



iPS 細胞誘導時におけるテロメアテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の重要性の解明 —iPS 細胞の分化誘導やがん化抑制の分子機序解明にも期待—

概要

九州大学大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門 ヒトゲノム幹細胞医学分野の永松 剛 助教らの研究グループは、慶應義塾大学医学部 (坂口光洋記念講座) 発生・分化生物学 (永松助教が平成 26 年 3 月まで所属) の須田 年生 (すだ としお) 教授らとの共同研究で、iPS 細胞誘導時におけるテロメアテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) (※1) の重要性を解明しました。iPS 細胞誘導時のストレス応答 (※2) の一端を明らかにしたもので、iPS 細胞の分化誘導やがん化抑制の分子機序解明にもつながると期待されます。

本研究は独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 個人型研究 (さきがけ) 「iPS 細胞と生命機能」の研究課題「生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発」(研究代表者:永松剛)、及び文部科学省科学研究費補助金における研究の一環として行われました。

本研究成果は、米国科学雑誌『*The Journal of Biological Chemistry*』のオンライン速報版で 2014 年 4 月 14 日に公開されました。

背景

体細胞をリプログラミングし多能性幹細胞へと誘導する iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) 技術は、2006 年にマウスで、2008 年にヒトでそれぞれ確立され、2012 年には京都大学の山中 伸弥教授がノーベル医学・生理学賞を受賞しました。現在は臨床応用へと向けて日進月歩の状況となっています。分化した体細胞がどのようにして多能性を獲得するのかというリプログラミングのメカニズムを理解することは重要な問題です。

iPS 細胞の誘導過程で、細胞は分裂・増殖しながら多能性を獲得していくことが知られていました。細胞増殖は DNA ダメージや染色体異常といった遺伝子変化の危険を伴います。それらを回避するため、染色体末端の維持や保護に働いているテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) はリプログラミングの過程で発現が誘導されます。そして、その発現のタイミングは、多能性幹細胞のマーカーとして広く使われている Oct3/4 (※3) や Nanog (※3) といった因子と同じであることが知られていました。

内容

研究グループは、TERT のリプログラミング過程における機能について検証を行いました。体細胞リプログラミングにおける TERT の機能を明らかにするために、TERT 遺伝子を欠損したマウス成体尾部から繊維芽細胞を調整し、Klf4 (※3)、Sox2 (※3)、Oct3/4、c-Myc (※3) の 4 因子を作用させて iPS 細胞を誘導しました。その結果、著しい効率の減少が確認されました。しかしながら iPS 細胞は誘導され、三胚葉への分化能も持ち合わせていました。これらのことから、TERT は体細胞リプログラミングに寄与するもののその働きは必須ではないことが明らかになりました。

一方で、樹立された iPS 細胞を継代、維持したところ、TERT 欠損株では増殖の異常および染色体異常が認められました (図 1)。このことは、増殖に伴う染色体末端修飾や保護といった、これまでによく知られている TERT の機能とよく一致するものと考えられます。

次に、これらの TERT の機能がその酵素活性に依存するものかどうかを検証しました。TERT の酵素活性部位にあたる 702 番目のアスパラギン酸 (D) をアラニ

野生型 iPS 細胞

TERT 欠損 iPS 細胞

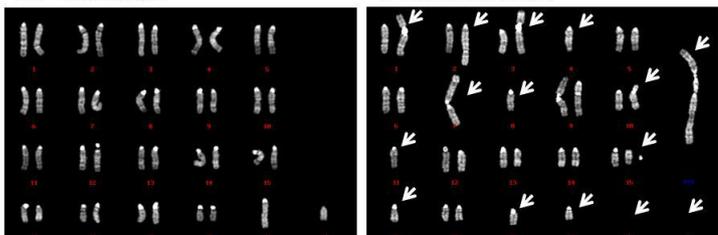


図1. 野生型およびTERT欠損iPS細胞の染色体
50回以上継代して維持した野生型およびTERT欠損iPS細胞の染色体。
矢印で示されるようにTERT欠損細胞では末端融合や欠損等の異常な染色体が観察される。

ン (A) に置換することで酵素活性を欠損させることができます (TERT D702A)。この酵素活性を持たない TERT D702A を TERT 欠損線維芽細胞に導入してレスキュー実験 (※4) を行いました。その結果、リプログラミング効率の改善が見られ、三胚葉への分化能も獲得されていることが分かりました。これらのことから体細胞リプログラミングにおける TERT の機能はその酵素活性によらないことが示唆されました (図 2)。

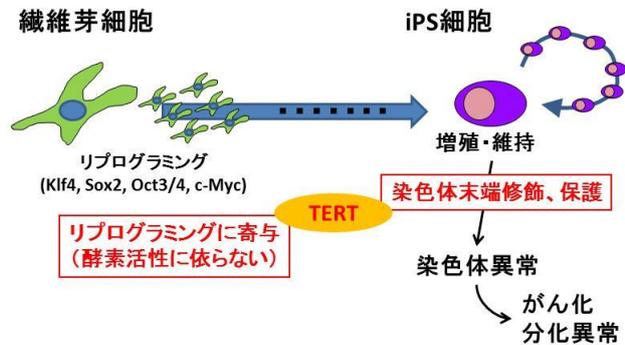


図2、リプログラミングおよびiPS細胞の増殖・維持におけるTERTの機能

■効果

TERT は先天性角化不全症の原因遺伝子です。遺伝性の疾患は根本的な治療は難しく、そのため、遺伝子治療のできる iPS 細胞を用いた自家移植は先天性角化不全症を治療するのに大きな可能性を持っています。今回得られたマウスの結果は、TERT 欠損細胞においても効率よく iPS 細胞を樹立する方法や、TERT を欠損した iPS 細胞でも染色体異常が起こらないように培養する方法を確立することにつながる可能性を持っています。このように将来的な再生医療の実現にとって重要な手法確立の基礎となる成果と考えられます。

■今後の展開

今後は、TERT の酵素活性以外のどのような機能が体細胞リプログラミングに関わっているのかを検討していきます。また、樹立された iPS 細胞の維持においても酵素活性の依存性を検討していきます。これらの検討から作用機序を詳細に理解して TERT 欠損においても効率よく iPS 細胞を樹立する方法と TERT を欠損した iPS 細胞でも染色体異常が起こらないような培養法の確立を目指しています。

■論文

Taisuke Kinoshita #, Go Nagamatsu #*, Shigeru Saito, Keiyo Takubo, Katsuhisa Horimoto, Toshio Suda (#Equal contribution, *Corresponding Author)

Telomerase Reverse Transcriptase has an Extratelomeric Function in Somatic Cell Reprogramming.

The Journal of Biological Chemistry. 2014 Apr 14.

【共同研究グループ】

九州大学大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門 ヒトゲノム幹細胞医学分野：助教 永松剛
 慶應義塾大学大学院医学研究科 医学研究系専攻 発生・分化生物学分野：博士課程4年 木下泰輔
 慶應義塾大学医学部 (坂口光洋記念講座) 発生・分化生物学 専任講師 田久保圭誉、教授 須田年生
 株式会社オプト『オプトデータサイエンスラボ』：所長 齊藤秀
 産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター：副センター長 堀本勝久

【用語解説】

(※1) テロメアテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT)

真核生物の染色体は直鎖状になっており、複製するたびに短くなってしまふ。それを防ぐために末端部分のテロメアという配列とテロメラーゼという酵素を用いて伸長させている。テロメラーゼは鋳型となる RNA 構成要素の TERC、逆転写酵素である TERT、およびその他の制御サブユニットによって構成されている。テロメラーゼは通常の体細胞では活性がない。一定よりもテロメアが短くなると異常な染色体末端と認識され修復機構が働き末端構造が融合し、細胞死が誘導されたり細胞ががん化してしまったりする。それを防ぐために体細胞では細胞増殖を停止させ、染色体の不安定化を阻止している。

(※2) ストレス応答

細胞は熱や圧力等の外的なものから増殖の際におけるタンパク質合成、DNA 合成に伴う異常の修復といった内的なものまで様々なストレスにさらされる可能性がある。それらストレスに対する応答を細胞のストレス応答と総称している。

(※3) Oct3/4、Nanog、Klf4、Sox2、c-Myc

多能性幹細胞で重要な働きをしている転写因子群。Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc の 4 因子は京都大学の山中教授が iPS 細胞を樹立した際に発見したリプログラミング因子群。Nanog、Oct3/4 は発現の特異性が多能性幹細胞で高いため多能性幹細胞のマーカーとして広く使われている。

(※4) レスキュー実験

遺伝子を欠損した細胞に外来性の遺伝子を導入することによって、表現型が野生型と同じように戻るかどうかを確かめる検証実験系。

【お問い合わせ】

大学院医学研究院 助教 永松 剛 (ながまつ ごう)

電話：092-642-4845

FAX：092-642-4846

Mail：gonag@hgs.med.kyushu-u.ac.jp