

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870074

研究課題名(和文) Paused iPSCを用いたiPS細胞誘導機構の解析

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of iPSC production using paused iPSC

研究代表者

西村 健(Nishimura, Ken)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80500610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Klf4発現量を調節しながらiPS細胞誘導を行い、様々な段階でiPS細胞誘導が途中で停止した細胞(paused iPSC)の誘導に成功した。そして、paused iPSCの多能性の高さに応じて発現が誘導されてくる遺伝子のうち、Tcl1遺伝子が多能性の向上に関与していることを明らかにした。また、paused iPSCにおける、Klf4量依存的遺伝子発現調節を解析した結果、Klf4は発現量依存的にTcl1等の多能性向上遺伝子のプロモーター領域に結合し、ヒストン修飾の変換等を介してそれらの遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to produce paused iPSCs with different KLF4 expression levels remaining at distinct intermediate stages of reprogramming. Among the genes highly expressing in Klf4-high paused iPSC, Tcl1 related to induction of high pluripotency. The analyses of Klf4-dose dependent transcriptional regulation in paused iPSC indicated that Klf4 binds to Tcl1 promoter dose dependently and lead to histone modifications, resulting in the induction of Tcl1 expression and pluripotency.

研究分野：iPS細胞誘導におけるエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解析

キーワード：Klf4 iPSC細胞 Tcl1 発現量依存的

## 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を再生医療等へ実用化するためには、高い多能性を獲得した良質な iPS 細胞が誘導されるメカニズムを明らかにし、ガン化等のリスクを無くす必要がある。また、iPS 細胞誘導では、初期化誘導遺伝子の発現バランスが誘導過程に大きく影響することが明らかになっている。しかし、従来の iPS 細胞誘導方法では、これらの遺伝子を個別に導入する等の理由のため、発現バランスをコントロールしながら誘導過程を解析することは困難であった。

それに対し、我々が開発した SeVdp ベクターを用いた iPS 細胞誘導方法では、一定の発現バランスで持続的に初期化誘導遺伝子を発現させ、効率良く均質な iPS 細胞を誘導できる (Nishimura K *et al.* 2011)。そして、そのような特長を生かして、現在までに様々な細胞からの iPS 細胞樹立に成功している。(Takayama N *et al.* 2010, Tateno H *et al.* 2013, Nishimura T *et al.* 2013, Wakao H *et al.* 2013, Trokovic J *et al.* 2014, Takayama Y *et al.* 2014, Masaki H *et al.* 2015, Ando M *et al.* 2015, Kyttilä A *et al.* 2016, Matsumoto T *et al.* 2016, Okamura M *et al.* 2016)。これらの特長は iPS 細胞誘導機構の解析にも有用であり、実際に、初期化誘導遺伝子の発現バランスを変えた、様々なベクターを用いて iPS 細胞誘導を行ったところ、Klf4 の発現量を減少させたベクター (SeVdp(fKOSM)) を用いて iPS 細胞誘導を行った場合、iPS 細胞誘導が途中で停止している細胞 (paused iPSC) が多く誘導されてきた。

分解配列 (FKBP) を融合させた Klf4 タンパク質の発現量は、Shield1 という化合物を培地に加えることによって調節できる。そして Shield1 を様々な濃度加えて iPS 細胞誘導を行ったところ、100 nM Shield1 を加えた場合、従来型の SeVdp(KOSM) と同様に、十分な初期化が確認されるのに対し、それより低い濃度では、多能性関連遺伝子の発現が低く、様々な段階で iPS 細胞誘導が停止した細胞が分離されてきた。また、これらの paused iPSC で Klf4 遺伝子の発現を増加させたところ、停止していた iPS 細胞誘導が再進行するということが明らかにした。また、同様な方法で、SeVdp(fKOSM) を用いてヒト Paused iPSC を得ることが出来ることも明らかにしている。

## 2. 研究の目的

連続的で複雑な iPS 細胞誘導機構を明らかにするために、様々な段階で iPS 細胞誘導が停止した paused iPSC を用いて、iPS 細胞誘導を細かい段階に分けて、各段階における遺伝子発現や Klf4 タンパク質の結合を解析する。その結果から、高い多能性を獲得するために必要な遺伝子や細胞機能の変化を明らかにし、より効率の良い iPS 細胞誘導方法の確立に繋げる。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA マイクロアレイを用いた paused iPSC の遺伝子発現データの取得

SeVdp(fKOSM) をマウス繊維芽細胞 (MEF) に感染させ、Shield1 を 0, 10, 30, 100 nM 加えて誘導した paused iPSC について、全ゲノムの遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析する。同様に、paused iPSC に Shield1 を加えて培養し、iPS 細胞誘導を再進行させた前後の細胞についても、遺伝子発現のデータを取得する。

### (2) 全ゲノム解析を元にした高い多能性獲得に関する遺伝子のスクリーニング

(1) の DNA マイクロアレイ解析から得られた、各 paused iPSC における全ゲノムの遺伝子発現の情報を元に、より効率良く iPS 細胞誘導の各ステップを進行させるために必要な遺伝子の探索を行う。

具体的にはまず、Shield1 を加えずに誘導した paused iPSC (low-Klf4 paused iPSC) と 100 nM Shield1 を加えて誘導した paused iPSC (high-Klf4 paused iPSC) の遺伝子発現データを比較し、high-Klf4 paused iPSC でのみ発現している遺伝子を抽出する。抽出された遺伝子の中で、他の研究グループによって明らかにされている、iPS 細胞誘導後期に発現が誘導されてくる遺伝子群 (Polo JM *et al.* 2009) と共通で、かつ ES 細胞において Klf4 がプロモーター領域に結合している遺伝子 (Chen X *et al.* 2008) を選択する。選択されてきた遺伝子について、レトロウイルスベクター等を用いて paused iPSC 内で過剰発現させ、多能性関連遺伝子の発現変化を指標に、実際にこれらの遺伝子が高い多能性の獲得に関与しているか解析する。

### (3) Flag-tag 付き Klf4 発現ベクターを用いた

## ChIP 解析

(2)で解析対象となる多能性向上遺伝子は、Klf4 量依存的発現調節を受けるので、この Klf4 量依存的発現調節機構を解析するために、FKBP 配列と共に Flag-tag を融合させた Klf4 タンパク質を発現する iPS 細胞誘導用ベクターを作製する。そして、このベクターを用いて誘導された paused iPSC において、ベクターから発現した Klf4 が結合しているゲノム DNA の領域を、抗 Flag 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) によって解析する系を構築する。

### (4) Klf4 量依存的 iPS 細胞誘導機構の解析

(2)で明らかにした、paused iPSC の多能性を向上させる遺伝子のプロモーター領域への Klf4 の結合量を、(3)で構築した ChIP 解析系で定量する。Klf4 結合量の他にも、他の初期化誘導因子の結合やヒストン修飾の状態について、Klf4-low, Klf4-high paused iPSC におけるデータを ChIP 解析で取る。そしてそれらのデータを総合して、Klf4 量依存的な多能性向上遺伝子の発現誘導を介した、iPS 細胞誘導の分子機構を明らかにする。

### (5)効率良く高い多能性を獲得した iPS 細胞を誘導する方法の確立

(2)で同定した、多能性向上遺伝子について、それらの遺伝子を 4 つの初期化誘導因子に追加して発現させて iPS 細胞誘導を試みる。誘導されてきた iPS 細胞について、多能性関連遺伝子の発現等を確認することによって、iPS 細胞誘導方法の最適化を行い、従来の方法よりも、効率良く高い多能性を獲得した iPS 細胞を誘導する方法の確立を試みる。

## 4. 研究成果

SeVdp(fKOSM)を用いて、Klf4 発現量を調節しながら、iPS 細胞誘導が異なる段階で停止した paused iPSC を用意し、それらについて、DNA マイクロアレイを用いて、全ゲノムの遺伝子発現データを取得した。次に、得られたデータについて、解析ソフト GeneSpringGX10 を用いてクラスタリング解析を行い、Klf4 発現量依存的に、paused iPSC における発現量が異なる遺伝子群を同定した。Klf4 依存的に発現量が増加する遺伝子の中には、多能性維持に関わる遺伝子が多く存在したことから、paused

iPSC では、Klf4 発現量依存的に多能性が異なることが、全ゲノムの遺伝子発現解析からも証明された。

また、paused iPSC において、Klf4 に対する ChIP 解析を行うために、Flag-tag 付き Klf4 を発現する paused iPS 細胞誘導用ベクター (SeVdp(fKgOSM)) を作製した。このベクターを用いて、Klf4 発現量を調節しながら iPS 細胞を誘導したところ、SeVdp(fKOSM)を用いた時と同様に、Klf4 発現量依存的に多能性が異なる paused iPSC が得られた。この結果から、Klf4 に付加した Flag-tag は paused iPSC 誘導に影響しないことを明らかにした。そして、paused iPSC からクロマチンを調整し、抗 Flag 抗体を用いて ChIP 解析を行う方法を確立した。

paused iPSC 細胞の全ゲノム遺伝子発現解析を元に明らかにした、Klf4 量依存的に iPS 細胞誘導時に発現が上昇してくる遺伝子の中で、実際に多能性獲得に重要な遺伝子の同定を試みた。まず、我々が明らかにした Klf4 量依存的に発現誘導される遺伝子群の中で、他の研究グループによって明らかにされている、iPS 細胞誘導後に発現が誘導されてくる遺伝子群 (Polo JM *et al.* 2009) と共通で、かつ ES 細胞において Klf4 がプロモーター領域に結合している遺伝子 (Chen X *et al.* 2008) を抽出した。抽出された 8 遺伝子を、各々レトロウイルスベクターを用いて paused iPSC 細胞で過剰発現させたところ、Tcl1 と Foxh1 遺伝子を過剰発現させると paused iPSC 細胞の多能性が向上することを明らかにした。その後、Tcl1 機能の阻害剤等を用いた実験により、Tcl1 は iPS 細胞誘導時に Klf4 量依存的に発現が誘導され、複数の代謝経路の機能調節を行うことによって、多能性獲得に寄与しているということを明らかにした。

また、Flag-tag 付き Klf4 を発現する paused iPSC 誘導用ベクター SeVdp(fKg-OSM)を用いて、paused iPSC 細胞内における Klf4 の結合やヒストン修飾の状態を ChIP 解析した。その結果、Klf4 が標的遺伝子のプロモーター領域に結合する量に相関して、いくつかのヒストン修飾等が変化していることを明らかにした。以上の結果から、iPS 細胞誘導時に、Klf4 は量依存的に Tcl1 等の多能性向上遺伝子のプロモーター領域に結合し、ヒストン修飾の変換等を介してそれらの遺伝子の発現を制御しており、それによって最終的に Klf4 量依存的な

多能性誘導が起きるということを明らかにした。

さらに、4つの初期化誘導遺伝子と共に Tc1 を発現する iPS 細胞誘導用ベクター (SeVdp(fKiT-OSM)) を作製し、iPS 細胞誘導に用いたところ、従来のベクターと比較して、早い時期に多能性マーカー遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。この結果から、Tc1 遺伝子を共発現させることによって、より高い多能性を効率良く誘導できることを明らかにした。

なお、Klf4 量依存的に多能性が異なる paused iPSC が誘導されるという研究成果は、Stem Cell Reports 誌に掲載された (Nishimura K *et al.* 2014)。また、論文の内容について大学の HP でプレスリリース (<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p20141003010.html>) を行い、それに関する記事が、2014年10月3日付けの日本経済新聞に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

Okamura K, Sakaguchi H, Sakamoto-Abutani R, Nakanishi M, Nishimura K, Yamazaki-Inoue M, Ohtaka M, Periasamy VS, Alshatwi AA, Higuchi A, Hanaoka K, Nakabayashi K, Takada S, Hata K, Toyoda M, Umezawa A: Distinctive features of single nucleotide alterations in induced pluripotent stem cells with different types of DNA repair deficiency disorders. *Scientific Reports*, 2016, doi: 10.1038/srep26342, 査読有

Matsumoto T, Fujimori K, Andoh-Noda T, Ando T, Kuzumaki N, Toyoshima M, Tada H, Imaizumi K, Ishikawa M, Yamaguchi R, Isoda M, Zhou Z, Sato S, Kobayashi T, Ohtaka M, Nishimura K, Kurosawa H, Yoshikawa T, Takahashi T, Nakanishi M, Ohyama M, Hattori N, Akamatsu W, Okano H: Functional neurons generated from T cell-derived iPSCs for neurological disease modeling. *Stem Cell Reports*, Vol. 6(3), 422-435, 2016, doi: 10.1016/j.stemcr.2016.01.010., 査読有

Kyttälä A, Moraghebi R, Valensisi C, Kettunen J, Andrus C, Pasumarthy KK, Nakanishi M, Nishimura K, Ohtaka M, Weltner J, Handel BV, Parkkonen O,

Sinisalo J, Jalanko A, Hawkins RD, Woods NB, Otonkoski T, Trokovic R: Genetic variability overrides the impact of parental cell-type and determines iPSCs differentiation potential *Stem Cell Reports*, Vol. 6(2), 200-212, 2016, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.12.009., 査読有

Yamasaki S, Hamada A, Akagi E, Nakatao H, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Toratani S, Okamoto T: Generation of cleidocranial dysplasia-specific human induced pluripotent stem cells in completely serum-, feeder-, and integration-free culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, Vol. 52, 252-264, 2016, doi: 10.1007/s11626-015-9968-x, 査読有

西村健、久武幸司: Klf4 遺伝子発現調節による iPS 細胞誘導中間体の作製、医学のあゆみ、医歯薬出版、Vol. 255(2)、173-174 頁、2015、査読無

Lin HT, Masaki H, Yamaguchi T, Wada T, Yachie A, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakauchi H, Otsu M.: An assessment of the effects of ectopic gp91phox expression in XCGD iPSC-derived neutrophils. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, Vol. 2, 15046, 2015, doi: 10.1038/mtm.2015.46., 査読有

Nakadai T, Fukuda A, Shimada M, Nishimura K, Hisatake K: The RNA-binding complexes, NF45-NF90 and NF45-NF110, associate dynamically with the *c-fos* gene and function as transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, Vol. 290(44), 26832-26845, 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.688317., 査読有

Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H: A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. *Stem Cell Reports*, Vol. 5(4), 597-608, 2015, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.011., 査読有

Masaki H, Kato-Itho M, Umino A, Sato H, Hamanaka S, Kobayashi T, Yamaguchi T,

Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Nakauchi H: Interspecific in vitro assay for chimera-forming ability of human pluripotent stem cells. *Development*, Vol. 142(18), 3222-3230, 2015, doi: 10.1242/dev.124016., 査読有

Nishimura K, Kato T, Chen C, Oinam L, Shiomitsu E, Ayakawa D, Ohtaka M, Fukuda A, Nakanishi M, Hisatake K: Manipulation of KLF4 expression generates iPSCs paused at successive stages of reprogramming. *Stem Cell Reports*, Vol. 3(5), 915-929, 2014, doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.014., 査読有

Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R, Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, Kawabata K, Mizuguchi H: Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSC-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 111(47), 16772-16777, 2014, doi: 10.1073/pnas.1413481111., 査読有

Trokovic R, Weltner J, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Salomaa V, Jalanko A, Otonkoski T, Kyttälä A: Advanced Feeder-Free Generation of iPSC Directly From Blood Cells. *Stem Cells Trans. Med.*, Vol. 3(12), 1402-1409, 2014, doi: 10.5966/sctm.2014-0113., 査読有

[学会発表](計9件)

K. Nishimura : Application of novel RNA vector to stem cell engineering、Gene-editing, transgenics & stem cells: Frontiers in medical and molecular therapeutics Workshop、2015年9月8日(Dublin, Ireland) [招待講演]

K. Nishimura, N.F. Liliani, E. Shiomitsu, M. Ohtaka, A. Fukuda, M. Nakanishi, K. Hisatake : Molecular mechanism of KLF4-dose dependent induction of pluripotency during iPSC production、CiRA/ISSCR International Symposium、2016年3月22日(京都大学百周年記念

ホール、京都市) [ポスター発表]

K. Nishimura, E. Shiomitsu, N.F. Liliani, T. Kato, C. Chen, M. Ohtaka, A. Fukuda, M. Nakanishi, K. Hisatake : Manipulation of KLF4 expression generates iPSCs paused at successive stages of reprogramming、International Society of Stem Cell Research 13<sup>th</sup> Annual Meeting、2015年6月25日(Stockholm, Sweden) [ポスター発表]

西村健、加藤哲男、C. Chen、L. Oinam、塩満鋭美、大高真奈美、福田綾、中西真人、久武幸司 : Paused iPSC を用いた iPSC 細胞誘導過程の解析、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月21日(パシフィコ横浜、横浜市) [口頭発表]

加藤哲男、西村健、L. Thuy、大高真奈美、福田綾、中西真人、久武幸司 : iPSC 細胞誘導初期に関する転写因子の同定とその機能解析、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日(パシフィコ横浜、横浜市) [ポスター発表]

塩満鋭美、西村健、L. Oinam、F. Liliani、福田綾、久武幸司 : 細胞の初期化におけるリプログラム因子の機能解析、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日(パシフィコ横浜、横浜市) [ポスター発表]

西村健、加藤哲男、C. Chen、L. Oinam、塩満鋭美、大高真奈美、福田綾、中西真人、久武幸司 : Klf4 遺伝子発現量調節による多能性が異なる iPSC 細胞の誘導、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日(パシフィコ横浜、横浜市) [ポスター発表]

T. Kato, L. Oinam, E. Shiomitsu, A. Fukuda, K. Nishimura, K. Hisatake : Mechanistic analysis of the early phase of iPSC production、The 13<sup>th</sup> Joint Mini-Symposium 2014 of NTU, KU and UT、2014年9月26日(筑波大学健康医科学イノベーション棟、つくば市) [ポスター発表]

K. Nishimura, T. Kato, D. Ayakawa, L. Oinam, M. Ohtaka, A. Fukuda, M. Nakanishi, K. Hisatake : Manipulation of Klf4 expression produces paused iPSC

stalling at distinct intermediate stages of reprogramming、Keystone Symposia “Stem Cells and Reprogramming”、2014 年 4 月 8 日 (Olympic Valley, USA) [ポスター発表]

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称：多能性幹細胞作製用ベクター材料及び  
これを用いた多能性幹細胞作製方法  
発明者：中西真人、西村健、大高真奈美、佐  
野将之

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特許 WO2010134526A1

取得年月日：2014 年 10 月 24 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

プレスリリース

<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p20141003010.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 健 (NISHIMURA KEN)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80500610