

iPS 細胞誘導を促進させる遺伝子の発見 ～ *Tcl1* 遺伝子による代謝変換が iPS 細胞誘導を促進する～

研究成果のポイント

1. iPS 細胞誘導遺伝子の1つである KLF4 が iPS 細胞誘導の効率を高める仕組みを解明しました。
2. KLF4 によって発現が増加させられた *Tcl1* 遺伝子が細胞のエネルギー産生をミトコンドリアから解糖系へと変換し、それによって、iPS 細胞の多能性が向上することがわかりました。
3. 知られている4つの初期化誘導遺伝子に *Tcl1* 遺伝子を加えて iPS 細胞誘導を行うと、従来の方法よりも短期間でより多くの iPS 細胞が誘導されることが確認できました。

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、人工多能性幹細胞(iPS細胞)^{※1}誘導過程で、KLF4が*Tcl1*遺伝子を誘導することによって細胞の代謝を変化させることを見出しました。

iPS細胞の誘導時には複雑な細胞機能の変化が起こりますが、その変化の過程で、どの遺伝子がどの様に関与するかは、十分には解明されていません。iPS細胞の誘導過程で細胞機能を変化させる遺伝子とその作用機構を明らかにすれば、完全に初期化されたiPS細胞を効率良く誘導することが可能になると考えられます。

本研究グループは、センダイウイルスベクターシステム(SeVdpベクター)を用いて、初期化誘導遺伝子(KLF4, OCT4, SOX2, c-MYC)の1つであるKLF4の発現量を操作すると、iPS細胞誘導が途中で停止した中間体細胞が作製できることを既に報告しています。今回の研究から、この中間体細胞の初期化を再開するには、KLF4によって*Tcl1*遺伝子が誘導されることが必要であり、この過程で細胞の代謝が変化することを明らかにしました。

また、本研究により、*Tcl1*遺伝子が細胞内でのエネルギー産生を体細胞型から多能性幹細胞型へと変換することによって、iPS細胞の誘導を促進することが明らかになりました。*Tcl1*遺伝子は、iPS細胞誘導過程において、細胞によるブドウ糖の取り込みや乳酸産生を増加させると共に、ミトコンドリアでの酸素消費を減少させます。

さらに、*Tcl1*遺伝子を4つの初期化誘導遺伝子に加えてiPS細胞を誘導すると、従来の方法よりも短期間でより多くのiPS細胞が誘導されてきました。*Tcl1*遺伝子によって代謝変換を加速すると、良質なiPS細胞を効率良く誘導出来る可能性が示唆されました。

本研究の成果は、アメリカ東部時間2017年3月2日12時(日本時間3日2時)付けで、国際幹細胞学会の機関誌「Stem Cell Reports」で公開されました。

* 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、iPS細胞が多能性を十分に獲得していないと、目的とする細胞に分化誘導後も一部に未分化な細胞が残存し、移植後に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に理解した上で、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細胞の誘導過程では多数の遺伝子の発現変化に伴って様々な細胞機能が

変化します。しかし、細胞が多能性を獲得するために必要な細胞機能の変化が、どの遺伝子によっていかに引き起こされるかは、ほとんど明らかになっていませんでした。

本研究グループは以前、独自の遺伝子導入用ベクター(SeVdpベクター)から、4つの初期化誘導遺伝子(KLF4、OCT4、SOX2、c-MYC)を発現させてiPS細胞を誘導する際に、KLF4遺伝子の発現を減少させると初期化が途中で停止し、iPS細胞誘導の中間体(Paused iPS細胞)が得られることを見出しました(Nishimura *et al.* 2014)。この Paused iPS細胞に様々な遺伝子を発現させ、途中で停止していたiPS細胞誘導を再開させる遺伝子の探索とその作用機構の解析を行いました。

また、体細胞では、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化によりエネルギーの大部分を産生しますが、iPS細胞などの多能性幹細胞では、主に解糖系がエネルギー産生を担っています。このため、体細胞からiPS細胞への誘導過程では代謝が変化することが必要ですが、その機構は十分には解明されていませんでした。本研究では、その機構の解明を目指しました。

研究内容と成果

まず始めに、初期化誘導遺伝子 KLF4 の発現量が少ない iPS 細胞(Low-K iPS 細胞)と多い iPS 細胞(High-K iPS 細胞)で遺伝子発現を比較して、High-K iPS 細胞でのみ高発現している遺伝子を選び出しました。そしてそれらの中から、他の研究グループの論文を参考にしながら、KLF4 遺伝子によって発現が調節される遺伝子であり、さらに iPS 細胞誘導の後期に発現が上昇してくる 6 つの遺伝子(*Apoc1*, *Dmt1*, *Foxh1*, *Tcl1*, *Tmem8*, *Rex1*)を選び出し、これらを Paused iPS 細胞の多能性を向上させて iPS 細胞誘導を進行させる遺伝子の候補としました。

次に、これらの 6 遺伝子を Paused iPS 細胞で過剰発現させて、多能性を実際に向上させられるかどうかを検討した結果、*Tcl1* 遺伝子のみが多能性を向上させられることを明らかにしました(図 1)。また、High-K iPS 細胞において、*Tcl1* 遺伝子の発現を抑制したところ、多能性が減少することも確認されました。以上の結果から、iPS 細胞誘導において多能性誘導に関与しているのは、KLF4 によって誘導される *Tcl1* 遺伝子であることが示唆されました。

さらに、4 つの初期化誘導遺伝子に追加して *Tcl1* 遺伝子も発現できる遺伝子導入用 SeVdp ベクターを作製し、そのベクターを用いて iPS 細胞誘導を行いました。その結果、従来の 4 つの遺伝子で誘導する場合よりも早い時期に、高い多能性を獲得したより多くの iPS 細胞が誘導されました(図 2)。すなわち、*Tcl1* 遺伝子を用いて iPS 細胞誘導をすると、iPS 細胞をより効率よく誘導できることを明らかにしました。

次に、KLF4 発現量が増加することによって *Tcl1* 遺伝子発現量が増加することから、*Tcl1* 遺伝子が KLF4 によって直接発現調節を受けているかを解析しました。その結果、KLF4 遺伝子は、発現量が増加すると *Tcl1* 遺伝子のプロモーターやエンハンサーへの結合が可能となり、それによってプロモーター近辺の H3K4me3^{注2}修飾を増加させて転写活性化状態に変え、*Tcl1* 遺伝子の発現を誘導するということを明らかにしました。

さらに、*Tcl1* 遺伝子の発現が増加することによって、細胞機能にどのような変化が生じているかを解析しました。*Tcl1* 遺伝子は、AKT^{注3}をリン酸化して活性化することによって、細胞内の様々な細胞機能を変換させることが明らかになっています。そこでまず *Tcl1* 遺伝子と AKT のリン酸化との関係を解析しました。その結果、High-K iPS 細胞では AKT のリン酸化が確認されるのに対し、Low-K iPS 細胞では AKT の活性化が確認されず、また、リン酸化 AKT に対する阻害剤を加えた場合、High-K iPS 細胞であっても多能性が誘導されないことを明らかにしました。この結果から、*Tcl1* 遺伝子は AKT の活性化を介して多能性を誘導していることが示唆されました。ガン細胞等において、AKT の活性化によって解糖系が亢進するという知見があることから、次に、Low-K iPS 細胞と High-K iPS 細胞の間で、解糖系の機能に違いがあるかを検討しました。その結果、High-K iPS 細胞では Low-K iPS 細胞に比べて、解糖系関連遺伝子の発現上昇、グルコース取込みの亢進及び乳酸産生の増加が起きていることを明らかにしました。これらの結果から、iPS 細胞誘導において、KLF4 によって誘導された *Tcl1* 遺伝子は、AKT の活性化を介して解糖系を亢進させていることが明らかになりました。

以前、他の研究グループから、*Tel1* 遺伝子はミトコンドリアのポリヌクレオチドホスホリラーゼ(PnPase^{註4})の活性を阻害することによって、iPS 細胞誘導過程において、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を抑制しているという報告がありましたので、次に、Low-K iPS 細胞と High-K iPS 細胞の間で、ミトコンドリアの機能に違いがあるかを検討しました。その結果、High-K iPS 細胞では Low-K iPS 細胞と比較して、ミトコンドリアの活性の低下や、細胞の酸素消費量の低下が起きていることが明らかになりました。さらに、これらのミトコンドリア機能の変化に、*Tel1* 遺伝子による PnPase の機能阻害が関与していることも明らかになりました。これらの結果から、iPS 細胞誘導において *Tel1* 遺伝子は、PnPase の機能を阻害することによって、ミトコンドリア活性を低下させて酸化的リン酸化を抑制していることを明らかにしました。

体細胞ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を介したエネルギー産生が中心であるのに対し、ES 細胞や iPS 細胞等の多能性幹細胞では、解糖系によるエネルギー産生が中心であることが知られています。そのため、体細胞から iPS 細胞を誘導する過程では、代謝変化(代謝リプログラミング)が起きることが必要となります。本研究から、iPS 細胞誘導の過程では KLF4 が *Tel1* 遺伝子を誘導し、誘導された *Tel1* 遺伝子が中心となって代謝リプログラミングが進行することを明らかにしました(図 3)。また、*Tel1* 遺伝子による代謝リプログラミングの促進は多能性の獲得にとって重要であり、*Tel1* 遺伝子を利用した iPS 細胞誘導によって、より効率の良い iPS 細胞誘導方法の確立が可能であることが示唆されました。

今後の展開

Tel1 遺伝子による代謝リプログラミングの促進は多能性の獲得に寄与することが明らかになりましたが、代謝リプログラミングによって、どのようにして多能性が誘導されるのかは不明な点が残されています。今後はこの分子機構を明らかにし、さらに効率の良い iPS 細胞誘導方法の確立に繋げることを目指したいと考えます。

また、本研究により、iPS 細胞誘導の中間体である Paused iPS 細胞は、iPS 細胞誘導に重要な分子機構を解析するための有用なツールになることが明らかになりました。*Tel1* 遺伝子以外にも、Paused iPS 細胞の多能性を向上させる候補遺伝子をいくつか見出し、これらの遺伝子を介した iPS 細胞誘導機構の解析を進めて行く予定です。

さらに本研究において、KLF4 量のわずかな変化によって、*Tel1* 遺伝子の発現がどの様に変化するかも明らかになりました。今後は、*Tel1* 以外の遺伝子でも同様な解析を進める予定です。これらの解析によって、iPS 細胞誘導機構の全容を明らかにすると共に、より一般的な、転写因子の量依存的な遺伝子発現調節機構についても重要な知見を明らかにしていきたいと考えています。

参考図

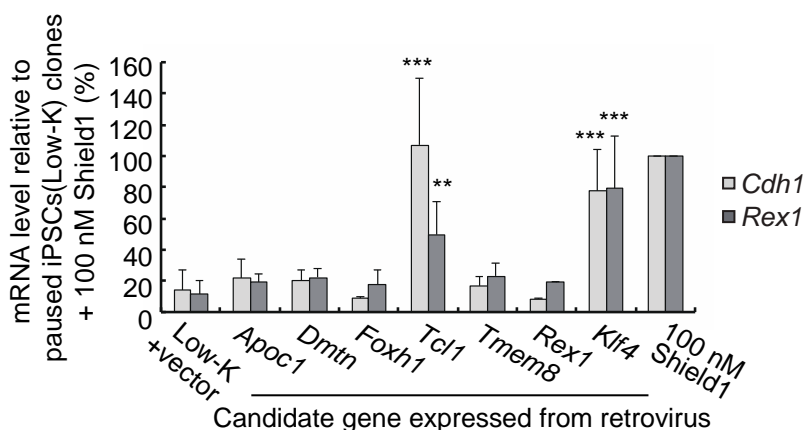


図 1: *Tel1* 遺伝子による iPS 細胞誘導の再開
Paused iPS 細胞に *Tel1* 遺伝子を過剰発現させることにより、多能性関連遺伝子 (*Cdh1*, *Rex1*) の発現が上昇する

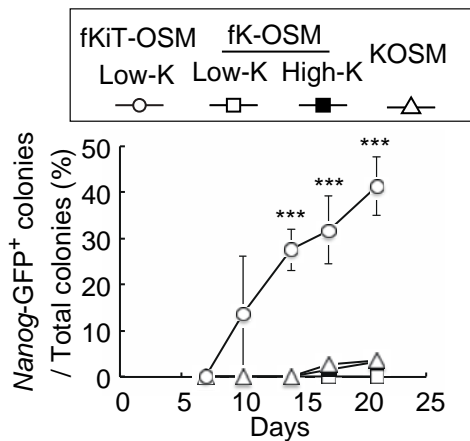


図 2: *Tcl1* 遺伝子発現による iPS 細胞誘導効率の向上

Tcl1 遺伝子を初期化誘導遺伝子と共に発現 (fKiT-OSM) させることにより、従来の誘導方法 (KOSM) と比較して、早く、多くの iPS 細胞を誘導可能

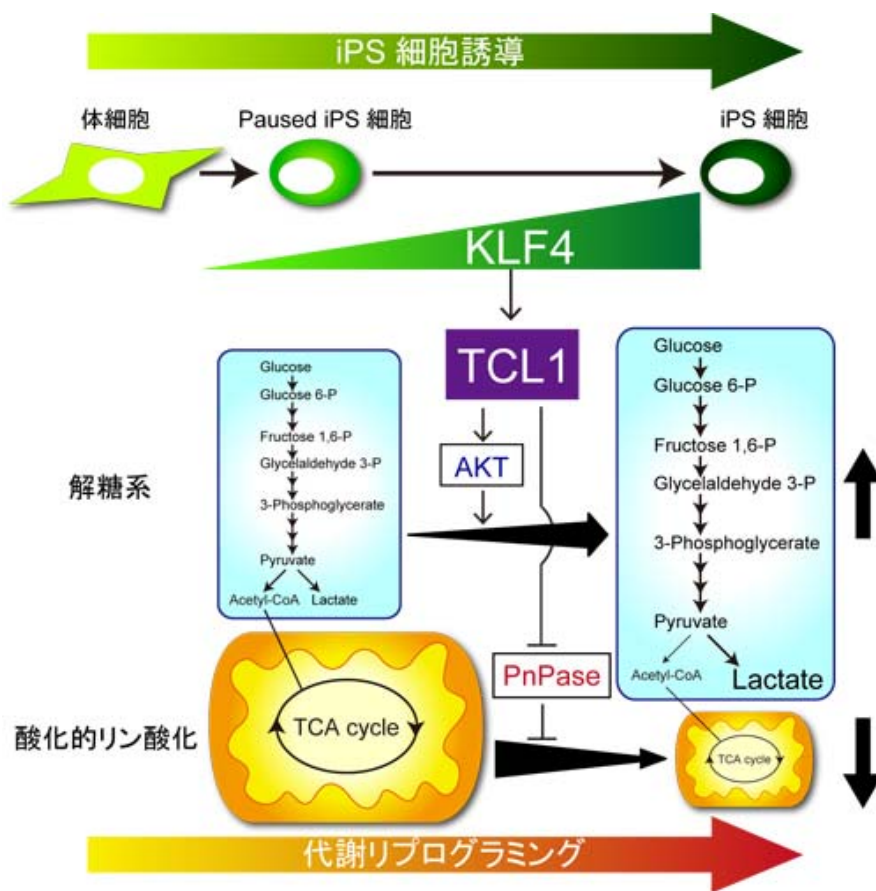


図 3: iPS 細胞誘導における *Tcl1* 遺伝子を介した代謝リプログラミング

iPS 細胞誘導過程において、KLF4 依存的に誘導された *Tcl1* 遺伝子によって、解糖系の亢進とミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の抑制(代謝リプログラミング)が起きる

用語解説

注1) 人工多能性幹細胞(iPS 細胞)

様々な組織に分化できる能力(多分化能)と、性質が変わることなく増殖する能力(自己複製能)の両方を併せ持つ能力を多能性という。胚性幹細胞(ES 細胞)は多能性を持つ代表的な細胞であり、iPS 細胞は体細胞に人工的に遺伝子を導入して、ES 細胞と同等の多能性を獲得(初期化)させた細胞である。代表的な初期化誘導遺伝子は、KLF4、OCT4、SOX2、c-MYC の4遺伝子で、山中4因子とも呼ばれる。

高い多能性を維持している iPS 細胞は、いうなれば高品質な iPS 細胞であり、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る。

注2) H3K4me3 修飾

染色体 DNA が巻き付いているヒストン H3 の 4 番目のリジンに、メチル基が 3 つ結合した修飾状態。この修飾状態を目印にして、転写を活性化させる分子が集まると考えられているため、転写開始部位近辺にこの修飾が認められると、その遺伝子の転写が活性化されている指標になる。

注3) AKT

細胞増殖、アポトーシス、代謝など、様々な細胞機能に関与するシグナル分子。Tcl1 や PI3K によるリン酸化によって活性化される。

注4) PnPas

ミトコンドリアへの RNA の輸送に関与する酵素。この酵素の働きが阻害されると、酸化的リン酸化等のミトコンドリアの機能が低下することが明らかになっている。

参考文献

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, 2014

掲載論文

【題名】 A role for KLF4 in promoting the metabolic shift via TCL1 during induced pluripotent stem cell generation.

(KLF4 は iPS 細胞誘導において TCL1 を介した代謝変化を促進させる)

【著者名】 Nishimura K, Aizawa S, Nugroho FL, Shiomitsu E, Tran YTH, Bui PL, Borisova E, Sakuragi Y, Takada H, Kurisaki A, Hayashi Y, Fukuda A, Nakanishi M, Hisatake K

【掲載誌】 Stem Cell Reports

doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.026

問い合わせ先

西村 健(にしむら けん)

筑波大学 医学医療系 助教

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

E-mail: ken-nishimura@md.tsukuba.ac.jp

Tel: 029-853-3929

久武 幸司(ひさたけ こうじ)

筑波大学 医学医療系 教授

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

E-mail: kojihisa@md.tsukuba.ac.jp

Tel: 029-853-3929