＜平成21年度助成＞

iPS細胞を用いた食品由来の脱メチル化化合物探索システムの開発

福　田　智　一
（東北大学大学院農学研究科）

1. 緒　　言

近年、様々な食品由来の機能性物質が注目を浴びている。一例では赤ワインやピーナッツの皮に多く含まれるレスベラトロールは寿命の延長、抗炎症、抗腫瘍効果があるといわれている。このように食品中には様々な生物活性を持つ天然化合物が豊富に存在すると考えられるが効率的に機能をアッセイする方法がないために、様々な活性物質を見いだすことが難しい。

一方、近年のがんの分子遺伝学的研究の発展は目覚ましいものがあり、細胞ががん化するとゲノムの多くの部位でメチル化が亢進することが明らかになった。ゲノムのメチル化は主に、遺伝子の発現を調節するプロモーター部位において認められ、遺伝子発現の低下を招いている。このようなゲノムにおけるメチル化の亢進は、細胞増殖を低下させる腫瘍抑制遺伝子の発現の低下を招き、細胞をがん化に導くと考えられている。

近年、ゲノムの脱メチル化を誘導する薬剤が開発され、脱メチル化剤と呼ばれている。脱メチル化剤の代表的なものに5-aza-deoxycytosine（5-aza-dC）が挙げられる。この薬剤は多発性骨髄腫に対する抗癌剤として米国で認可されており（Balch et al., 2005）、我が国においても有用な抗癌剤候補剤である。従って、このゲノムの脱メチル化活性を効率的に探索することが可能となれば、抗癌剤のための新規化合物を獲得できると考えられる（**図1**参照）。

我々は近年開発された人工多能性幹細胞（iPS

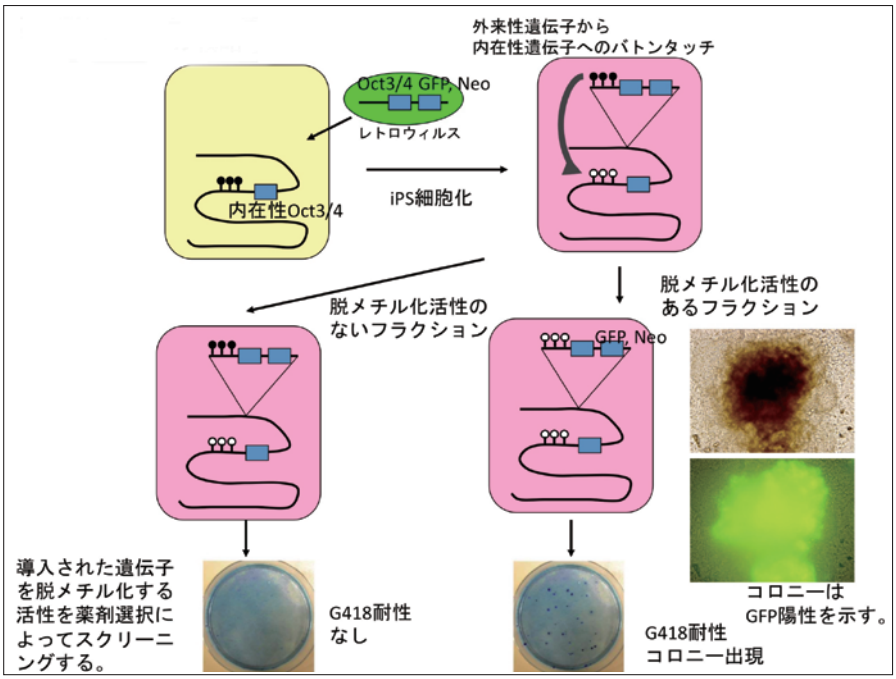


図1　本研究の戦略

細胞）の高いゲノムのメチル化能力に着目した。iPS細胞へ外来遺伝子を導入すると高頻度にその発現制御領域であるプロモーターがメチル化により不活性化される（Nakagawa at al., 2008）。その不活性化した遺伝子発現を脱メチル化作用によって発現を回復させる作用のある薬剤を探索すれば、抗癌剤のシーズ化合物になり得ると考えた。特に我が国において、食品を含めた様々な天然物由来の化合物から医薬品のシーズとなる化合物が見いだされている歴史がある。

本研究ではマウス由来の胎児性線維芽細胞から蛍光蛋白質マーカーを導入したiPS細胞を樹立したこと、脱メチル化を検出する上で効率的な分化誘導させるため、無フィーダー状態での維持に成功したこと、脱メチル化薬剤の陽性対象物質である5-aza-dC処理によって導入遺伝子の発現回復を検討した結果を報告する。

2.　試料および実験方法

マウス胎児由来線維芽細胞を妊娠後13.5日のC57BL6系統のマウスより樹立した。マウス胎児組織を鋏によって細切した。細切された組織は金属メッシュによりさらに小片化され、我々は小片化した胎児組織を初代培養の材料として用い、胎児由来線維芽細胞を得た。胎児由来線維芽細胞は10％のウシ胎児血清（FCS）および抗生物質を添加したDMEM細胞培養培地を使用し、37℃, 5％ CO2の条件で培養を行った。樹立された初代培養細胞は液体窒素中に保存し、実験に使用するまで保存を行った。

京都大学の山中伸弥教授の研究グループより、マウス由来のKlf4, c-myc, Sox2遺伝子を発現するpMXベクターを基本骨格とした組み換えレトロウィルスベクターを得た。iPS細胞を樹立する上で最も重要な転写因子とされるOct3に関して、カイアシ由来の蛍光蛋白質であるcopGFPと融合タンパク質を発現するよう、cDNA配列を化学合成した。この合成遺伝子はマウス由来Oct3とcopGFPのタンパク質の翻訳フレームが連結されており、２者のタンパク質の間に自己消化性ペプチドであるT2A配列が導入されている（**図2**参照）。一度、翻訳されたOct3-copGFPの融合タンパク質は、翻訳後速やかにOct3および蛍光蛋白質copGFPとして切り離されることが期待される。独自に構築したOct3-copGFP融合遺伝子はpMXレトロウィルスベクターへ制限酵素処理およびライゲーション反応によってサブクローニングを行った。

Oct3-copGFP融合遺伝子、Klf4, Sox2, c-myc

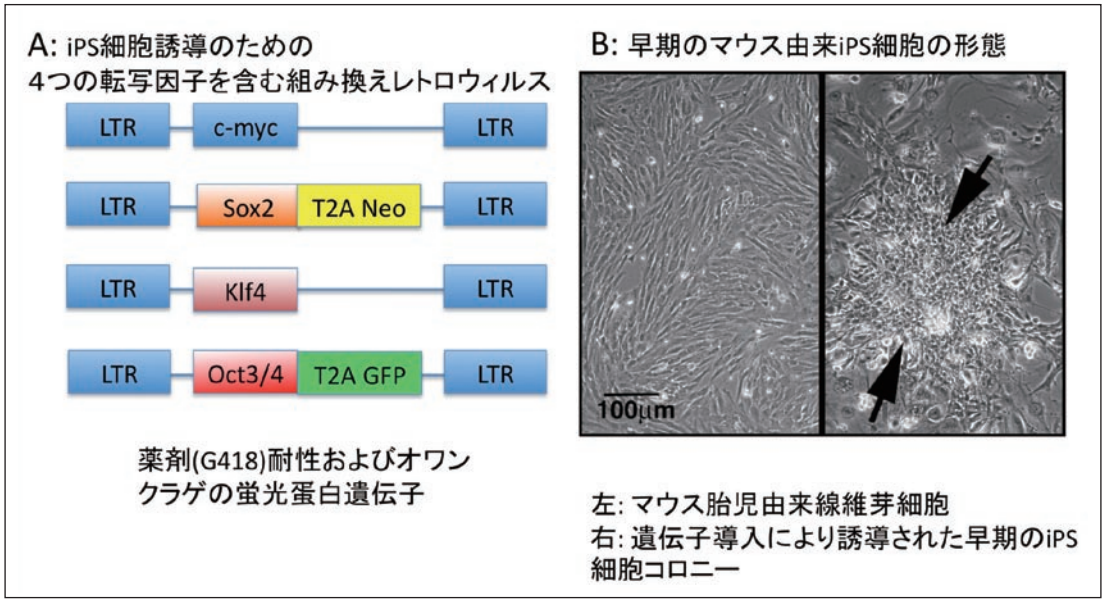


図2　導入した遺伝子の構造および細胞の形態変化

のそれぞれのレトロウィルスベクターは293T細胞へパッケージングプラスミドであるpCL10A1（Imugenex）とともに、リポフェクション法にて導入を行った。293T細胞へ48時間導入を行った後に、通常の10％ FCS-DMEM培地に交換し、さらに48時間後に組み換えウィルス液を回収した。回収した組み換えウィルス液にポリエチレングリコールを基本組成とする濃縮試薬（Retro-X Concentrator: Clontech）を使用し、30倍に濃縮を行った。濃縮されたOct3-copGFP融合遺伝子、Klf4, Sox2, c-myc組み換えウィルスは混合し、3.5cmディッシュあたり$1X10^5$細胞の密度で播種されたマウス胎児由来線維芽細胞に48時間感染した。感染された細胞は15％ Knockout Serum Replacement（KSR）（Invitrogen）を含んだDMEM培地で2–3週間の間、培養を行った。

その後出現したiPS細胞コロニーは実体顕微鏡下にて、26G注射針で分離し、48穴細胞培養ウェルに予めマイトマイシン処理によって不活性化したマウス胎児由来フィーダー細胞上に、0.05％トリプシンにより細胞分散後、播種した。48穴細胞培養ウェルで形成されたiPS細胞コロニーは、再度0.05％トリプシンによって分散後、3.5cmディッシュ上に用意したフィーダー細胞上へ播種を行った。

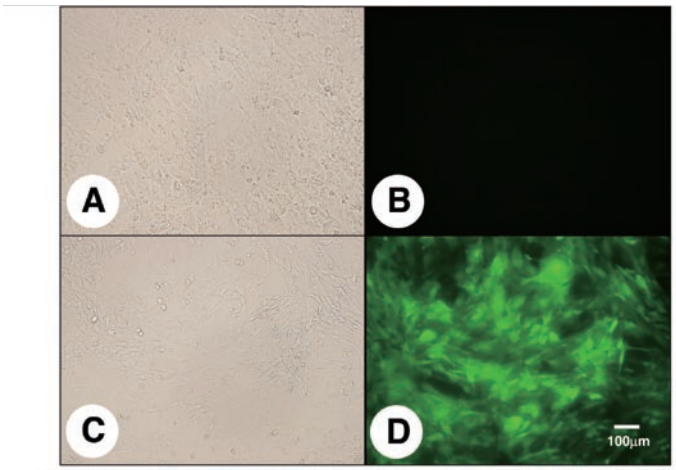
樹立されたiPS細胞の生物学的性質を明らかにするために、幹細胞のマーカーのひとつであるアルカリホスファターゼ活性をFastRedを基質とした酵素染色によって検出を行なった。加えてiPS細胞化したマーカーとしてNanogタンパク質の発現を免疫蛍光染色法によって検出した。

脱メチル化活性を持つことが知られている5-aza-dC処理を樹立したiPS細胞に対して行った。5-aza-dCをiPS細胞の培地に添加し、5μM, 10μM, 100μMの各濃度で約48時間の処理を行った。脱メチル化活性の検出をiPS細胞の樹立の過程で不活性化した蛍光蛋白質の発現を蛍光顕微鏡にて観察を行い、検出を行なった。

3. 結　　果

iPS細胞を誘導する組み換えウィルスを得るために、293T細胞へOct3-copGFP融合遺伝子、Klf4, Sox2, c-mycのそれぞれのcDNAを持ったpMXレトロウィルスベクターをパッケージングプラスミドとともに導入を行った。その後、得られた組み換えウィルスをマウス胎児由来線維芽細胞に感染させたが、感染後に線維芽細胞はほぼ100％の頻度で蛍光を発し、高い遺伝子の導入効率が確認された（**図3**参照）。ウィルスの感染後、約2週間後に周辺の線維芽細胞とは明らかに形態が異なるコロニーが出現した（**図2**参照）。このコロニーは幹細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ染色に陽性を示し、ドーム状の形態を示した（**図4**参照）。このコロニーを実体顕微鏡下でピックアップし、マイトマイシン処理により不活性化したフィーダー細胞上に継代を行った。その後、フィーダー上にマウスの胎性幹細胞（ES細胞）の形態を示すコロニーが出現した。このコロニーはフィーダー上に安定的に10世代以上維持できることが明らかとなり、加えて幹細胞特有の遺伝子産物であるNanog蛋白質の発現を蛍光免疫染色にて検出した（**図5**参照）。以上の状況から、我々は蛍光マーカーを導入したOct3遺伝子によってマウスiPS細胞を樹立したと結論した。

我々が樹立したマウス由来iPS細胞は20株を超え、Oct3-copGFP融合遺伝子を用いて安定的にiPS細胞を樹立できることが明らかになった。現在、マウスのiPS細胞に関して理化学研究所のバイオリソースセンターを通じて基礎的な学術目的であるならば、分与を受けることが可能となっている。しかしiPS細胞の場合はES細胞と比較してその性質にばらつきが大きく、研究の発展のためには数多くの研究材料が利用できることが望ましい。我々が樹立したマウスiPS細胞は東北大学加齢医学研究所、医用細胞資源センターに細胞



A および B：遺伝子導入しない場合の通常顕微鏡および蛍光観察像。
C および D：遺伝子導入した場合の通常および蛍光観察像。強い蛍光が検出され、高い効率での遺伝子導入が認められる。

図 3　遺伝子の導入効率

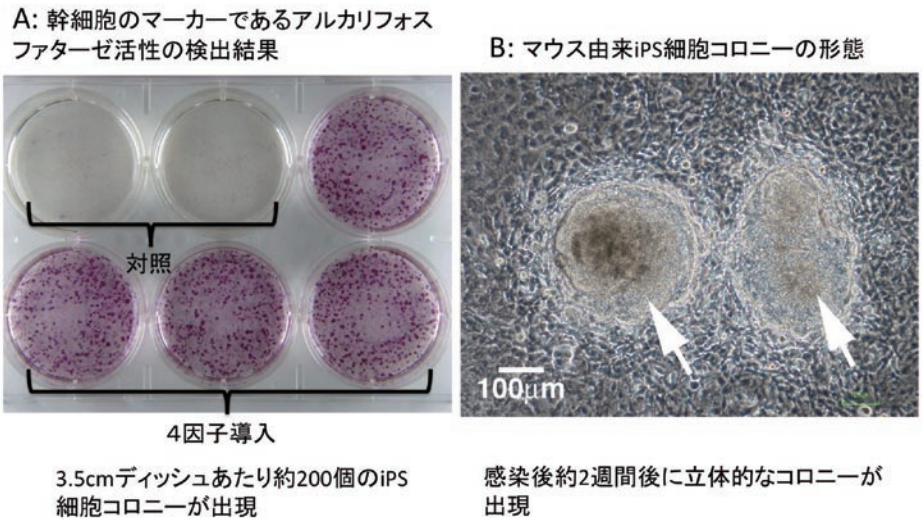
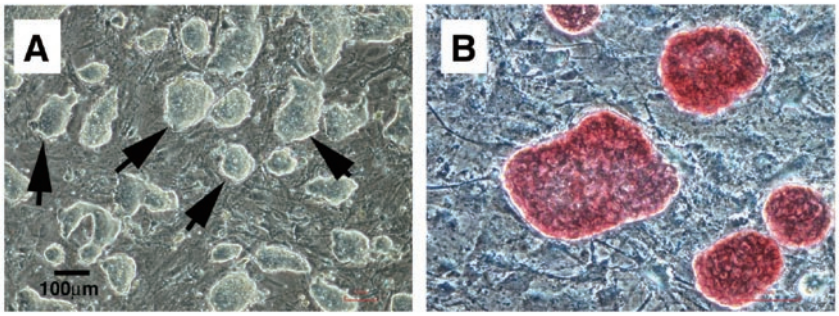
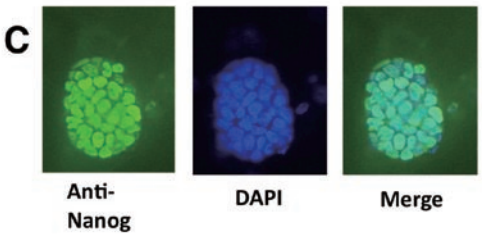


図 4　得られたマウス iPS 細胞の性質





A: 樹立されたマウスiPS細胞の形態。矢印がiPS細胞を示す。B: 幹細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性, C: Nonog遺伝子産物の免疫蛍光染色による検出

図 5　ライン化されたマウス iPS 細胞の性質

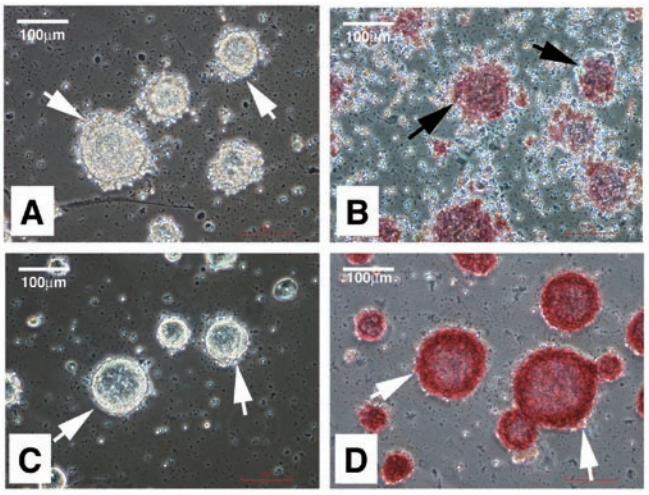
材料としてデポジットする予定である。東北大学を含めた多くの研究者に研究資源として利用して頂く予定である。

iPS細胞は全身の組織に分化できる全能性を維持するため、通常はフィーダー細胞の上で培養されることが通例である。しかしこのフィーダーの存在は、iPS細胞を分化誘導する際には逆に障害となる。本研究では脱メチル化活性を検出するバイオアッセイ系を構築する上でiPS細胞を効率よく分化誘導することが必要である。未分化な状態ではレトロウィルスのプロモーターに結合する転写因子遺伝子の発現がオフであり、この転写因子遺伝子の発現を回復させるには一度、iPS細胞を分化させなければならない。そこで、樹立したマウスiPS細胞をフィーダー細胞のない培養条件で維持できるか検討を行った。マウスES細胞は従来、特殊無血清培地を使用することで、フィーダーなしで効率よく細胞増殖することが知られている。我々はこの培地をiPS細胞に使用したところ、数日間は効率よくiPS細胞の増殖が生じるが、やがてコロニーの形が崩れ始め、iPS細胞の増殖が低下することが判明した（**図6**参照）。そこで我々は従来の研究においてES細胞およびiPS細胞の増殖と分化能力の維持に有効と報告されている2種類の低分子阻害剤（PD0325901, CHIR99021）を使用した。その結果、我々が樹立したiPS細胞はフィーダーが存在しない条件においても、効率よく細胞増殖することが明らかになった（**図6**参照）。

脱メチル化活性を持つことが知られている5-aza-dCを5 μM, 10 μM, 100 μMの各濃度で約48時間の処理を行った。100 μMでは5-aza-dCの細胞毒性が観察され、iPS細胞コロニーに数が1/10程度に低下した。10 μMでは無処理群の約半分程度のコロニーが認められたが、蛍光遺伝子の発現が回復したコロニーは蛍光顕微鏡下では検出されなかった。未分化な状態ではレトロウィルスのプロモーターに結合する転写因子遺伝子の発現がオフであり、この転写因子遺伝子の発現を回復させるには一度、iPS細胞を分化する必要が考えられる。現在、樹立した無フィーダー培養系を使用し、レチノイン酸を用いて神経細胞へ分化誘導する実験を進行している。

4. 考　　察

我々は脱メチル化活性を検出するバイオアッセイ系としてマウスiPS細胞を利用することを



A：ESF-C培地のみで培養したマウスiPS細胞の形態。B：ESF-C培地のみで培養したアルカリフォスファターゼ活性。C：ESF-C培地に低分子阻害剤を添加して培養した場合のマウスiPS細胞の形態。D：ESF-C培地に低分子量阻害剤を添加し培養した場合のアルカリフォスファターゼ活性

図6　無血清、無フィーダー状態でマウスiPS細胞の維持

発案し、導入するOct3遺伝子産物と融合蛋白としてカイアシ由来の蛍光蛋白質であるcopGFPを発現する実験系を構築した。Oct3遺伝子産物とcopGFPはひとつの融合蛋白質として翻訳されるが、その後２つの遺伝子産物の間に存在するT2Aの自己消化ペプチドの存在により、２つの蛋白質に自動的に切り離される。このOct3の発現系は蛍光蛋白質の発現が消失することで、導入された遺伝子のサイレンシングを蛍光によってモニタリングすることが出来る。実際に本レトロウィルスの感染後のマウス胎児由来線維芽細胞はほぼ100％の頻度で蛍光を発した一方、樹立されたiPS細胞は全く蛍光蛋白質の発現が消失していた。このことはiPS細胞において高い効率で導入遺伝子のサイレンシングとゲノムのリプログラミングが生じたことを示している。

レトロウィルスには導入遺伝子のプロモーターとなるLTR（Long Terminal Repeat）配列が存在する。ESおよびiPS細胞においては、この遺伝子発現を制御するLTR配列が高頻度にメチル化し、遺伝子発現が不活性かすることが知られている。加えて未分化状態のESおよびiPS細胞ではこのLTRプロモーターの転写活性を上昇させる転写因子遺伝子の遺伝子発現がオフになっていることが近年の研究によって明らかになった（Matsui et al. 2010）。このことはESおよびiPS細胞の未分化な状態では、例えプロモーター部位が脱メチル化したとしても遺伝子発現が回復しないことを示す。脱メチル化によって遺伝子発現が回復することを検出するためにはiPS細胞を分化誘導する必要がある。

そこで本研究ではiPS細胞を効率よく分化誘導するために、フィーダーなしで維持するための培養条件を検討した。我々の樹立したマウスiPS細胞は、低分子阻害剤であるPD0325901およびCHIR99021を添加した培地によって、フィーダー細胞が存在しない状態でも効率よく維持できることが明らかになった。通常、このように幹細胞の性質を保ったまま、大きく培養条件を変更するために、数ヶ月の長期に渡る細胞の馴化が必要である。しかし我々の考案した低分子阻害剤を添加した条件では馴化の期間を全く必要とせずに、そのままフィーダーなしの培養が可能であった。

我々の樹立したiPS細胞をフィーダーのない条件で脱メチル化化合物の処理を行った。しかし脱メチル化活性によるマーカー遺伝子の発現の回復は、iPS細胞が未分化状態では検出されなかった。今後はiPS細胞を効率よく分化させる実験系と脱メチル化剤処理の組み合わせにより、ゲノムの脱メチル化活性を効率よく検出する実験系が樹立できると期待される。

謝　辞

本研究は浦上食品・食文化振興財団の研究助成を受け、遂行したことをご報告、厚く御礼申し上げます。本研究の遂行中に私どもの所属する東北大学は2011年３月に発生しました東北・東日本大震災により多大な被害を受けました。我々が樹立したiPS細胞も多くが死滅することになりましたが、今一度以前より優れた研究成果を得ることを目指し鋭意努力しております。皆様のご支援と御指導に心から御礼申し上げます。

文　献

Balch C, Yan P, Craft T, Young S, Skalnik DG, Huang TH, et al. 2005. Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. Mol Cancer Ther 4(10): 1505-1514.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotechnol 26(1): 101-106.

Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, et al. 2010. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. Nature 464(7290): 927-931.

The establishment of bioassay system with induced pluripotent stem (iPS) cell for the screening of the de-methylating activity of the genome

Tomokazu Fukuda
Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku University

The various food-derived functional compounds, such as resveratrol, have the potential to contribute to the prevention of the human cancers. These anti-tumorigenic compounds are expected to involve within the various types of foods, however, it is difficult to discover the new compounds, due to the difficulty of the bioassay for the anti-tumorigenic activity.

The recent progress of the cancer research explored that the increased methylation of the genome is commonly observed in the malignant cancers. The methylation of the genome is obviously observed in the promoter region, which regulates the gene expression. The increased level of the methylation in the promoter region is known to result in the inactivation of the transcription of the genes. The inactivation of the anti-oncogenic protein, such as p53, is expected to induce the more malignant cancers. The low molecular compounds, which have the biological activity to induce the de-methylation of the genome is called as de-methylating reagents. As one of the representative de-methylating reagents, 5-aza-2'-deoxycitidine (5-aza-dC) is frequently used. To be noted, 5-aza-dC was reported to have strong anti-tumorgenic effect to the Multiple Myeloma, and 5-aza-dC was authorized as anti-cancer drug by Food and Drug Administration (FDA) in the United States. Therefore, if we screened the unknown low molecular compounds based on the de-methylating activity, the new candidate low molecular compounds for the anti-cancer drug would be obtained from the natural derived mixtures.

In this study, we focused on the high methylating activity of the iPS cells. When we introduced the exogenous gene and promoter into the iPS cell, the introduced exogenous promoter is commonly inactivated due to the methylation in the iPS cell. The screening of the low molecular compounds, which induces the recovery of the inactivated genes during the establishment of iPS cells, will enable us to identify the new leading chemicals for the de-methylating activity of the geneome. We established the induced pluripotent stem cells, which have the fluorescence marker. Furthermore, we found out the combination of the differentiation inhibitors (PD0325901 and CHIR99021) allows us to efficiently maintain the iPS cell without the adaptation of the cells. In addition, we obtained the preliminary data after the treatment of demethylating compound, 5-aza-dC. Our results suggested that the combination of the efficeint differentiation system of iPS cell and the treatment of the demethylating compounds enables us to screen the leading conpounds for the anti-cancer drugs.