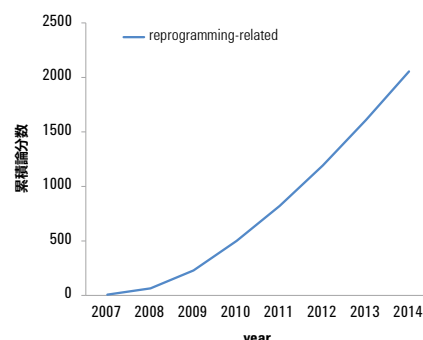




幹細胞におけるリプログラミング

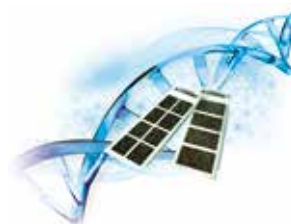
2007年、世界で初めてのヒト iPS 細胞の作製の報告において、患者 / 疾患由来の多能性幹細胞を作り出す可能性が示されて以来、iPS 細胞は基礎研究のみならず、再生医療の利用に向けた応用に関する研究が破竹の勢いで進んでいます。iPS 細胞に関する論文報告は基礎から応用研究に至るまで幅広く出版されており、『2010年は、242の論文が発表された』と山中先生が述べたことは比較的記憶に新しいところですが¹⁾、その後、リプログラミング法の改良を始めとする基礎研究に関する報告は着実に増えており、2014年末の時点で幹細胞の「リプログラミング」に関する論文数だけでも2000報に達しています(右図参照)。



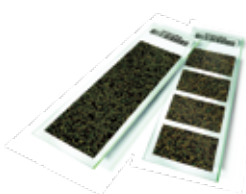
近年では、miRNA や低分子化合物など従来の遺伝子とは異なる物質によってリプログラミングを促進したり、ゲノムの不安定性を回避する方法の報告がなされています。さらに、2015年に入り、2000報を超えるリプログラミング法のデータベース化²⁾、種々のダイレクトリプログラミング法の比較³⁾、オートファジーのプロセスの関与の報告⁴⁾、同じ遺伝的バックグラウンドを持ったESとiPS細胞の同一性を様々なゲノミクス手法によって解析した結果が報告されたり⁵⁾と、リプログラミングに関する基礎研究の成果は今なおとどまるところを知りません⁶⁾。

アジレント社は、比較的最新の疾患やがんデータベースの知見を基にプローブ密度を上げたCGHカタログアレイ、miRNA/lncRNAのデータベースに対応させた高密度カタログアレイ、オリジナリティの高い基礎研究を進めていただくためのカスタムアレイの提供を行っています。今回は、幹細胞とリプログラミングとの様々な関わりの中から、アジレント社の製品を使用した例を中心に、これらの解析結果を報告した論文をご紹介します。

- 1) *Bio Clinica* 2011 26(9):13. Yamanaka S.
- 2) *Bioinformatics*. 2015 Oct 1;31(19):3237-9. Shen Y, et al.,
- 3) *PLoS One*. 2015 ;10(11)e0141688. Winiacka-Klimek M, et al.,
- 4) *Nature Cell Biol*. 2015 Nov;17(11):1379-87. MA T, et al.,
- 5) *Nat Biotechnol*. 2015 Nov;33(11):1173-81. Choi J, et al.,
- 6) *Nat Commun*. 2016 Mar 7;7:10869. Shao Z, et al.,



複製ストレスによる iPS 細胞の不安定化を軽減させる試み



iPS 細胞のゲノム不安定性の原因として、活性酸素などによる DNA 損傷など幾つかのエビデンスが報告されていますが、十分に解決されているとは言えません。今回、Ruiz S *et al.* は、ゲノム不安定性が複製ストレス (RS) に関連付けられた DNA 損傷の一つのタイプであることを示しました。彼らは、Chk1TG (チェックポイントキナーゼ 1) の量を増やすことで、マウスの胚性繊維芽細胞からのリプログラミング誘導が WT (野生株) 細胞より効率的に起こることを見出しました。その中で、リプログラミングから誘導される RS がヌクレオシドによって抑制されることも見出しました。彼らは、リプログラミング過程

におけるヌクレオシド補充の有り・無しの条件において得られた幾つかのヒト iPS 細胞株に対して、高密度アジレント **CGH マイクロアレイ** を用いた解析を行い、CNV の数を評価しました。その結果、ヌクレオシド補充の存在下でリプログラミングが行われた時、新規に検出された *de novo* CNV の平均数が少なくなることが示されました。これらの *de novo* CNV については、再発性の染色体再構築の脆弱部位として知られるものや、RS を引き起こす薬剤に反応して CNV を起こすことが知られている遺伝子座が含まれていました。一方、エクソーム解析の結果からは、ヌクレオシドの処置に関係なく翻訳領域内で点変異が見られ、これらはリプログラミングの過程で元の繊維芽細胞が持つ変異を反映していることが示されています。今回の報告で明らかにされた条件によって iPS 細胞のゲノム不安定性を部分的に軽減できることが示されました。この分野での研究が進むことにより、リプログラミング過程で起きる望ましくない影響を回避する手段の開発が望まれます。

“Limiting replication stress during somatic cell reprogramming reduces genomic instability in induced pluripotent stem cells.” *Nat Commun*. 2015 Aug 21;6:8036. Epub 2015 Aug 21. Ruiz S, Fernandez-Capetillo O.,





ヒトレトロウィルスの発現が iPS 細胞の初期化や分化に与える影響

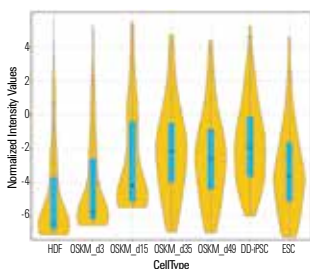


Fig. アジレント遺伝子発現マイクロアレイで取得した DD-iPSC マーカー遺伝子のバイオリンプロット

ヒト繊維芽細胞 (HDF) を OSKM で初期化するとマーカー遺伝子の発現が上昇し、初期化が進むと発現は減少するが、DD-iPSC は上昇したままであることが示された。

GSE54848 の一部を弊社 GeneSpring GX にて表示。軸: log₁₀ normalized signal intensity. 青いボックスの上端は 75 percentile、中央が 50 percentile、下端が 25 percentile。

分化多能性を持つ iPS 細胞 (iPSC) は、体細胞に山中 4 因子 (OSKM:OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入することで作製されますが、そのうち 20% の細胞は神経へ分化誘導しても分化抵抗性を示します。このような differentiation-defective (DD)-iPSC において、著者はヒト内在性レトロウイルス (HERV-H) の反復配列 long-terminal repeat (LTR7) 領域が関与することを前報^{*}で報告しました。本論文では、まず一細胞サブクローニングを行い、正常 iPSC と DD-iPSC を単離しました。abhydrolase domain containing 12B (ABHD12B)、HERV-H LTR-associating1 (HHLA1)、KLF4 や long intergenic non coding RNA, regulation of reprogramming (lincRNA-RoR) を含む 144 遺伝子が DD-iPSC 特異的に高発現しており、このうち約 2 割の遺伝子は LTR7 の下流 30 kb 内にコードされていました。さらに DD-iPSC におけるこの 144 遺伝子の発現挙動は初期化途中の細胞 (TRA-1-60 (+)) と類似していることを見出しました。RNA-Seq 解析の結果、TRA-1-60 (+) 細胞では ABHD12B、HHLA1、lincRNA-RoR 中の LTR7 も発現していることが分かり、エピジェネティックな解析からも初期化中の細胞と DD-iPSC との類似性が示されました。LTR7 の発現は、TRA-1-60 (+) 細胞の初期化後数日で上昇し、初期化が進むにつれて減少し、正常 iPSC 細胞と同じレベルに下がっており、初期化には欠かせないことが示唆されました。次に著者は初期化因子 OSKM のうち KLF4 が LTR7 を活性化することを示しました。正常 iPSC に KLF4 を発現させ神経に分化させると、KLF4 を発現させていない細胞と比べ、多能性マーカー陽性を示す細胞が多くなりました。また DD-iPSC において LTR7 や KLF4 の発現を抑制すると HERV-H の発現が減少し、分化誘導後に多能性マーカー陽性を示す細胞も減少しました。以上のことから、山中 4 因子の導入で作製された当時の iPSC 細胞においては、初期化や分化抵抗性においてレトロウィルスの発現が極めて重要な役割をもっていたと言えます (2016 年 3 月現在の再生医療への取り組みで調整されている iPSC 細胞では初期化因子や培養条件等が当時の状況と異なっています^{***)}。

* Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Dec 17; 110(51): 20569-7, Koyanagi-Aoi M. et al.

** Sci Rep. 2014 Jan 8; 4:3594. Nakagawa M. et al.

“Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential.” Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Aug 26; 111(34):12426-31 Ohnuki M. et al.,

新たに樹立した多能性幹細胞の性質をアジレント遺伝子発現マイクロアレイで検証



通常は体細胞から iPSC を作製するにはウィルスベクターあるいは非組込ベクターなどを用いて OSKM を導入しますが、Bose B. et al は OSKM や低分子を用いずに筋肉由来幹細胞 (MDSC) から多能性幹細胞を作製することに成功しました。TGF β スーパーファミリーの 1 つであるミオスタチン null mice (*Mstn*^{-/-}) 由来の MDSC (*Mstn*^{-/-} MDSC) を 95 日間、Leukemia Inhibitory factor (LIF) とともにマウス胚性幹細胞 (mESC) の培地で長期培養すると胚性幹細胞様コロニーが形成され、これを CiPSC (culture-induced pluripotent stem cells) と名付けました。CiPSC と野生型マウス由来の MDSC (WT-MDSC)、W4mESC の発現挙動をアジレント遺伝子発現マイクロアレイで比較すると、多能性に関与する遺伝子が CiPSC と W4mESC で高発現しており、CiPSC は WT-MDSC

よりも W4mESC に発現挙動に近いことが示されています。次に *Mstn*^{-/-} MDSC と WT-MDSC を、mESC の多能性を誘導する条件下で培養したところ、*Mstn*^{-/-} MDSC のみ間葉から上皮多能性様細胞へ変化し培養 50 日以後、多能性遺伝子 Oct4 や Rex1 の発現が上昇しました。著者は作製した CiPSC クローンが W4mESC と同様の形態を示すことやアルカリホスファターゼ染色により Oct4, Sox2, Nanog などの多能性マーカーが陽性であること、長期培養下でも核型が安定していることなどを確認しています。さらに CiPSC 形成のメカニズム解明のため、多能性の重要な制御因子の 1 つである TGF β パスウェイのメチル化状態を解析したところ、CiPSC は W4mESC と同様、BMP2 が高メチル化され、タンパクレベルでも発現していないことをウェスタンブロットで確認しました。今後 CiPSC の分化確認が期待されます。

“Pluripotent Conversion of Muscle Stem Cells Without Reprogramming Factors or Small Molecules.” Stem Cell Rev. 2016 Feb; 12(1):73-89 Bose B. et al.,

アジレントゲノミクス関連製品サイト : <http://AgilentGenomics.jp>

販売店

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品は全て研究用です。

その他の用途にご利用いただくことはできません。

<http://AgilentGenomics.jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2016

Printed in Japan, May, 15, 2016

