

iPS 細胞誘導初期の転写調節機構の解析

加藤 哲男 (筑波大学 生物学類)

指導教員：久武 幸司 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

近年、失われた臓器や組織の再生を目的とした再生医療が注目されている。再生医療の分野で特に注目されているのが iPS 細胞(induced Pluripotent Stem cell)である。iPS 細胞は、様々な細胞へと分化する(多分化能)のみならず、自らと同じ細胞を複製する能力(自己複製能)を持つ。同様の特徴を持つ細胞として、ES 細胞(Embryonic Stem cell)があるが、受精卵から細胞を得るという倫理的な問題に加え、移植の際に患者の体が ES 細胞に対して免疫拒絶を示す問題などが指摘されている。iPS 細胞は、ES 細胞などで発現の高い初期化遺伝子を患者自身の体細胞に導入し、脱分化誘導されることで得られたため、ES 細胞では臨床応用の障壁となっていた倫理的な問題や拒絶反応の問題がほとんどない。これらのことから iPS 細胞を用いた再生医療は、今まで治療が困難とされてきた病気の治療への応用が期待されている。

しかし現状ではまだ臨床的な利用には至っていない。これは、iPS 細胞において安全性の問題、特に細胞癌化の問題があるからである。癌化の原因の一つとして、iPS 細胞より誘導された分化細胞内に未分化な iPS 細胞が残存することが挙げられる。これは、iPS 細胞作製時に脱分化の不十分な iPS 細胞が混在すると、iPS 細胞を分化誘導した際に、未分化な iPS 細胞がそのまま残存し、癌化することによる。脱分化の不十分な iPS 細胞混在の問題は、iPS 細胞の誘導メカニズムについて、まだ不明な点が多いことによると思われる。よって、より安全で高品質の iPS 細胞を得るためには、iPS 細胞誘導過程のメカニズムを解析し、iPS 細胞誘導過程で重要な働きをする遺伝子を明らかにすることが必要となる。

本研究では、繊維芽細胞から iPS 細胞を誘導した際に、iPS 細胞誘導初期に発現量が低下する遺伝子で、Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc の 4 つの因子のいずれかに直接制御される転写因子に注目した。この転写因子を過剰発現させることで、この転写因子が iPS 細胞誘導に与える影響を解析し、iPS 細胞誘導メカニズムについて考察した。

【方法】

1. プラスミドの作製

MEF(Mouse Embryonic Fibroblast)より RNA 抽出試薬 Isogen(ニッポンジーン)を用いて、RNA を抽出し、RNA を鋳型として作製した cDNA library より、目的遺伝子を PCR で増幅した。得られた cDNA はレトロウィルス発現プラスミドベクターである pMXs(Addgene) もしくは pLNCX2(Clontech)に導入した。pLNCX2 については、CMV(Cytomegarovirus) promoter を TK(Tymidine kinase) promoter に置換したものを使用した(以下 pLNCX-Tkp)。また、目的遺伝子の N 末には、抗体染色に用いるための 3xFlag Tag を挿入した。

2. レトロウィルスベクターの産生

レトロウィルスの構造遺伝子(gag, pol, env)を持つパッケージング細胞として、Plat-E 細胞を用いた。この細胞に

Lipofectamine LTX(Invitrogen)を用いて、プラスミドを Transfection し、3 日培養後、上清を回収した。

3. レトロウィルスベクター感染と感染の確認

2 で産生したレトロウィルスベクターを 0.45 μm のフィルターでろ過し、8 ng/ml の polybrene(Wako)を含む培地に加えた。これにより、MEF もしくは 3T3 細胞に対してレトロウィルスベクターを感染させた。

また感染率の検証として、1 次抗体として Anti-Flag 抗体(Sigma Aldrich)を用いて抗体染色を行った。さらに mRNA の発現量を定量するためにリアルタイム PCR を行った。RNA 抽出試薬 Isogen で得た RNA を SuperScript III(Invitrogen)を用いて cDNA とし、Gotaq qPCR(Promega)を用いて、7500 リアルタイム PCR システム(Applied Biosystem)で定量した。データは GAPDH もしくは TBP(TATA-Binding Protein)を用いて標準化した。

4. iPS 細胞誘導

本研究室西村助教が作成したセンダイウィルスベクター(SeVdp[KOSM])を使用した。このベクターは初期化因子 Klf4, Oct4, Sox2, c-Myc を持続的に発現する。そこで、まず、MEF に対して上記の方法で、レトロウィルスベクター感染させ、3 日間培養した。次にこの細胞にセンダイウィルスベクターを培地に加え、センダイウィルスベクターを感染させた。1 日後、フィーダー細胞の上にこの細胞を均一に撒き、37°C, 5% CO₂ 条件下で 2 週間培養した。その後多能性を持つ細胞を見分けるためにアルカリホスファターゼ染色をし、iPS 細胞誘導により形成されたコロニー数を数えた。

【結果・考察】

本研究室の先行研究として、MEF より iPS 細胞を誘導する初期段階で発現量が低下する 20 個の候補遺伝子が絞られていた。もしこれらの因子の発現量低下が iPS 細胞誘導に必須であれば、これらの因子を過剰発現すると、iPS 細胞誘導を阻害することが予想される。

20 個の候補遺伝子のうち、10 個の遺伝子についてクローニングに成功した。各 10 個の遺伝子をレトロウィルスベクターで MEF に過剰発現させた後、iPS 細胞誘導を行ったところ、Ebf1 を過剰発現させた細胞において、形成されたコロニー数の減少が確認された。また、このコロニーの細胞は、増殖が他の遺伝子を過剰発現させた細胞と比べると遅いことが確認された。細胞増殖は、分化細胞より未分化細胞の方が早いという事実から、Ebf1 を過剰発現させた細胞では、iPS 細胞誘導に見られる細胞増殖の促進が十分に起こらず、iPS 細胞誘導の効率が低下したのではないかと考えられる。

今後は、まだ未解析である 10 個の遺伝子について、プラスミドを作製するとともに、今回、結果が得られた Ebf1 について、Ebf1 が制御する遺伝子を明らかにし、iPS 細胞誘導メカニズムについて考察したいと思う。