

# ナイーブ型ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導法の開発

京都大学 iPS 細胞研究所未来生命科学開拓部門

高島 康弘

## 1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

幹細胞は未分化性を維持しつつ増殖する自己複製能を持ち、分化した細胞に比べ、老化やストレスに抵抗性を示すと考えられる。

生命最初の幹細胞として、また生命の萌芽である無垢な幹細胞として、胚盤胞(blastocyst)の内部細胞塊(ICM)や着床前エピプラストに由来する胚性幹細胞(ES細胞)がある。また、山中四因子を用いることによって、体細胞をES細胞と同じステージの細胞へとリプログラミングした人工多能性幹細胞(iPS細胞)がある。ES/iPS細胞は試験管内で未分化性を維持しつつ、胚体外組織を除いたすべてを作り出す能力を持つ。マウスES/iPS細胞は、着床前エピプラストに限りなく近い状態で維持することが可能で、ナイーブ型と呼ばれている。着床前エピプラストは私どもの体を構成するすべての細胞を作り出す。試験管内で着床前エピプラストと同様の状態で細胞が維持されるなら、その幹細胞は生体のすべての細胞を同様に作り出す潜在的能力を持つと期待される。

このため、ナイーブ型細胞としてES/iPS細胞が維持出来ることは重要である。が、ヒトを含む霊長類では、ナイーブ型ES/iPS細胞として試験管内で維持することは難しく、少し分化したプライム状態で維持されていると考えられている。この少しの分化のため、現在私たちが培養するヒトES/iPS細胞の株間における多様性や、同一細胞株内における不均一性という問題が引き起こされる可能性がある。そのため、ヒトにおける真にリセットされたヒトES/iPS細胞を樹立し、解析することは重要なテーマである。

iPS細胞を用いた治療をより高いレベルで実現するために、いかに完全なiPS細胞を分化に利用できるのかは、分化させる技術と細胞を移植する技術とともに重要な技術である。この点において、私の研究は、より完全なiPS細胞を樹立する技術を高めることである。ナイーブ型ヒトiPS細胞は真の生命の始まりの細胞である可能性があり、現行のプライム型iPS細胞に比べ、分化させる細胞としてより相応しい可能性がある。例えば、現在私たちが培養するヒトES/iPS細胞の株間における多様性、あるいは同一細胞株内における不均一性という問題の解決にナイーブ型ヒトiPS細胞は役に立つかもしれない。さらに分化能力の株間の差を埋める事につながるかもしれない。しかしながら、これらは、現時点では可能性であり、実際に確認する必要があり、さらに基礎的な研究を積み上げる必要もあり、克服しなくてはならない問題は多いと考える。最初にナイーブ型細胞を安定化させることは最重要であり、続いて分化能力の検討も大事である。

ヒトナイーブ型細胞は、より初期の幹細胞であることから、ヒトの生命の始まりを解析することに利用できる可能性がある。着床前から着床期への生命の発生は、ヒト胚へのアプローチが制限されていることから、難しい分野であった。ナイーブ型ヒトiPS細胞を用いて、試験管内での発生システムを構築して、より早い時期の解析を行っていき、その結果、より適切な分化方法の開発へとつなげていくことが可能になる。そのため、ヒトナイーブ型iPS細胞を用いて初期発生を解析することは重要である。

そこで本申請では、ヒト多能性幹細胞の分化能力に関し、ナイーブ型とプライム型を比較した。特に胚体外原始内胚葉への分化を試みた。

## 2. 方法

ヒトナイーブ型多能性幹細胞を作成するために、ヒトプライム型ES細胞(H9プライム細胞)およびヒトiPS細胞(AiPSプライム細胞)にEOSベクターを導入したヒトプライム型多能性幹細胞(H9-EOS細胞, AiPS-EOS細胞)を作成した。これらプライム型多能性幹細胞をHDAC阻害剤で処理し、ナイーブ培地でヒトナイーブ型多能性幹細胞を誘導、維持し、リセット細胞を樹立した(H9ナイーブ細胞, AiPSナイーブ細胞)。マウスES細胞にGATA6, GATA4, SOX17を過剰発現させると、胚体外組織である原始内胚葉に誘導できる。マウスES細胞にGATA6, GATA4, SOX17を過剰発現すると、マウス原始内胚葉が誘導されることが知られている。そこで、H9ナイーブ細胞とH9プライム細胞株にDOX誘導下にGATA6を発現するプラスミドを導入した。

## 3. 結果 研究成果

● ヒトナイーブ型多能性幹細胞とプライム型多能性幹細胞由来のPDGFRA陽性細胞は異なる集団であるH9ナイーブ細胞にDOXを加えて、血清中で分化させたところ、いずれの過剰発現でもnaïve型のドーム状コロニーは平坦になり、分化していった。遺伝子発現を確認したところ、GATA6を過剰発現させた細胞株では、ヒトナイーブ型から原始内胚葉のマーカであるGATA4, GATA6, SOX17がday 2から発現し、day 4にかけ

上昇することが分かった。H9 ナイーブ細胞においても GATA6 を過剰発現させると、GATA4, 6, SOX17 は発現が誘導された。GATA4 を過剰発現した際も GATA6 ほどではないが遺伝子の発現が誘導されることが分かった。

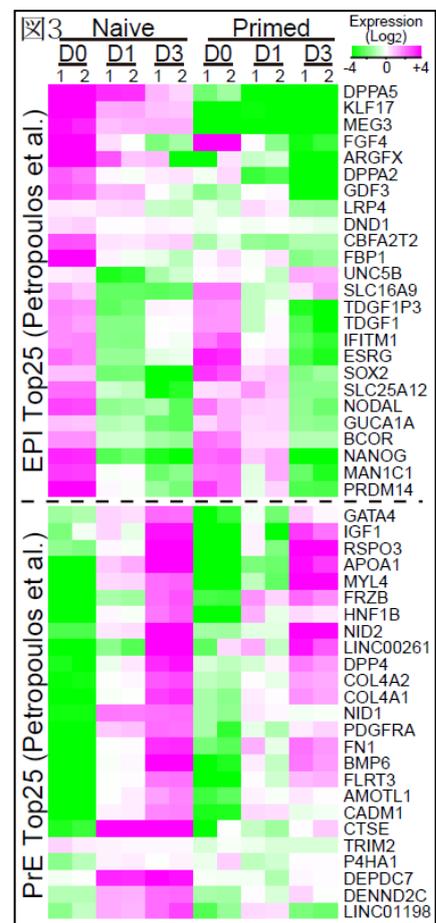
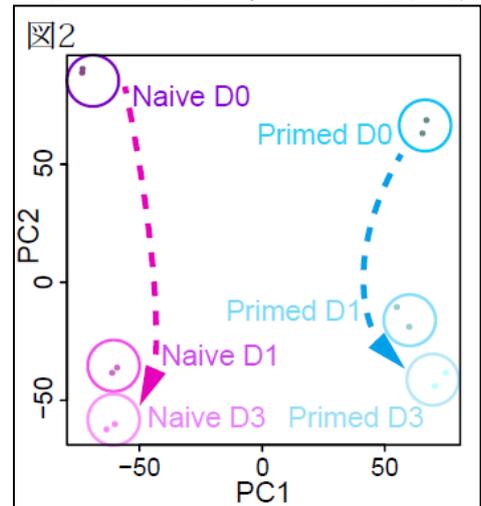
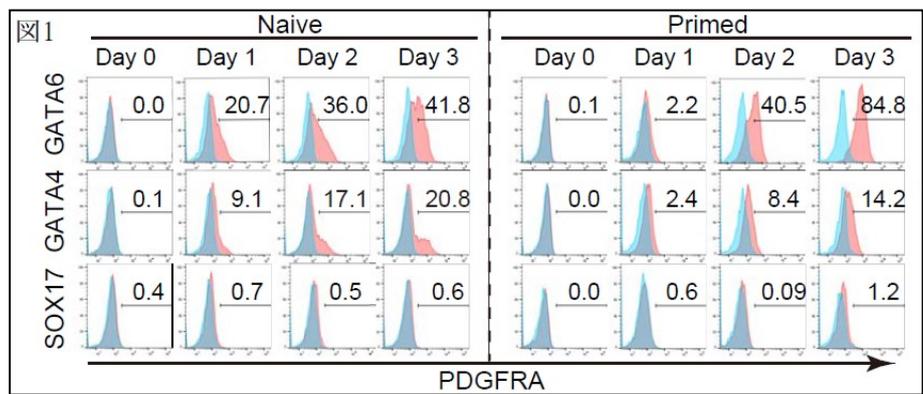
マウスプラストシストにおいて、原始内胚葉は PDGFRA 陽性である。またマウス ES 細胞から原始内胚葉へと分化した細胞は、PDGFRA を発現していることが知られる。single cell RNA sequencing を用いた解析において、ヒト胚の原始内胚葉において、PDGFRA が発現していることが報告されている。そこで誘導した細胞において、PDGFRA の発現を qPCR で確認すると、ナイーブ型、プライム型同様に GATA6 を発現させると、PDGFRA の発現が上昇することが分かった。そこでフローサイトメトリーで PDGFRA の発現を確認した (図 1)。GATA6 を過剰発現させると、PDGFRA の発現が Day1 から認められ、Day3 で GATA6 では 41%、GATA4 では 20%の細胞が PDGFRA 陽性であった。続いて、PDGFRA 陽性細胞の遺伝子発現を調べた。ナイーブ由来 PDGFRA 陽性細胞を純化しその発現を調べたところ、H9 ナイーブ-GATA6 の PDGFRA 陽性細胞からは、原始内胚葉のマーカーである GATA4、GATA6、SOX17、HNF4A、FOXA2、COL4A1 が発現し、一方多能性のマーカーである OCT3/4、NANOG の発現は減少した。

一方、H9 プライム-GATA6 から誘導される PDGFRA 陽性細胞の遺伝子発現を調べたところ、ナイーブ型に比較し、GATA4、SOX17をはじめ HNF4A、FOXA2 といった原始内胚葉遺伝子は発現せず、PDGFRB、KDR、SNAI2、CDH11、VIMENTIN といった中胚葉や間葉系に関連する遺伝子が発現していた。以上からナイーブ型からは原始内胚葉関連遺伝子を発現する細胞が誘導されるが、プライム型からは中胚葉系の遺伝子を発現する細胞が誘導されることが分かった。

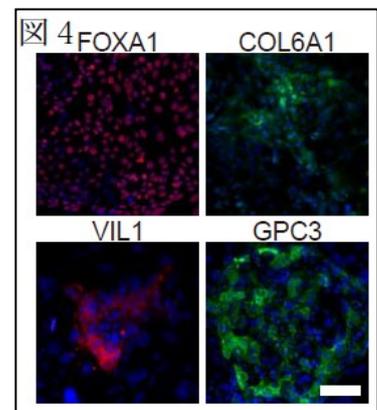
● ヒトナイーブ型多能性幹細胞由来 PDGFRA 陽性細胞は原始内胚葉に同等である

分化のシグナルをより明らかにするために、非血清培地である SF03 培地を利用して、誘導を行った。H9 ナイーブ-GATA6 において、GATA6 を過剰発現させ、FGF4 を加えて誘導したところ、Day1 では約 30%の細胞が PDGFRA 陽性になり、Day3 では 80%の細胞が PDGFRA 陽性であった。PDGFRA 陽性細胞をフローサイトメトリーで純化し、発現を確認したところ、血清コンディションと非血清コンディションでほぼ同程度に GATA4、SOX17、FOXA2、HNF4A、COL4A1、SPARC といった原始内胚葉関連遺伝子を発現していた。免疫染色を実施したところ、GATA6 の過剰発現によって、GATA4、SOX17 が誘導されることが確認された。PDGFRA 細胞の性質をより深く解析するために、RNA-seq を用いた網羅的解析を行った。全遺伝子を用いて主成分解析を行ったところ、H9 ナイーブ細胞および H9 プライム細胞は、PC1 で異なり、GATA6 を過剰発現させ誘導した PDGFRA 陽性細胞 (Day1, Day3) はナイーブ型とプライム型で未分化な状態と同様に PC1 は異なり PC2 が同じ方向に変化した (図 2)。すなわち誘導した PDGFRA 陽性細胞も異なる細胞集団であることが示唆される。H9 プライムから誘導される細胞は、中胚葉系細胞であることが示唆されたことから、中胚葉系遺伝子の発現を見たところ、D1 において、初期の原始線条 (primitive streak) に関連する遺伝子が発現しており、中胚葉の細胞へと誘導されることが推測される。一方、ナイーブ細胞では、このような中胚葉系の遺伝子は誘導されなかった。H9 ナイーブ細胞より誘導された細胞とヒト胚におけるエピブラスト (EPI) と原始内胚葉 (PrE) に関する Top25 遺伝子の発現を比較したところ、誘導前の Day0 はエピブラストに近く、誘導後の Day3 は原始内胚葉に近いことが分かった (図 3)。以上から、ヒトナイーブ細胞から誘導された PDGFRA 陽性細胞は原始内胚葉に近い細胞であると考えられる。

さらに、ナイーブ型から誘導した原始内胚葉細胞の分化能力を調べるために、フローサイトメトリーで純化後、さらに培養を行った。ヒト胚では原始内胚葉細胞は、卵黄囊と胚体外間葉系細胞に分化することが知られており、遺伝子発現を、qPCR、免疫染色、RNA-seq で検索した。ナイーブ型から誘導した原始内胚葉細胞は、実際、卵黄囊で発現する FOXA1、



VIL1、GPC3、COL6A1 を発現していた(図4)。ヒト卵黄嚢から RNA を取り出し解析した RNA-seq データをコントロールとし、ナイーブ細胞から誘導した細胞を比較したところ、ヒト卵黄嚢に近い遺伝子発現をすることが分かった。このことから、ヒトナイーブ細胞から誘導した原始内胚葉は、生体内同様に卵黄嚢に分化する能力を持つことが分かった。



#### 4. 考察 まとめ

- ヒトナイーブ型多能性幹細胞とプライム型多能性幹細胞由来の PDGFRA 陽性細胞は異なる集団である。
- ヒトナイーブ型多能性幹細胞由来 PDGFRA 陽性細胞は原始内胚葉に近い性質を持つ細胞である。一方、プライム型多能性幹細胞は、原始線条から中胚葉遺伝子を発現する。

#### 5. 発表論文、参考文献

##### 論文

1. Stefano BD, Ueda M, Sabri S, Brumbaugh J, Huebner A, Sahakyan A, Clement K, Clowers KJ, Erickson A, Shioda K, Gygi SP, Gu H, Shioda T, Meissner A, **Takashima Y**, Kathrin Plath, Hochedlinger K. Reduced MEK inhibition confers a growth advantage and improves genomic stability in naïve human ES cells *Nature Methods* in press
2. Yu L, Li J, Hong J, **Takashima Y**, Fujimoto N, Nakajima M, Yamamoto A, Dong X, Dang Y, Hou Y, Yang W, Minami I, Okita K, Tanaka M, Luo C, Tang F, Chen Y, Tang C, Kotera H, Liu L. Low Cell-Matrix Adhesion Reveals Two Subtypes of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* in press
3. Karagiannis P, **Takashima Y\***. Surface markers guide the journey towards naïve pluripotency *Cell Stem Cell* 2017; 20(6) 237-238 (\*corresponding author)
4. Honda A, Kawano Y, Izu H, Chojookhuu N, Honsho K, Nakamura T, Yabuta Y, Yamamoto T, **Takashima Y**, Hirose M, Sankai T, Hishikawa Y, Ogura A, Saitou M. Discrimination of Stem Cell Status after Subjecting Cynomolgus Monkey Pluripotent Stem Cells to Naïve Conversion. *Sci Rep.* 2017 Mar 28;7:45285. doi: 10.1038/srep45285.

##### 和文総説

1. **高島 康弘**, 蝉 克憲, 上田 舞 ヒトナイーブ型 ES/iPS 細胞の性質と展開、細胞 2018 (6) p
2. 上田 舞, **高島 康弘** 多能性幹細胞の歴史とヒトナイーブ型多能性幹細胞、Cytometry Research 27 巻 (2017) 1 号 p. 19-24、doi.org/10.18947/cytometryresearch.27.1\_19  
History of Pluripotent Stem Cells and Human Naïve Pluripotent Stem Cells  
Mai Ueda, Yasuhiro Takashima
3. **高島康弘**、山中伸弥 iPS 細胞の樹立とあらたな生命科学の開拓 「医学のあゆみ」 Vol1257 No13 2016 1333-1336
4. **高島康弘** iPS 細胞を用いた生活習慣病の解明と治療への応用 「Clinical CALCIUM」 医薬ジャーナル社 Vol126 N03 2016; p.93-99, doi: CliCa1603433439