

研究報告書

「純然たるヒトiPS/ES細胞の樹立、維持および増殖機構の解析」

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: 高島 康弘

1. 研究のねらい

私どもの体を構成するすべての細胞はブラストシストの初期エピブラストより発生、分化する。ES細胞はこの初期エピブラストから樹立される。マウスではMEKのインヒビターであるPD0325901とGSK3のインヒビターであるCHIR99021という2種類のインヒビターを用いた培地(2i培地)を用いる事でin vivoの初期エピブラストにかなり近い基底状態(グランドステート)細胞として維持できるようになった。

一方、ヒトES細胞はマウス同様に初期エピブラストから樹立され、多能性を持つが、発生刺激が加えられ、分化が進んだ状態ではないかと考えられている。そして、マウスにおける着床後の胚より樹立されたエピブラスト幹(EpiS)細胞に近いとされる。

マウスEpiS細胞は多能性をもつ幹細胞であるが、キメラ形成能をもたず、X染色体の活性化もなく、マウスES細胞と異なる。ヒトES/iPS細胞がマウスEpiS細胞と同じであるなら、エピジェネティクにも完全にリプログラミングされた細胞ではない可能性がある。グローバルなDNAメチレーションを見たとき、ヒトiPS細胞のDNAメチレーションはヒトES細胞とは異なったパターンを示し、完全に同じではない。マウスiPS細胞のDNAメチレーションのパターンは培養することで、ES細胞にかなり近い状態になり、ヒトiPS細胞とは異なっている。

現在私たちが培養するヒトES/iPS細胞には多様性、不均一性という問題があり、株間の差が指摘される。さらにiPS細胞の場合、完全にリプログラミングされていない不完全iPS細胞がある。不完全なiPS細胞を除外し、完全にリプログラミングされたiPS細胞を取り出すことは重要である。真にリプログラミングをされたヒトiPS細胞の樹立は純度の高い完全型iPSを樹立することにつながり、ヒトiPS細胞の効率的かつ簡便な樹立方法と培養条件の確立となりうる。また、分化実験においても、現行の問題点を克服しうる可能性がある。

以上から、ヒトにおけるナイーブ型多能性幹細胞の樹立を本研究のねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

マウスで確立された、マウスグランドステート(基底状態、ナイーブ型)ES/iPS細胞と同様の真のヒトiPS細胞、純然たるiPS細胞を樹立することが、本研究の大きなテーマである。

この目的のために、マウスにおけるデータを利用し、研究をすすめた。MEKのインヒビターであるPD0325901とGSK3のインヒビターであるCHIR99021という2種類のインヒビターを用いた培地、2i培地を用いて、ヒトにおける多能性、未分化性を維持する多能性幹細胞をまずは樹立した。樹立した細胞が、多能性幹細胞としての性質を持つのか確認し、このヒト多能性幹細胞がグランドステートとしての性質を保持するのか、解析をすすめた。

マウスナイーブ型細胞の最も大きな特徴であるキメラを形成し、生殖細胞に分化し、世代を

越えるという能力は、ヒトでは確認できない。そこで、他の特徴を利用しながら、樹立した細胞がナイーブ型としてふさわしい細胞である、という確認を行っていった。まず、シグナルがマウスグランドステートと同様になっているのか確認し、網羅的な遺伝子の発現をRNA-seqを用いて比較した。DNAメチレーションを調べ、脱メチル化を伴いエピジェネティックにもグランドステート型へ移行しているか解析した。

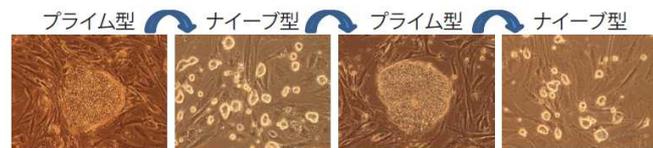
最後に、転写因子ネットワークがグランドステート型になっていることを確認した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立」

従来型のヒト ES 細胞に2種類の遺伝子、NANOG と KLF2 を導入し、誘導を行った。マウスのナイーブ型が維持可能になる MEK インヒビター PD0325901 と GSK インヒビター CHIR99021 を培地として用いた。その結果、形態の上マウス ES 細胞様の細胞を得ることができた。この細胞は ROCK inhibitor を用いることなく、単一細胞に解離し、継代をすることができる。遺伝子発現を確認したところ、マウスで発現するナイーブ型遺伝子の上昇を認めた。

この誘導条件は、H9ES 細胞、Edi2ES 細胞、Shef4ES 細胞、ピギーバックを用いた神経幹細胞由来 iPS 細胞、レトロウイルスを用いた線維芽細胞由来 iPS 細胞、センダイウイルスを用いた線維芽細胞由来 iPS 細胞、ケラチノサイト由来 iPS 細胞、ヒト脂肪組織由来 iPS 細胞で行われ、いずれの株でも樹立が可能であった(図1)。



(図1)H9ES細胞のナイーブ化を行った。培地をプライム型にすることにより、プライム型に戻る。再びナイーブ型にすることも可能である。

研究テーマ B 「ナイーブ型ヒト iPS 細胞の解析」

ナイーブ型細胞を従来型の培養条件で培養したところ、再びプライム型の形態になり、遺伝子発現もプライム型に戻った。分化能を調べたところ、ナイーブ型からの直接分化、プライム型に戻してからからの分化、ともに in vitro で三胚葉に分化する能力を認めた。また、NOD-SCID マウスの腎皮膜下に移植をしたところ、テラトーマも形成し、樹立したナイーブ型細胞は多能性を示した。

Activin/TGF シグナルを SB431542 や A83-01 によって阻害しても、ヒトナイーブ型細胞は維持された。また、LIF を加えることで、STAT3 が活性化されることと LIF の下流の遺伝子が上昇することを確認した。逆に STAT3 をノックダウンすると、ヒトナイーブ型としての維持はできなくなる。

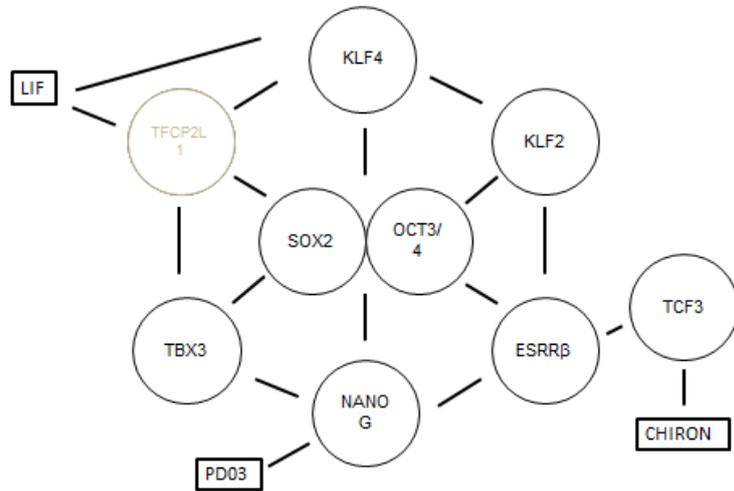
マウスにおいて、ブラストシストの初期エピブラストでは、DNA メチレーションが脱メチル化しており、2i 培地で培養したマウスナイーブ型 ES 細胞も脱メチル化していることが知られている。樹立したヒトナイーブ型 iPS 細胞の DNA メチレーションをバイサルファイト DNA シークエンスによって、網羅的に調べたところ、元々のヒト ES 細胞に比較し、グローバルな DNA メチレーションの低下を認めた。

研究テーマC「ナীব型ヒトiPS細胞の転写因子ネットワーク」

マウスナীব型多能性幹細胞は、転写因子ネットワークにより多能性を維持している。この転写因子ネットワークはキイになる転写因子が阻害されると、ネットワークは破壊され、多能性、未分化性は維持できなくなる。

ヒトにおけるナীব型転写因子ノックダウンのネットワークへの影響

もともとのヒトES細胞はキイとなる転写因子TFCP2L1の機能を阻害しても多能性を維持できた。しかしながら、樹立したナীব型では、TFCP2L1を阻害すると、多能性は維持できなくなった。すなわち、樹立したヒトナীব型は、遺伝子の発現が、変化しているだけではなく、機能的にも



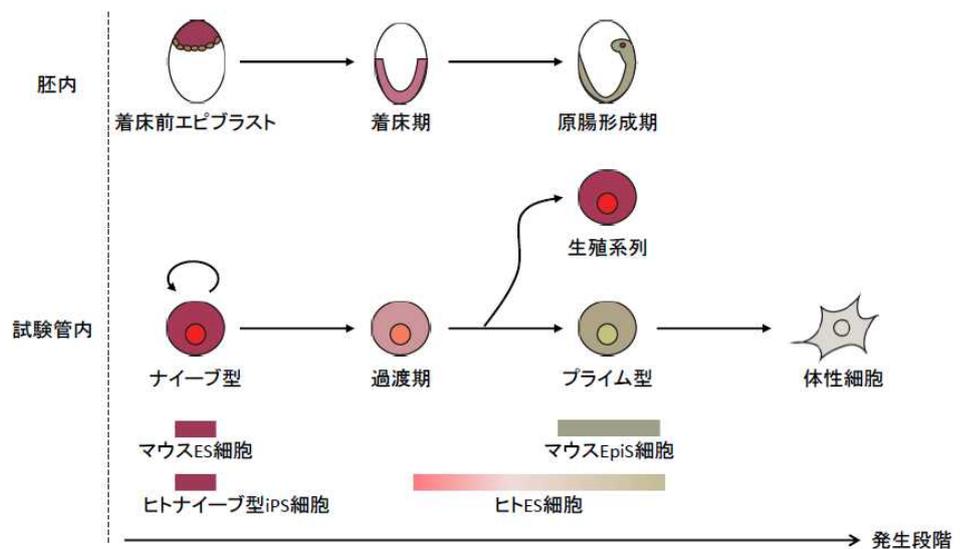
役割を話している事がわかった。通常のヒト多能性幹細胞からマウス型のナীব型転写因子ネットワークへと変化をしていることを確認できた。

3. 今後の展開

樹立したヒトナীব型iPS細胞は脱メチル化状態であることから、in vivoの初期エピブラストにより近い細胞であると共に、in vitro分化の開始点の細胞として有効な細胞となりうるかもしれない。

従来のプライム型ヒトiPS細胞にはエピジェネティックなメモリーや分化抵抗性の問題に加えて、株間の多様性の問題があった。プライム型は、発生を開始し、さまざまな分化段階にコミットしてしまっている可能性がある(図2)。着床前

(図2) 多能性幹細胞と発生段階のモデル



の初期エピブラストという一つの状態に収束したナীব型はプライム型とは異なり一つの発生ステージであり、分化誘導が容易になる可能性がある。またすでにDNAメチル化されているプライム

型の場合、メチル化された方向と違う分化系列に成熟した細胞として最終分化をさせようとするとき、遺伝子発現に問題が生じる事も推測される。

今後は、この細胞が実際に期待するような有用な細胞であるのかを確認したい。

4. 評価

(1) 自己評価

研究のねらいは、ヒトグランドステート多能性幹細胞を樹立する事で、このことに関しては、何とか目標を達成できたと考える。今後は、ピアレビューを受け、論文として、世の中に発表することである。この点においては、当初の目的の研究成果はほぼ得られたと考える。

しかしながら、iPS 細胞をめぐる研究の発展は早く、実用面での要求も強い。この細胞はマウスのような完成したグランドステートとしては、増殖能力、安定性の面からまだ十分とは言えないと考える。より完成したヒトグランドステート多能性幹細胞の樹立は、私のライフワークの一つとして、今後発展できればと考える。

同時に、今後の展開で記したように、樹立した細胞が有用な細胞であるのかの確認は、さきかけ研究内には完成出来なかった。この点は、早急に確認する事を目指す。

最後に、質の高い研究を目指すべきであるが、コンスタントに結果を出していくことも大切であり、スピードも要求される。この点は反省点であり、今後、気をつけて研究を進めたい。

(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)。

胞胚の内部細胞塊と同等のヒト ES 細胞を樹立するための条件の確立という挑戦的な提案であり、ケンブリッジに在籍しているという利点もあるとして採択した。期待通り、独自の新しい条件を確立しつつあるが、論文発表に至っていないので、この点では厳しい評価をせざるを得ない。最近、海外の幾つかの研究室から同じ方向性の論文が出始め競争が激しくなって来た。それぞれの方法はまだ幾つかの点で違いがあるため、他の論文によって今までの奮闘が無になる訳ではないが、早期に論文を発表する事が求められている。また今後、このナイーブ型のヒト ES 細胞は重要な手法として定着するので、日本での研究場所を確保して専門知識を提供する事も、さきかけ研究助成を受けた使命だと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, **Takashima Y**, Villageois P, Carrière A, Svensson M, Bagnis C, Chignon-Sicard B, Svensson PA, Casteilla L, Smith A and Dani C. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into brown and white adipocytes: Role of Pax3. *Stem Cells* in press, on line 3 Dec 2013
2. Stricker S, Feber A, Engstrom PG, Caren H, Kurian KM, **Takashima Y**, Watts C, Way M, Dirks P, Bertone P, Smith A, Beck S, and Pollard SM. Widespread resetting of DNA methylation in glioblastoma-initiating cells suppresses malignant cellular behavior in a lineage-dependent manner. *Genes and Dev* 2013;27:654-669

3. Falk A, Koch P, Kesavan J, **Takashima Y**, Ladewig J, Alexander M, Wiskow O, Taylor J, Trotter T, Pollard S, Smith A, Brüstle O. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLOS ONE* 2012;7:e29597

4. Camnasio S, Carri DA, Lombardo A, Grad I, Mariotti C, Castucci A, Rozell B, Riso PL, Castiglioni V, Zuccato C, Rochon C, **Takashima Y**, Diaferia G, Biunno I, Gellera C, Jaconi M, Smith A, Hovatta O, Naldini L, Donato SD, Feki A, Cattaneo E. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiol Dis.* 2012 46(1):41-51

5. Moretti A, Bellin M, Jung CB, Thies TM, **Takashima Y**, Bernshausen A, Schiemann M, Fischer S, Moosmang S, Smith AG, Lam JT, Laugwitz KL. Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB J.* 2010 24(3):700-11

(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)

<招待講演>

1. Takashima Y “Human pluripotency” Cellular reprogramming course in Karolinska Institutet 17 Sep 2013 Stockholm, Sweeden
2. Takashima Y “Human pluripotency” Cellular reprogramming course in Karolinska Institutet 20 Sep 2012 Stockholm, Sweeden
3. Takashima Y “Human pluripotency” Cellular reprogramming course in Karolinska Institutet 15 Sep 2011 Stockholm, Sweeden

<著作物>

1. 高島康弘 2つの多能性幹細胞—ナীব型とプライム型 「生物の科学 遺伝」NTS Vol68 NO1 2014; p.37-43
2. 高島康弘 ES/iPS 細胞—無垢なる生命のはじまりから再生医学— 「幹細胞研究と再生医療」南山堂 2013; p.43-53