

研究報告書

「順遺伝学による iPS 細胞生成機構の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 堀江 恭二

1. 研究のねらい

本研究では、iPS 細胞の生成に関与する遺伝子群を、順遺伝学的手法により同定することを試みた。順遺伝学とは、多数の変異体の中から、目的の表現型を示す変異体を同定・解析する方法である。順遺伝学においては、はじめに変異体を準備する段階では、変異が導入される個々の遺伝子の機能は考慮せずに、可能な限り広範囲の変異導入を行う。このため、目的の表現型を示す変異体を特定した際に、全く予期せぬ遺伝子が原因であることが多く、ブレークスルーに結びつきやすい。しかし、ヒトやマウスを研究対象とする場合、表現型を露呈させるには、2コピー存在する遺伝子の両方を破壊した「ホモ変異体」を得る必要がある。通常の遺伝子破壊法で得られるのは、1コピーのみが破壊された「ヘテロ変異体」であり、ホモ変異体を得るには、さらに多くの労力を要す。このため、従来法では、ヒトやマウスの細胞に対して順遺伝学を適用するのは困難であった。

この問題点を解決するために、我々は、マウス ES 細胞において、ホモ変異体を迅速に単離する方法を開発してきた。多数のホモ変異体 ES 細胞を作製して、順遺伝学的手法により解析すれば、ES 細胞の未分化性を制御する新規遺伝子群を同定できると期待される。iPS 細胞研究の進展過程を振り返ると、ES 細胞の未分化性を制御する遺伝子が、iPS 細胞の生成においても重要な役割を果たす可能性は極めて高い。本研究では、ホモ変異体 ES 細胞バンクの構築と、その表現型解析を通じて、iPS 細胞生成に関する新たな知見を得ることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

独自に開発した方法を用いて、2000 株のヘテロ変異体マウス ES 細胞株を作製し、その中から、200 株のホモ変異体を作製した。これら変異体の中から、分化抵抗性、または、易分化性を示す細胞株をスクリーニングした。このような表現型を示す原因遺伝子は、iPS 細胞生成過程にも重要な役割を果たす可能性があると考えられる。そこで、分化細胞において、スクリーニングで特定した遺伝子の発現を変化させて、iPS 細胞生成への影響を解析し、リプログラミングの制御に関与する遺伝子を同定した。

iPS 細胞を臨床へ応用するには、種々の細胞系譜への分化誘導に関する基礎研究も重要である。そこで、ES 細胞の *in vitro* 分化誘導系を用いて、神経分化や造血系前駆細胞の生成に異常を来たす変異体を単離した。

(2) 詳細

研究テーマ A「変異 ES 細胞バンクの作製(図 1)」

マウス ES 細胞に対して、レトロウイルスやトランスポゾンを導入して、約 2000 株のヘテロ変

異体を作製し、凍結保存した。すべての変異株に対して、ベクターの挿入部位を決定し、破壊された遺伝子を特定してデータベース化した。その中から、文献的に機能が未知の遺伝子を特定し、順遺伝学のためのホモ変異体を作製した。ホモ変異体を作製するには、ヘテロ変異体を解凍後、Bloom 遺伝子の発現を一過性に抑制する。Bloom 遺伝子を可逆的に ON/OFF するために、我々が

用いた ES 細胞の親株では、Bloom 遺伝子を tet-system で制御可能なように改変している。Bloom 遺伝子の抑制下では、細胞周期の 4N の時期に、相同染色体間の組換えが亢進する。このため、図 1 に示すように、細胞

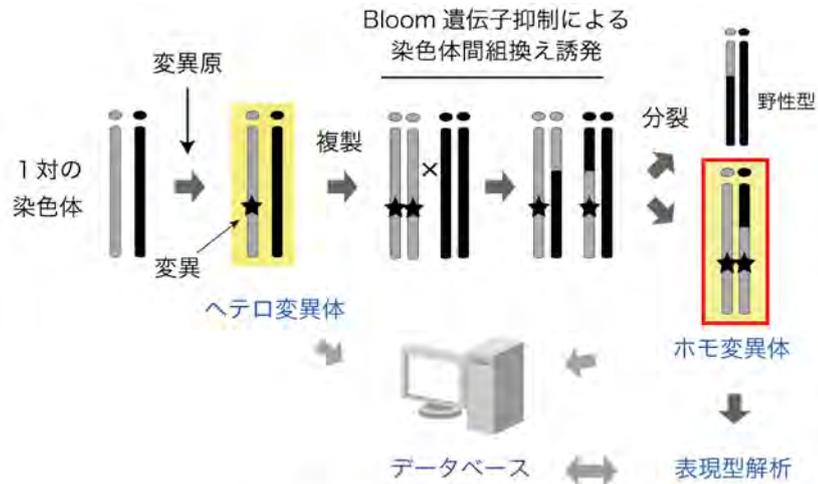


図1. 変異ES細胞バンクの構築

分裂後にホモ変異体が効率的に得られると期待される。これまでに、約 200 個のホモ変異体を単離した(論文 1; 学会発表 1, 2; プレスリリース 1)。

研究テーマ B「変異 ES 細胞バンクを用いた表現型解析」

ホモ変異体 ES 細胞を、様々な条件下で培養し、表現型の同定を試みた。まず、ES 細胞の培養条件として最も一般的な、血清入り培地での「LIF 有り、MEF 有り」の条件に加えて、「LIF 有り、MEF 無し」「LIF 無し、MEF 無し」で培養した。また、無血清培地 N2B27 において「LIF 無し、MEF 無し、2i 有り」の条件でも培養した。2i とは、Mek inhibitor と Gsk3 inhibitor を指す。2i 存在下では、野生型 ES 細胞は極めて未分化性の高い状態で培養できることが知られている。細胞は、6 穴プレート各 well あたり 500 個と、薄く播いた。これは、single cell からの増殖を観察する方が、表現型が露呈しやすいことによる。細胞の播種から 1 週間後に、細胞の形態を観察し、必要に応じて未分化・分化マーカーの染色を行った。図 2 は、血清入り培地で、LIF 存在下、MEF 非存在下で培養した例である。本実験では、既に分化抵抗性として報告のある 3 つの遺伝子に関するホモ変異体を、実験条件を評価するための positive control として用いた。図 2 に示すよう

に、3 種類のホモ変異体のいずれも、野生型 ES 細胞と比べて分化抵抗性を示した。興味深いことに、3 種類のホモ変異体は、分化抵抗性の程



図2. 遺伝子を破壊したES細胞を分化誘導し、正常細胞と比較した。分化抵抗性の性質を持つ細胞の例を示す。

度は、大きく異なっていた。このことは、同一実験条件下で表現型解析を行うことで、各遺伝子の重要度を比較・評価できることを意味し、多数のホモ変異体を有す利点と考えている(論文1)。

上記のスクリーニングで、易分化性を示した場合は、対象遺伝子が未分化性の維持に関与すると考えられるので、強制発現により iPS 細胞を誘導するための候補遺伝子となる。一方、分化抵抗性を示した場合は、対象遺伝子の機能を阻害することにより未分化性が高まると期待されるので、対象遺伝子の抑制による iPS 細胞の誘導を試みた。

研究テーマ C「iPS 細胞の生成に関与する遺伝子の同定」

分化抵抗性を示す変異体の中に、未分化 ES 細胞の培養条件において、野生型の ES 細胞と比べて、より均一かつ高い未分化性を示す変異体を同定した。これより、この原因遺伝子の機能を分化細胞で阻害すれば、細胞は未分化状態へシフトし、iPS 細胞生成も促進される可能性があると考えられる。そこで、本遺伝子産物を阻害する薬剤を用いて、リプログラミングへの影響を解析した。ES 細胞よりも発生段階が進行していると考えられる epistem cell(EpiSC)を、無血清培地 N2B27+2i+LIF の条件で培養すると、細胞は、分化もしくは死滅した。それに対して、同じ培養条件で阻害薬を加えたところ、iPS 細胞様の形態を呈すドーム状のコロニーを得た。さらに、このコロニーを単離して培養すると、本阻害薬が無くても iPS 細胞様の形態が維持され、細胞の初期化が十分に行われたことが示唆された。さらに、この細胞をマウス胚盤胞へ注入すると、キメラマウスが得られたことから、細胞の初期化を証明できた(学会発表 3)。ただし、ヒト細胞への効果については、現時点では証明できておらず、さらに別の因子が必要であろうと考えている。

研究テーマ D「細胞分化を制御する遺伝子のスクリーニング」

本変異体 ES 細胞バンクは、iPS 細胞研究以外にも、様々な細胞生物学的解析に利用できる一般的なリソースである。これまでに、造血系や神経系への分化誘導系を適用することで、これらの系譜への分化異常を示す変異体を特定している。分化と未分化性は、表裏一体であることから、様々な系譜への分化誘導を試みる中で、未分化性への考察を深めていきたい。

3. 今後の展開

本研究を通じて、マウス ES 細胞を用いた順遺伝学的な解析が可能なこと、および、iPS 細胞生成過程へ関与する遺伝子の同定が可能なが示された。上述の遺伝子以外にも、ES 細胞の表現型から、iPS 細胞生成過程への関与が推察される遺伝子を取得しており、今後も、それらの解析を、順次、進めていく。一方、本手法で解析できたのは、約 2 万個ある遺伝子のうちの極一部のみであり、包括的な順遺伝学を行うには、さらなる改良が必要である。最近になって、ヒトやマウスのゲノム改変法には大きな進展があった。ゲノムの特定部位を制限酵素で切断して効率的に変異を導入する方法や、マウスに関しては、染色体が1倍体の ES 細胞を樹立して1コピーのみの遺伝子破壊で表現型を得る方法が報告されている。我々が本研究で樹立した表現型解析プロトコールは、これらの新しい手法で得た変異体へそのまま適用でき、遺伝学的なアプローチをさらに進展させるために有効と考えている。

本研究を遂行する過程で、変異体解析の重要性を再認識するとともに、変異体解析のみに



留まっていたは、細胞の多能性やリプログラミング機構を深く理解できないことも痛感した。本研究で得た知見をさらに発展させるために、今後は、多能性やリプログラミングの研究ならではの、細胞のダイナミックな状態変化を解析するための研究手法を積極的に取り入れて行きたい。

4. 自己評価

さきがけ研究に参加するまでは、私は主に、ゲノム改変の技術開発に携わっていた。しかし、研究者として成長するには、技術開発に加えて、生命現象の根幹の解明に深く取り組むための能力と視野が必須と感じていた。そこで、本さきがけ研究では、単にこれまでの技術を生かすのみならず、長期的に取り組むに値する、生物学的な研究テーマを模索することに努めて来た。この点に関しては、未だ論文という具体的な形で示すには至っていないものの、未公開のデータも蓄積しており、本さきがけ研究の機会を得たことが、将来の発展のための契機になったと考えている。さきがけ研究を通じて、多くの研究者と知り合えたことと、さきがけ研究ならではのチャレンジ精神を学んだことを、今後の研究の財産にし、基礎医学の立場から医学の発展へ貢献したい。

5. 研究総括の見解

もともと ES 細胞を利用する順遺伝学システム作りを中心に研究を行っていたが、実際には突然変異形質をどう見つけるかに大きな課題を抱えていた。この問題を一定程度解決する可能性を iPS と分化抵抗性というフェノタイプに求め、いくつかの遺伝子同定にまで至った事は評価できる。解析が間に合わず、期限内に論文発表にまで至らなかったのは残念であるが、今回同定した遺伝子はこれまで調べられているものではないことから、地道に解析を進める事で重要な貢献が出来るのではと期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **K. Horie**, C. Kokubu, J. Yoshida, K. Akagi, A. Isotani, K. Yusa, R. Ikeda, Y. Huang, A. Bradley, J. Takeda. A homozygous mutant embryonic stem cell bank applicable for phenotype-driven genetic screening. *Nat Methods* 12: 1071-1077, 2011.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[学会発表]

1. K. Horie, J. Yoshida, J. Takeda. A recessive genetic screen for pluripotency regulators using the homozygous mutant mouse embryonic stem cell bank and its application to reprogramming study. The 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan, June 14, 2011.
2. 堀江恭二、吉田純子、國府力、竹田潤二 哺乳動物細胞における各種トランスポゾンベ



クターの比較解析とゲノム改変への応用 第 84 回日本生化学会大会 京都 2011 年 9 月 23 日

3. 堀江恭二 両アレル変異導入法を用いた ES 細胞の未分化性制御機構の解析 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011 年 3 月 22 日

[プレスリリース]

1. 堀江恭二、竹田潤二 ES 細胞において遺伝子機能を迅速に解析する方法を開発
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20111024-2/index.html> 大阪大学・科学技術振興機構
2011 年 10 月 24 日