

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19339

研究課題名(和文) Tc11を利用したゲノム変異の少ないiPS細胞誘導方法の開発

研究課題名(英文) A Tc11-mediated method to generate iPSCs with reduced genomic mutations

研究代表者

久武 幸司 (Hisatake, Koji)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：70271236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、iPS細胞誘導過程で、Tc11がミトコンドリア呼吸から解糖系への代謝変換を促進し、その結果としてiPS細胞の効率を向上されることを明らかにした。また、iPS細胞過程では前期及び後期に代謝変化が起こるが、Tc11は特に後期の代謝変換に関与することが分かった。iPS細胞誘導中に、Tc11を過剰発現することにより、代謝変換の促進、iPS細胞誘導効率の向上のみならず、活性酸素(ROS)の産生を低減することを明らかにした。このことより、Tc11過剰発現はiPS細胞の質向上に資する可能性があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞誘導過程では、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化が一過性に活性化され、それに伴って活性酸素(ROS)の産生量が増える。ROSはDNA損傷の原因の一つであるので、iPS細胞誘導時に発生するROSがDNA損傷を誘発し、それがiPS細胞におけるゲノム変異の一因となっている可能性がある。本研究では、Tc11が酸化的リン酸化を抑制することに着目し、iPS細胞誘導過程でTc11がミトコンドリア量と数、代謝及びROS産生に及ぼす影響を解析し、Tc11がROS産生を低減することを明らかにした。この成果は、ゲノム変異の少ないiPS細胞作製へとつながり、iPS細胞の再生医療への実用化を加速させる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we found that Tc11 enhances the metabolic shift from mitochondrial respiration to glycolysis during iPSC generation and improves the efficiency of iPSC generation. In addition, iPSC promotes the metabolic shift at the late stage rather than the early stage of iPSC generation. Over-expression of exogenous Tc11 during iPSC generation not only promotes the metabolic shift and increases the efficiency of iPSC generation, but also reduces the production of reactive oxygen species (ROS), which may damage the genome of the derived iPSCs. Our results raised the possibility that Tc11 over-expression improves the quality of the derived iPSCs, probably via reduction of the DNA damages that occur during iPSC generation.

研究分野：幹細胞学

キーワード：iPS細胞 リプログラミング 代謝変換 ミトコンドリア 活性酸素 解糖系 Tc11

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、センダイウイルスを基に独自の遺伝子導入ベクター (SeVdp ベクター) を開発し、Klf4 遺伝子の発現量を増減させて iPS 細胞誘導を行うと、初期化が幾つかの中間段階で一時的に停止した多能性の低い iPS 細胞が得られることを報告した。

上記の系を利用して、iPS 細胞誘導時に Klf4 が制御する遺伝子を探索し、Klf4 が iPS 細胞誘導後期に Tc11 の発現を誘導することを見出した。さらに、Tc11 が酸化的リン酸化を抑制し、解糖系を促進することによって、細胞のエネルギー代謝を体細胞型から幹細胞型へ変換する「代謝リプログラミング因子」として働くことを明らかにした。また、初期化誘導遺伝子と加えて Tc11 遺伝子を同時に発現させて iPS 細胞を誘導すると、初期化誘導遺伝子のみで誘導した場合に比して、iPS 細胞誘導がより早く、そして効率良く起こることも発見した。

一方、他グループの報告より iPS 細胞誘導では、代謝リプログラミングの初期過程として、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が一過性に亢進し、ROS を産生することが報告された。ここで産生された ROS は、複数の転写因子を誘導して代謝リプログラミングを促進するため、代謝リプログラミングに必須の過程であると考えられている。しかし ROS は DNA を損傷させ、ゲノム変異を引き起こすので、iPS 細胞誘導にとっては諸刃の剣となっている可能性がある。

我々は、iPS 細胞誘導後期の「代謝リプログラミング因子」である Tc11 を、誘導開始時から発現させると、一過性の酸化的リン酸化亢進や ROS 産生を経ずに、代謝をリプログラミングできるのではないかと考えている。もしそうであれば、iPS 細胞誘導過程で ROS によるゲノム変異が発生するリスクを軽減することができる。

2. 研究の目的

体細胞を初期化して樹立した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) では、ゲノム DNA の変異 (点変異、欠失、重複、コピー数変異など) が珍しくないことが知られている。このようなゲノム変異は、細胞の機能異常やガン化の原因となるので、iPS 細胞を再生医療に実用化するには大きな問題となる。分裂回数を揃えた ES 細胞と iPS 細胞を比較すると、iPS 細胞に点変異がはるかに多いことから、ゲノム変異は単なる複製エラーではなく、初期化特有の現象であると推察されている。しかし、iPS 細胞で見られるゲノム変異の原因は不明である。その一方で、iPS 細胞誘導における代謝リプログラミングの一つとして、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化が一過性に活性化され、それに伴って活性酸素 (ROS) の産生量が増えることが報告された。ROS は DNA 損傷の原因の一つであるので、我々は、iPS 細胞誘導時に発生する ROS が DNA 損傷を誘発し、それが iPS 細胞におけるゲノム変異の一因となっているのではないかと仮説を立てている。

また、我々の最近の研究から、Tc11 が「代謝リプログラミング因子」として、酸化的リン酸化を抑制することを明らかにした。また、Tc11 を初期化誘導遺伝子と共に発現させて iPS 細胞を誘導すると、初期化誘導遺伝子の場合と比較して、より早い時期に高い多能性を獲得した細胞が誘導されることも見出した。Tc11 を用いた iPS 細胞誘導は、高効率であるのみならず、誘導初期の ROS 産生を低減し、樹立された iPS 細胞におけるゲノム変異の発生リスクを下げる可能性が考えられる。

そこで本研究では、iPS 細胞誘導過程において、代謝リプログラミングのどの時期に ROS が産生するか、ROS がゲノム変異の原因となるか、及び Tc11 が ROS 産生を抑制し、ゲノム変異を低減するかを明らかにする。本研究の成果は、ゲノム変異の少ない iPS 細胞作製へとつながり、iPS 細胞の再生医療への実用化を加速させる。

3. 研究の方法

(1) センダイウイルスベクターにて 4 つの初期化因子をマウス繊維芽細胞 (MEF) に導入し、iPS 細胞誘導時に起こる代謝リプログラミング全体の時間的経過を把握する。約 30 日間に渡って 5 日毎に初期化途中の細胞を集める。iPS 細胞誘導の各段階を明らかにするために、Thy1、AP (アルカリホスファターゼ)、SSEA1、Cdh1、Nanog、Rex1 等のマーカー発現を、免疫染色、酵素活性測定及び定量的 RT-PCR にて測定する。また、代謝リプログラミングの経過を把握するために、グルコース取り込み、乳酸産生、ミトコンドリアによる酸素消費量を定量し、MitoTracker 染色でミトコンドリア量を測定する。以上より、センダイウイルスベクターによる iPS 細胞誘導の全過程での代謝リプログラミングの推移が分かる。

(2) 次に、代謝リプログラミング過程での、ROS の産生時期と産生量を解析する。上記細胞にて、MitoSox Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Thermo Fisher) を用いて ROS を定量し、ROS で誘導される Nrf2、AP1 等の発現を定量的 RT-PCR で測定する。ROS の発生は短期間で一過性の可能性があるため、必要であれば、特定の期間については、細胞を 1、2 日おきに回収し、同様の測定を行う。DNA 障害の一つである 2 本鎖 DNA 切断は、リン酸化 -H2AX の免疫染色にて観察する。以上より、センダイウイルスによる iPS 細胞誘導過程のどの時期に ROS ができ、ROS 産生と Nrf2、AP1 の誘導や 2 本鎖 DNA 切断が時間的に関連するか明らかになる。

(3) 上記の解析に関連して、リプログラミング過程でのミトコンドリア量の変化を視覚的に定量化できるかどうかを明らかにする。iPS 細胞誘導において、センダイウイルスベクターからの Klf4 発現量を変化させ、Klf4 量が少なくリプログラミングが途中で停止した細胞と

Klf4 量が高く完全にリプログラミングが起きた細胞を作製する。各細胞群を RM-DIC 顕微鏡で観察し、フェーズ量を抽出した後に、色々なレベルで閾値を設定し、ミトコンドリア量や機能を反映するフェーズ量が抽出できるか検討する。また、この閾値を用いて、iPS 細胞の多能性が推定できるかも検討する。

4. 研究成果

(1) センダイウイルスによる iPS 細胞誘導過程で、遺伝子発現の解析、細胞形態の観察、酸素消費量や乳酸産生量等の測定を行うと、少なくとも前期と後期の二つの時期に、2 段階で代謝の変換が起こっていることが明らかとなった。各段階では、ミトコンドリアによる呼吸が減少すると共に、解糖系の活動が増加し、乳酸産生が増える。ロックダウン等の解析から、Tcl1 は後期の代謝変換の促進に大きな役割をしていた。また、センダイウイルスベクターから山中 4 因子+Tcl1 を発現することにより、この後期の代謝変換が促進された。

(2) MitoSox Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Thermo Fisher)を用いて iPS 細胞誘導における活性酸素 (ROS) 産生量をモニターした結果、体細胞 (MEF) と比較して iPS 細胞では蛍光が強く観察されたことから、iPS 細胞では ROS 産生が亢進していると考えられた。他の研究グループによって、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が、iPS 細胞誘導初期に一時的に亢進するという報告があることから、その酸化的リン酸化亢進によって ROS 産生量が iPS 細胞誘導初期に増加しているか検証した。その結果、誘導 1~7 日後には顕著な増加は確認されなかったことから、iPS 細胞誘導過程における ROS 産生量の増加は、iPS 細胞誘導の後期に起きていることが示唆された。また、山中 4 因子+Tcl1 で誘導した iPS 細胞では、通常の 4 因子で誘導した iPS 細胞と比較して ROS 産生量が減少していた。このことから、誘導後期に起こる ROS 産生の亢進に対し、Tcl1 は抑制的に働くことが考えられる。既に我々が報告しているように (Nishimura K et al. 2017 Stem Cell Reports) Tcl1 は iPS 細胞誘導後期において、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を抑制する働きがある。よって、この Tcl1 による酸化的リン酸化抑制が ROS 産生抑制に関係していることが予想される。

(3) iPS 細胞誘導過程でミトコンドリアの構造と機能を追跡すると、上述の代謝変換に伴って、ミトコンドリア量の減少と酸素消費量の減少が見られた。また、多能性の高い iPS 細胞は、多能性の低い iPS 細胞に比して、ミトコンドリア量が少なく、解糖系がより活発に働いていることが分かった。この多能性の違う二つの細胞を RM-DIC 顕微鏡で観察し、ミトコンドリアに対応するフェーズ量の抽出を試みると、適切な閾値を設定することによって、フェーズ量からミトコンドリアの量 (おそらくその機能も) 定量化することに成功した。この抽出したフェーズ量は、細胞の多能性と非常に良く相関していることが分かり、RM-DIC 顕微鏡の観察から、代謝や遺伝子発現の解析をすることなく、多能性の高い iPS 細胞を同定することができた。これにより、より詳細な解析の前に iPS 細胞の選別を行い、多能性の高い iPS 細胞を簡便に選別することが可能となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Nishimura K, Ishiwata H, Sakuragi Y, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K
Live-cell imaging of subcellular structures for quantitative evaluation of pluripotent stem cells

Scientific Reports 9: 1777, 2019 (査読有)

doi: 10.1038/s41598-018-37779-x

Tran THY, Fukuda A, Aizawa S, Bui PL, Hayashi Y, Nishimura K, Hisatake K

Live cell imaging of X chromosome reactivation during somatic cell reprogramming

Biochemistry and Biophysics Reports 15: 86-92, 2018 (査読有)

doi: 10.1016/j.bbrep.2018.07.007

西村健、久武幸司

Tcl1 による代謝リプログラミングが iPS 細胞誘導を促進する

医学の歩み 265;293-294, 2018 (査読無)

西村健、Tran NVK、久武幸司

新規ベクターシステムを利用した高純度分化細胞単離法

PHARMSTAGE 17(10);11-15, 2018 (査読無)

Nishimura K, Ohtaka M, Takada H, Kurisaki A, Tran NVK, Tran YHT, Hisatake K, Sano M, Nakanishi M

Simple and effective generation of transgene-free induced pluripotent stem cells using an auto-erasable Sendai virus vector responding to microRNA-302

Stem Cell Research 23: 13-19, 2017 (査読有)

doi: 10.1016/j.scr.2017.06.011

[学会発表] (計 11 件)

Chiu CH, Nishimura K, Hisatake K

Isolation of a pure population of differentiated cells using auto-erasable vector
TGSW2018、2018年9月20日(つくば)

Nishimura K, Ishiwata H, Sakuragi Y, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K
Quantitative Assessment of Pluripotent Stem Cells by an Improved RM-DIC Imaging System
2018 TERMIS World Congress、2018年9月6日(京都)

石渡裕、西村健、久武幸司

RM-DIC顕微鏡を用いた無染色・非侵襲な多能性幹細胞の評価手法
第43回光学シンポジウム、2018年6月22日(東京)

Nishimura K, Kumar BA, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K
KLF4-dose dependent metabolic shift through TCL1 during iPSC generation
ISSCR2018、2018年6月22日(Melbourne, Australia)

Bui PL, Nishimura K, Hisatake K

Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors

The Exploring identity: lessons from genomes and epigenomes meeting、2018年5月31日(Paris, France)

相澤志穂、西村健、Nugroho FL、櫻木佑太、大高真奈美、林洋平、福田綾、中西真人、久武幸司

Klf4による多能性獲得はTcl1を介した代謝変化により起きる
第17回日本再生医療学会総会、2018年3月22日(横浜)

相澤志穂、Bui PL、西村健、久武幸司

X染色体の再活性化をモデルとしたエピジェネティクス転写制御機構の解明
超異分野学会2018、2018年3月2日(東京)

西村健、相澤志穂、櫻木佑太、林洋平、福田綾、久武幸司

Tcl1による代謝リプログラミングはiPS細胞の多能性を向上させる
ConBio2017、2017年12月9日(神戸)

相澤志穂、Bui PL、西村健、久武幸司

iPS細胞誘導におけるX染色体再活性化機構の解析

ConBio2017、2017年12月9日(神戸)

Bui PL、西村健、久武幸司

Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors

ConBio2017、2017年12月6日(神戸)

Bui PL, Nishimura K, Hisatake K

Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors

The 6th Human Biology Symposium、2017年9月27日(つくば)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西村 健
ローマ字氏名：NISHIMURA, ken
所属研究機関名：筑波大学
部局名：医学医療系
職名：准教授
研究者番号（8桁）：80500610

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。