎ止め、安定化させることで FGF2-MEK/Erk シグナル経路を増強していることが分かった。実際に、マウス ES 細胞において Cdh2 を発現させると、FGF2 シグナルが増強し、分化に傾倒した。これまでの研究において、ヒト iPS 細胞はマウス EpiSC に近い性質を有すると考えられてきた。そのため、本研究成果により、ヒト iPS 細胞の作成においては Cdh2 の発現をモニタリング、制御することが重要である可能性が明らかになった。本研究成果は Scientific Reports 誌に投稿中である。

研究 2. β カテニン共役因子 CBP/p300 のスイッチングと多能性制御に関する研究

β カテニン は様々な細胞機能を調節制御している。これまでに、多くのコファクターが関連することが分かっており、転写調節のファイン・チューニングを行っている。我々は、多能性幹細胞の EMT 様変化に伴い、 β カテニンコファクターである CBP と p300 の優先性が切り替わることを発見した。また、それぞれのコファクターに結合する阻害剤を使用することで、多能性の型 (Epithelial-like あるいは Mesenchymal-like) を切り替えることができることを見いだした。

この阻害剤を用いて iPS 細胞の樹立を行ったところ、樹立効率が有意に改善された。これまでにこのような機構は全く報告がなく、新規の幹細胞制御法と考えられる。現在、研究成果を投稿準備中である。

研究 3. EMT 制御転写因子 Twist1、EMT 関連 lncRNA HOTAIR と未分化関連分子の関連性に関する研究

Twist1 は EMT を誘導する転写因子である。しかし、Twist1 と多能性制御機構との関連性は全く分かっていない。本研究では、Twist1 がどのような遺伝子に影響を及ぼすかを明らかにするため、株化細胞 TC-28 においてアデノウイルスベクターを用いて Twist1 を強制発現させ、マイクロアレイ解析、メチル化解析を行った。その結果、Twist1 が特定の標的遺伝子においてヒドロキシメチル化状態を変化させ、遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。これまで全く新規の分子メカニズムであり、未分化性維持機構だけでなく、生物の発生に広く関わる現象であると考えられる。現在、スクリプス研究所（分担者の寺村が在外研究中に実施）、東京医科歯科大学、岡山大学と共同研究で詳細な解析を進めている。

現在、様々な細胞現象に非コード長鎖 RNA (lncRNA) が関わっていることが分かっている。EMT 現象においては、HOTAIR の関与が考えられているが、iPS 細胞作成プロセスあるいは未分化維持におけるその機能は不明である。本研究では、HOTAIR に対し Gapmer（ターゲット mRNA に対しハイブリッド鎖を形成し RNaseH の選択的基質となる）を設計し、TC-28 細胞に導入、マイクロアレイ解析を行った。その結果、細胞の上皮化あるいは終末分化制御に関わる Klf 転写因子群の発現が変化することを見いだした。今後、さらに研究を進める予定である。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

研究 2 について、今後は霊長類の ES 細胞、iPS 細胞で検証する。検証結果を得て、論文発表を計画している。研究 3 については、コンディショナル・トランスジェニックマウスの作成、ノックアウト ES 細胞を用いた解析を進める。これにより、Twist1 とターゲット遺伝子群の関わり、そのメカニズムを明らかにする。HOTAIR については、siRNA、強制発現系を用いてターゲット遺伝子のスクリーニングを進め、RNA-IP をはじめ、関連タンパク質の特定を計画中である。また、本研究の目的である「iPS 細胞作成の効率化と未分化性制御法の開発」をさらに進めるため、平成 26 年度に予備検討で抽出した分子 TAK1 の制御を用いた系の改良を進める予定である。

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)
12 th International Society for Stem Cell Research (バンクーバー)	ポスター発表	2014 年 6 月 19 日
13 th International Society for Stem Cell Research (トロント)	ポスター発表	2015 年 6 月 26 日