

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460354

研究課題名(和文) iPS細胞誘導の初期段階での転写因子ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of the transcription factor network during the early stage of iPSC production

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイドな遺伝子発現解析より、リプログラミングの初期に発現量の減少する転写因子を選択し、Oct4やKlf4の直接の標的となりうる候補遺伝子をデータベースを利用して絞り、38個の候補遺伝子を見出した。siRNAや過剰発現の型を用いてこれらの遺伝子がリプログラミングに及ぼす影響を解析した。その結果、Osr1、Ebf1、Ebf3、Meox2、Smad3及びPrx1がリプログラミングの初期に低下することが、必須であることが分かった。NMuMG細胞を用いて遺伝子が上皮間葉転換および間葉上皮転換に関係するかどうかを調べたところ、Ebf3にEMTを促進する活性が認められた。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide expression analyses were used to identify transcription factors whose expression decrease at the early stage or reprogramming. They were further narrowed down by other data base to select for the genes that are likely to be regulated directly by Oct4 and Klf4. The selection resulted in 38 candidate genes whose expression changes are potentially important for the early stage of reprogramming. siRNA-mediated knockdown and over-expression of these genes showed that down-regulation of Osr1, Ebf1, Ebf3, Meox2, Smad3 and Prx1 is essential at the early stage of reprogramming. The involvement of these genes in EMT or MET was examined by the used of NMuMG cells, and the Ebf3 was found to have an activity in promoting EMT.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 遺伝子発現制御 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

本研究で用いるベクターは RNA ウイルスであるセンダイウイルスの持続感染株 Cl.151 株から開発したものである。Cl.151 株は野生型センダイウイルスとは異なり、細胞質内で長期間にわたり持続感染する (Nishimura K et al, 2007)。また、染色体挿入が無く、複数の遺伝子を一定のバランスで、持続的かつ高発現し、ベクターを人為的に除去することも可能である。このベクターの性質を利用し、Oct4、Sox2、Klf4 および c-myc を同一のゲノムに搭載した持続発現型 RNA ベクターを作製し iPS 細胞誘導を行うと、従来の誘導方法よりも約 100 倍も効率良く、しかもベクターゲノムを含まない iPS 細胞が誘導できた (Nishimura K et al, 2011)。

持続発現型 RNA ベクターによる iPS 細胞誘導系では、100%近い効率でマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) に遺伝子導入が可能であるので、この系を利用して誘導初期に關与する遺伝子のスクリーニングを行った。まず持続発現型 RNA ベクターを用いてマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) から iPS 細胞を誘導し、発現アレイ解析で全ゲノムの遺伝子発現の変化を解析した。iPS 細胞誘導過程では MEF 特異的な遺伝子発現が抑制され、細胞の性質がリセットされた後で ES 細胞特異的な遺伝子発現が起こるといふ知見 (Stadtfield M et al, 2008) があるので、我々はまず誘導初期に発現の低下する転写因子に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞誘導初期にみられる遺伝子発現の変化、特に転写因子の発現変化に着目し、その変化が iPS 細胞誘導に必須のものを同定し、次のその因子の機能を明らかにする。以上の結果をもとに、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資するデータを得る。

3. 研究の方法

1) ノックダウンによる iPS 細胞の誘導効率上昇の検証

データベースのスクリーニングで絞った 38 個の転写因子毎に、3 個の siRNA を設計する。GFP を Nanog 遺伝子座にノックインした MEF 細胞を siRNA で処理し転写因子の発現を下げた上で、Oct4、Sox2、Klf4 および c-myc を発現する持

続発現型 RNA ベクターを導入し、iPS 細胞ができるまで培養する。ここで、siRNA によるノックダウンの効率はウイルス感染直前に各転写因子の mRNA を定量して推定する。iPS 細胞誘導の効率はプレート当たりコロニー数をアルカリフォスファターゼ染色によって計測し、さらに蛍光顕微鏡観察下で Nanog 陽性細胞の比率も検討する。

2) 候補転写因子の持続発現による iPS 細胞の誘導効率低下の検証

1) とは逆に、38 個の転写因子をそれぞれレトロウイルスの発現ベクターに組み込み、MEF に予め感染させたあと、持続発現型 RNA ベクターによる iPS 細胞誘導を行い、候補遺伝子の発現低下が iPS 細胞誘導に必須かどうかを決定する。なお、この実験で用いるレトロウイルスは市販のベクターを改変したものをを用いる。予備実験により市販のベクターでいくつかの転写因子を発現させると、内在性のものに比べ 100 倍以上の発現を示し、過剰発現による細胞毒性が強くなる。市販ベクターの CMV エンハンサー/プロモーター部分を TdT などの細胞由来の弱いプロモーターに替えたベクターでは、各転写因子の発現が内在性のものの数倍程度となり細胞毒性を示さないのので、この改変ベクターにて実験を行う。

3) NMuMG 細胞を用いた各転写因子の MET での作用機構の解析

NMuMG 細胞は TGF- β により上皮間葉変換を起こすことが知られている。iPS 細胞誘導の初期ではこれと逆の現象、すなわち間葉上皮変換が起こる。本研究で同定した転写因子群は発現が低下するので、NMuMG 細胞を TGF- β で間葉上皮変換させる系を利用し、各転写因子の上皮間葉変換での役割を検討した。まず各遺伝子を siRNA でノックダウン後に、NMuMG 細胞を TGF- β で処理し、上皮間葉変換が起こるかどうかを、形態学的観察や E カドヘリンの発現低下、N カドヘリンの発現上昇にて検討する。逆に、各因子を NMuMG 細胞に過剰発現させ、形態学的観察や E カドヘリンの発現低下、N カドヘリンの発現上昇を解析し、TGF- β 非依存性に上皮間葉変換が起こるかどうかを検討する。

4) NMuMG 細胞を用いた各転写因子の MET での転写ネットワークの解析

各因子を NMuMG 細胞に過剰発現させ、上皮間葉変換時に発現が変化する遺伝子群、特に転写因子 (Sox4, Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2, Twist) に着目し、転写因子間のネットワークを明らかにする。

4. 研究成果

iPS 細胞誘導の各段階で、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 を用いて解析し、発現量が変化する遺伝子群を同定した。また、他のデータベースも利用することにより、iPS 細胞誘導の初期に遺伝子発現が急速に低下する 38 個の転写因子を候補因子として抽出した。

次に、これらの遺伝子について siRNA と過剰発現系を用いて iPS 細胞誘導への影響を検討すると、Osr1, Ebf1, Ebf3, Meox2, Smardc3 及び Prrx1 がリプログラミングの初期に低下することが必須であることが分かった。また、これらの因子を継続して発現させると形態学的により繊維芽細胞に近いものが残ることより、Osr1, Ebf1, Ebf3, Meox2, Smardc3 及び Prrx1 が間葉上皮変換時に抑制される可能性を示した。これは、正常の発生・分化の過程で、これらの遺伝子が上皮間葉変換に関係していることを強く示唆した。

そこで NMuMG 細胞を用いて各遺伝子が上皮間葉転換および間葉上皮転換に関係するかどうかを調べたところ、これらの因子の中で、特に Ebf3 に EMT を促進する活性が認められた。実際、Ebf3 を siRNA でノックダウン後、NMuMG 細胞を TGF- β で処理し、上皮間葉変換が起こるかどうかなどを、形態学的観察や E カドヘリンの発現低下、N カドヘリンの発現上昇にて検討すると、上皮間葉変換が強く抑制された。

また、Ebf3 を過剰発現させると、上皮間葉変換で重要な作用をする Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2, Twist, Cdh1, Cdh2 等の遺伝子の発現が上昇した。この作用は、上皮間葉変換のマスターレギュレーターと言われている Sox4 よりも強かった。

以上の結果より、iPS 細胞誘導の初期では、リプログラミング因子により Ebf3 の発現が抑制され、Zeb1, Zeb2, Snail1, Snail2, Twist, Cdh1, Cdh2 等の遺伝子の発現が低下

することにより、上皮間葉変換の逆現象である間葉上皮変換が引き起こされることが明らかとなった。

なお、本研究の途中で偶然見出した Klf4 量依存的に多能性が異なる iPS 細胞が誘導される系は、本研究で利用後に、別プロジェクトからのデータを追加して論文投稿し、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 5 件)

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. (2015) 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, doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.014. (2014) 査読有

Kogawa M, Hisatake K, Atkins GJ, Findlay DM, Enoki Y, Sato T, Gray PC, Kanasaki-Yatsuka Y, Anerson PH, Wada S, Kato N, Fukuda A, Katayama S, Tsujimoto M, Yoda T, Suda T, Okazaki Y, Matsumoto M: The Paired-box Domain Transcription Factor Pax6 Binds to the Upstream Region of the TRAP Gene Promoter and Suppresses RANKL-induced Osteoclast Differentiation. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M113.461848 (2013) 査読有

Fukuda A, Shimada M, Nakadai T, Nishimura K, Hisatake K: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein R Cooperates

with Mediator to Facilitate Transcription Reinitiation on the c-Fos Gene. *PLoS ONE* 8(8): e72496. doi:10.1371/journal.pone.0072496 (2013) 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

〔学会発表〕(計8件)

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(京都大学百周年時計台記念館、京都) [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 13th 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iPS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) [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：iPS細胞誘導初期に関与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) [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) [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iPS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) [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 13th Joint Mini-Symposium 2014 of NTU, KU and UT、2014年9月26日(つくば) [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]

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
取得状況(計0件)

〔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
久武 幸司 (HISATAKE KOJI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：70271236

(2) 研究分担者
西村 健 (NISHIMURA KEN)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：80500610