戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞(iPS 細胞)作製・
制御等の医療基盤技術」
研究課題「iPS 細胞誘導の為の分子基盤の解明に
よる安全性の確保」

研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成26年3月

研究代表者:奥田 晶彦
(埼玉医科大学ゲノム医学研究センター
発生分化再生部門、教授)

§1. 研究実施の概要

(1)実施概要

本グループは、ES・iPS 細胞の未分化状態を支える分子基盤、及び iPS 細胞誘導の根本にある分子基盤の解明を目指し、それらの研究から得られた成果を、ES・iPS細胞の安全性向上の為に応用することを目標に研究してきた。特に、ES・iPS 細胞状態、及び iPS 細胞誘導過程における Myc 転写因子の機能解析に多くの勢力を投入して研究してきた。ES 細胞において、Myc タンパク質が、Oct3/4 タンパク質同様、それら細胞の未分化性維持において極めて重要な働きをしていると最初に提唱したのは米国の Stephen Dalton 博士であり(Development 132, 885-896, 2005)、山中伸弥先生が、iPS 細胞誘導の為の候補遺伝子の一つとして c-Myc タンパク質を選択したのも、彼らの研究成果があったからである。但し、その論文では、極めて人工的な実験系を用いていた為、彼らの示したデータが、真の意味でのES細胞におけるc-Mycの機能を反映しているか否かは疑わしいと私たちは感じたので、自分たちとしては、loss of function の見地から、Myc タンパク質の機能を証明したいと考えた。但し、Myc タンパク質は、c-Myc、N-Myc、L-Myc の 3 種類のタンパク質によりファミリーを構成しており、かつ、これら 3 種類の Myc タンパク質のいずれもが ES 細胞で高発現している為、c-Myc 遺伝子をホモでノックアウトしても functional redundancy の問題が生ずることが容易に想像された。但し、これら 3 種の Myc タンパク質はいずれもが、転写因子として機能する為には Max パートナー因子を必要とするので、Max 遺伝子の発現を消失させれば、c-Myc、N-Myc、L-Myc 全ての機能的な不活化を達成できると考え、Max ホモ欠失マウス ES 細胞を樹立した。なお、その細胞は、Max 遺伝子の単純なホモ欠失 ES 細胞ではなくて、ROSA26 遺伝子座にテトラサイクリン(tet)-off のシステムと伴に Max cDNA が導入されており、それ故、本 ES 細胞は、テトラサイクリンあるいはその誘導体であるドキシサイクリン(Dox)の添加の有無により、Max 遺伝子の発現を完全にコントロールできる。そして、この細胞を用いて、マウス ES 細胞が、サイトカインの一つである LIF と血清という古典的な ES 細胞の培養条件下にあるときは、ES 細胞としての未分化状態を維持することができず、未分化状態が破綻した後にアポトーシスにより細胞が死滅することを確認した。但し、Max ホモ欠失 ES 細胞を MAPK と GSK3β に対する阻害剤を用いるグランドステート培養条件下に曝すと、未分化状態の破綻や、アポトーシスのいずれも見られなくなり、ES 細胞として半永久的に培養維持ができることがわかった。このことは、Myc タンパク質は、Oct3/4 タンパク質等とは異なり、ES 細胞としての特質を維持する上で決して必須なものではなく、培養条件等の違いにより、必要であったり、必要でなかったりするものであるということを意味しており、一般に持たれていた ES 細胞における Myc の役割に関しての概念を大きく変えるものであった。その他、内在性の Myc や Max タンパク質とは相互作用しないが、変異体同士では野生型タンパク質と同レベルの強固さで結合し、転写複合体として機能できる変異 Myc、Max タンパク質ペアーを用いることで、Myc タンパク質による顕著な iPS 細胞誘導促進活性は維持しつつ、外来 Myc 遺伝子の再発現による癌化の危険性を大幅に下げる方法も開発した。

iPS 細胞誘導過程で生ずる partial iPS 細胞に関する研究に関しても勢力的に行った。iPS 細胞誘導は、2～3 週間というかなり長い期間を要する為、その期間で起こっている細胞内での変化の全体像を全て分子レベルで理解することは極めて困難であり、それ故、リプログラミングの過程が不十分ではあるが、かなり iPS 細胞状態に近い状態にある partial iPS 細胞を出発材料に、その細胞が真の iPS 細胞になる過程の分子基盤の解明を目指して研究を行った。その関連の研究の 1 つとしては、piggyBAC ベクターを用いて、ランダムにゲノム遺伝子を活性化させる方法を用いて、partial iPS 細胞から真の iPS 細胞への変換をサポートできる遺伝子の同定を試み、Ccr4-Not 複合体と Trim28 タンパク質が、細胞分化を司る遺伝子の発現を抑制することで、partial iPS 細胞から、iPS 細胞への変換を促進することを明らかにすることができた。partial iPS 細胞に関連した研究の 2 つ目の研究としては、partial iPS 細胞という安定な状態が、外来性の Myc 遺伝子の発現に依存していることが証明出来た。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. c-Myc タンパク質は、マウス ES 細胞がその未分化状態を維持する上で、Oct3/4 転写因子などと同様に必須な転写因子の一つであると考えられていた。但し、私たちは、ES 細胞がグランドステートという培養条件化にあるときは、同タンパク質は全く必要ないという事実を示した。そのことで、ES 細胞における c-Myc タンパク質の役割に関しての従来の概念を大きく変えた。
2. ES 細胞において、Myc タンパク質が転写因子として機能する上で必須な Max タンパク質をコードする遺伝子の発現を消失させると、ES 細胞としての未分化性の消失とアポトーシスという2つの顕著なフェノタイプが観察されるが、それら 2 つの現象は、決してランダムに起こっているのではなくて、アポトーシスが起こる前には必ず未分化状態を消失していることを見出した。このことは、未分化状態にある ES 細胞には、アポトーシスを遂行させない特定の分子メカニズムが存在することを強く示唆する。
3. Ccr4-Not 複合体、及び Trim28 タンパク質が、partial iPS 細胞における細胞分化関連遺伝子の発現を抑えることにより、partial iPS 細胞から真の iPS 細胞への変換に寄与できることを明らかにした。すなわち、これら 2 種類の細胞間での変換の分子基盤の一端を明らかにすることができた。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 優れた基礎研究としての成果の 1 番目に挙げた成果は、ES 細胞の未分化性維持において、Myc 遺伝子は必ずしも必要ないということを示したことで、無限の増殖性を、Myc 遺伝子のような癌原遺伝子に依存しているような ES・iPS 細胞は大変危険な細胞であるという固定観念を大きく緩和し、ES・iPS 細胞を用いた再生医療の実現に対して、有形無形の効果をもたらしたと考えている。
2. iPS 細胞誘導の初期の段階でニコチンアミドを培地に添加することで、Myc タンパク質依存的に iPS 細胞誘導効率を 10 倍程度上昇させることができた。ニコチンアミドは水溶性ビタミンの一つであり、それ故、薬としての副作用はほとんど心配しなくてもよい可能性が高く、かつ極めて安価な物質である。そのような化学物質を用いて iPS 細胞の誘導効率を高めることが出来たことは、産業化という点で発展性が高い発見であると言える。
3. Myc 及び Max タンパク質が持つロイシンジッパー部分のアミノ酸置換により、内在性の c-Myc や Max タンパク質では相互作用できないが、変異体同士では、相互作用できる Myc-Max のペアーを用いた iPS 細胞誘導では、Myc を用いた際の iPS 細胞誘導効率を促進するというメリットを維持したまま、iPS 細胞を出発材料として作製した分化細胞の移植後に起こる外来性の Myc 遺伝子の再活性化の問題を極限まで下げることができる。この方法は、L-Myc タンパク質にも応用可能であり、それ故、L-Myc タンパク質を用いることで達成された安全性をさらにもう一段階高めることができる方法として利用される可能性がある。

§2. 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①「奥田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
奥田 晶彦	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 発生・分化・再生部門	教授	H20.6～
三谷 幸之介	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門	教授	H20.6～
丸山 昌良	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 発生・分化・再生部門	助教	H20.6～H20.12
三井　薫	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門	助教	H20.6～H21.6
片野　幸	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター発生・分化・再生部門	助手	H20.6～
菱田 友昭	同上	特任研究員	H20.6～H24.1
平木　啓子	同上	特任技術員	H20.6～H25.3
来田　里奈	同上	派遣技術員	H20.6～H21.3
平林　裕香	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門	派遣技術員	H20.6～H21.3
加藤　英政	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター 発生・分化・再生部門	講師	H21.4～
加門　正義	同上	特任研究員	H21.4～H25.1
野崎　友里子	同上	特任技術員	H21.4～H.23.3
鈴木　歩	同上	博士研究員	H24.4～
平崎　正孝	同上	助教	H24.4～

研究項目

- c-Myc 遺伝子の iPS 細胞誘導促進活性の分子基盤の解明
- iPS 細胞誘導の為の分子基盤の解明
- リプログラミング因子の染色体組込みの回避

②「岡崎」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
岡崎　康司	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター ゲノム科学部門	教授	H20.6～
水野　洋介	同上	助教	H20.6～
八塚　由紀子	同上	助手	H20.6～

北里　舞	同上	派遣技術員	H20.6～H21.3
伊関　大敬	同上	特任研究員	H21.4～
徳沢　佳美	同上	博士研究員	H21.10～H22.9
山下　泉	同上	D3	H21.10～
伊関　美緒子	埼玉医科大学ゲノム医学研究センター トランスレーショナルリサーチ部門	技術員	H21.10～

研究項目
- DNA マイクロアレー解析、及びバイオインフォーマティックス解析
- Jarid2 による iPS 細胞の質、及び誘導効率の向上に関する研究

③「高橋」グループ
研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
高橋　智	筑波大学　医学医療系	教授	H20.6～
工藤　崇	同上	准教授	H20.6～
一条　裕之	筑波大学　人間総合科学研究科	准教授	H20.6～H22.3
西川　恵子	同上	技術員	H20.7～H21.3
濱田　理人	同上	研究員	H21.4～H22.3
小島　正美	筑波大学　医学医療系	非常勤研究員	H24.4～H25.3

研究項目
- キメラマウスを用いた解析
- 改良型 c-Myc/Max を用いた iPS 細胞誘導に関する研究

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

　東北大学加齢医学研究所　松井靖久先生、東京都医学総合研究所　正井久雄先生、慶應義塾大学先端生命科学研究所(山形県鶴見市)曽我朋義先生とそれぞれ、Maxホモ欠失ES細胞の生殖細胞への変換、DNA複製ストレス、メタボローム解析に関して共同研究遂行中

§3. 研究実施内容及び成果

(1) c-Myc 遺伝子の iPS 細胞誘導促進活性の分子基盤の解明(埼玉医科大学　奥田グループ)
①研究実施内容及び成果

c-Myc 遺伝子が ES 細胞の未分化性維持において重要な働きをしていることを最初に指摘したのは、2005 年の Stephen Dalton 博士らの論文 (Development 132, 885-896, 2005)であり、ES 細胞特異的な発現プロファイルを示さない遺伝子であるにも関わらず、山中伸弥博士らが、iPS 細胞誘導の為の 24 個の候補遺伝子の一つに c-Myc 遺伝子を加えたのは、この論文からの情報があったからである。そして、その 24 個の因子から、iPS 細胞誘導をサポートする因子として、最終的に Yamanaka 4 因子と呼ばれる 4 つの因子に絞られたが、c-Myc は、その 4 つの因子の一つである。この事実からも明白なように、c-Myc 遺伝子の iPS 細胞誘導促進活性を分子レベルで理解する為には、c-Myc 遺伝子の ES 細胞、及び iPS 細胞として樹立された後の c-Myc 遺伝子の機能を分子レベルで理解する必要があると考えた。Myc タンパク質は、c-Myc タンパク質の他にアミノ酸配列、及び機能において極めて類似している N-Myc、L-Myc の計 3 種類の Myc タンパク質によりファミリーを形成しているが、それら3種類の Myc タンパク質とも、ES・iPS 細胞で発現している。それ故、例えば、c-Myc 遺伝子の機能を loss of function の見地から検討することを目的に c-Myc 遺伝子のみをホモで欠失させても、functional redundancy の問題に遭遇するであろうことは容易に想像された。但し、これら 3 種類の Myc タンパク質とも、転写因子として機能する上で、パートナー因子である Max タンパク質を必要とするので、ES 細胞において Max タンパク質をコードする遺伝子をホモ欠失させれば、全ての Myc 遺伝子の機能的なノックアウト細胞に相当すると考えられる。その考えのもと、Max ホモ欠失 ES 細胞を樹立することにした。但し、Max 遺伝子の発現の消失が ES 細胞に及ぼす結果を瞬時に判定することを可能にする為に、単純な Max ホモ欠失 ES 細胞を樹立するのではなくて、Max 遺伝子とは関係のない遺伝子座(ROSA26 遺伝子座)に tetracycline (tet)-off システムと共に、Max cDNA が導入された Max ホモ欠失 ES 細胞を樹立した(図 1)。

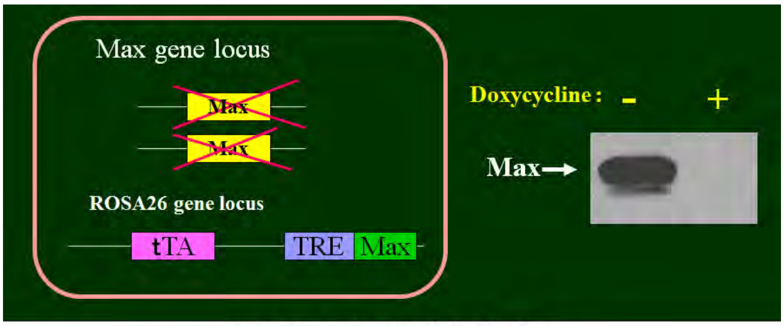


図1 Maxホモ欠失ES細胞

従って、この ES 細胞は、テトラサイクリン、あるいはその誘導体であるドキシサイクリン(Dox)の培地への添加の有無により、Max 遺伝子の発現を完全にコントロールすることができる。実際に、Max ホモ欠失 ES 細胞を Dox で処理すると、ES 細胞としての未分化性を維持できなくなるだけではなくて、アポトーシスの為、細胞の生存も維持できないことが明らかになった(図2)。このように、Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する主なフェノタイプは、ES 細胞の未分化性の消失と細胞死であったが、これら 2 つのフェノタイプは、Max 遺伝子の発現の消失に伴って決してランダムに起こるのではなくて、Max ホモ欠失 ES 細胞が細胞死のフェノタイプを呈する前段階として必ず、ES 細胞としての未分化性が消失していることがわかった。それ故、Dox 処理して 4 日後であるとか、早期の段階で、Oct3/4 と活性

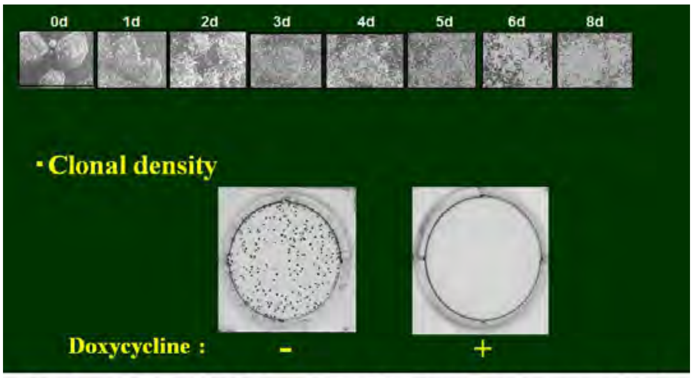


図2 Max遺伝子発現消失に伴って起こるES細胞のviablityの消失

化カスペースの両方のタンパク質に対して共免疫染色を行うと、それら２つのタンパク質の存在は、相互に排他的であることが確認できる（図 3)。このことは、ES 細胞には、未分化状態では、細胞死を起こさせないメカニズムが存在し、Max 遺伝子の発現が消失するなどのことが起こってアポトーシスを誘導する必要性が生じた際は、未分化 ES 細胞が持つ、細胞死を起こさせないメカニズムを回避する為に細胞を分化させ、その後、アポトーシスを執行するというスキームを想定させる。そして、その仮説が正しければ、Klf4 などの pluripotency マーカー遺伝子の過剰発現により、Max ホモ欠失 ES 細胞の未分化性を強制的に維持できれば、この細胞は、Max 遺伝子の発現が無くても、少なくとも、ES 細胞としての無限の自己増殖性は維持できるのではないかと考えた。そして、

図3 Max発現消失過程にあるES細胞におけるOct-3/4と活性化カスペース3の相互に排他的な発現

Oct3/4、Sox2、Klf4 などの pluripotency マーカー遺伝子が恒常的に発現する安定株を樹立した後、Max ホモ欠失 ES 細胞を Dox で処理し、それらの細胞がアポトーシスを呈さなくなるか否かを検討した。その結果、ほとんどの pluripotency マーカー遺伝子は、Max ホモ欠失 ES 細胞が呈するアポトーシスに対して変化を与えることはなかったが、Nanog の強制発現に関しては、その細胞でのアポトーシスを完全に起こらなくし、永久継代を可能にすることが明らかになった（図 4)。なお、マウス ES 細胞は、血清とサイトカインの一つである Leukemia inhibitory factor (LIF)を用いて培養することが一般的であるが、Austin Smith 博士らは、グランドステート培養条件といって、ES 細胞の分化に関係する２つのキナーゼ（MAPK と GSK3 β）に対する阻害剤を用いた新しい培養方法を報告した(Nature 453, 519-523, 2008)。この論文の中で、グランドステート培養条件下にある場合は、いわゆる従来の培養条件で培養されている場合とは異なり、c-Myc タンパク質の発現が極端に低いと報告されていた。私たちは、このことは、マウスES細胞は、LIF と血清を用いた通常培養条件下にある場合とは異なり、グランドステート培養条件下にあるマウス ES 細胞は、その未分化状態維持において Myc 活性に依存していないことを示唆するデータであると考え、実際に、Max ホモ欠失 ES 細胞をグランドステート培養条件下に曝した後、培地への Dox 添加に伴って起こるフェノタイプの変化を観察することにした。その結果、マウス ES 細胞は、グランドステート培養条件下にある場合、Max 遺伝子の発現を消失させることにより Myc 活性を完全に奪っても、ES 細胞の特質に影響を与えないことを明らかにすることができた(図 5)。この発見は、ES 細胞、あるいは iPS 細胞を用いた再生医療の実現に即、繋がるものではないが、私たちが示したデータは、Myc タンパク質は、Oct3/4 タンパク質などとは異なり、培養条件によってその必要性が異なる因子であることを示したことにある。そしてそのことは、従来よりあった、「ES 細胞、及び iPS 細胞は、癌原遺伝子である Myc に未分化性を依存しているような細胞であるから、癌と同様に危険な細胞である。」という概念を払拭した発見であると、新聞等のメディアに取り上げられた。

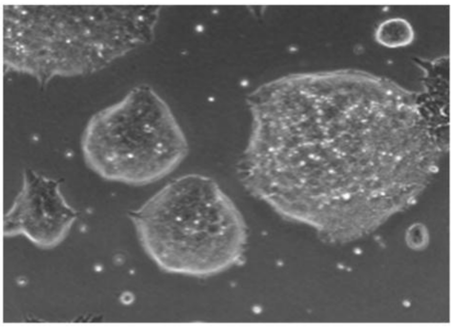


図4 Nanog-rescued Maxホモ欠失ES細胞

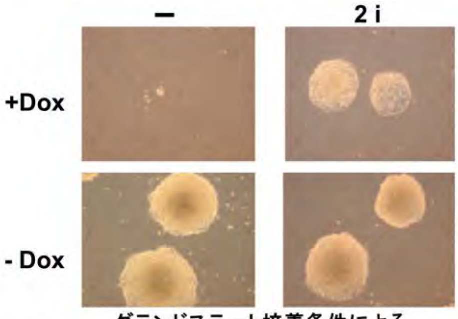


図5 グランドステート培養条件によるMaxホモ欠失ES細胞のレスキュー

Max ホモ欠失 ES 細胞の、通常培養条件下に置いた際のアポトーシスの原因追求に関する研究も行った。細胞のアポトーシス、特に ES 細胞のアポトーシスに関連するシグナルトランスダクション

因子に対する阻害剤の効果を網羅的に検討したところ、ニコチンアミド(Nam)、p38MAPK inhibitor (SB203580)、p53 inhibitor (PFTα)の3つのケミカルがヒットした。但し、これら3つの薬剤の作用点は異なるように思われた。というのは、Nam によって viability がある程度レスキューされた細胞は、pluripotency 遺伝子の発現に関しても、かなり保たれており、細胞コロニーの形態を見ても、マウス ES 細胞が示す典型的な形態である、いわゆるドーム状の形態をある程度保っているのに対して、SB203580 を用いて viability がレスキューされた細胞では、pluripotency 遺伝子の発現はほとんど検出されず、コロニーの形態も、扁平であった。なお、PFTαによりレスキューされた Max ホモ欠失 ES 細胞は、ES 細胞としての未分化度に関して Nam でレスキューされた細胞と SB203580 によりレスキューされた細胞の中間的なものであった(図 6)。すなわち、Nam でレスキューされた Max ホモ欠失 ES 細胞が、ES 細胞としての未分化度が最も高いことがわかった。なお、Nam は、Sirt と PARP の両方に対する阻害剤なので、それぞれの酵素に特異的な阻害剤(Sirt に対する阻害剤: Sirtinol; PARP に対する阻害剤: DPQ)を用いて、その効果を調べた結果、Nam によるレスキュー効果は、Sirt 活性を下げることで達成されていることが明らかになった(図 7)。かつ、私たちは、Dox で処理した Max ホモ欠失 ES 細胞では、Sirt1 の酵素活性が高まっていることも確認した。PFTαによる Max ホモ欠失 ES 細胞のレスキュー効果に関しても、p53 遺伝子発現のノックダウンで PFTαの処理で見られたのと同様な効果が見られるかといった詳細な解析を行った(図 8)。但し、PFTα処理によって viability が確保された Max ホモ欠失 ES 細胞の自己増殖性に関しての安定性は、Nam によりレスキューされた細胞のそれと比べて遥かに劣っており、実際、PFTα処理 Max ホモ欠失 ES 細胞は、数回以上の継代に耐えることができず、全て死滅してしまうことがわかった。図 9 は、Nam、PFTα、SB203580 を用いた Max ホモ欠失 ES 細胞レスキュー細胞の解析から、本 ES 細胞で起こっている未分化性の消失及び細胞死の関係している因子、及びそれら因子の作用点に関してまとめたものである。

上記のごとく Max ホモ欠失 ES 細胞が Nam の処理により、ES 細胞としての未分化性がか

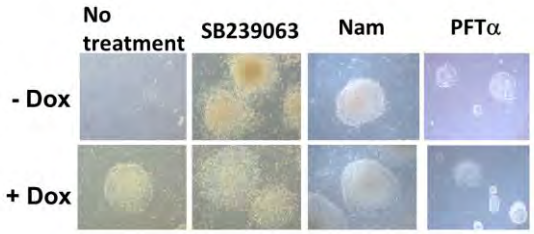


図6 MAPK, Sirt1, p53阻害剤による Maxホモ欠失ES細胞レスキュー

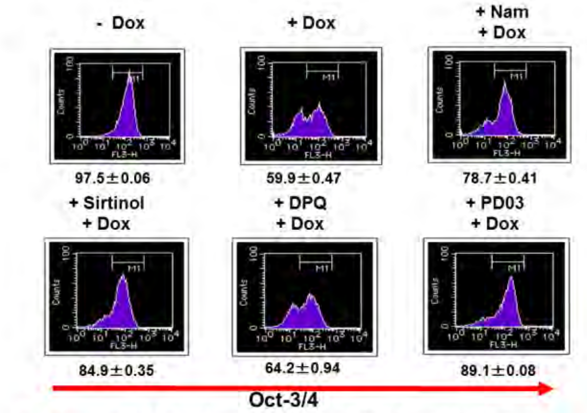


図7 Sirt1 阻害剤によるMaxホモ欠失ES細胞レスキュー

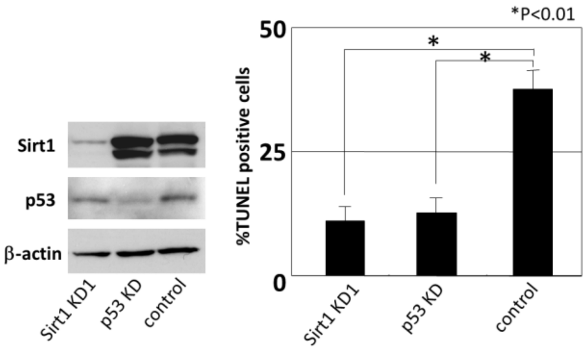


図8 p53 ノックダウンによるMaxホモ欠失ES細胞のレスキュー

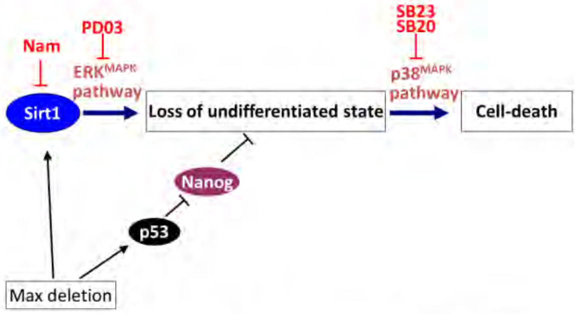


図9 Maxホモ欠失ES細胞に対してレスキュー効果を示したchemicalの作用点

なり維持できるという事実を発見できたことで、私たちは、Nam が、iPS 細胞誘導の過程において、c-Myc の代替品として機能を発揮できるのではないかという仮説を持った。但し、その仮説を支持するデータは得られず、逆に、予想に反して、Nam は、iPS 細胞誘導過程において、c-Myc による iPS 細胞誘導効率促進活性をさらに数倍高めることができることが明らかになった（図 10）。Nam による iPS 細胞誘導促進活性は、iPS 細胞誘導の初期段階に限定されており、iPS 誘導の 4 日後に処理しても、その効率においてなんら影響を与えないことがわかった。なお、Nam の iPS 誘導効率への効果は、c-Myc タンパク質を含む Yamanaka 4 因子の場合に見られ、c-Myc タンパク質を含まない Yamanaka 3 因子による iPS 細胞誘導では全く効果を発揮しないが、c-Myc タンパク質の代わりに L-Myc を用いた iPS 細胞誘導においては、c-Myc タンパク質を用いた場合と同様に Nam の効果が得られることが確認できた（図 11）。また、ヒトの線維芽細胞を出発材料に用いた iPS 細胞誘導においても、マウス胎児線維芽細胞を用いた場合と同様に、iPS 細胞誘導初期に限定して、Nam による促進効果が見られることが確認できた。Nam は、上記にあるように、Sirt と PARP の両方の活性を阻害するので、これらのデータのみでは、Nam による iPS 細胞誘導促進活性が、いずれの酵素活性の阻害に起因するものであるかはわからないが、図 12 に示すように、Sirt の活性化剤であるレズベラトロールを用いた iPS 誘導では、Nam と逆の効果が見られたことから、Nam による iPS 細胞誘導促進効果は、Sirt の酵素活性の阻害を介していると結論した。また、Nam を用いた iPS 細胞誘導促進活性として、最終的に出来上がった iPS 細胞のコロニーの数の上昇という指標以外に、iPS 誘導を下したマウス胎児線維芽細胞が、Nam で処理した場合、わずか 4 日間で、アルカリフォスファターゼ陽性細胞が出現することを見出した。この結果は、Nam は、iPS 細胞誘導の初期段階を促進することで、最終的に iPS 細胞として樹立される確率を向上させていることが強く示唆している。

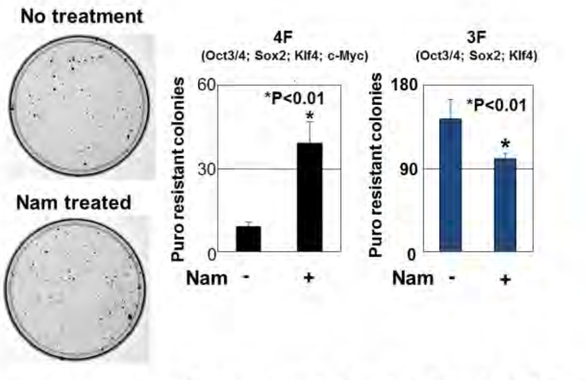


図10 c-Myc依存的なNamによるiPS細胞誘導促進作用

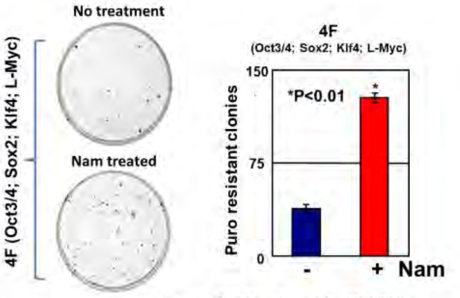


図11 L-Mycを用いたiPS細胞誘導におけるNamの促進作用

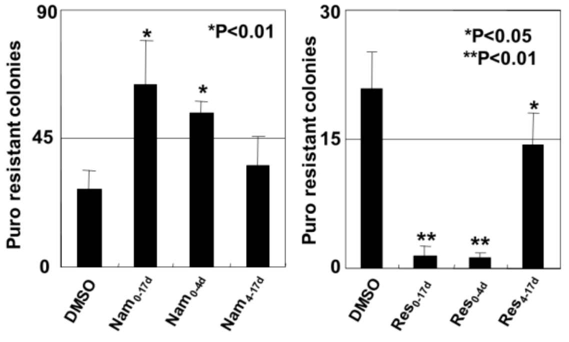


図12 レズベラトロールによるiPS細胞誘導抑制作用

iPS 細胞が樹立された当初は、iPS 細胞樹立の為に c-Myc 遺伝子は、Oct3/4 遺伝子などと同様に分化細胞のリプログラミンに必須な因子であるとされていた。但し、最初の iPS 細胞が樹立されて約 1 年後には、c-Myc なしで iPS 細胞の樹立が可能なことが示された。但し、c-Myc を使わかった場合、iPS 細胞誘導の効率は極めて低く、レトロウイルスを用いた iPS 細胞誘導系であれば、なんとか可能であるものの、プラスミドを用いるなど、より安全性の高い方法を用いた場合は、c-Myc を用いない iPS 細胞の樹立は困難を極めていた。その後、c-Myc よりも遥かに癌誘導活性が低いとされる L-Myc でも、c-Myc と同レベルの iPS 誘導促進活性が発揮されることが分かり、この問題は一件落着したかのように考えられるようになった。但し、L-Myc といえども癌原性を持った遺伝子であるので、私たちは、c-Myc から L-Myc 遺伝子の変換による安全性の向上のみに頼るのではなくて、

他の角度からもMycが持つiPS細胞誘導促進活性を安全に利用する方策を作り出すことが好ましいと考えた。c-Mycタンパク質とMaxタンパク質間の結合は、これらのタンパク質が持つロイシンジッパー領域に一部依存している。ロイシンジッパーを介した2つのタンパク質間の結合では、ロイシンなどの疎水性アミノ酸同士の相互作用が中心的な働きをしているが、それだけではなくて、このドメインに存在する酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の間での相互作用も、タンパク質間の結合に寄与している。Amati博士らは、c-Myc-Max間の結合に関わる酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸をc-MycとMaxタンパク質間でスワップさせた変異体を作製しており、これら変異c-Myc及びMaxタンパク質は、もはや内在性のc-MycやMaxタンパク質とは全く相互作用することができず、但し、これら変異体同士では、酸性、及び塩基性アミノ酸の1対1対応の関係は保たれているので、全く問題なく相互作用でき、かつ野生型のc-Myc/Max転写複合体と同様に、転写を促進することができる。私たちは、この変異c-Myc/Maxタンパク質を用いてiPS誘導を行えば、c-MycによるiPS細胞誘導促進活性をフルに利用でき、かつ、c-Mycを用いたことに伴う癌の危険性をほぼ完全に回避できるのではないかと考えた。何故ならば、c-Myc遺伝子を用いた際に危惧される癌の危険性は、iPS細胞誘導の際にリプログラミング因子として用いたc-Myc遺伝子が、染色体の中に組み込まれ、そのようにして出来上がったiPS細胞から分化細胞を調製し、治療の目的で生体に移植後に、c-Myc遺伝子が再発現してしまうことで起こることなので、変異c-Myc/Maxタンパク質ペアーを用いて作製したiPS細胞では、一つの細胞の中でたとえ、変異c-Myc遺伝子が活性化されたとしても、変異c-Mycタンパク質は内在性のMaxタンパク質とは相互作用することができないので、癌の原因になることはないと考えられる。変異c-Myc遺伝子と変異Max遺伝子の両方が、一つの細胞の中で活性化された場合は、もちろん、癌の発生の危険を伴うが、その可能性は、単一の外来遺伝子の活性化と比べて遥かにその頻度は低い筈である。それ故、c-Myc遺伝子の再発現による癌の危険性はほぼ回避できるストラテジーになっていると考えている。実際、変異c-Myc/Maxペアーを用いてiPS細胞誘導を行ったところ、期待通り、変異c-Mycと変異Maxの両者を発現した場合に限り、iPS細胞の前駆体に相当するアルカリフォスファターゼ陽性細胞コロニー形成の上昇が見られた(図13)。これらの細胞を、iPS細胞として成熟させた後、高橋グループの協力を得て、キメラマウスを作製し、癌発生が起こるか否か経過観察した。その結果、野生型c-Myc遺伝子を用いて作製したiPS細胞を用いたキメラマウスでは高頻度で癌の発生が見られたが、変異c-Myc/Maxペアーを用いて作製したiPS細胞を用いて作製したキメラマウスでは癌の発生が今のところ起こっていない。

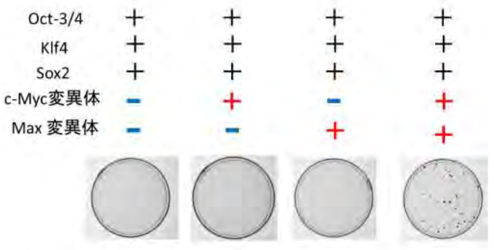


図13 c-Myc・Max変異体ペアーによるiPS細胞誘導

なお、Mycタンパク質が、三胚葉への分化多能性を持ったES細胞で重要な働きをしていることはよく知られた事実であるが、ES細胞と同様に三胚葉への分化多能性を持ったEpiblast幹細胞(EpiSC)でも重要な働きをしているか否かは明らかにされていない。また、真のiPS細胞とは異なり、リプログラミングが不十分なpartial iPS細胞では、主にMyc遺伝子によって発現レベルが支配されているMycモジュール遺伝子群の発現が概ね高いことが知られているが、ES・iPS細胞と同様に、これらの遺伝子の発現がpartial iPS細胞が呈する安定的な自己増殖にどれだけ貢献しているかは未だ示されたことはない。そこで、まず、EpiSCにおける遺伝子発現データとしてGene Expression Omnibusに登録され

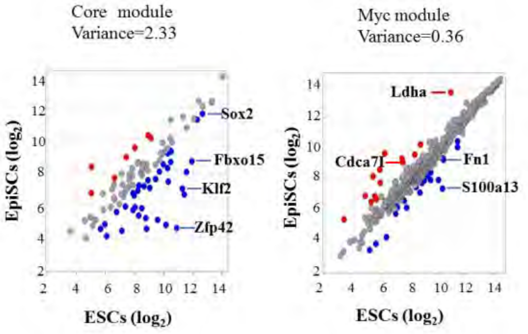


図14 ES細胞及びEpiblast幹細胞におけるMycモジュール遺伝子メンバーの発現の驚くべき保存性

ているデータから、503 個の遺伝子により構成される Myc モジュール遺伝子の発現データを抽出し、それらの遺伝子発現の平均値を ES 細胞におけるそれと比較したところ、同レベルであることが明らかになった。さらに、スキャタープロット解析により個々の遺伝子に関して、ES 細胞と EpiSC における遺伝子発現のレベルを比較したところ、Myc モジュール遺伝子群に属する遺伝子の 90%以上の遺伝子が、ES 細胞と EpiSC において同等なレベルの発現を維持していることが明らかになった（図 14）。かつ、同様なことが、iPS 細胞と partial iPS 細胞間の比較においても認められた（図 15）。

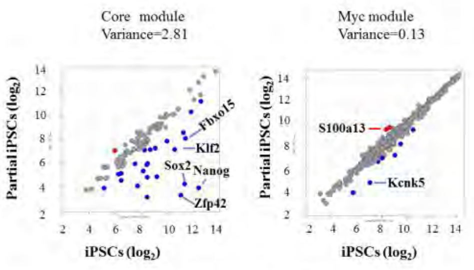


図15 iPS細胞及びPartial iPS細胞間でのMycモジュール遺伝子メンバーの発現の保存性

これらの結果は、ES 細胞、EpiSC、partial iPS 細胞と、全く性質の異なる 3 種類の細胞種において、Myc モジュール遺伝子群は、共通の役割を果たしていることを強く示唆している。これら 3 種類の細胞における共通な性質は、安定な自己増殖性であるので、その可能性を検討する為に、tet on システムにより、c-Myc の発現がコントロールできる partial iPS 細胞を樹立し、その partial 細胞の自己増殖性が、Dox の添加の有無により、違いが生ずるか否かを検討した。その結果、図 16 に示すように、この partial iPS 細胞は、Dox を除くことで、外来性の c-Myc 遺伝子の発現を消失させると、細胞の増殖がほぼ完全にストップすることがわかった。

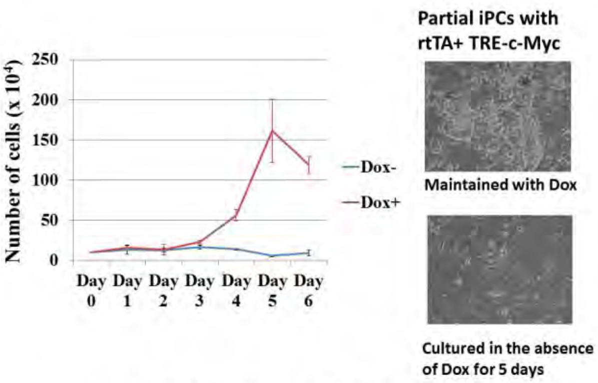


図16 partial iPS細胞の外来性c-Myc遺伝子依存的な細胞増殖

(2) partial iPS 細胞から、iPS 細胞へ変換させる能力を持った遺伝子の同定・機能解析（埼玉医科大学　奥田グループ）

①研究実施内容及び成果

iPS 細胞誘導には 2～3 週間という極めて長い時間を必要とする。それ故、iPS 細胞誘導過程で起こっている現象を全て分子のレベルで理解することは大変難しい。partial iPS 細胞とは、真の iPS 細胞と比べて、リプログラミングが不十分な細胞である。但し、真の iPS 細胞同様、極めて安定的に増殖維持できる細胞であるため、iPS 細胞を得ることを目的とした iPS 誘導を下した細胞集団の中で、真の iPS 細胞よりも、むしろ partial iPS 細胞が大部分を占めるということをしばしば経験する。なお、バイオインフォーマティックス解析などから、partial iPS 細胞は、分化細胞から iPS 細胞になるための途中のある段階にある細胞ではなくて、むしろ、iPS 細胞になる為の正規のルートを多少逸脱した状態にある細胞であることが示唆されている。それ故、一つには、iPS 細胞誘導を下した細胞が、partial iPS 細胞に陥らない方法を開発することが重要であり、また、partial iPS 細胞状態に陥った細胞を iPS 誘導過程の正規のルートに戻す方法を開発することも、iPS 細胞誘導効率を向上させるといった意味から必要になってくる。また、partial iPS 細胞は、iPS 誘導の正規のルートから外れているとはいえ、リプログラミング状態は、体細胞よりも iPS 細胞に遥かに近い状態にあるので、partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換を司る分子メカニズムの解明は、iPS 細胞誘導の最後の段階の解明に繋がる可能性が高いと考えられる。なお、partial iPS 細胞は、グランドステート培養条件下に細胞を曝すと速やかに iPS 細胞に変換するが、何故、partial iPS 細胞をその条件に置くと iPS 細胞になるかということに関しての分子メカニズムは全くわかっていない。私たちは、このような状況を踏まえ、partial iPS 細胞から iPS 細胞の変換に関与する遺伝子を同定する為に、piggyBAC ベクターを用いたゲノムワイドなスクリーニングを行った。

この目的を達成する為にまず、自分たちの partial iPS 細胞と呼べるクローンを樹立することにした。レトロウイルスを用いた山中 4 因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)に加え、DsRed を発現するレトロウイルスを作製し、Nanog-GFP レポーター遺伝子を持つ MEF 細胞に感染させた。そして、感染後2週間経過した時点で、Nanog 遺伝子の発現の指標である GFP の発現はなく、レトロウイルス由来の DsRed の発現が保たれている 100 個の細胞コロニーを partial iPS 細胞の候補として回収し、培養維持の過程で、pluripotency マーカー遺伝子の発現の有無を調べるなどの解析から、partial iPS 細胞としての定義に合致する 2 種類のクローン(2B1, 5C5)を樹立した。そして、それらのクローンにおける網羅的な遺伝子発現を明らかにする為に DNA マイクロアレー解析を行い、既に他のグループにより partial iPS 細胞として報告されている細胞における遺伝子発現との類似性に関して、クラスタリング解析を行った。その結果、図 17 に示すように、私たちが樹立した partial iPS 細胞と、他のグループが報告している partial iPS 細胞は、遺伝子発現の類似性という分類において、同じクラスター内に位置することが確認できた。

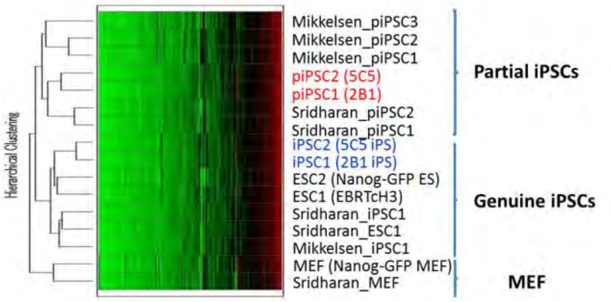


図17 各種partial iPS、iPS、MEFに関してのクラスタリング解析

上記のごとく、私たちの研究室でも、他のグループから報告されている partial iPS 細胞とほぼ同等と考えられる細胞が得られたので、その次のステップとして、この partial iPS 細胞から真の iPS 細胞への変換を司ることができる遺伝子の同定を目的としたゲノムワイドなスクリーニングを行った。実験系としては、murine stem cell virus (MSCV)由来のエンハンサー/プロモーターを持つ piggyBAC ベクターを partial iPS 細胞のゲノムのランダムな位置に挿入させると、piggyBAC ベクターの挿入位置のすぐ下流に位置するゲノム遺伝子は MSCV の作用により強制的に発現するようになる。そして、そのように MSCV エンハンサー/プロモーターの影響により、高発現するようになった遺伝子が、partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換できる機能を持った遺伝子であれば、その細胞は、GFP 陽性細胞として回収されることになる。実際にこの piggyBAC ベクターを partial iPS 細胞に導入したところ、GFP レポーター遺伝子を発現するようになった 3 つのクローンが得られた(図 18)。これら 3 つのクローンでは、それぞれ、ZW10、MCSF、Cnot2 遺伝子の発現が、piggyBAC ベクターの挿入により活性化されていることがわかったが、Cnot2 遺伝子が活性化されて GFP レポーター遺伝子を発現するようになったクローンが、レトロウイルス遺伝子の発現が完全にシャットオフされているなど、得られたクローンの iPS 細胞の質という点において最も優れていたので、それ以降の実験は、partial iPS 細胞からの iPS 細胞への変換における Cnot2 遺伝子の発現の重要性に的を絞って研究を行った。Cnot2 タンパク質は様々な機能を有する Ccr4-Not complex の中の一つのサブユニットであり、その複合体のコアは、Cnot1、Cnot2、Cnot3 の 3 つのタンパク質により構成される。また、クロマチン免疫沈降実験から、Cnot3 と Trim28 がゲノムの多くの場所で近接して存在することが示されているので、本研究では、piggyBAC ベクターを用いたゲノムワイドなスクリーニングにより同定された Cnot2 のみならず、Cnot1、Cnot3、及び Trim28 についても機能解析を行うことにした。

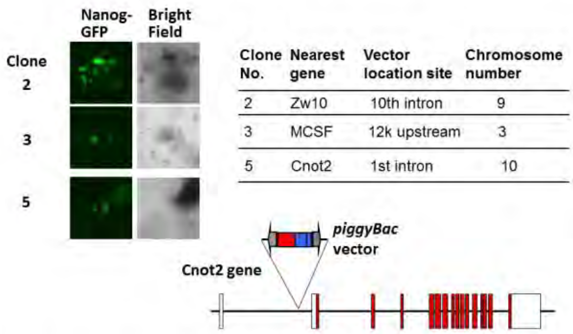


図18 piggyBACベクターを用いたゲノムワイドなスクリーニングにより得られた3つのクローン

まず行った実験は、partial iPS 細胞をグランドステート培養条件下に置くことに伴って起こる iPS 細胞への変換において、Cnot2 因子をはじめとしたこれらの因子が重要な役割を担っているか否かをノックダウン実験により検討することにした。その結果、図 19 に示すように、これらすべての因子が、グランドステート培養条件に伴って起こる partial iPS 細胞の iPS 細胞への変換に関与していることが示唆された。その次の実験として、Cnot2 遺伝子などの強制発現により GFP 陽性の細胞が得られるか否か検討した。但し、この実験からは期待するデータは得られず、ほとんどの細胞は、iPS 細胞へと変換することなく、partial iPS 細胞として留まることがわかった。しかしながら、Cnot2 と Trim28 など、複数の因子を同時に発現させると、グランドステート培養条件下に曝すことによる効果と比べれば極めて低いレベルではあるものの、Cnot2 などを単独で発現させるよりも大きな効果は得られた(図 20)。

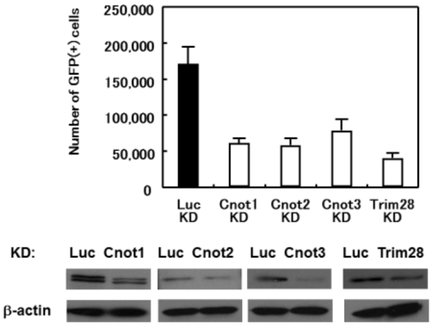


図19 グランドステート培養条件下によるpartial iPS細胞のiPS細胞への変換におけるCnot/Trim28各因子ノックダウンの影響

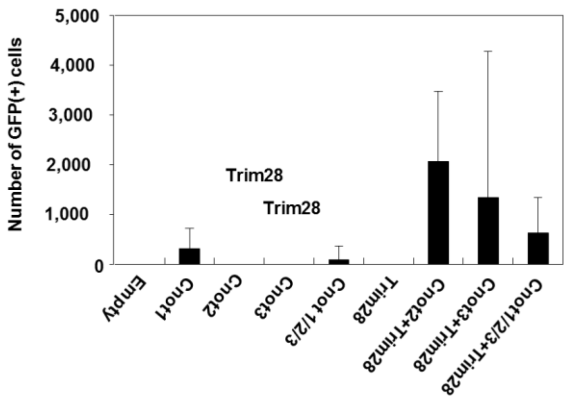


図20 Cnot/Trim28強制発現によるpartial iPS細胞のiPS細胞への変換

上記にあるように、piggyBAC ベクターを用いたゲノムワイドな解析では、Cnot2 遺伝子発現単独の活性化により、partial iPS 細胞から iPS 細胞へ変換させることが可能であることが示唆されたが、その後に行った強制発現実験では、Cnot2 及びそれら関連遺伝子の発現では、複数の因子を同時に発現させた場合でさえも、ほとんどの partial iPS 細胞が、その状態を脱し、真の iPS 細胞へ変換できないことがわかった訳である。それ故、piggyBAC ベクターを用いたゲノムワイドなスクリーンにおいて、Cnot2 遺伝子が高発現することで iPS 細胞に変換した細胞は、partial iPS 細胞集団の中でエリート細胞とでも呼べる細胞であって、その細胞のみは、iPS 細胞に変換する為に必要な Cnot2 以外の因子は揃っていたのではないかと推測している。たとえそうであったとしても、私たちは Cnot2 及びその他の関連因子の強制発現により、partial iPS 細胞は、何らかの要素において、iPS 細胞に近づいている可能性があると考えた。それ故、私たちは、DNA マイクロアレー解析により partial iPS 細胞と、Cnot2 因子などを強制発現させた partial iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルを明らかにし、Cnot2 因子などを強制発現させたことによって発現が変化した遺伝子群を同定した。まず、Cnot2 因子などの強制発現により、発現のレベルが低下する遺伝子について解析を進めることにした。その結果、Cnot1，2，3 によって共通に発現が低下する遺伝子が 551 個同定され、一方、Trim28 遺伝子の強制発現により発現が低下する遺伝子が 315 個同定された。そして、それらの遺伝子の中で、210 個の遺伝子は、両者に共通していることがわかった(図 21)。図 21A にあるように、Cnot あるいは Trim28 のいずれかにより発現が低下する遺伝子と、両者で共通に低下する遺伝子の 3 つのグループに分け、それぞれの遺伝子群に関して、

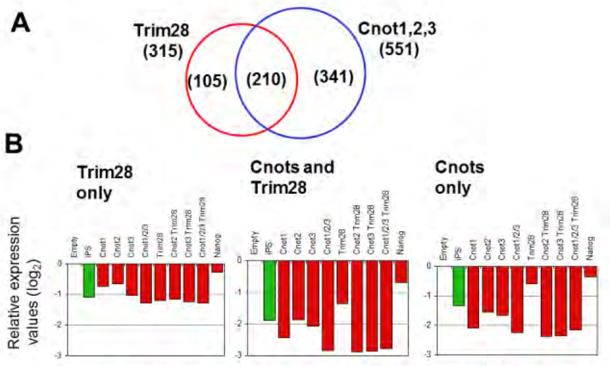


図21 Partial iPS細胞でのCnot/Trim28強制発現により遺伝子発現が低下する遺伝子

図 22B にある状態の細胞における遺伝子の発現レベルを比較した。その結果、Cnot2 及びその他の関連因子の強制発現によって発現が低下したこれら 3 種類の遺伝子群の平均値は、partial iPS 細胞状態にある場合と比べて低値を示すことが明らかになった。また、興味深いことには partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換にたいして強力に作用する Nanog 強制発現細胞では、ここにある 3 種類の遺伝子群の発現に関してはほとんど影響を与えないことがわかった。そして、このことは、partial iPS 細胞からの iPS 細胞への変換における Cnot2 及びその関連遺伝子の役割と Nanog 遺伝子の役割は大きく異なることを示唆するデータであると考えている。これら Cnot2 及びその関連遺伝子により発現が低下した遺伝子の機能的な意味付けの為に Gene Ontology(GO)解析を行った。その結果、Cnot 因子のみ、及び Cnot と Trim28 の両方に共通して発現が低下した遺伝子群は、tissue morphogenesis であるとか、pattern specification process といった発生分化に関わる遺伝子が濃縮されていることがわかった（図 22A）。すなわち、これらの結果は、partial iPS 細胞から iPS 細胞への変換における Cnot2 及びその関連遺伝子の役割は、iPS 細胞と比べて比較的発現が高い発生分化関連遺伝子の発現を抑えることであることを強く示唆している。これらの結果を踏まえ、図 23 に示すモデルを提唱した。なお、Cnot2 及びその関連遺伝子により発現が上昇する遺伝子群に関しても同様な解析を行ったが、それら因子によって発現が上昇する遺伝子のほとんどは、partial iPS 状態と比べて iPS 細胞状態で高値を示しておらず、かつ、GO 解析に関しても遺伝子発現の上昇に関しての生物学的機能を示唆するデータはえられなかった(図 25B)。それ故、iPS 細胞への変換におけるこれらの遺伝子の意義はよくわからなかった。

図22 Partial iPS細胞において、Cnot/Trim強制発現により発現レベルが変化する遺伝子のGene Ontology解析

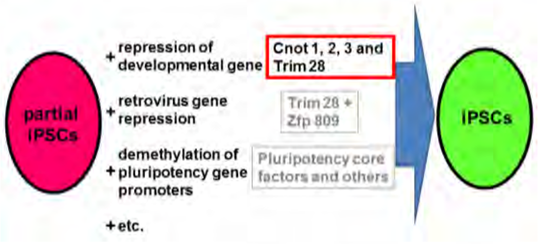


図23 Partial iPS細胞からiPS細胞への変換に必要な様々な変化の中でのCnot/Trim28因子の役割

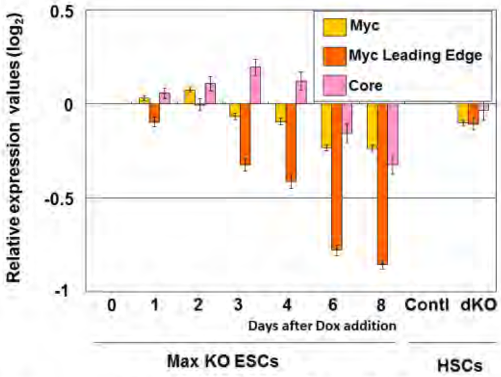


図24 Max発現消失に伴うCore及びMycモジュール遺伝子発現の変化

(3) DNA マイクロアレー解析、及びバイオインフォーマティックス解析（埼玉医科大学　岡崎グループ）

①研究実施内容及び成果

岡崎グループの本研究プロジェクト全体での役割の一つは、研究代表者である奥田グループが作製する遺伝子改変 ES 細胞であるとか、様々な方法で作製された iPS 細胞における遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレー解析により決定し、それらのデータを用いてバイオインフォーマティックス解析を行うことである。具体的には、c-Myc 研究に関して、Max ホモ欠失 ES 細胞において、Core、Myc モジュールと呼ばれる遺伝子群の発現の変化をモニターした(図 24)。その他、遺伝子発現プロファイル解析から、Nanog 強制発現や、グランドステート培養条件を用いてレスキューした Max ホモ欠失 ES 細胞が真に ES 細胞として維持されているという証拠を提供した。

(4) 卵母細胞、及び ES 細胞の両方において高発現している遺伝子の中からの iPS 細胞誘導効率向上、及び時短化を促すことができる因子の同定（埼玉医科大学　岡崎グループ）

①研究実施内容及び成果

iPS 細胞誘導は長期間の時間を要するのみならず、元来、偶発的な反応であるため、極めて効率の悪い反応である。それ故、iPS 細胞誘導の効率を高める遺伝子・化学物質を同定することが重要である。本グループは、リプログラミン活性を持つ卵母細胞と、ES 細胞に共通して高発現している遺伝子を候補遺伝子として、それらの中に iPS 細胞誘導の効率化、あるいは時短化を促進する因子を検索した。その結果、クロマチン関連因子など、いくつかの因子を同定することができた。かつ、Yamanaka 4 因子に加え、それらの因子も含めて作製した iPS 細胞は、レトロウイルス遺伝子の発現抑制が完全であるなど、iPS 細胞としての質に関しても優れていることを明らかにすることができた。

図25　Maxホモ欠失ES細胞を用いたキメラマウス解析

(5) キメラマウスを用いた解析（筑波大学　高橋グループ）

①研究実施内容及び成果

高橋グループの本研究プロジェクト全体での役割の一つは、研究代表者である奥田グループが行う研究に対してマウス個体を用いた in vivo 機能解析という側面からサポートすることである。図 25 は、グランドステート培養条件下にあった Max ホモ欠失 ES 細胞が、ES 細胞としての特質を失うことなく長期間、培養維持できていたことの証明として、ES 細胞としての最も厳密な証明方法であるキメラマウス解析により証明したものである。

(6) 改良型 c-Myc/Max を用いた iPS 細胞誘導に関する研究（筑波大学　高橋グループ）

①研究実施内容及び成果

内在性の c-Myc や Max タンパク質とは全く相互作用することができず、但し、これら変異体同士では、全く問題なく相互作用でき、かつ野生型の c-Myc/Max 転写複合体と同様に、転写を促進することができる c-Myc/Max 変異体のペアーを用いることで、Myc 遺伝子の発現の再活性化による癌の発生の問題を回避する方法の確立に関して、iPS 細胞の樹立までは奥田グループで行われたが、Blastcyst インジェクションによるキメラマウスの作製、及びそれらキメラマウスにおける癌の発生頻度を検討する実験は高橋グループが担当した。最初の目的では、キメラマウスからヘテロマウスを作製し、そのヘテロマウスにおける癌の発生頻度をモニターする予定であったが、何故がそれができず、それ故、キメラマウスを用いて解析を行った。その結果、野生型の c-Myc 遺伝子を用いた場合は、生後 6 ヶ月以内に確実に癌を発症したのに対して、変異 c-Myc/Max ペアーを用いて樹立した iPS 細胞由来のキメラマウスでは、少なくとも生後 1 年間は 1 匹も癌を発症しないことがわかった。なお、図 26 は、その解析に用いたキメラマウスである。最近では、iPS 細胞に c-Myc 遺伝子を用いる代わりに、癌原性が極めて低い L-Myc を用いるケースがほとんどであるが、L-Myc といえども、全く癌原性が無いわけではなく、変異 c-Myc/Max ペアーを用いる方法は L-Myc/Max 複合体にも応用できるので、L-Myc の安全性をさらに高める方法として活用できると考えている。

図26　変異c-Myc/Maxペアーを用いて作製したiPS細胞からのキメラマウス

§4. 成果発表等

(1)原著論文発表　(国内(和文)誌 0 件、国際（欧文）誌 12 件)

1. Zhang J, Nomura J, Maruyama M, Nishimoto M, Muramtsu M, Okuda A. Identification of an ES cell pluripotent state-specifci DUSP6 enhancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**: 319-323, 2009. (DOI:10.1016/j.bbrc.2008.11.068)
2. Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Okuda A. Differential requirement of Nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells* **27**:1066-1076, 2009 (DOI:10.1002/stem.44)
3. Suzuki K, Ohbayashi F, Nikaido I, Okuda A, Takaki H, Okazaki Y and Mitani K. Integration of exogenous DNA into mouse embryonic stem cell chromosome shows preference into genes and frequent modification at junctions. *Chromosome Res.*, **18**, 2, 191-201, 2010 (DOI: 10.1007/s10577-010-9111-5)
4. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, Okuda A. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex -independent mechanisms. *Cell Stem Cell*, **9**, 37-49, 2011 (DOI: 10.1016/j.stem.2011.04.020)
5. Mariani J, Favaro R, Lancini C, Vaccari G, Ferri AL, Bertolini J, Tonoli D, Latorre E, Caccia R, Ronchi A, Ottolenghi S, Miyagi S, Okuda A, Zappavigna V and Nicolis SK. Emx2 is a dose-dependent negative regulator of Sox2 telencephalic enhancers. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6461-6476, 2012 (DOI:10.1093/nar/gks295)
6. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Iseki H, Katano M, Kamon M, Hirasaki M, Nishimoto M, Okazaki Y, Okuda A. Sirt1, p53 and p38MAPK are crucial regulators of detrimental phenotypes of ESCs with *Max* expression ablation. *Stem Cells*, **30**, 1634-1644, 2012 (DOI:10.1002/stem.1147)
7. Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**:6412-7, 2013 (DOI:10.1073/pnas.1220200110)
8. Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A, Matsui Y. Max was identified as a repressor of germ-cell related gene expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Commun.* **4**:1754, 2013 (DOI:10.1038/ncomms2780)
9. Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, Hirasaki M, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Katsura Y, Satta Y, Deakin JE, Graves JA, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Ema M, Takahashi S, Kato H, Okuda A. In vivo function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1. *PLoS One* **8**:e68119, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0068119)
10. Uema N, Ooshio T, Harada K, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA, Katano M, Soga T, Nakamura Y, Okuda A, Hirao A. Abundant nucleostemin expression supports the undifferentiated properties of germ cell tumors. *Am J Pathol* **183**:592-603, 2013 (DOI:10.1016/j.ajpath.2013.04.018)
11. Hirasaki M, Hiraki-Kamon K, Kamon M, Suzuki A, Katano M, Nishimoto M, Okuda A. Striking similarity in the gene expression levels of individual Myc module members among ESCs, EpiSCs, and partial iPSCs. *PLoS One* **8**:e83769, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0083769)
12. Kamon M, Katano M, Hiraki K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-Not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* (in press) (DOI:10.1089/scd.2013.0326)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 奥田晶彦 「iPS 細胞誘導の為の分子基盤の解明による安全性の確保」*日本再生医療学会雑誌　再生医療　特集(iPS 細胞研究の最前線)* p27-29, 2008.8
2. Miyagi S, Kato H and Okuda A. Role of SoxB1 transcription factors in development. *Cell Mol Life Sci* **66**: 3675-3684, 2009
3. 片野幸、野村淳、加藤英政、奥田晶彦 「癌細胞と幹細胞で発現する Nucleostemin 遺伝子の役割」 *細胞周期フロンティア　佐方功幸、稲垣昌樹、岸本健雄編* pp.225-229, 2010
4. 菱田友昭、奥田晶彦 「ES 細胞における Myc-Max 転写複合体に非依存的な自己増殖能」 *ライフサイエンス新着論文レビュー*
(http://first.lifesciencedb.jp/archives/3286#more-3286 2011 年 7 月 22 日)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 2 件、国際会議 1 件)

1. Okuda A. "Role of Sox2 in mouse developmental brain" 2nd Sox meeting organized by Dr. Hisato Kondoh at Osaka University (Awajishima, Hyogo, Japan September 16 ~ 19, 2008)
2. 奥田晶彦、菱田友昭 「Myc/Max 転写複合体非存在下における ES 細胞の無限の自己増殖性」 第 10 回日本再生医療学会年会　シンポジウム(2S-1) iPS・ES 細胞の万能性と維持機構の解明　～Pluripotency の正体とは～(東京都新宿区 2011 年 3 月 2 日)
3. 奥田晶彦 「iPS 細胞研究の最前線から ～基礎研究と今後の展望について～」 第 42 回埼玉県医学検査学会 (埼玉県大宮市、大宮ソニックシティー 2013 年 12 月 1 日)

② 口頭発表 (国内会議 14 件、国際会議 2 件)

1. 奥田晶彦 「ES 細胞と神経幹細胞の増殖・生存における Nucleostemin 遺伝子の重要度の違い」 第6回 RCGM フロンティア国際シンポジウム (埼玉、2008 年 10 月 25 日)
2. Okuda A, Katano M, Kato H, Masui S and Nomura J. "Differential requirement of nucleostemin for cell viability between ES cells and neural stem cells." 第7回幹細胞シンポジウム (東京、2009 年 5 月15～16 日)
3. 奥田晶彦 「iPS 細胞誘導の為の分子基盤の解明による安全性の確保」 再生医療の実現化プロジェクト　第 2 回　夏のワークショップ (熱海、2009 年 7 月 16 日～17 日)
4. 奥田晶彦、野村　淳、片野　幸、加藤英政、水野洋介、岡崎康司 「ES 細胞における p53 の安定性の調節因子としての Nucleostemin の役割」第 82 回日本生化学会大会 (神戸、2009 年 10 月 21～24 日)
5. 奥田晶彦 「ground state と通常状態における ES 細胞の未分化状態維持に必要な転写因子の違い」第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム (埼玉県日高市、2009 年 11 月 3 日)
6. 奥田晶彦 「ES・iPS 細胞の外部刺激から遮断された ground state における転写ﾈｯﾄﾜｰｸ」 第 9 回 RCGM シンポジウム (埼玉県日高市　埼玉医科大学、2010 年 11 月 3 日)
7. Katano M, Kato H, Nomura J and Okuda A. "The Nexus between Nucleostemin and Nanog for the maintenance of ES cell pluripotency" 第33回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市　神戸ポートアイランド、2010 年 12 月 10 日)(一般ポスターからの選出、口頭発表者　片野)
8. 奥田晶彦 「ES 細胞の無限の増殖における c-Myc/Max 転写複合体の役割」広島大学原爆医療研究所分子疫学セミナー (広島県広島市広島大学原爆医療研究所 2010 年 12 月 13 日)
9. Hishida T and Okuda A. "Ground state condition renders Myc activity redundant in ES cells for their indefinite self-renewal" 第 9 回幹細胞シンポジウム (東京都港区　泉ガーデンギャラリー 2011 年 5 月 14 日)
10. 奥田晶彦 「iPS 細胞誘導過程、及び pluripotency 獲得後における c-Myc/Max 転写複合体の役割」 再生医療実現化プロジェクト　第 4 回夏のワークショップ (大阪市 TKP 大阪梅田ビジネスセンター 2011 年 7 月 8 日)

11. 加門正義、菱田友昭、平木啓子、片野幸、西本正純、加藤英政、奥田晶彦 「Partial iPS 細胞を真の iPS 細胞へと変換する能力を持つ遺伝子のゲノムワイドスクリーニングによる同定」第 34 回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日）（一般ポスターからの選出、発表者 加門）
12. Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Kato H and Okuda A. “Eutherian-specific UTF1 gene is critical for the placental growth” 第 34 回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日）（一般ポスターからの選出、発表者 西本）
13. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M and Okuda A. “Context-dependent requirement of Myc/Max complexes for the maintenance of the indefinite self-renewal of ES cells” 第 34 回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日）（一般ポスターからの選出、発表者 菱田）
14. Moriyama Y, Kato H, Hiraki K, Funayama S, Okazaki Y and Okuda A. “Reprogramming human cells into a humanized ground state” 第 34 回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日）（一般ポスターからの選出、発表者 船山）
15. 奥田晶彦 「分子メカニズムの解明に基づいた iPS 細胞誘導過程の洗練化」広島大学原爆医療研究所分子疫学セミナー （広島県広島市広島大学原爆医療研究所 2011 年 12 月 21 日）
16. Okuda A. “Underlying the molecular bases of cell death phenotype of *Max*-null embryonic stem cells” Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming Asia-2013 Meeting（東京、東京大学 山上会館 2013 年 11 月 25-26 日）

③ ポスター発表 （国内会議 25 件、国際会議 8 件）

1. Maruyama M, Nomura J, Masui S, Nishimoto M and Okuda A “Differential requirement of nucleostemin for cell viability between ES cells and neural stem cells.” 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 （神戸、2008 年 12 月 9～12 日）
2. Zhang J, Nomura J, Maruyama M, Nishimoto M and Okuda A. “Identification of regulatory enhancer of DUSP6 gene which supports pluripotent state specific gene expression in ES cells.” 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会大会 合同大会 （神戸、2008 年 12 月 9～12 日）
3. 菱田友昭、加藤英政、西本正純、奥田晶彦 「ES 細胞の viability 維持における c-Myc/Max 複合体の役割」第 82 回日本生化学会大会 （神戸、2009 年 10 月 21～24 日）
4. 片野幸、野村淳、西本正純、加藤英政、奥田晶彦 「マウス ES 細胞における p53 活性制御因子としての Nucleostemin の役割」第 32 回日本分子生物学会年会 （横浜、2009 年 12 月 9 日～12 日）
5. 菱田友昭、野崎友里子、加藤英政、西本正純、奥田晶彦 「Myc/Max 複合体は ES 細胞の viability 維持に必須である」第 32 回日本分子生物学会年会 （横浜、2009 年 12 月 9 日～12 日）
6. 西本正純、片野幸、山岸敏之、菱田友昭、野村淳、丸山昌良、鍋島曜子、鍋島陽一、加藤英政、奥田晶彦「UTF1 は胎盤の成長に寄与している」第 32 回日本分子生物学会年会 （横浜、2009 年 12 月 9 日～12 日）
7. 菱田友昭、野崎友里子、加藤英政、西本正純、奥田晶彦 「c-Myc/Max 複合体はES細胞の LIF を介した自己複製及び分化多能性維持に必須である」 第33回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 （神戸市 神戸ポートアイランド、2010 年 12 月 10 日）
8. 西本正純、加藤英政、片野幸、山岸敏之、菱田友昭、加門正義、鍋島曜子、鍋島陽一、奥田晶彦 「胎盤を持つ哺乳類に特異的ない遺伝子の一つである UTF1 遺伝子の胎盤形成における役割」第33回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 （神戸市 神

戸ポートアイランド、2010年12月10日）

9. 加門正義、加藤英政、菱田友昭、平木啓子、片野幸、西本正純、奥田晶彦 “Establishment of partial iPS representing a novel intermediated state which are more advanced than those previously reported.” 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 （神戸市 神戸ポートアイランド、2010年12月10日）
10. Hiraki K, Kato H, Takada H, Araki T and Okuda A. “Culturing human iPS cells under non-feeder conditions alters their basic pluripotent status.” 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 （神戸市 神戸ポートアイランド、2010年12月10日）
11. 鈴木啓一郎、大林富美、二階堂愛、奥田晶彦、高木晴良、岡崎康司、三谷幸之介 「哺乳動物細胞における外来 DNA の染色体組込み部位の解析:不正確な非相同末端結合による発現遺伝子領域内への組込み」 第33回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 （神戸市 神戸ポートアイランド、2010年12月7日）
12. Okuda A, Hishida T, Nozaki Y, Kato H. “No requirement of c-Myc/Max transcriptional complex for maintaining cell viability and pluripotency of ES cells cultured with 2i + LIF condition.” ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, USA June 16-19, 2010
13. Katano M, Kato H, Nomura J and Okuda A. “The nexus between Nucleostemin and LIF/STAT signaling of mouse ES cells” 第34回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011年12月13日）
14. 加門正義、菱田友昭、平木啓子、片野 幸、西本正純、加藤英政、奥田晶彦 「Partial iPS細胞を真のiPS細胞へと変換する能力を持つ遺伝子のゲノムワイドスクリーニングによる同定」第34回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011年12月13日）（一般ポスターからの選出、発表者 加門）
15. Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Kato H and Okuda A. “Eutherian-specific UTF1 gene is critical for the placental growth” 第34回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011年12月13日）（一般ポスターからの選出、発表者 西本）
16. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, and Okuda A. “Context-dependent requirement of Myc/Max complexes for the maintenance of the indefinite self-renewal of ES cells” 第 34 回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011年12月13日）（一般ポスターからの選出、発表者 菱田）
17. Moriyama Y, Kato H, Hiraki K, Funayama S, Okazaki Y and Okuda A. “Reprogramming human cells into a humanized ground state” 第34回日本分子生物学会年会 （横浜、パシフィコ横浜、2011年12月13日）（一般ポスターからの選出、発表者 船山）
18. Okuda A and Hishida T. “Myc activity can be eliminated in ES cells under 2i condition without affecting their indefinite self-renewal propensity” 9th annual meeting of ISSCR (Toronto, Canada, 2011年6月16日)
19. Okuda A. “Placental development depends on Eutherian mammal-specific UTF1 gene” The 8th Okazaki Biology Conference: Specification and Adaptation -Environment and Epigenetics- (Okazaki, Aichi, Japan 2012年3月18日)
20. 加藤英政、平木啓子、森山陽介、船山静香、奥田晶彦「ヒト iPS 細胞の真の分化多能性を引き出す」第35回日本分子生物学会年会 （福岡、福岡国際会議場、2012年12月11日）
21. 前田郁麻、時武裕子、三瀬名丹、阿部訓也、野瀬俊明、奥田晶彦、立花 誠、松居靖久「MaxはES細胞における生殖細胞関連遺伝子群の抑制因子である」第35回日本分子生物学会年会 （福岡、福岡国際会議場、2012年12月12日）
22. 西本正純、片野 幸、山岸敏之、菱田友昭、加門正義、鍋島曜子、桂有加子、颯田葉子、Janine Deakin、Jennifer Graves、黒木洋子、小野竜一、石野史敏、加藤英政、奥田晶彦

「真獣類特異的遺伝子 UTF1 は胎盤の増殖を促進する」第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡、福岡国際会議場、2012 年 12 月 13 日)

23. 鈴木　歩、菱田友昭、平崎正孝、奥田晶彦「Max からの制御を離れた c-Myc タンパク質は、ES 細胞において細胞死を引き起こす」第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡、福岡国際会議場、2012 年 12 月 13 日)
24. 加門正義、菱田友昭、平木啓子、片野　幸、西本正純、加藤英政、奥田晶彦「partial iPS 細胞からの真の iPS 細胞への変換に関与する因子としての Cnot2 の同定」第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡、福岡国際会議場、2012 年 12 月 13 日)
25. 平木啓子、加藤英政、森山陽介、船山静香、Thierry Forne、荒木敏之、岡崎康司、川上秀史、奥田晶彦「Tet1 sets the stage for the transition of naïve-to-primed pluripotency」第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡、福岡国際会議場、2012 年 12 月 13 日)
26. Hiraki K., Kato H., Moriyama Y, Funayama S, Forne T, Araki T, Okazaki Y, Kawakami H, and Okuda A. "TET1 protein degradation sets the stage for the transition of naïve-to-primed pluripotency." 10th annual meeting of ISSCR (Yokohama, Japan, 2012 年 6 月 14 日)
27. Iseki H, Nakachi Y, Hishida T, Okuda A, and Okazaki Y. "Promotion of mouse iPSC generation by highly expressed genes in both ESCs and Oocytes." 10th annual meeting of ISSCR (Yokohama, Japan, 2012 年 6 月 14 日)
28. Okuda A, and Hishida T. "Unlimited self-renewal of mouse ES cells without Myc/Max complexes under 2i condition." 10th annual meeting of ISSCR (Yokohama, Japan, 2012 年 6 月 15 日
29. Ono T, Suzuki Y, Kato Y, Fujita R, Hiraki K., Moriyama Y, Okuda A, Kato H., and Sato Y. "A single cell and feeder free culture system for monkey embryonic stem cells" 10th annual meeting of ISSCR (Yokohama, Japan, 2012 年 6 月 15 日)
30. Iseki H, Nakachi Y, Hishida T, Tanimoto Y, Sugiyama F, Yagami K, Okuda A, Okazaki Y. "Jarid2 improves the kinetics and efficiency of transcription-based reprogramming." 11th annual meeting of ISSCR (Boston, United State, 2013 年 6 月 14 日)
31. 平崎正孝、片野　幸、鈴木　歩、西本正純、奥田晶彦「Myc モジュール遺伝子メンバーのほとんどが、ES 細胞と Epiblast 幹細胞の両者で同レベルの発現を示す」第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、神戸ポートアイランド、2013 年 12 月 3-6 日)
32. 鈴木　歩、菱田友昭、平崎正孝、曽我朋義、奥田晶彦「Max ノックアウト ES 細胞の激しい細胞死はヌクレオチド欠乏に伴う複製ストレスにより引き起こされる」第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、神戸ポートアイランド、2013 年 12 月 3-6 日)
33. 加藤英政、平木啓子、栄徳勝光、清澤秀孔、川上秀史、奥田晶彦「ヒト分化多能性細胞の分化の改善」第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、神戸ポートアイランド、2013 年 12 月 3-6 日)

(4)知財出願

① 国内出願 (1 件)

1. 発明の名称:人工多能性幹細胞の製造方法

　発明者:菱田友昭、奥田晶彦、加藤英政

　出願人:学校法人埼玉医科大学

　出願日:2010/2/16

　出願番号:特願 2010-030830

② 海外出願 (1 件)

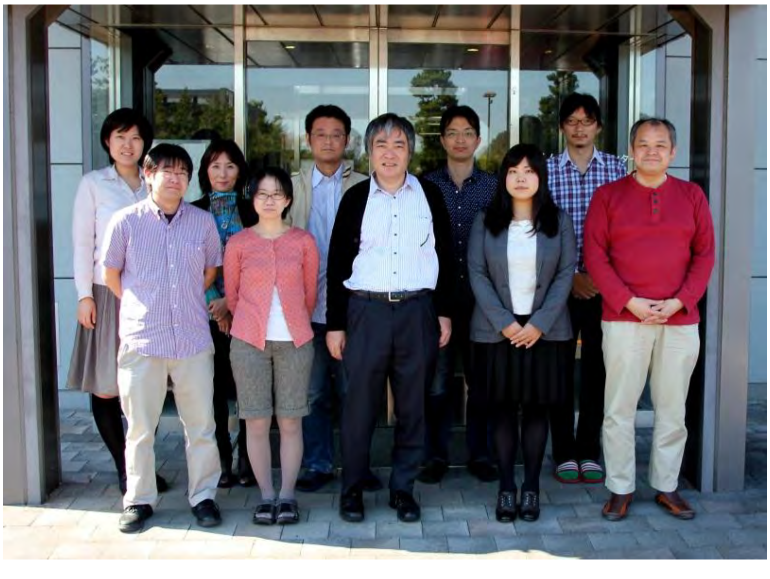
1. 発明の名称:人工性多能性幹細胞の製造方法

　発明者:菱田友昭、奥田晶彦、加藤英政

　出願人:学校法人埼玉医科大学

出願日:2011/2/15
出願番号:PTC/JP2011/53110

(5)受賞・報道等
① マスコミ(新聞・TV等)報道
1. 産経新聞 「ES 細胞 がん遺伝子不要 高品質 iPS 細胞作製も」 2011 年 7 月 8 日
2. 日刊工業 「ES 細胞の機能維持 がん原因遺伝子不要」 2011 年 7 月 8 日
3. 化学工業日報 「ES 細胞の多能性維持にがん原因遺伝子不要」 2011 年 7 月 8 日
4. 日経バイオテクノロジージャパン 「c-Myc 無しでも ES 細胞が多能性維持、MAPK と GSK3・の阻害剤添加が有効」 2011 年 7 月 8 日
5. 日経産業 「多能性維持の仕組み発見 がん化回避に期待」 2011 年 7 月 12 日

§5. 最後に

私は、ES 細胞研究に関しての長年の実績を買われて CREST-iPS のメンバーとして採択されたと考えている。そして、自分としても ES 細胞の実績をフルに活用して iPS 細胞が樹立される分子メカニズムの謎を解き明かそうと考えてきた。但し、iPS 細胞と呼んで良い細胞は容易に作製できるけれども、実際作製できた iPS 細胞が真の意味で、良い iPS 細胞であるかという点に関して検証するには、大変大掛かりな実験が必要であり、それ故、iPS 細胞研究でオリジナリティーに富んだ成果を生み出すことは大変難しいと実感した。かつ、神経幹細胞を出発材料に用いることにより、少ない数のリプログラミング因子による iPS 細胞誘導を実現するなど、自分が CREST 申請書に研究計画として提案した研究計画が、CREST 研究を始めて半年も経たない内に世界各国から発表され、自分の発想力の乏しさを実感させられた。とはいっても、自分の原点は ES 細胞にあるので、当初の計画とおり、ES 細胞を用いて得られた結果を iPS 細胞研究に応用するというスタイルを貫き、Myc 関連の研究では、Cell Stem Cell への論文発表を筆頭にいくつかの業績を生み出すことができたので、CREST 研究代表者として及第点は与えられる成果を出せたのではないかと考えている。この Myc 関連の研究は、現在も大変興味深い成果を生み出し続けており、本 CREST 研究終了後も、論文発表という形で成果を配信し続けたいと考えている。