

# 研究報告書

## 「人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 堀田 秋津

### 1. 研究のねらい

体細胞に数種類の転写因子を導入することによって作成される iPS 細胞は、分化多能性を持つ為、損傷した臓器を分化細胞によって補完する再生医療など、多様な応用が期待されている。しかしながら、iPS 細胞の誘導過程は確率論的かつ非効率であり、作出された iPS 細胞における「質のばらつき」が大きな問題となっている。iPS 細胞誘導過程において、ゲノム一次配列は基本的に変化しないが、遺伝子発現パターンを制御するエピジェネティックな環境は大きく変化して、ES 細胞のそれに変化していく。ES 細胞等多能性幹細胞の核内環境を多面的に捉え、そこに関わる因子を明らかにすることで、iPS 細胞誘導メカニズムの更なる理解を目指した。

### 2. 研究成果

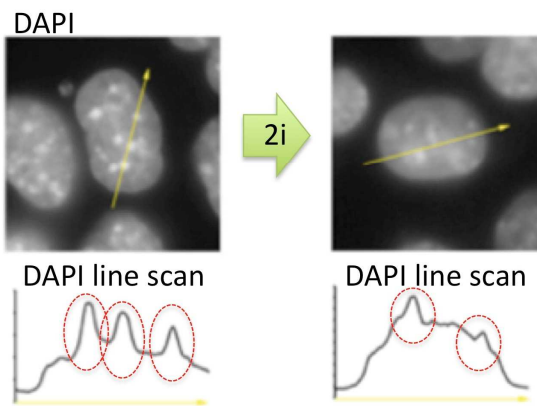
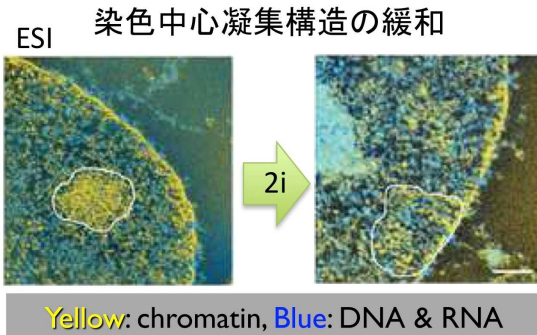
#### (1) 概要

初期化に失敗した出来損ないの iPS 細胞が、真の ES 細胞に近い状態へと変化する過程に着目し、核内のクロマチン構造変化とそれに伴うエピジェネティクス経路の包括的な理解を目指した。クロマチン構造変化を観察すると、線維芽細胞や出来損ないの iPS 細胞についてはヘテロクロマチン構造が凝集しているのに対し、真の iPS 細胞や ES 細胞はヘテロクロマチン構造が緩和していることが明らかとなった。また、外来遺伝子サイレンシングに関わる宿主因子群を同定することを目指し、*piggyBac* トランスポゾンを利用した shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングシステムを開発した。ES/iPS 細胞における強制発現ベクターや Knock-down ライブラリーにより、エピジェネティクス状態や核内環境を操作することを目標としている。

#### (2) 詳細

## 研究テーマ1「iPS 細胞におけるヘテロクロマチン構造の緩和」

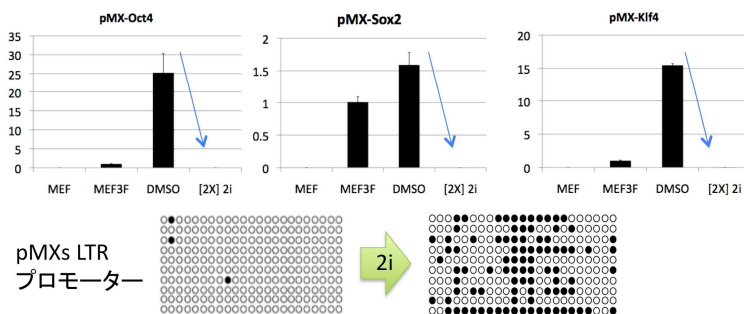
マウス細胞核内の染色中心(クロモセーター)は Major Satellite および Minor Satellite の繰返し配列で構成されており、DAPI 染色や H3K9me3 の明るいドットとして観察可能な、高度凝集クロマチン構造を取る事が知られている。ESI (Electron Spectroscopic Imaging)と呼ばれる特殊な電子顕微鏡を用いてリン(P)と窒素(N)を可視化すると、この染色中心の核内での物理的構造が体細胞や出来損ないの iPS 細胞では高度に凝集しているものの、真の iPS 細胞や ES 細胞、マウス着床前胚の ICM では凝集構造が緩和していることが明らかとなった[右図]。出来損ない iPS 細胞を真の iPS 細胞に変換するために、MEK/ERK 経路阻害剤 (PD0325901) と GSK3 阻害剤阻害剤 (CHIR99021)を添加する 2i 処理後には、この染色中心凝集構造が緩和し、DAPI 染色によるスポット蛍光強度が緩和し、マウス ES 細胞と同等の構造になることも確認した。



## 研究テーマ2「iPS 細胞におけるレトロウイルス・トランスポゾンのサイレンシング」

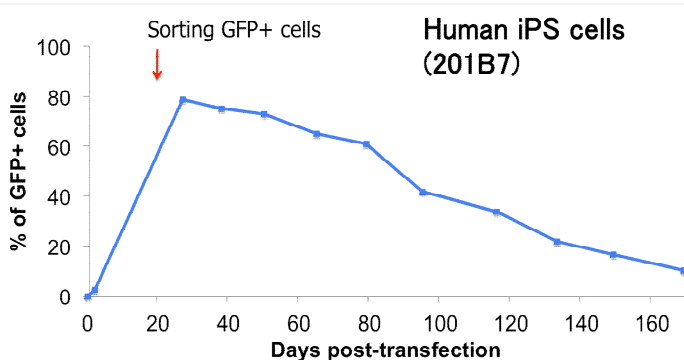
出来損ない iPS 細胞において、pMXs レトロウイルスベクターで導入された山中3因子は、サイレンシングに失敗して発現が持続している。この時、pMXs ベクターの LTR プロモーターで

2i処理後のpMXsレトロウイルスベクターのサイレンシング



は、DNA のメチル化が全く起っていない。しかし、2i 処理後にはレトロウイルスのサイレンシングが引き起され、LTR LTR が部分的に DNA メチル化を受ける事を確認した。[左図]

一方、蛾由来の DNA トランスポゾンである *piggyBac* は、ヒト ES 細胞などでサイレンシングを受けにくいとの報告がある。本当に ES/iPS 細胞でサイレンシングを受けないのかを確認するために、*piggyBac* ベクターを ES 細胞、iPS 細胞に導入して長期に渡って GFP レポーター発現を追った所、徐々に導入遺伝子の発現が低下して行くことを見出した[下図]。



同様の発現低下は、Dnmt3a, Dnmt3b 欠損 ES 細胞にも起こること、またこの時 piggyBac ベクター内部に CpG メチル化は見られないことから、サイレンシングの誘導に DNA メチル化は必要で無いことが分かった。

### 研究テーマ3・shRNA ライブラリーを用いたゲノム規模機能解析

高品質 iPS 細胞が低品質 iPS 細胞と明らかに異なるもう一つの側面は、レトロウイルス等の外来遺伝子をサイレンシングする機構を備えている点にある。このサイレンシング機構は、高品質 iPS 細胞だけでなく、ES 細胞や初期胚でも観察される機構である[Hotta et al., J Cell Bio, 2008]。MoMLV タイプのレトロウイルスに関しては、今までの研究で Trim28, Zfp809, Eset 等、いくつかの抑制因子が報告されているが、他のウイルスやトランスポゾンに関する発現抑制機構はほとんど研究が進んでいない。そこで、外来遺伝子の発現抑制機構に関与する因子を探索するべく、ゲノム規模のスクリーニング実験が必要であると考えた。

昨今、ゲノム規模の shRNA スクリーニングは、ある生命現象を基底する遺伝子群を同定する為に広く用いられている。shRNA を目的細胞の染色体へ挿入することで、長期間安定に遺伝子発現を抑制可能という利点がある。現行では shRNA をレンチウイルスベクターに搭載したものが大多数であるが、下の表で示した様に、ウイルスを使用する煩雑性・安全性、作成過程におけるバイアス、ES/iPS 細胞での外来遺伝子発現抑制[申請者文献⑧]等々が問題となっている。そこで申請者は、piggyBacトランスポゾンを利用して shRNA を導入可能な新規ベクターを開発する事とした。piggyBac ベクターは、ベクターと転移酵素をコードするプラスミドを導入するだけで、簡便に高効率で目的細胞の染色体に挿入できる新しいタイプのベクターである。下の表で挙げた様に、同じ挿入型ベクターのレトロウイルス/レンチウイルスと比べても多くの利点を持っており、利便性が格段に優れている。

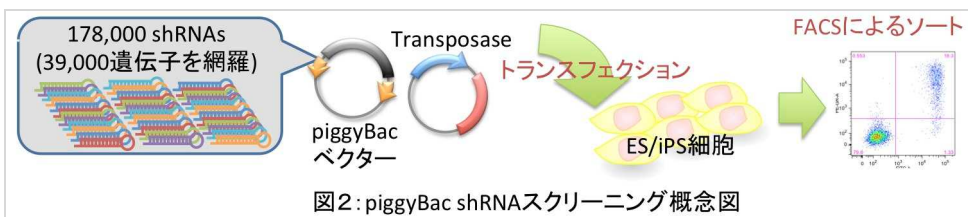
レンチウイルス shRNA ライブラリーの問題点	piggyBac shRNA ライブラリーの利点
× 封込レベル P2での取扱が必要。	◎プラスミド DNA の調整のみでライブラリーが完成(P1 レベル)
× ライブラリーの作成に大量のプラスミド DNA とパッケージング細胞が必要。	◎プラスミド DNA を細胞にトランスフェクションするだけの簡便操作。コストも安い。
× ウイルス作成過程において、ライブラリーの一部が選択的に失われ、バイアスがかかる。	◎操作ステップが少ないため、選択によるライブラリーのバイアスを最小限にできる

× 多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)ではベクター導入効率が低い。

◎ 多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)でも導入しやすく、発現抑制を受け難い。

#### ・piggyBac-shRNA ライブラリーの構築

shRNA 発現用 *piggyBac* ベクターを新たに構築し、マウス ES 細胞において GFP に対するノックダウンを行った所、80%程度の抑制効果が3週間以上安定して持続可能であることを確認した。また、SBI より購入した shRNA ライブラリーのプールを *piggyBac* ベクターへ乗せ替えた。さらに、構築した shRNA ライブラリーの数を確認するために、MiSeq を利用して超並列シーケンスを行なった所、既知のマウス遺伝子(RefSeq ベース)およそ 30,000 をターゲットとする約 60,000 shRNA が存在することを確認した。



このライブラリーを用いて、トランスポゾンベクターを長期培養した際に多能性幹細胞においてサイレンシングに影響する因子のスクリーニングを行なった。その結果、多数の転写制御因子が見出され現在はその中からいくつかの因子に絞って解析を進めている。

#### 研究テーマ4・人工ヌクレアーゼによるES/iPS細胞のゲノム編集技術確立

cDNA の強制発現、shRNA によるノックダウンの他に、ES/iPS 細胞における遺伝子機能解析を促進するために、TALEN や CRISPR/Cas9 技術を利用したゲノム編集技術の検討を行った。その結果、これまで相同組換えが困難であったヒト iPS 細胞においても、高効率でゲノム編集が可能となることを見出した。現在、上記スクリーニングで見出した因子を、ゲノム編集技術でノックアウトする実験にも取り組んでいる。

### 3. 今後の展開

*piggyBac* shRNA ライブラリースクリーニングによって同定された因子について解析を進め、なるべく早く論文を投稿したい。今回構築したライブラリーは非常に簡便にゲノム規模のスクリーニングを進める事ができるので、未知の生命現象や病態発症機構を解明する際に有用であるとかんがえる。トランスポゾンのサイレンシング誘導因子に関しては、遺伝子発現機構の解明のみならず、将来的には多能性幹細胞の特性や、外来/内在遺伝子を見分けて制御している機構などの解明に繋がるのではないかと期待している。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

当初の目的であった、iPS 細胞誘導過程におけるエピジェネティックの直接的な制御因子解析については、研究所内での実験テーマ重複や海外研究の先行もあり、思うような成果を挙げる事が出来なかった。しかし、iPS 細胞研究で威力を発揮する発現ベクター、shRNA ライブラ

リー、ゲノム編集技術やバイオインフォマティクス解析などの技術開発については、一定の寄与が出来たのではと考えている。今後は同定因子の解析と詰めの実験を進め、なるべく早く論文にまとめたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

リプログラム過程でクロモソームの染色体構造の凝集度が緩むという独自の観察を基礎に、リプログラムレベルを測定し、質の高いiPS作製法を開発するという提案だったが、この目標到達には遠かったようだ。ただ、iPSの質を高めるための様々なプロジェクトを推進しており、例えば本現象に関わる遺伝子を特定するために、shRNAで網羅的に遺伝子を抑制するシステムを立ち上げている。そのため、時間がかかり、進捗が遅いのもある程度理解できる。もともと、方法の開発など努力を厭わない研究者なので、今後も最も優れた方法をこの分野に提供するという方向でも活動して欲しいと期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Fussner E*, Djuric U*, Strauss M, <u>Hotta A</u> , Perez-Iratxeta C, Lanner F, Dilworth FJ, Ellis J, Bazett-Jones DP.(*: equal contribution) "Constitutive heterochromatin reorganization during somatic cell reprogramming." EMBO Journal, 2011; Vol.30 (9): p1778-1789.
2. Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, <u>Hotta A</u> , Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi myopathy in vitro." PLoS ONE, 2013; Vol.8 (4): e61540.
3. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, <u>Hotta A</u> , Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J "Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate." Stem Cell Reports, 2013; Vol.1 (4): p283-292.

### (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)

- ・ 李 紅梅, Knut Woltjen, 高橋和利, 山中伸弥, 堀田秋津. "TALENを用いたヒトiPS細胞におけるゲノム編集" 細胞工学, 2013; Vol.32 (5): p526-531. (総説)
- ・ 堀田秋津. "iPS細胞の小分子制御" 学術の動向, 2011; Vol.16 (5): p62-65. (総説)
- ・ Li HL, Nakano T, Hotta A "Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications." Development Growth & Differentiation, 2014; online publication. (Review)
- ・ Hotta A and Yamanaka S. "Biomaterials and Regenerative Medicine: Chapter 2 Induced Pluripotent Stem Cells", 2014, in press. (Book chapter)