

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「細胞リプログラミングと分化における転写
調節機構」

研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成27年3月

研究代表者: 西田 栄介
(京都大学大学院生命科学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

I. 細胞リプログラミング過程における転写プログラム変換の分子機構の解明

リプログラミング初期における遺伝子発現パターンを、マイクロアレイと *in silico* 転写因子予測法を用いて解析し、リプログラミング過程に重要な新規転写因子として、Foxd1 と Foxo1 を同定した。また、これらの転写因子は、リプログラミング途中段階の時期特異的マーカー遺伝子としても有用であることを明らかにした(Koga et al., Nat. Commun. 5, 3197 (2014).)。さらに、RNA-seq を用いた解析により、リプログラミングにより変化するスプライシングバリエントを同定し、多能性幹細胞のスプライシング制御に関与する U2af1 と Srsf3 の 2 つの RNA 結合タンパク質が、細胞リプログラミング過程で重要な役割を果たすことを明らかにした(Ohta et al., Cell Rep. 5, 357-366 (2013).)。

II. 細胞分化の諸過程における遺伝子発現変換プログラムの解明

筋肉は、単核の筋前駆細胞が融合した多核細胞から構成されており、MAP キナーゼ経路の一つである ERK5 経路が、Sp1 転写因子および Klf 転写因子を介して筋前駆細胞の融合を特異的に制御することを明らかにした (Sunadome et al., Dev. Cell, 20, 192-205 (2011).)。また、哺乳類小腸上皮培養細胞の系において、Hippo シグナル伝達経路の下流で機能する転写制御因子 YAP/TAZ が、小腸上皮幹細胞・前駆細胞の増殖を促進する Wnt/beta-catenin 経路の下流で駆動される転写を、負に制御することを発見し、その分子機構を解明した (Imajo et al., EMBO J. 31, 1109-1122 (2012).)。さらに我々は、*in vivo* で小腸上皮細胞特異的に遺伝子導入する方法 (intestine-specific gene transfer (iGT)) を開発し、Hippo 経路が幹細胞・前駆細胞の増殖と分化細胞の一種である杯細胞への分化の双方を制御していることを明らかにした(Imajo et al., Nat. Cell Biol. 1, 7-19 (2015).)。

III. 転写カスケードを用いて分化細胞から別の分化細胞へ転換させる自動プログラムの樹立とその機構解明

リプログラミング過程におけるマーカー遺伝子として着目した Foxd1 に関して、Cre/LoxP システムを用いた細胞運命追跡実験を行い、95%以上の Nanog 陽性 iPS 細胞コロニーが、Foxd1 陽性細胞に由来することを示した。この Foxd1-Cre システムを用いた分化転換の自動プログラムの作製を開始した。

IV. 転写調節の分子基盤である転写因子の作用機構およびエピジェネティック制御の調節機構の解明

筋分化のマスターレギュレーターである転写因子 MyoD と脂肪分化のマスターレギュレーターである転写因子 PPAR γ が互いに排他的に作用することで、筋肉細胞と脂肪細胞の両方の性質を合わせ持つ細胞の生成を細胞自律的に抑制していることを明らかにした。さらに、MyoD と PPAR γ は、エピジェネティック制御を介した転写抑制とユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解という異なる機構によって、互いの分化プログラムを抑制していることを示した(Sunadome et al., Mol. Cell, 54, 526-535 (2014).)。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. リプログラミング初期の遺伝子発現パターンを、マイクロアレイと独自開発した *in silico* 転写因子予測法を用いて解析し、リプログラミング過程に重要な新規転写因子として Foxd1 を同定した。また、Foxd1 が時期特異的マーカー遺伝子としても有用であることも示した(Koga et al., Nat. Commun. 5, 3197 (2014).)。Foxd1 はリプログラミング段階で一過的に発現するため、他グループのスクリーニングでは見出だされていなかった。

2. 筋分化のマスターレギュレーターである転写因子 MyoD と脂肪分化のマスターレギュレーターである転写因子 PPAR γ が互いに排他的に作用することで、筋肉細胞と脂肪細胞の両方の性質を合わせ持つ細胞の生成を細胞自律的に抑制していることを明らかにした(Sunadome et al., Mol. Cell, 54, 526-535 (2014).)。本研究成果は、細胞が個性を維持するメカニズムに重要な知見を与えるものであり、肥満治療や再生医療への応用が期待される。
3. MAP キナーゼ経路の一つである ERK5 経路が、Sp1 転写因子および Klf 転写因子を介して筋前駆細胞の融合を特異的に制御することを明らかにした (Sunadome et al., Dev. Cell, 20, 192-205 (2011).)。筋分化はマスター転写因子 MyoD の下流で、分化の全てのプロセスが不可分に進行すると従来考えられていたため、融合のみを特異的に制御するシグナル伝達経路の発見は、その定説を覆すものである。この経路を活性化させ筋前駆細胞間の融合効率を上げることが、損傷した筋肉の再生に有効である可能性がある。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 転写後修飾の一つであるスプライシング制御機構は、今まで考えられていた以上に多くの生物学的現象や疾患過程に関与していることが最近明らかとなりつつある。本研究で開発した選択的スプライシングの変化をゲノムワイドに明らかにするアルゴリズムや digital PCR (絶対定量) を利用したスプライシングバリエーションの高精度な測定法 (Ohta et al., Cell Rep. 5, 357-366 (2013).)は、多くの研究に適用することが可能であり、これらを用いた解析により基本的な生物学的現象から疾患のメカニズムの解明といった多くの分野で新しい知見をもたらすことが期待できる。
2. 従来、腸における遺伝子の機能を解析するためには、培養細胞を用いる、あるいは遺伝子操作マウスを用いる方法が主であった。本研究で開発した *in vivo* で小腸上皮細胞特異的に遺伝子導入する方法 (intestine-specific gene transfer (iGT) (Imajo et al., Nat. Cell Biol. 1, 7-19 (2015).)により、生体の小腸における遺伝子操作が容易となり、今後の腸上皮の基礎研究および腸に関連した疾患のメカニズムの解明が加速することが期待できる。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「西田」グループ

研究参加者

| 氏名 | 所属 | 役職 | 参加時期 |
|--------|--|--------------|------------------------------|
| 西田 栄介 | 京都大学大学院生命科学 科学研究科 | 教授 | H21.10-H27.3 |
| 日下部 杜央 | 同上 | 助教 | H21.10-H27.3 |
| 山本 拓也 | 京都大学 iPS 細胞研究所 | 特定拠点助教 | H21.10-H27.3 |
| 戎家 美紀 | 理化学研究所 発生・再 生科学総合研究センタ ー再構成生物学研究ユ ニット | ユニットリーダ ー | H21.10-H27.3 |
| 満島 勝 | 京都大学大学院生命科学 科学研究科 | 研究員 | H22.4-H23.5 |
| 今城 正道 | 同上 | 研究員 | H22.4-H24.3 |
| 砂留 一範 | 同上 | 特定研究員 | H24.4-H24.12 |
| 小山 明 | 同上 | 研究員 | H22.10-H24.12 H25.4-H27.3 |
| 宇野 雅晴 | 同上 | 研究員 | H26.4-H27.3 |
| 鈴木 俊康 | 同上 | 研究員 | H26.4-H27.3 |
| 宮竹 功一 | 同上 | 研究員 | H26.4-H27.3 |
| 李 俊成 | 同上 | D4 | H26.4-H27.3 |

研究項目

- ・ 細胞リプログラミング過程における転写プログラム変換の分子機構の解明
- ・ 細胞分化の諸過程における遺伝子発現変換プログラムの解明
- ・ 転写カスケードを用いて分化細胞から別の分化細胞へ転換させる自動プログラムの樹立とその機構解明
- ・ 転写調節の分子基盤である転写因子の作用機構およびエピジェネティック制御の調節機構の解明

(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

(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

【本研究成果に関する共同研究】

立命館大学生命科学部 川村晃久准教授のグループとの共同研究を行った。リプログラミングやテラトーマ作製の技術指導をしていただき、また、Foxd1の機能解析において多くの意見交換をしていただいた。

Koga M, Matsuda M, Kawamura T, Sogo T, Shigeno A, **Nishida E** & Ebisuya M. Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. *Nat. Commun.*, 5, 3197 (2014).

京都大学再生医科学研究所の瀬原淳子教授のグループとの共同研究を行った。生体内での筋肉の再生に関して、技術指導をしていただいた。

Sunadome, K., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Kondoh, K., Sehara-Fujisawa, A., and

Nishida, E. ERK5 regulates muscle cell fusion through Klf transcription factors. *Dev. Cell*, 20, 192-205 (2011).

【本研究グループと国内の研究者との共同研究】

京都大学医学研究科 篠原隆司教授のグループとの共同研究を行った。精原幹細胞から多能性幹細胞を作製する研究において、主にマイクロアレイ解析に関連した技術提供を行った。Takashima S, Hirose M, Ogonuki N, Ebisuya M, Inoue K, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, **Nishida E**, Ogura A & Shinohara T. Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes Dev*, 27, 1949-1958 (2013).

京都大学 iPS 細胞研究所の山田泰広教授との共同研究により、in vivo リプログラミング過程におけるエピジェネティックの変化を解析した。

Ohnishi, K., Semi, K., **Yamamoto, T.**, Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., Soejima, H., Moriwaki, H., Yamanaka, S., Woltjen, K., and Yamada, Y. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* 156, 663-677 (2014)

京都大学再生医科学研究所の佐藤孝彦助教、瀬原淳子教授のグループとの共同研究により、骨格筋幹細胞の静止期／未分化状態への移行期における miRNA の解析を共同して行った。

Sato, T., **Yamamoto, T.**, and Sehara-Fujisawa, A. miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat. Commun.* 5, 4597 (2014)

京都大学 iPS 細胞研究所の井上治久教授のグループに本研究で用いたスプライシング制御機構の同定・解析法を提供し、共同研究を開始している。

§ 3 研究実施内容及び成果

3.1 I. 細胞リプログラミング過程における転写プログラム変換の分子機構の解明

(1) 研究実施内容及び成果

マウス胎仔繊維芽細胞にリプログラミング因子を導入し、リプログラミング初期における遺伝子発現状態の変化について、経時的なマイクロアレイ解析を行った結果、リプログラミング過程で発現量が上昇する約 800 個の遺伝子を同定した。この結果をもとに、本研究グループが開発した *in silico* 転写因子予測法（共通の変動を示す遺伝子群において各遺伝子のプロモーターの解析から、それら遺伝子群の発現に共通に関与している転写因子を *in silico* で予測する方法）を用いて、遺伝子発現状態の変化の制御因子を解析したところ、Foxd1 と Foxo1 という転写因子の関与が予測された。そこで Foxd1 や Foxo1 のノックダウンやノックアウトを行ったところ、iPS 細胞のコロニー数や未分化マーカーの発現量が減少した（図 1）。Foxd1 に関しては、リプログラミングや多能性に関わる報告はこれまで全くされていない。そこで、Foxd1 の分子的作用機序の解析を進めた結果、Foxd1 の下流遺伝子群には Dax1 や Epcam など多能性に関わる遺伝子が含まれており、特に Dax1 のノックダウンによってリプログラミング効率が減少することを見出した。以上のように本研究グループは、Foxd1 と Foxo1 を、リプログラミング過程で発現量が上昇する遺伝子群を制御する新規転写因子として同定したが、興味深いことに Foxd1 や Foxo1 自身の発現量もリプログラミング過程で一過的に上昇していた。よって、これらの転写因子は、リプログラミング過程の時期特異的のマーカー遺伝子として用いることも可能である(Koga et al., Nat. Commun. 5, 3197 (2014).)。

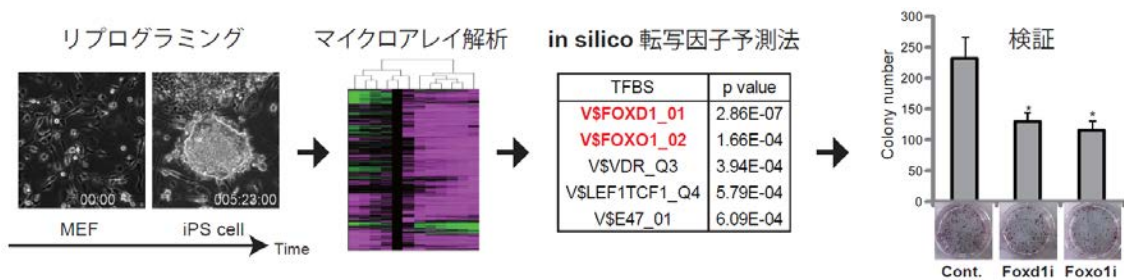


図 1 リプログラミング過程に重要な新規転写因子として、Foxd1 と Foxo1 を同定した。

また、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により、リプログラミング過程前後におけるスプライシングバリエーションごとの発現プロファイリングを行った。その結果、体細胞初期化の前後でスプライシングパターンが変化する遺伝子群を 600 個以上同定した。さらに、それら遺伝子群の一部を RT-PCR により検証し、実際にスプライシングパターンが変化していることを確認した。これらの遺伝子群のリプログラミング過程における選択的スプライシングがいかにかに制御されているかを調べるために、リプログラミング段階特異的なマーカー遺伝子の発現をもとに細胞を分取し、各分画のスプライシングパターンを解析した。その結果、スプライシングパターンが MEF 型から iPS 細胞型になるタイミングは遺伝子ごとに異なり、そのタイミングによりサブグループに分けられることを明らかにした。さらに同定した遺伝子群のスプライシングパターンを一連の組織サンプルにおいて調べた結果、iPS/ES 細胞におけるスプライシングパターンが、精巣で見られるスプライシングパターンに類似しているという興味深い現象を見出した。また、多能性幹細胞で発現量が高い RNA 結合タンパク質 (RBPs) の siRNA スクリーニングにより、多能性幹細胞でスプライシングを制御する RBP を複数同定した。中でも、U2af1 と Srsf3 の 2 つの RBP が、細胞リプログラミング過程で重要な役割を果たすことを明らかにした（図 2）。以上の結果から、選択的スプライシングが多能性幹細胞の特性や体細胞の初期化機構に重要な働きをもつこ

とが明らかとなった(Ohta et al., Cell Rep. 5, 357-366 (2013).)。

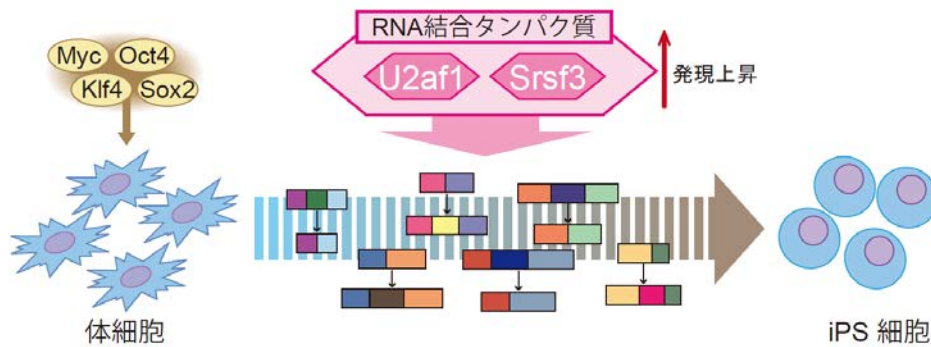


図2 U2af1 と Srsf3 の2つの RNA 結合タンパク質が、細胞リプログラミング過程で重要な役割を果たすことを明らかにした。

3. 2 II. 細胞分化の諸過程における遺伝子発現変換プログラムの解明

(1)研究実施内容及び成果

我々は筋細胞をモデルとして、分化過程における転写プログラムの同定を行なった。筋肉は動物の運動に必須の組織であり、収縮能をもつ繊維状の多核細胞から構成される。このような多核細胞は、単核の筋前駆細胞が互いに融合し、筋肉特異的な遺伝子群を発現する事によって形成される。筋分化はマスター制御因子として知られている MyoD ファミリー、および MEF2 ファミリーとよばれる転写因子ファミリーによって制御されており、細胞の融合という現象は MyoD や MEF2 によって制御される分化プログラムの一部にすぎないと考えられていた。我々は、マウス培養筋前駆細胞 C2C12 において MAP キナーゼ経路の一つである ERK5 経路が分化誘導後に活性化することを見出した。さらに、ERK5 の上流因子である MEK5 の優勢阻害型(dnMEK5)を過剰発現して ERK5 の活性を阻害すると、融合は顕著に抑制された。一方で恒常的活性型の MEK5 (caMEK5)を過剰発現すると、融合は促進された(図 3、左)。しかしどちらの場合においても、myogenin などの筋分化のマーカー遺伝子の発現は影響をうけず、融合以外の分化の進行に大きな変化はみられなかった。同様の結果が、マウス腓腹筋から単離した筋衛星細胞からも得られた。以上の結果から、ERK5 経路は筋分化の中でも細胞融合に特異的に関与しているシグナル伝達経路であると考えられた。筋細胞の融合は筋肉の再生に必須のプロセスであるが、筋再生における ERK5 経路の機能を調べるために、マウス前脛骨筋に筋肉の損傷を引き起こすカルジオトキシンを注射し、その再生過程において MEK 阻害剤である U0126 を患部に注射して ERK5 経路を阻害した。ERK5 経路を阻害した筋肉ではコントロールに比べて筋繊維が細く、再生が阻害されている事が示唆された。次に我々はマイクロアレイを行い、C2C12 細胞の分化過程において ERK5 経路により制御される 189 個の遺伝子を同定した。さらに、モチーフ検索アルゴリズム Weeder、並びに TRANSFAC データベースを用いて、189 遺伝子のプロモーター領域を解析した(図 3、中央)。その結果、189 遺伝子の発現制御に関与する転写因子の候補として Klfファミリーならびに Sp1 ファミリーを見出した。定量的 PCR、レポーターアッセイ、ChIP アッセイなどから、ERK5 は Sp1 の活性を制御し、Klf2 ならびに Klf4 の発現を制御している事が示された。Sp1、Klf2 または Klf4 をノックダウンすると、筋細胞の融合が顕著に抑制された。さらに、B1 インテグリンと相互作用する接着分子である Npnt が ERK5-Klf 経路の下流で筋細胞の融合に関与するという結果を得た。以上の結果より、我々が同定した「MAP キナーゼ分子 ERK5/転写因子 Sp1/転写因子 Klf/接着分子 Npnt 経路」は、MyoD などを介して筋分化全体のプログラムを調節する事なく、融合のみを特異的に制御するシグナル伝達経路であることがわかった(Sunadome et al., Dev. Cell 20, 192-205 (2011).) (図 3、右)。筋分化はマスター転写因子 MyoD の下流で、分化の

全てのプロセスが不可分に進行すると従来考えられていたため、融合のみを特異的に制御するシグナル伝達経路の発見は、その定説を覆すものである。

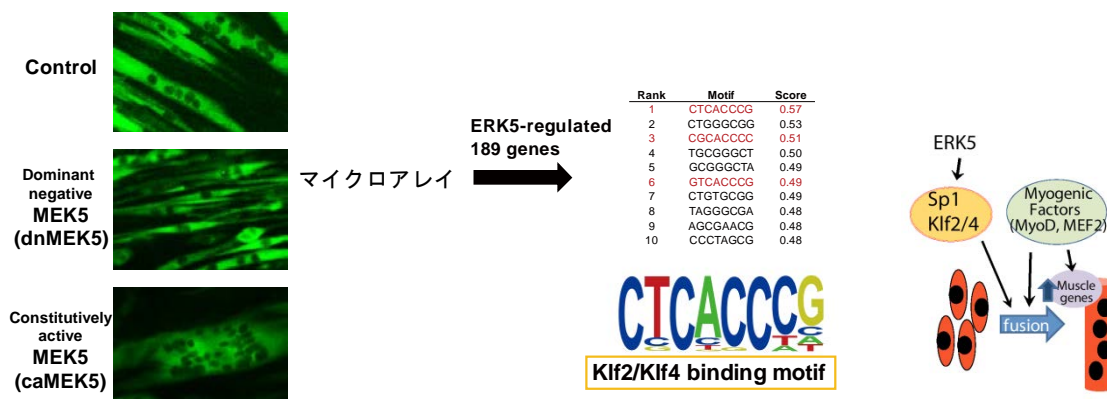


図3 筋細胞融合におけるシグナル伝達経路の解析

(左) マウス培養筋前駆細胞 C2C12 において、ERK5 の上流因子である MEK5 の優勢阻害型(dnMEK5)を過剰発現すると、融合は顕著に抑制され、恒常的活性型の MEK5 (caMEK5)を過剰発現させると、融合は促進された。

(中央) 筋分化過程において ERK5 経路により制御される 189 個の遺伝子を同定し、それらのプロモーター領域を *in silico* 転写因子予測により解析した結果、189 遺伝子の発現制御に関与する転写因子の候補として Klf ファミリーを見出した。

(右) ERK5 経路は、マスター因子である MyoD・MEF2 が構成する筋分化全体のプログラムを調節する事なく、Sp1 転写因子および Klf 転写因子を介して筋前駆細胞の融合のみを特異的に制御する。

我々はさらに腸上皮細胞をモデルとして、細胞分化過程における転写プログラムの同定を試みた。腸上皮は人体において細胞の新陳代謝が最も活発な組織であり、幹細胞からの増殖・分化・移動・アポトーシスにより絶えず細胞が更新されている。陰窩に存在する幹細胞が増殖性の前駆細胞を供給し、この前駆細胞から、栄養を吸収する腸吸収細胞、消化管ホルモンを分泌する腸内分泌細胞、粘液を分泌する杯細胞、抗菌物質を分泌するパネート細胞が分化する。近年、腸上皮幹細胞のマーカー遺伝子が同定され、また幹細胞を単離・培養することが可能となった事で、腸上皮は組織幹細胞研究のモデル組織となりつつある。我々は哺乳類小腸上皮培養細胞の系において、Hippo シグナル伝達経路の下流で機能する転写制御因子 YAP/TAZ が、小腸上皮幹細胞・前駆細胞の増殖を促進する Wnt/beta-catenin 経路の下流で駆動される転写を、負に制御することを発見し、その分子機構を解明した

(Imajo et al., EMBO J. 31, 1109-1122 (2012).)。さらに我々は、*in vivo* で小腸上皮細胞特異的に遺伝子導入する方法 (intestine-specific gene transfer (iGT)) を開発した。この方法は、不活性化したセンダイウイルスのエンペロープにプラスミドや siRNA を封入し、小腸の内腔に直接注射する手法であり、任意の遺伝子の過剰発現や RNAi によるノックダウンを簡単に、短期間で行うことが出来る。この iGT を用いて Wnt 経路の活性を阻害すると、幹細胞・前駆細胞の増殖抑制など予想される表現型が引き起こされたことから、iGT が腸上皮細胞分化を制御する機構の解析に有用であることが示唆された。さらに我々は、iGT を用いた解析により、Hippo 経路が幹細胞・前駆細胞の増殖と杯細胞への分化という二つの過程を制御することを見出した。そしてこの Hippo 経路の二重の役割に二種類の転写因子が関与すること、具体的には、幹細胞・前駆細胞の増殖においては TEAD 転写因子、杯細胞への分化においては KLF 転写因子が YAP/TAZ のパートナーとして機能することがわかった (Imajo et al., Nat. Cell Biol. 1, 7-19 (2015).) (図4)。

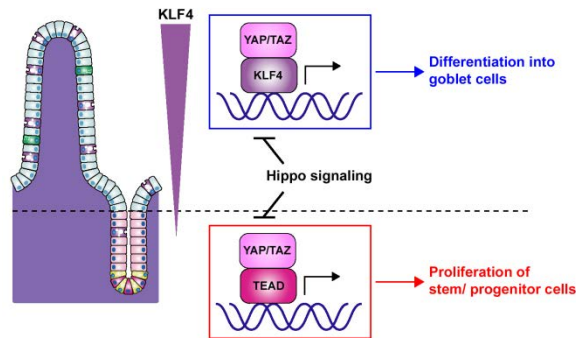


図 4 腸上皮細胞分化におけるシグナル伝達経路の解析

iGT を用いて、Hippo 経路が幹細胞・前駆細胞の増殖と杯細胞への分化という二つの過程を制御すること、そしてこの Hippo 経路の二重の役割に二種類の転写因子が関与することを見出した。

我々はさらに軟骨をモデルとして、細胞分化過程における転写プログラムの解析を行った。Sox5、Sox6、Sox9 は、軟骨細胞の分化に非常に重要な役割を果たしており、軟骨細胞の分化のマスター制御因子と考えられている。我々は軟骨形成を制御する新規分子として MAPKKK ファミリー分子 MLTK を同定した。そして軟骨細胞の分化のマスター制御因子 Sox9、Sox5、Sox6 のうち、MLTK のノックダウンは Sox6 の発現のみを減少させた。また、Sox9 を共発現させた条件下において MLTK の過剰発現は容量依存的に Sox6 の発現を上昇させた。以上の結果は重要なマスター因子である Sox6 が MLTK によって制御されることを示唆しており、軟骨細胞分化の分子機構のさらなる理解に繋がった (Suzuki et al., Development. 139, 2988-2998 (2012)., 図 5)。

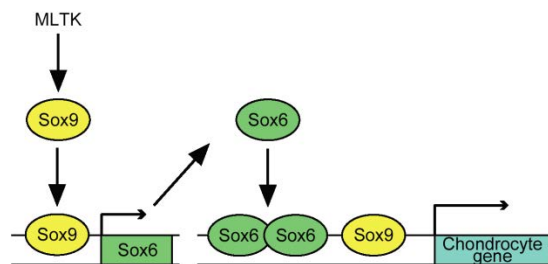


図 5 軟骨細胞分化における転写調節機構

3. 3 III. 転写カスケードを用いて分化細胞から別の分化細胞へ転換させる自動プログラムの樹立とその機構解明

(1) 研究実施内容及び成果

リプログラミング過程におけるマイクロアレイの結果をもとに、リプログラミング過程で発現量が変化する時期特異的マーカー遺伝子を、多数同定した (図 6、左)。特に、項目 1 で述べた Foxd1 は、4 (3) 因子導入から 8-10 日後付近で一過的な発現上昇を示した。そこで、Foxd1 のプロモーター下で GFP が発現するレポーターマウスを用いて、Foxd1 の発現量によって細胞を分取した (図 6、中央) ところ、この時期に Foxd1 を発現していた細胞は、その後のリプログラミング効率が高くなることがわかった (図 6、右)。さらに、Foxd1

に関して、Cre/LoxP システムを用いた細胞運命追跡実験を行い、95%以上の Nanog 陽性 iPS 細胞コロニーが、Foxd1 陽性細胞に由来することを示した。つまり、Foxd1 は、多能性を獲得していく過程の時期特異的マーカーとして有用であるとわかった(Koga et al., Nat. Commun. 5, 3197 (2014)。)。今後、Foxd1-Cre システムを用いて、リプログラミングが成功しつつある細胞で分化のマスター因子を自動的に発現する系を開発し、分化細胞から別の分化細胞へ転換させる自動プログラムの樹立を目指す。

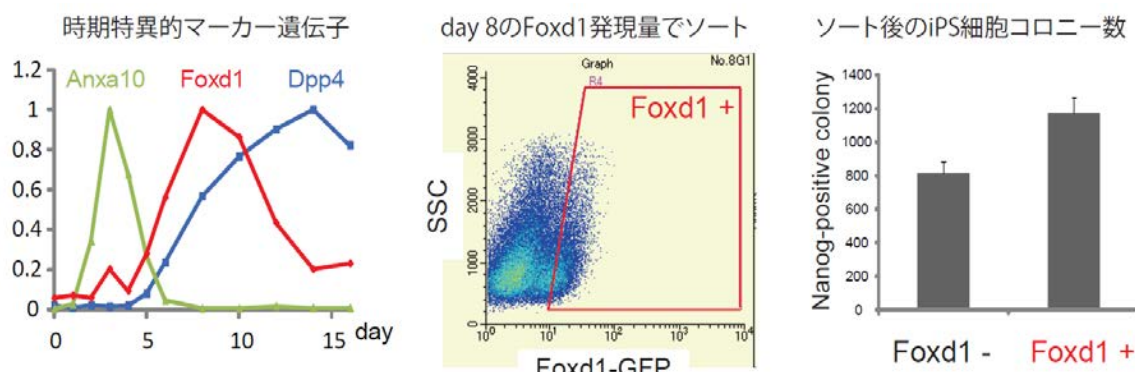


図 6 Foxd1 はリプログラミング過程で一過的な発現を示し、その時期に Foxd1 を発現した細胞は iPS 細胞になりやすい。

さらに、項目 I のリプログラミング過程におけるスライシングパターンの変化と関連して、スライシングの変化をリアルタイムで観察する系の立ち上げを行った。改善の余地は残されているが、体細胞と多能性幹細胞で内在性のスライシングパターンと一致するような色の変化を示すレポーターの構築に成功した。今後これらのレポーターを用いてさらなるスライシング制御機構のメカニズムを解析する予定である。

3. 4 転写調節の分子基盤である転写因子の作用機構およびエピジェネティック制御の調節機構の解明

(1)研究実施内容及び成果

転写因子間の相互作用を検討し、筋分化、脂肪分化それぞれのマスター制御因子である MyoD、PPAR γ の相互作用に注目した。MyoD のみ、あるいは PPAR γ のみを C3H10T1/2 細胞に導入すると、ほぼ全ての細胞が筋肉、あるいは脂肪へと分化した。一方で MyoD と PPAR γ の両方を同時に導入すると、筋肉、脂肪それぞれの細胞は観察されたが、両方の特性をもった細胞（脂肪滴をもつ筋繊維）は観察されなかった(図 7)。これは、異なる分化プログラムが混じり合い、細胞の個性が破綻する事を防ぐ頑強なシステムが細胞内に存在する事を示唆しており、MyoD、PPAR γ のそれぞれが誘導する分化プログラムは排他的で、細胞はどちらか一つの運命しか選ぶ取事ができないことを意味する。そのメカニズムとして、脂肪細胞ではユビキチン・プロテアソーム系が働くことで、MyoD のタンパク質の半減期が短くなることがわかった。また、その制御に Cdk が関与していることを明らかにした。一方、PPAR γ を発現する筋細胞でマイクロアレイ解析を行った結果、脂肪の貯蔵を制御する白色脂肪細胞に選択的な遺伝子群が強く抑制されている事を見出した。さらに、PPAR γ のエフェクターとして知られている脂肪分化の制御因子 C/EBP α の発現を調べたところ、PPAR γ を発現する筋細胞では C/EBP α の発現が抑制されている事、C/EBP α の発現抑制にはヒストン脱アセチル化が関与している事を見出した(Sunadome et al., Mol. Cell, 54, 526-535 (2014)。)(図 8)。

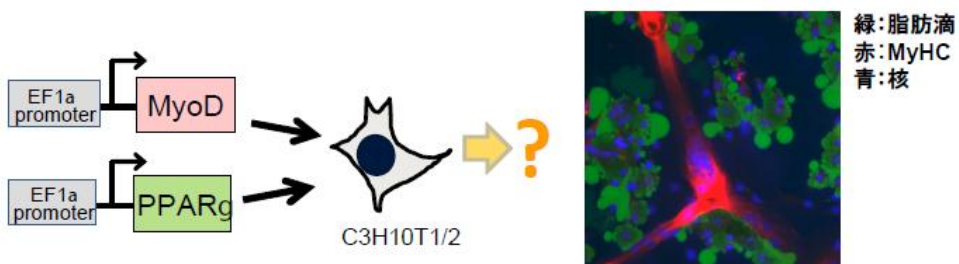
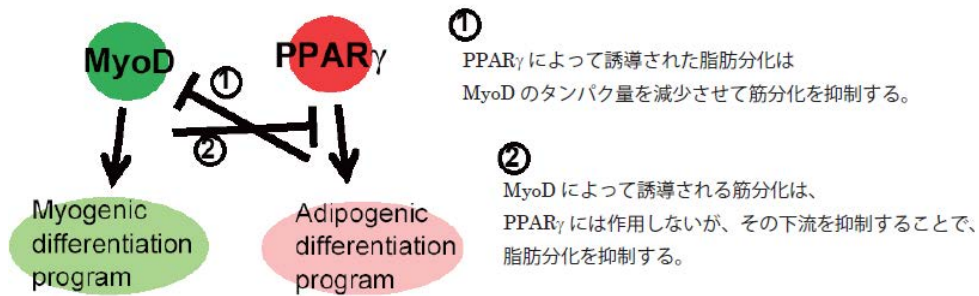


図 7 MyoD と PPAR γ を同時にマウス間葉系幹細胞 C3H10T1/2 に導入したところ、脂肪滴をもつ筋繊維は観察されなかった。

図 8 MyoD と PPAR γ が排他的作用する分子メカニズム



§ 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 15件)

1. Imajo, M., and Nishida, E. Human Tribbles homolog 1 functions as a negative regulator of retinoic acid receptor. *Genes Cells* **15**, 1089–1097 (2010). (DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01445.x)
2. Endo, T., Kusakabe, M., Sunadome, K., Yamamoto, T., and Nishida, E. The kinase SGK1 in the endoderm and mesoderm promotes ectodermal survival by downregulating components of the death-inducing signaling complex. *Sci. Signal.*, **4**, ra2 (2011). (DOI:10.1126/scisignal.2001211)
3. Sunadome, K., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Kondoh, K., Sehara-Fujisawa, A., and Nishida, E. ERK5 regulates muscle cell fusion through Klf transcription factors. *Dev. Cell*, **20**, 192–205 (2011). (DOI:10.1016/j.devcel.2010.12.005)
4. Imajo, M., Miyatake, K., Imura, A., Miyamoto, A., and Nishida, E. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J.* **31**, 1109–1122 (2012). (DOI:10.1038/emboj.2011.487.)
5. Matsumura, S., Hamasaki, M., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Sato, M., Nishida, E., and Toyoshima, F. ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. *Nature Commun.* **3**, 626 (2012). (DOI:10.1038/ncomms1634)
6. Suzuki, T., Kusakabe, M., Nakayama, K., and Nishida E. The protein kinase MLTK regulates chondrogenesis by inducing the transcription factor Sox6. *Development* **139**, 2988–2998 (2012). (DOI:10.1242/dev.078675)
7. Matsuda, M., Koga, M., Nishida, E., and Ebisuya, M. Synthetic Signal Propagation Through Direct Cell–Cell Interaction. *Sci. Signal.*, **5**, ra31 (2012). (DOI:10.1126/scisignal.2002764)
8. Tanimura, N., Saito, M., Ebisuya, M., Nishida, E., and Ishikawa, F. Stemness-related Factor Sall4 Interacts with Transcription Factors Oct-3/4 and Sox2 and Occupies Oct-Sox Elements in Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.*, **288**, 5027–5038 (2013). (DOI:10.1074/jbc.M112.411173)
9. Koga, M., Matsuda, M., Kawamura, T., Sogo, T., Shigeno, A., Nishida, E., and Ebisuya, M. Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. *Nat Commun*, **5**, 3197 (2014). (DOI:10.1038/ncomms4197)
10. Ohta, S., Nishida, E., Yamanaka, S., and Yamamoto, T. Global splicing pattern reversion during somatic cell reprogramming. *Cell Rep.*, **5**, 357–366 (2013). (DOI:10.1016/j.celrep.2013.09.016)
11. Sunadome, K., Suzuki, T., Usui, M., Ashida, Y., and Nishida, E. Antagonism between the master regulators of differentiation ensures the discreteness and robustness of cell fates. *Mol. Cell*, **54**, 526–535 (2014). (DOI:10.1016/j.molcel.2014.03.005)
12. Takashima, S., Hirose, M., Ogonuki, N., Ebisuya, M., Inoue, K., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Nishida, E., Ogura, A., and Shinohara, T. Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes Dev.* **27**, 1949–1958 (2013). (DOI:10.1101/gad.220194.113)
13. Takayama, M., Miyatake, K., and Nishida, E. Identification and characterization of retinoic acid-responsive genes in mouse kidney development. *Genes Cells*. **19**, 637–649 (2014). (DOI:10.1111/gtc.12163)
14. Imajo, M., Ebisuya, M., and Nishida, E. Dual role of YAP and TAZ in renewal of the intestinal epithelium. *Nat Cell Biol.* **17**, 7–19 (2015). (DOI:10.1038/ncb3084)
15. Matsuda, M., Koga, M., Woltjen, K., Nishida, E., and Ebisuya, M. Synthetic lateral inhibition governs cell-type bifurcation with robust ratios. *Nat Commun.* **6**, 6195 (2015). (DOI:10.1038/ncomms7195)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 山本拓也、iPS 細胞におけるレトロウイルス挿入部位の網羅的同定法、細胞工学 2011 年 8 月号 p835-p840

(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 3 件、国際会議 0 件)

1. 今城正道、西田栄介、腸上皮ホメオスタシスを制御するシグナル伝達経路の解析、第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011.9.21-24.
2. 西田栄介、細胞内シグナル伝達:寿命制御と組織ホメオスタシス維持機構、第 86 回生化学会大会、パシフィコ横浜、2013.9.11.
3. 西田栄介、MAP2 から MAP キナーゼ、そしてシグナル伝達ネットワーク研究へ、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013.12.5.

②口頭発表 (国内会議 3 件、国際会議 5 件)

1. Ebisuya M, Analysis and synthesis of gene networks, The second international young scientist career development organization (ICDO) symposium, Shiran Kaikan, Kyoto University, Japan, January 31, 2012.
2. Ohta S, Nishida E, Yamanaka S, Yamamoto T, Unraveling the mechanisms of alternative splicing during somatic cell reprogramming, 10th International Student Seminar, Shiran Kaikan, Kyoto University, Japan, March 5-8, 2012.
3. Yamamoto T, Reversion of somatic splicing during the reprogramming process, CLS-iCeMS Joint Symposium, Peking University, Tsinghua University, China, April 20-22, 2012.
4. 松田充弘、古賀牧土、西田栄介、戎家美紀、細胞間フィードバック回路を用いたパターンの作製、定量生物学の会第5回年会、東京大学生産技術研究所、2012.11.24.
5. Yamamoto T, Dynamic alteration in RNA splicing during somatic cell reprogramming, Global COE Program "Education and Research Center for Stem Cell Medicine" Final Symposium, Keio University Shinanomachi Campus, December 3-4, 2012.
6. 松田充弘、古賀牧土、西田栄介、戎家美紀、遺伝子回路からつくる細胞パターン、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡、2012.12.13.
7. 松田充弘、古賀牧土、西田栄介、戎家美紀、Reconstitution of multicellular patterns using Delta-Notch signaling、第 7 回 Notch 研究会、国立遺伝学研究所、2013.2.14.
8. Matsuda M, Koga M, Nishida E, Ebisuya M, Reconstitution of multicellular patterns that are driven by Delta-Notch signaling, The 11th International Student Seminar, Kyoto University, Kyoto, Japan, March 4-9, 2013.

③ポスター発表 (国内会議 12 件、国際会議 7 件)

1. 太田翔、山中伸弥、西田栄介、山本拓也、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析、第 62 回日本細胞生物学会大会 大阪国際会議場、2010.5.19-21.
2. 遠藤達矢、日下部杜央、砂留一範、山本拓也、西田栄介、SGK1 は細胞非自律的な抗アポトーシスシグナル伝達を仲介する、第 22 回 高遠シンポジウム 高遠さくらホテル(長野県伊那市高遠町)2010.8.19-20.
3. 砂留一範、山本拓也、戎家美紀、近藤邦生、瀬原淳子、西田栄介、筋分化において細胞間の融合を制御するシグナル伝達経路、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 神戸ポートアイランド、2010.12.7-10.
4. Koga M, Matsuda M, Nishida E, Ebisuya M, Gene expression analysis in the reprogramming process, The 9th International Student Seminar, Shiran Kaikan, Kyoto University, March 7-9, 2011
5. 樋口真美、満島勝、西田栄介、In vitro analysis of the intrinsic branching mechanism of the uretric bud, 第 63 回日本細胞生物学会、北海道大学 クラーク会館、学術交流会館、

2011.6.27-29.

6. 古賀牧土、松田充弘、西田栄介、戎家美紀、 Prediction and analysis of transcription factors involved in the reprogramming process, 第 63 回日本細胞生物学会大会、北海道大学 クラーク会館、学術交流会館、2011.6.27-29.
7. 太田翔、西田栄介、山中伸弥、山本拓也、体細胞初期化過程における選択的スプライシング制御機構の解明、第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館、2011.9.21-24.
8. 今城正道、宮竹功一、飯村寛、宮本侑、西田栄介、 A molecular mechanism that links Hippo signaling to the inhibition of Wnt/beta-catenin signaling, 第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011.12.13-16.
9. 砂留一範、西田礼美、西田栄介、Antagonism between MyoD and PPAR γ in cell differentiation programs, 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011.12.13-16.
10. 太田翔、西田栄介、山中伸弥、山本拓也、Global changes of splicing regulation in the reprogramming process, 第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011.12.13-16.
11. Takayama M, Hiramatsu T, Nishida E, Identification of signaling molecules that regulate renal branching morphogenesis, BSDB, BSCB and JSDB Joint Spring Meeting, University of Warwick, Coventry, UK, April 15-18, 2012
12. Takayama M, Hiramatsu T, Nishida E, Identification of factors that regulate renal branching morphogenesis, 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸国際会議場&神戸商工会議所、2012.5.28-31.
13. Koga M, Matsuda M, Nishida E, Ebisuya M, Identification of transcription factors involved in the reprogramming process, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, June 13-16, 2012
14. Ohta S, Nishida E, Yamanaka S, Yamamoto T, Dynamic alteration in rna splicing during somatic cell reprogramming, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan. June 13-16, 2012
15. Koga M, Matsuda M, Nishida E, Ebisuya M, Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process, The 11th International Student Seminar, Kyoto university, Kyoto, Japan, March 5-6, 2013
16. Ashida Y, Sunadome K, Nishida E, Mutual exclusivity in the differentiation programs of adipocytes and myotubes ensures their distinct phenotypes, The 11th International Student Seminar, Kyoto university, Kyoto, Japan, March 5-6, 2013
17. Ohta S, Nishida E, Yamanaka S, Yamamoto T, RNA splicing regulation during somatic cell reprogramming, The ISSCR 11th Annual Meeting, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, USA. June 12-15, 2013.
18. 古賀牧土、松田充弘、川村晃久、西田栄介、戎家美紀、Foxd1 はリプログラミング過程特異的に発現が上昇しリプログラミングを制御する、第 25 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム、延暦寺会館、2013.8.29-30.
19. 古賀牧土、松田充弘、川村晃久、十河孝浩、西田栄介、戎家美紀、Foxd1 はリプログラミング過程特異的に発現が上昇する新規リプログラミング制御因子である、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013.12.3-6.

(4)受賞・報道等

①受賞

1. 平成 21 年度上原賞
2. 2010 年度武田医学賞
3. 平成 22 年秋 紫綬褒章

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

1. 日経新聞、“iPS 細胞作製に関与 2 種類のタンパク質 京大発見”、2013 年 10 月 18 日、“プレ

ス実施”

2. 日刊工業新聞、 “DNA の”切り貼り”パターン iPS 作製時に初期化”、2013 年 10 月 18 日、“プレス実施”
3. 京都新聞、“「筋肉になれ」「脂肪になれ」 細胞 複数命令聞かず”、2014 年 4 月 4 日、“プレス実施”
4. 産経新聞、“筋肉・脂肪細胞の不良品防ぐ仕組み”、2014 年 4 月 4 日、“プレス実施”
5. 日刊工業新聞、“筋・脂肪分化の制御因子 「混在細胞」生成抑制”、2014 年 4 月 4 日、“プレス実施”

(5)成果展開事例

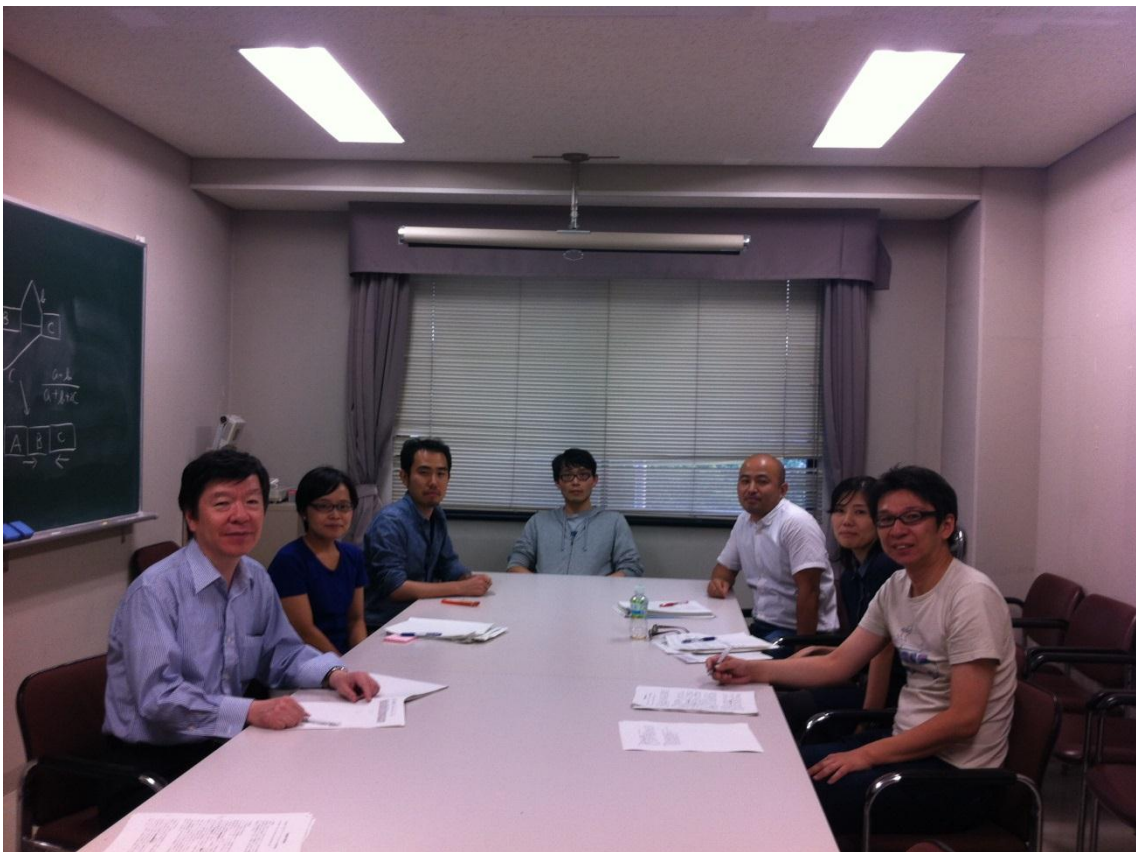
①社会還元的な展開活動

- 本研究成果を以下のページで公開し、一般に情報提供している。
1. http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2013_1/131018_1.htm
大規模遺伝子解析により体細胞の初期化過程で RNA スプライシングパターンが変化することを解明
 2. http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/140404_1.html
なぜ筋肉と脂肪のハイブリッド細胞はできないのか？ 筋分化と脂肪分化が排他的に起こる仕組みの解明 – 肥満、再生医療などの治療応用に期待 –

§5 最後に

本研究で、最も重点を置いた研究課題である「細胞リプログラミングの分子機構の解析」において、世界に先駆けて、多数の分子・遺伝子の関与を明らかにし、また、スプライシングの意義も示したことは、この分野に重要な貢献をしたものと考えている。また、ここでは詳述しないが、本研究を遂行する過程で、いくつかの新しい実験手法や解析手法を開発することに成功したことは、今後の研究の発展につながると考える。

CREST の領域会議等において、他の研究チームと交流できたことは、今後の研究の展開に役立つものであった。将来につながると思う。



(研究方針を相談するための会議終了時のスナップ写真である。)