

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成28年4月25日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科

(申請時) iPS細胞研究所 特定研究員

(報告時) ETH Zurich Department of Biosystems Science and
Engineering ポスドク研究員

氏 名 島 本 廉

助成の種類	平成27年度・若手研究者在外研究支援・在外研究長期助成		
研究課題名	iPS細胞誘導時の体細胞への逆戻り分子機構の解明		
受入機関	スイス連邦工科大学チューリッヒ校		
渡航期間	助成対象期間 平成27年4月1日 ～ 平成28年3月31日(現在留学継続中)		
成果の概要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会計報告	交付を受けた助成金額	3,000,000円	
	使用した助成金額	3,000,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	渡航費(航空券)	96,870円
		交通費	98,000円
滞在費充当		2,805,130円	
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 助成金は渡航費、交通費、滞在費に使わせて頂きました。これによって生活基盤が安定し、研究を円滑に進めることができました。海外留学のための助成金は数が少なく、競争率が高いです。一人でも多くの研究者の留学を支援できるようにこの在外研究長期助成を続けて頂きたいです。一年間の留学期間に研究だけでなく海外生活のノウハウなど様々なことを学びました。このような情報をこれから留学する方に伝えるための場、例えば前年度採択者と交流会などがあればと思います。		

iPS 細胞誘導時の体細胞への逆戻り分子機構の解明

ETH Zurich Department of Biosystems Science and Engineering/Timm Schroeder 研究室

島本 廉

研究目的

体細胞に特定の遺伝子を発現させることによって、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が誘導される。最近、iPS 細胞の誘導過程において、一度多能性幹細胞に特異的なマーカーを発現するようになった細胞 (iPS 細胞前駆細胞)の、実に 50%以上が体細胞へと逆戻りすることが示された。しかし、そのメカニズムは明らかにされていない。

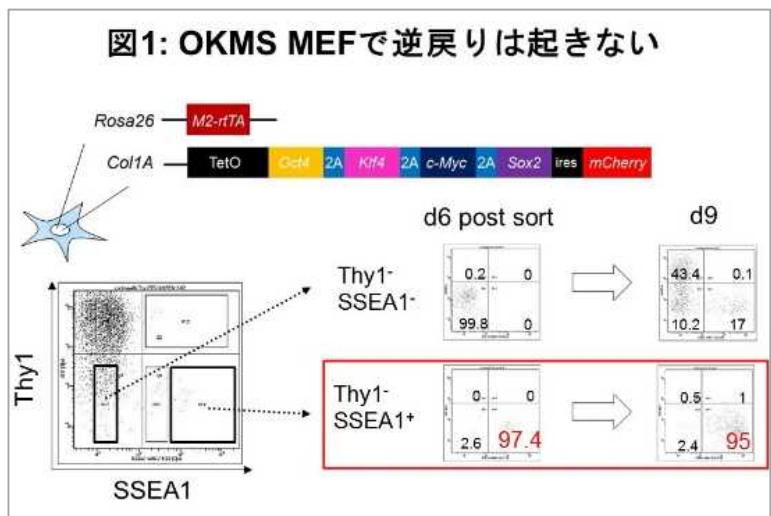
本研究では生細胞イメージングを用いて、逆戻り細胞を一細胞レベルで特定し、逆戻り細胞で生起する変化とその機構を分子レベルで解析する。逆戻りの分子機構を解析することにより、より詳細な iPS 細胞誘導の必要条件を明らかにする。

結果

OKMS MEF で逆戻りは起きない

まず初めにこれまで報告されている逆戻りがマウス iPS 細胞誘導中に起こるかどうかなを確認した。iPS 細胞誘導には $Collagen1a1^{TetO-Oct3/4-Klf4-c-Myc-Sox2}$, $Rosa26^{rtTA}$ マウス胎仔線維芽細胞 (OKMS MEF) を用いた。この細胞は $Collagen1a1$ 遺伝子座に $Oct3/4$, $Klf4$, $c-Myc$ 及び $Sox2$ (OKMS)が挿入されており、ドキシサイクリンを加えることによって iPS 細胞を誘導することが可能である。ウイルスやプラスミドを用いた方法ではリプログラミング因子のコピー数や挿入部位が細胞毎に異なり、細胞毎のリプログラミング因子の発現レベルが異なる。この方法では、細胞間で発現レベルが均一であり、リプログラミング因子の働きをより直接的に見ることができる。逆戻りは、iPS 細胞誘導開始後 6 日目に SSEA1 陽性 $Thy1$ 陰性細胞 (iPS 細胞前駆細胞) を回収し、3 日後に

SSEA1 陽性 $Thy1$ 陰性細胞がどれだけ含まれているかで判断した。SSEA1 は多能性細胞マーカー、 $Thy1$ は皮膚細胞マーカーとして知られている。誘導開始後 5 日目で SSEA1 陽性の細胞が出現し始めることが予備実験により分かっていた。iPS 細胞誘導が進むにつれて細胞は iPS 細胞へと変化し、逆戻りが起こりにくくなると考えられたため、出来るだけ早い日の 6 日目の細胞集団から iPS 細胞前駆細胞を回収した。



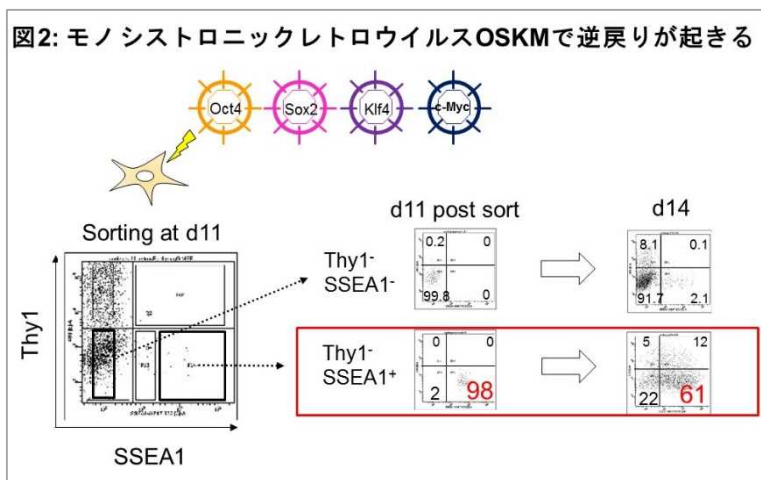
出来たばかりの 6 日目の細胞集団から iPS 細胞前駆細胞を回収した。

細胞回収直後に97.4%であったThy1陰性SSEA1陽性の割合が9日目には95%となり、2.4%減少した(図1)。これまでの報告のような50%程の大きな減少はなく、OKMS MEFでは逆戻りが起きていないと考えられた。

モノシストロニック O, S, K, M レトロウイルスでは逆戻りが起きる

これまでの報告により、iPS細胞誘導過程の細胞の変化はリプログラミング因子の発現量のバランスや遺伝子導入方法に依存することが知られており、逆戻りもiPS細胞誘導方法に依存して起こる可能性が考えられる。そこで、逆戻りが起こる方法と起こらない方法を比較し、逆戻りの原因を調べるため、逆戻りが起こる方法を探すこととした。まず初めに、ヒトにおいて逆戻りの報告があるモノシストロニック O, S, K, M レトロウイルスを検討した。この方法では誘導開始後10日目からSSEA1陽性細胞が出現し始める。11日目に98%であったThy1陰性SSEA1陽性画分が14日目には61%であり、37%の減少が見られた(図2)。

この結果からモノシストロニック O, S, K, M レトロウイルスを用いた方法では逆戻りが起こることが分かった。



生細胞イメージングによる逆戻り細胞の特定

標識に用いる抗体の検討

逆戻りする細胞を特定するため、タイムラプスムービーを用いることとした。まず初めにiPS細胞前駆細胞を標識に用いる抗体の検討を行った。マウスES細胞もしくはMEFをibidi μ -slide vi0.4に播種し、一日培養した後、抗体を添加したphenol red freeの培地に交換し、30分後写真を撮影した。その結果、SSEA1-FITC抗体を用いた場合ポジティブコントロールであるES細胞は標識されるがネガティブコントロールのMEFは標識されなかった(図3)。Thy1-APCを用いた場合、ポジティブコントロールのMEFが標識されるがネガティブコントロールのES細胞は標識されなかった(図4)。以上の結果からこれらの抗体をiPS細胞前駆細胞の識別に用いることにした。

図3 SSEA1-FITCはES細胞を標識する

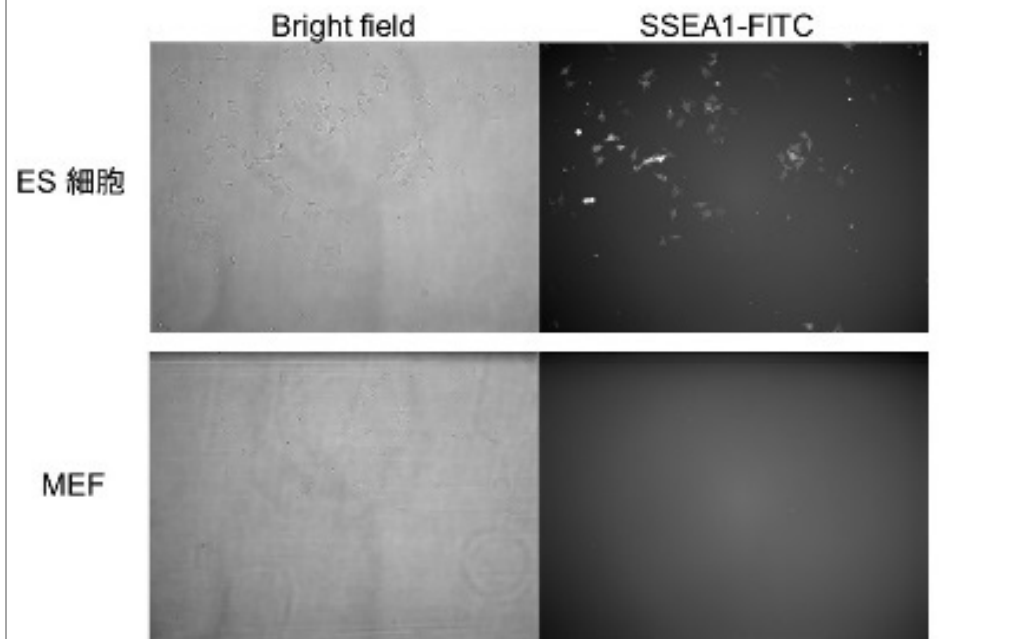
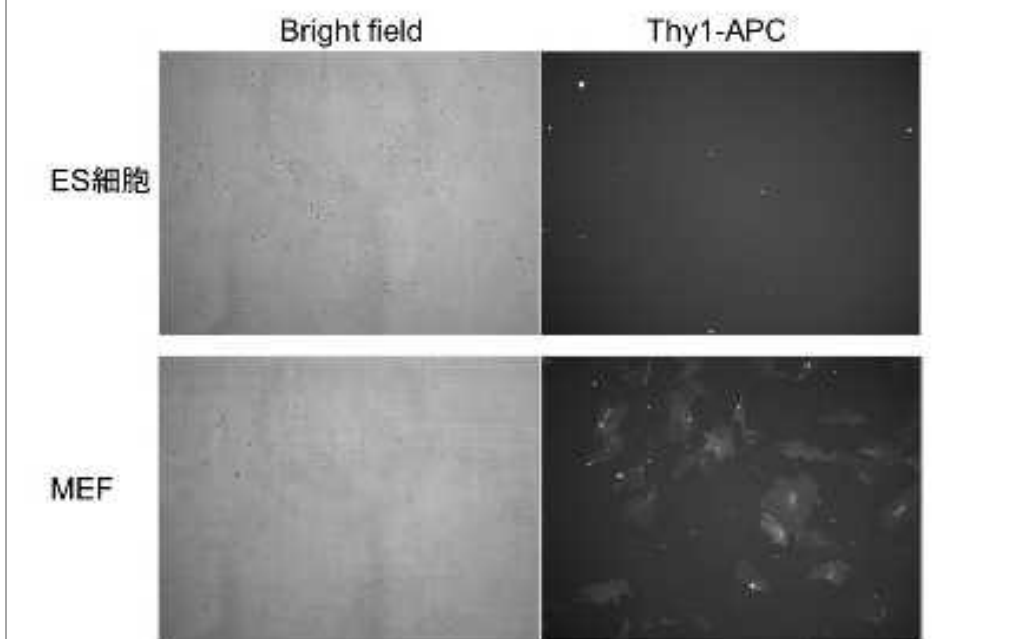


図4 Thy1-APCはMEFを標識する



今後の予定

OKMS MEF では逆戻りが起こらずモノシストロニック OSKM レトロウイルスを用いた方法では逆戻りが起きた。この結果から逆戻りの原因としてリプログラミング因子の発現のバランス、発現量、プロモーターのサイレンシングが考えられる。今後これらと逆戻りの関係について調べる。生細胞イメージングについては、今回検討した抗体を用いて iPS 細胞前駆細胞を標

識し、逆戻りする細胞（SSEA1 陽性 Thy1 陰性から変化する細胞）を特定する。その後、免疫染色を用いて逆戻り細胞の遺伝子発現について調べる。

以上