

# News Release



2014年8月4日  
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

## 初期化および分化において鍵となる ヒト内在性レトロウイルスの働き

### ポイント

- ヒトのゲノム<sup>注1</sup>中には進化の過程で取り込まれたレトロウイルス<sup>注2</sup>の塩基配列が含まれている。
- 内在性レトロウイルスの一種 HERV-H の活性化が初期化<sup>注3</sup>を促進する。
- KLF4 の異常な発現が引き起こす HERV-H の活性化が、一部の iPS 細胞で見られる分化抵抗性の原因である。
- 細胞の初期化における重要なメカニズムの一端を明らかにした。今後、高品質な iPS 細胞を高効率で作製できる技術につながると期待される。

### 1. 要旨

大貫茉莉研究員(現ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン/元京都大学 CiRA)、山中伸弥教授および高橋和利講師(京都大学 CiRA 初期化機構研究部門)らの研究グループは、iPS 細胞の樹立過程および分化能に、進化の過程でヒトゲノムに組み込まれた内在性レトロウイルス(HERV-H)が深く関与していることを明らかにしました。

初期化因子と呼ばれる遺伝子(OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC)を過剰発現させることで、体細胞を iPS 細胞へと初期化することができます。しかし、iPS 細胞の中には他の細胞へ分化させようとしてもしない、分化能の低いもの(分化抵抗性 iPS 細胞)や、iPS 細胞の多能性をうまく維持できないものもあります。どうしてこのような iPS 細胞が生じるのか、その仕組みについてはよく分かっていませんでした。

今回高橋講師らのグループは、分化抵抗性 iPS 細胞で特異的に高発現している HERV-H の制御配列(LTR7)が、OCT3/4、SOX2、KLF4 により初期化の過程で一過性に活性化されていることを見いだしました。そして、初期化の早い時期に LTR7 の働きを抑えると iPS 細胞の作製効率が著しく低下することが分かりました。また、LTR7 の活性化により HERV-H の発現が上昇しますが、その発現は、初期化が完了すると ES 細胞と同程度まで低下しました。しかし、分化抵抗性 iPS 細胞では LTR7 が活性化されたままで、LTR7 の働きを抑えることにより分化能を取りもどすことが分かりました。

本研究により、ヒト体細胞を初期化し、分化能をもつ上で内在性レトロウイルスが一過性に強く活性化することが重要であることが示されました。細胞の初期化技術に重要なメカニズムの一端を解明したことで、今後、高品質な iPS 細胞作製の効率化につながると期待できます。

この研究成果は 2014 年 8 月 4 日(月)(米国東部時間)から始まる週に米国科学誌「PNAS」のオンライン版に掲載されます。

## 2. 研究の背景

ヒト多能性幹細胞は2つの方法で作ることができます。一つは初期胚をつかったES細胞であり、もう一つは分化した細胞に初期化因子を導入することで作製されるiPS細胞です。ほとんどのiPS細胞の性質はES細胞と非常によく似ていますが、高橋講師らのグループは過去に、一部のiPS細胞が他の細胞へ分化させようとしてもしない、分化能の低いもの(分化抵抗性iPS細胞)であることを報告しました。そして、分化抵抗性iPS細胞で特異的に高発現する遺伝子近傍には共通した配列(内在性レトロウイルスの一種であるHERV-H)があり、それが活性化していたことが分かりました。

HERVは、レトロウイルスが進化の過程でヒトのゲノムの中に組み込まれたものです。組み込まれた配列がゲノム上の様々な部位に転移した結果、ヒトゲノムの8%を占めるようになりました。

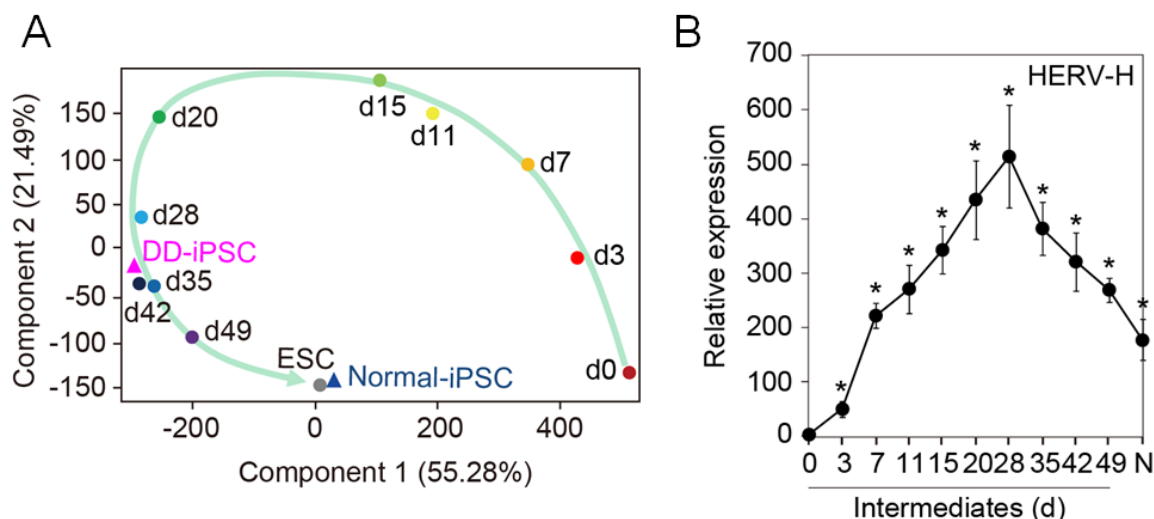
上述のようにHERV-Hと分化抵抗性との関連が示唆されていましたが、iPS細胞作製においてHERV-Hがどのような役割を果たしているかについてはよく分かっていませんでした。そこで高橋講師らのグループは、iPS細胞への初期化と分化抵抗性の観点から、HERV-H活性化の意義を検証しました。

## 3. 研究結果

### 1) HERV-Hの一過性の活性が初期化の過程で重要な役割を果たす

正常の分化能をもつiPS細胞と分化抵抗性iPS細胞の遺伝子発現をマイクロアレイ<sup>注4</sup>により比較解析しました。その結果、分化抵抗性iPS細胞では144のマーカー遺伝子の発現が上昇していました。これらの144遺伝子の発現を、ヒト線維芽細胞に初期化因子(OSKM)を作用させてから様々な初期化途中段階の細胞で調べたところ、分化抵抗性iPS細胞は正常のiPS細胞と比べて、初期化途中の細胞に似ていることが分かりました。

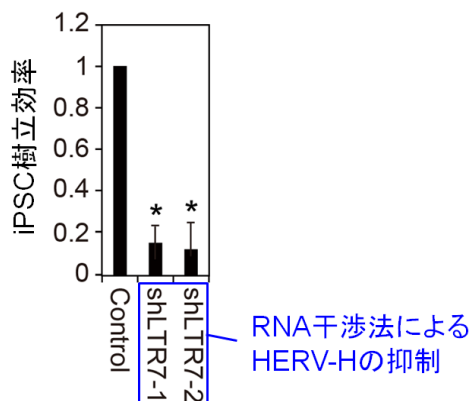
そこで、分化抵抗性の起きるメカニズムを探るためのヒントとして、まず、初期化途中でのHERV-Hの発現をリアルタイム定量PCR<sup>注5</sup>で調べました。すると、初期化の途中でHERV-Hの発現が一過性に増加していることが分かりました。また、HERV-H配列の両端にある長い反復配列(LTR7)の領域が一過性に低メチル化状態になり、LTR7が活性化されていることが分かりました。



**Fig. 1 分化抵抗性 iPS 細胞と初期化の過程の接点**

A: 144 遺伝子を用いた主成分解析。分化抵抗性 iPS 細胞 (DD-iPSC) が正常な iPS 細胞 (Normal-iPSC) と比べて初期化途中の細胞に類似していることが分かる。B: 初期化過程における HERV-H の発現変化。初期化途中で HERV-H は一過性に活性化している。Intermediate (d): 初期化因子導入からの日数、N: 正常な iPS 細胞

そこで、初期化の際に LTR7 の働きを抑える shRNA を導入すると、iPS 細胞の作製効率が著しく低下し、iPS 細胞のコロニーがほとんど形成されませんでした。



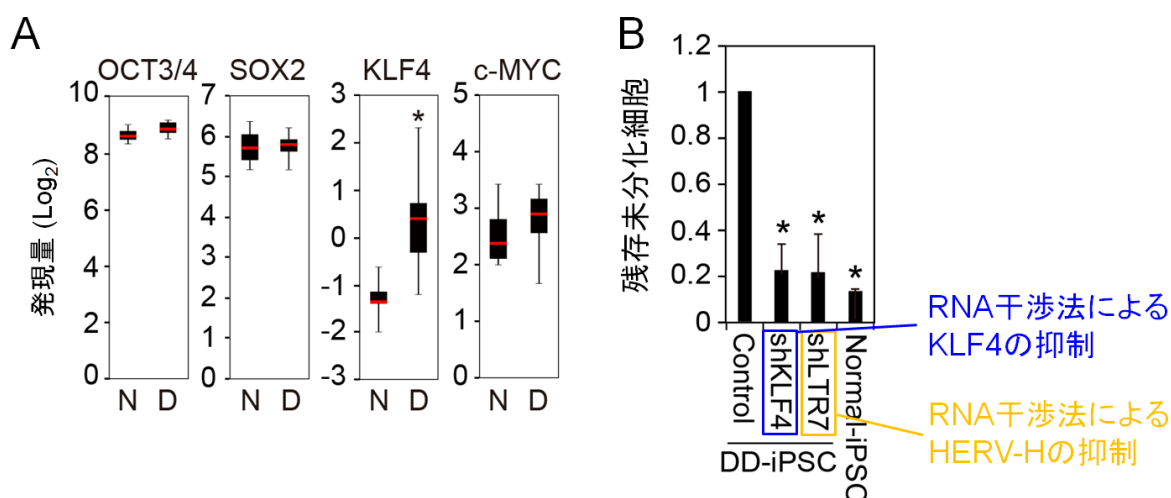
**Fig. 2 HERV-H の活性化は初期化に重要である**

ヒト線維芽細胞に OSKM (Control) または OSKM に加えて LTR7 に対する shRNA<sup>注6</sup>を導入し、25 日目に iPS 細胞の樹立効率を調べた。HERV-H の活性化を抑えると、iPS 細胞のコロニーの形成がほとんど見られなくなった。

上述の結果より、HERV-H が一過性に活性化することが、初期化を促すことがわかりました。

## 2) 初期化因子 KLF4 の異常な活性が HERV-H を活性化し、分化抵抗性を引き起こす

本研究では HERV-H に加えて、初期化因子の一つである KLF4 の発現も分化抵抗性 iPS 細胞で高くなっていることを見いだしました。そこで、shRNA を用いて分化抵抗性 iPS 細胞での KLF4 と LTR の働きをそれぞれ抑えたところ、共に HERV-H の発現が抑制され、分化能も通常の iPS 細胞と同程度になりました。これらの結果より、KLF4 の異常な活性が HERV-H の活性を引き起こし、分化抵抗性の引き金になっていることが示されました。



**Fig. 3 KLF4/HERV-H の異常な活性化が分化抵抗性を引き起こす**

A: 正常な iPS 細胞 (N) および分化抵抗性 iPS 細胞 (D) における初期化因子の発現。分化抵抗性 iPS 細胞において KLF4 が高発現していることが分かる。B: 分化抵抗性 iPS 細胞において KLF4 または HERV-H (LTR7) の発現を shRNA で抑制すると、分化能の改善が見られた。

#### 4. まとめ

今回の研究では、ヒト体細胞が iPS 細胞へと初期化される過程で、ゲノムのあらゆる場所に存在する内在性レトロウイルス HERV-H LTR7 が一過性に活性化されていること、またそれが iPS 細胞の作製や十分な初期化に必要であることが分かりました。初期化が完了すると、HERV-H LTR7 の活性は ES 細胞と同程度までに低下しましたが、分化抵抗性 iPS 細胞株では HERV-H LTR7 が活性化されているままであり、それにより分化抵抗性をもつことが分かりました。また、HERV-H LTR7 の活性化には初期化因子である KLF4 が大きな役割を果たしていることが示されました。

本研究により、これまで分からなかった細胞の初期化における非常に重要なメカニズムの一端が明らかになりました。今後、高い分化能をもつ高品質な iPS 細胞を効率よく安定的に作製できる技術につながると期待されます。



**Fig. 4 本研究のまとめ (iPS 細胞の樹立過程および分化能における HERV-H の役割)**

ヒト体細胞の初期化において、初期化因子はゲノム上に多く存在する HERV-H LTR7 に直接結合することで活性化し、初期化を促進する。完全な初期化には HERV-H の活性が適切に抑制されることが必要であり、不完全な HERV-H の抑制は iPS 細胞の分化抵抗性を引き起こす。

#### 5. 論文名と著者

- 論文名

“Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential”

- ジャーナル名

Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)

米国科学アカデミー紀要

- 著者

Mari Ohnuki<sup>1</sup>, Koji Tanabe<sup>1</sup>, Kenta Sutou<sup>1</sup>, Ito Teramoto<sup>1</sup>, Yuka Sawamura<sup>1</sup>, Megumi Narita<sup>1</sup>, Michiko Nakamura<sup>1</sup>, Yumie Tokunaga<sup>1</sup>, Masahiro Nakamura<sup>1</sup>, Akira Watanabe<sup>1</sup>, Shinya Yamanaka<sup>1,2</sup>, and Kazutoshi Takahashi<sup>1</sup>

- 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. グラッドストーン研究所

## 6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- 文部科学省 科学研究費補助金
- 文部科学省 再生医療の実現化プロジェクト
- 内閣府 最先端研究開発支援プログラム(FIRST)
- 科学技術振興機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム iPS 細胞研究中核拠点
- 文部科学省 世界トップレベル研究拠点プログラム
- 公益財団法人 日本応用酵素協会
- iPS 細胞研究基金

## 7. 用語説明

### 注1) ゲノム

生き物の遺伝情報全体のことを「ゲノム」と呼ぶ。通常、ゲノムは生き物の種類ごとの単位で表現され、人間(ヒト)であればヒトゲノム、マウスならマウスゲノムと呼ばれる。

### 注2) レトロウイルス

RNAを遺伝情報としてもっており、かつ逆転写酵素をもっているタイプのウイルスの総称。このウイルスに目的の遺伝子を組み込むことで遺伝子の導入ができることから、遺伝子研究で広く使われている。iPS細胞を作るときにも使われていた。

### 注3) 初期化

分化した体細胞の核がリセットされ受精卵のような発生初期の細胞核の状態に戻り、多能性幹細胞などに変化すること。

### 注4) マイクロアレイ

一度に膨大な数のDNAやRNA、タンパク質を網羅的に検査することができる解析技術。

### 注5) リアルタイム定量PCR

PCR法によって増やしたDNAの量を蛍光色素をつかって経時的に測定し、DNAを定量する方法。

### 注6) shRNA

Small (もしくは short) hairpin RNA の略。特定の遺伝子の発現を妨げるRNA干渉法でよく用いられる分子の一つ。この論文では例えばKLF4の発現を妨げるshRNAは「shKLF4」と表記している。