

IPS 細胞誘導の中間体の作製に成功 ～Klf4 遺伝子の発現量による iPS 細胞誘導の調節～

研究成果のポイント

1. iPS 細胞を誘導する4因子の一つである Klf4 遺伝子の発現量を減少させると、誘導が一時的に停止することを初めて明らかにしました。
2. Klf4 遺伝子の発現量を細かく調節することにより、誘導過程の様々な段階で一時的に停止した中間体を得ることに成功しました。
3. 中間体の細胞は、性質を変えずに安定に維持し、増やすことができます。
4. これら中間体の作製は、iPS 細胞誘導過程の詳細な解析を可能にし、良質な iPS 細胞を効率良く作製する方法の開発に繋がることが期待されます。

国立大学法人筑波大学 医学医療系 西村健助教、久武幸司教授らの研究グループは、独自に開発した方法を用いて、人工多能性^{注1}幹細胞(iPS細胞)誘導が途中で一時的に停止した中間体の作製に成功しました。

iPS細胞は、非常に複雑な過程を経て誘導され、その過程で様々な遺伝子の発現が変化します。iPS細胞誘導には、初期化^{注2}誘導遺伝子の発現バランスが重要であると言われていたのですが、従来の誘導方法では、このバランスを自在に操作することが不可能でした。

本研究グループは、独自のベクターシステム(SeVdpベクター)を用いて、初期化誘導遺伝子(Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc)の発現バランスを操作できる系を開発し、Klf4遺伝子の発現量を減少させたときのみ、多能性が低い細胞のみが誘導されてくることを見出しました。詳細な解析の結果、これらの細胞では、iPS細胞誘導が途中で一時的に停止していることが明らかになりました。さらに、Klf4遺伝子の発現量に応じて、iPS細胞誘導が様々な段階で一時的に停止した中間体が誘導されることも見出しました。このような中間体は、長期間培養しても性質が変化しない上に、Klf4遺伝子の発現量を上昇させることにより、iPS細胞誘導を再開させることもできます。

良質なiPS細胞を効率良く誘導することは、iPS細胞から作製された分化組織の安全性を高め、iPS細胞の再生医療への実用化を加速させることに繋がります。本研究で開発したiPS細胞誘導の中間体を用いると、これまで困難であったiPS細胞誘導過程の詳細な解析が可能になり、その知見は、良質なiPS細胞を効率良く誘導する方法の開発に繋がることが期待されます。

本研究の成果は、2014年10月3日付けで、国際幹細胞学会の機関誌「Stem Cell Reports」で公開される予定です。

* 本研究は、テニュアトラック普及定着事業からの支援によって実施されました。

研究の背景

人工多能性^{注1)} 幹細胞(iPS細胞)は再生医療への応用が期待されています。しかし、多能性を十分に獲得していないiPS細胞は分化能が劣るため、このような細胞を目的とする細胞に分化させて移植に用いた際には、未分化なままの細胞が残存し、腫瘍を形成するリスクが残ります。iPS細胞の安全性を高めるためには、iPS細胞の誘導機構を十分理解した上で、高い多能性を持つiPS細胞の誘導方法を確立する必要があります。

iPS細胞の誘導過程を理解するには、誘導過程で存在する中間体の細胞を解析することが有用です。しかし、誘導過程では様々な遺伝子の発現が連続的に変化するため、従来のiPS細胞誘導方法で得られる中間体の細胞は不均一であり、一過性の存在です。このような中間体細胞を大量かつ均質な状態で入手できないことが、iPS細胞の誘導過程の解析が十分に進まない要因の一つでした。

研究内容と成果

iPS細胞誘導において、初期化^{注2)} 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は知られていました。我々は、センダイウイルスの持続感染株を元に、持続的に複数の遺伝子を一定の発現バランスで発現させることができるベクター(SeVdpベクター)を独自に開発してきました。そして、ベクターの特長を生かし、SeVdpベクターから4つの初期化誘導遺伝子(Klf4、Oct4、Sox2、c-Myc)を一定の発現バランスで発現させることにより、効率良く、均質なiPS細胞を作製する系の構築に成功しています(Nishimura K. et al. 2011)。

上記のような我々独自の iPS 細胞誘導系を用いて、まず iPS 細胞誘導ベクターの感染をモニターするために、緑色蛍光タンパク質(EGFP)を初期化誘導遺伝子と共に発現する SeVdp ベクター(SeVdp(GKOSM))を作製し、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)に感染させて、iPS 細胞を誘導しました。その結果、予想に反して、iPS 細胞に類似したコロニーは誘導されるものの、それらのほとんどが多能性が低い細胞であるということが明らかになりました。我々はこの現象に着目し、なぜ、多能性が低い細胞ばかりが誘導されたのか解析を進めました。

最初に、この SeVdp(GKOSM)ベクターからの 4 つの初期化誘導遺伝子の発現量を定量した結果、4 つの遺伝子共に、従来のベクターよりも発現量が低下していることが明らかになりました。

次に、Proteotuner system^{注3)}を用いて、初期化誘導遺伝子の発現を個別に減少させることができる SeVdp ベクターを作製し、これを用いて iPS 細胞誘導を行いました。その結果、4 つの遺伝子のうち、Klf4 遺伝子の発現を減少させたベクター(SeVdp(fK-OSM); 図1)を用いたときのみ、SeVdp(GKOSM)と同様に、多能性が低い細胞ばかりが誘導されてくることを明らかにしました。

Proteotuner system では、Shield1 という化合物を培地に加える量によって、目的のタンパク質の発現を調節できるので、Shield1 添加量を変えて Klf4 発現量を調節しながら(図2)、SeVdp(fK-OSM)を用いて iPS 細胞誘導を行いました。その結果、Shield1 添加量を増やすのに従って、誘導されてくる細胞の多能性が向上し、100 nM の Shield1 を加えた場合には、十分に高い多能性を獲得した iPS 細胞を樹立することができました(図3)。このことから、ベクターからの Klf4 発現量を調節することによって、多能性の異なる細胞を誘導することができることを明らかにしました。我々は、このように、Shield1 添加量によって Klf4 発現量を調節しながら、SeVdp(fK-OSM)を用いて、多能性の異なる細胞を誘導するシステムを、SeVdp-based Stage Specific reprogramming system (3S reprogramming system)と名付けました(図4)。

さらに、3S reprogramming system を用いて誘導した多能性が低い細胞に対し、途中から Shield1 を加えて培養すると、多能性が向上することを明らかにしました。このことから、3S reprogramming system で誘導した細胞は、iPS 細胞誘導が途中で一時停止しているが、Klf4 発現量を上昇させることによって、初期化を再開させることができるということを見出しました。我々はこのような、iPS 細胞誘導が途中で一時停止した細胞を paused iPSC と名付けました。Paused iPSC 細胞は、長期間培養してもその性質が変化しないため、様々な段階で iPS 細胞誘導が一時停止した細胞を比較的大量に調整することができます。

また、ヒト繊維芽細胞に SeVdp(fK-OSM)を感染させて、iPS 細胞を誘導したところ、マウス細胞の場合と同様に、Klf4 発現量依存的に、iPS 細胞誘導が途中で一時停止した細胞が誘導されました。この結果から、3S reprogramming system を用いて、ヒト細胞からも paused iPSC を誘導できることを明らかにしました。

以上の結果から、iPS 細胞誘導において、Klf4 遺伝子の発現量が多能性獲得のために重要であり、3S reprogramming system を用いて、Klf4 遺伝子発現量を調節して iPS 細胞誘導を行うと、様々な段階で iPS 細胞誘導が一時停止した paused iPSC が誘導できることを明らかにしました。

今後の展開

本研究で開発された 3S reprogramming system では、ベクターからの Klf4 遺伝子発現量を調節するのみで、再現性良く、iPS 細胞誘導の中間体である paused iPSC を得ることができます。paused iPSC では、iPS 細胞誘導が途中で安定した状態で一時停止しているため、ある段階で停止した細胞を大量に調整することも可能です。よって、このような paused iPSC を用いて、従来の iPS 細胞誘導方法では不可能であった、iPS 細胞誘導過程の詳細な解析が可能になると考えられます。

また、3S reprogramming system では、転写因子である Klf4 の発現量を変えることによって、異なる遺伝子発現が誘発されることから、このシステムを用いて、転写因子の微細な量の変化によって遺伝子発現を変える機構の解析も可能になると考えられます。

このように、本研究で開発した我々独自の技術を用いて、iPS 細胞誘導過程の詳細が明らかになり、その知見を元に iPS 細胞の再生医療への実用化が加速することが期待されるとともに、その他の生命現象における遺伝子発現調節機構の理解においても、重要な知見を得ることが期待されます。

参考図



図1: SeVdp(fK-OSM) ベクターの構造

ProteoTuner system 由来のタンパク質不安定化配列を Klf4 タンパク質に融合し、Shield1 によって Klf4 発現量を可能にしている。

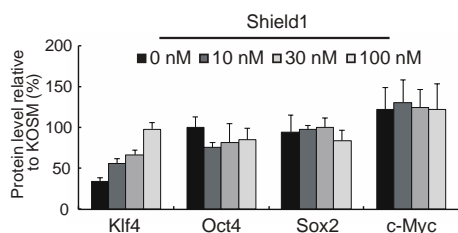


図2: ベクターからのタンパク質発現

4 つの初期化誘導遺伝子のうち、Klf4 のみ Shield1 添加量に応じて発現量が変化する。

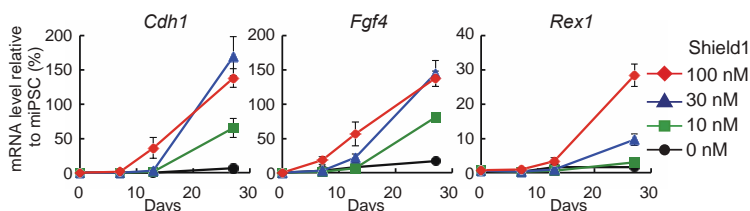


図3: SeVdp(fK-OSM)で誘導した細胞の多能性マーカー発現

Shield1 の量依存的に多能性マーカーの発現が上昇し、多能性が異なる細胞が誘導されていることが分かる。

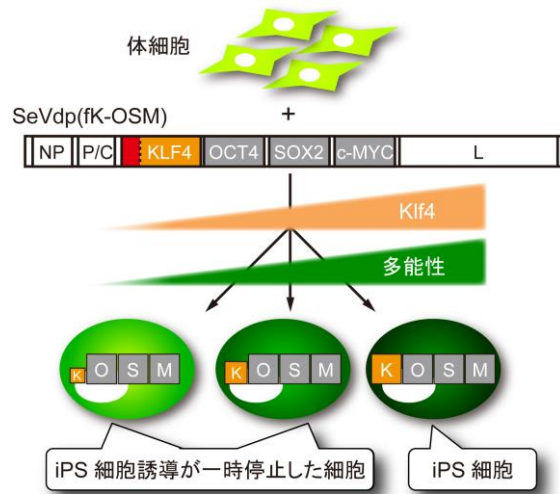


図4: 3S reprogramming system の概要

3S reprogramming system を用いて Klf4 発現量を調節して iPS 細胞誘導を行うと、Klf4 発現量に応じて、多能性の異なる、iPS 細胞誘導が一時停止した細胞 (paused iPSC) を得ることができる。

用語解説

注1) 多能性

様々な組織に分化できる能力(多分化能)と、性質が変わること無く増殖する能力(自己複製能)の両方を併せ持つ能力を多能性といいます。胚性幹細胞(ES 細胞)は多能性を持つ代表的な細胞。iPS 細胞も体細胞に遺伝子を導入して、ES 細胞と同等の多能性を獲得させた細胞です。

高い多能性を維持している iPS 細胞は高品質な iPS 細胞と言え、様々な組織を分化誘導し、再生医療に応用することができます。

注2) 初期化

細胞に多能性を獲得させること。分化と逆の細胞機能変化を起こします。iPS 細胞は体細胞を初期化することによって誘導されてくる細胞です。

代表的な初期化誘導遺伝子は、山中4因子とも呼ばれる Klf4、Oct4、Sox2、c-Myc の4つの遺伝子です。

注3) Proteotuner system

タカラバイオ株式会社から販売されている、タンパク質発現量調節システム。

FK506 結合タンパク質(FKBP)由来のタンパク質不安定化配列を利用しており、この配列を融合したタンパク質は、分解されやすくなるために発現量が減少します。さらに Shield1 という低分子化合物は、この不安定化配列に結合し、量依存的に分解を阻害するため、培地へ Shield1 を添加量することによって、タンパク質発現量を回復させることができます。

参考文献

K. Nishimura, M. Sano, M. Ohtaka, B. Furuta, Y. Umemura, Y. Nakajima, Y. Ikehara, T. Kobayashi, H. Segawa, S. Takayasu, H. Sato, K. Motomura, E. Uchida, T. Kanayasu-Toyoda, M. Asashima, H. Nakauchi, T. Yamaguchi, M. Nakanishi, Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: a Unique Gene Delivery/Expression System Ideal for Cell Reprogramming, *J. Biol. Chem.*, Vol. 286, 4760-4771, 2011

掲載論文

【題名】Manipulation of KLF4 expression generates iPSCs paused at successive stages of reprogramming
(Klf4 発現量の操作によって様々な段階で初期化が停止した iPS 細胞が得られる)

【著者名】 K. Nishimura, T. Kato, C. Chen, L. Oinam, E. Shiomitsu, D. Ayakawa, M. Ohtaka, A. Fukuda, M. Nakanishi, K. Hisatake

【掲載誌】 Stem Cell Reports

問合わせ先

西村 健(にしむら けん)

筑波大学 医学医療系 助教

久武 幸司(ひさたけ こうじ)

筑波大学 医学医療系 教授