

任意細胞の樹立法の開発

升井 伸治

細胞の分化においては、1500種類以上存在する転写因子のうち、少数の転写因子が大きな役割を果たす。たとえば、MyoDの強制発現は筋細胞を誘導し¹⁾、Hnf4aを含む2因子の強制発現は肝細胞を誘導する²⁾。また、Oct3/4を含む4因子の強制発現によって誘導されるiPS細胞は、その劇的な例といえる³⁾。こうした誘導活性をもつ転写因子（誘導因子）をさまざまな細胞で同定できれば、分化の自在な操作につながり、細胞の理解はもちろん、再生医療や疾患モデリングに大きく貢献するだろう。そこで筆者は、誘導因子の同定法開発を試みた。

従来法の問題点

機能抑制法は問題が多い 一般に、転写因子の機能はノックアウトによって調べられてきた。しかし実際には、ノックアウトは時間と手間がかかるから、解析する因子について発現特異性で絞り込みをかける（一種類の細胞には、数百種類の転写因子が発現している）。すると、発現特異性が低い重要な因子は、この時点でふるい落とされる（たとえば、ES/iPS細胞の誘導因子であるKlf4, c-Mycは、マウス全身で広く発現する）。また、ノックアウトを行ったとしても、リダンダンシーによってフェノタイプが弱まる場合が多い。とくに、「重要な働きをしているはず」と想像されていない場合は、わざわざ二重・三重ノックアウトをしようとは思わないものだ（実際、Klf, Mycファミリーが多重ノックアウト解析されるまでには、多くの周辺データの蓄積が必要だった）。ノックダウンの場合には、完全には遺伝子産物がなくなるから、やはりフェノタイプが弱まる場合が多い。したがって、これまでに見落とされている重要な因子は非常に多いと予想される。

強制発現に加えて工夫が必要 強制発現ならば、リダンダンシーの影響を受けない。ここ数年のCell, Nature論文に代表される従来法では、少数の転写因子プール（発現特異性やノックアウトなどから「重要そうな」因子を選んだもの）をまとめて強制発現し、その中から誘導因子を同定している^{4,5)}。ところが、この手法を他の細胞一般に適用するのは困難である。まず、「重要そうな」因子の数が、プールを作れるくらい報告されていなければならない。また、プールを作れたとしても、

誘導活性がみられなかった場合（プール中に入っている誘導因子の組み合わせで、誘導に至らない場合）には、誘導因子を同定できないのが問題である。新規因子を同定するためには、プール中に機能未知の転写因子を多く入れる必要がある。予備知識なしの20程度のプールだと、誘導因子が含まれる可能性が低いから、100以上のプールを作るべきだろう。しかし、100因子以上の強制発現が困難なことに加えて、誘導に阻害的に働く因子がしばしば含まれるから（細胞の中ではポジティブ・ネガティブ制御因子が適切な量比で働くから、安定化している）、誘導される確率は非常に低くなる。これを回避するために100因子から任意に3因子を選ぶとすると、その組み合わせ数は10の6乗で、しかも誘導実験はある程度の培養スケールと時間が必要だから、実際に実験するのはほぼ不可能といえる。もっとも深刻なことには、実験したとしても、誘導されなかった場合は、何の結果も残らない。したがって、活性の強い因子に絞ることが必要である。

iPS干渉法

発現プロファイルの排他性 一般に、ある細胞から別の細胞へ分化状態が変わると、元の細胞の発現プロファイルは消失する。たとえば、ES/iPS細胞は、分化すると、Oct3/4の発現などのES/iPS細胞特異的な発現プロファイルを失う。逆に、繊維芽細胞などの分化細胞は、iPS化すると、その特異的な発現プロファイルを失う。すなわち、細胞の発現プロファイルは、共存できない回路で規定されていると考えることができる。

発現プロファイル維持活性の検出 この作業仮説に基づけば、iPS化と同時に、任意の分化細胞Aで発現している転写因子を一つ過剰発現すれば、その発現プロファイル維持活性が、iPS化効率の減少、すなわちiPSコロニー数の減少として検出できると考えられる（iPS干渉、図1）。

実施例として、神経前駆細胞様セルラインNSEB5-2Cを用いて、比較的高発現している転写因子158個を、1因子ずつ、iPS化と同時に強制発現を行い、iPSコロニーの変動を解析した。もっとも強く干渉した6因子を別の細胞（胎児肝由来のヘパトブラスト）へ共導入したとこ

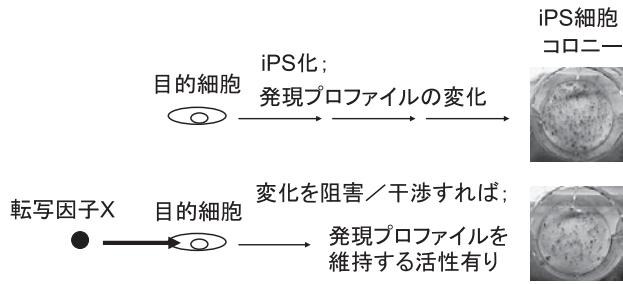


図1. iPS干渉法のスキーム. iPS化と同時に, 目的細胞においてすでに発現している転写因子を一つ, 過剰発現する.

ろ, NSEB5-2C様の細胞が現れた(図2). この細胞は, NSEB5-2Cの3つの特徴(成長因子依存的増殖, 神経マーカー陽性細胞への分化能および神経前駆細胞マーカーの発現)を, すべてもっていた. 網羅的遺伝子発現プロファイルも, NSEB5-2Cに非常によく似ていた. したがって, 6因子は誘導因子として機能したと考えられる.

他の細胞でも使えるかを調べるために, ヘパトブラストを用いてiPS干渉アッセイを40因子について行い, 強く干渉する4因子を同定した. この4因子には, Hnf4aなどのiHep誘導因子が含まれていた. すなわち, 肝細胞系譜の細胞においてiPS化に干渉する因子は, 肝細胞系譜の誘導因子を含むといえる. まとめて, 発現プロファイルが大きく異なる二種類の細胞で誘導因子を同定できたから, その他多くの細胞において, iPS干渉法を用いて誘導因子を同定できると示唆される(投稿中).

ちなみに, さらに別の細胞, 筋細胞とBリンパ球において, それぞれの誘導因子(MyoD, Pax5)はiPS化に干渉することが報告されている^{6,7)}.

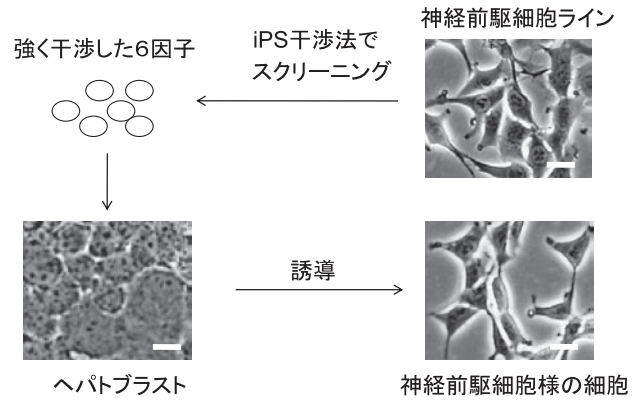


図2. 神経前駆細胞ラインの誘導因子を同定. 神経前駆細胞ラインにおいて最も強くiPS干渉した6因子を, ヘパトブラストへ導入すると, 神経前駆細胞様の細胞が現れた. スケールバー, 100 μm.

今後の展開

iPS干渉法を用いて, 多数の因子について1因子ずつアッセイし, 発現プロファイル維持活性をランク付けすることで, 発現プロファイル維持活性の強い因子をエンリッチできた. 転写因子以外の遺伝子(シグナル伝達分子など)についてもiPS干渉アッセイを行えば, 分化維持への貢献度を測定できるかもしれない.

文 献

- 1) Davis, R. L. *et al.*: *Cell*, **51**, 987 (1987).
- 2) Sekiya, S. and Suzuki, A.: *Nature*, **475**, 390 (2011).
- 3) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: *Cell*, **126**, 663 (2006).
- 4) Vierbuchen, T. *et al.*: *Nature*, **463**, 1035 (2010).
- 5) Ieda, M. *et al.*: *Cell*, **142**, 375 (2010).
- 6) Watanabe, S. *et al.*: *Stem cells*, **29**, 505 (2011).
- 7) Hanna, J. *et al.*: *Cell*, **133**, 250 (2008).