

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 21 年度採択研究代表者

高倉 伸幸

大阪大学・微生物病研究所・教授

生理的細胞リプログラミング機構の解明とその応用

§ 1. 研究実施の概要

細胞を用いた再生医療においては、体外で増幅させた幹/前駆細胞や成熟細胞による組織再構築法の開発が主になされてきている。しかし、個体において、成熟細胞が他のタイプの細胞にリプログラムすることが徐々に明らかにされてきており、体外での幹細胞の操作ではなく、個体のもつ内在性のリプログラミング機構を個体内で増強させる方法も将来再生医療に応用することが可能であると考えられる。そこで本研究では、我々がこれまで解明してきた内在的/生理的に生体に備わっている造血幹細胞分画により誘導される体細胞のリプログラミング機構が、組織特異的体細胞の幹細胞化にも関与しうるか、そしてそれがどのような分子機序により誘導されるのかを解明する。さらに、体細胞のリプログラミング化の頻度を向上させるために、リプログラミング現象を受けやすいための条件である、潜在的に細胞増殖活性を有する特殊な細胞を生体内で発見し、これらの細胞の生理的意義を解析するとともに、潜在的細胞増殖に関わる分子の遺伝子制御について解明する。本年度、造血幹細胞が非直接的な組織細胞との融合様現象により組織細胞の幹細胞化/前駆細胞化を誘導する機序の解明を実施したが、まだその実体は明らかにはならなかった。引き続き検討を実施する。一方、我々は組織中に存在する、潜在的に細胞増殖能の高い細胞として、成熟した血管内皮細胞の中の side population (SP) 分画 (EC-SP 細胞) を同定してきた。EC-SP 細胞の発生期から、成体における存在様式をマウスを用いて解析したところ、この細胞は胎児期には存在せず、生後数日で体内に現れ、マウスの成長とともに豊富になっていくことが判明した。今後、この EC-SP 細胞の起源を探索するとともに、成熟した内皮細胞が、いかに幹細胞様の遺伝子変化を生後に獲得するのかを解明する。また、造血幹細胞をモデルとして、潜在的細胞増殖活性の解析を、DNA 複製能の維持機構から解析を行ってきた。その結果、休眠中の幹細胞と、一過性増殖期にある幹細胞において、DNA 複製因子 PSF1 の発現を巧みに制御することにより営まれることを示唆する所見が得られてきた。今後もこの PSF1 の発現制御を中心にして、幹

細胞性増殖の機構を明らかにする。

§ 2. 研究実施体制

(1)「高倉」グループ

① 研究分担グループ長:高倉 伸幸(大阪大学、教授)

② 研究項目

- ・ 造血幹細胞を用いた体細胞の幹細胞化／初期化の誘導とその分子機序の解明
- ・ 体細胞初期化効率改善を目的とした DNA 複製因子 GINS の発現とその制御
- ・ GINS 抑制因子による iPS 細胞の細胞死誘導

§ 3. 研究実施内容

研究項目 I. 造血幹細胞を用いた体細胞の幹細胞化／初期化の誘導とその分子機序の解明

[研究目的] 我々は、腫瘍組織に侵入した造血幹細胞が、がん細胞と細胞融合様の現象を介して、がん細胞のがん幹細胞化を誘導することを発見した。この現象を培養において再現したところ、実際には造血幹細胞とがん細胞が完全に融合するのではなく、造血幹細胞ががん細胞と接触した際に、何らかのシグナルをがん細胞に伝達していることによることが判明してきた。そこで、この造血幹細胞による、がん細胞のがん幹細胞化の現象について分子機序を明らかにして、これを応用して成熟した組織細胞の幹細胞化を誘導する方法論を得ることを研究目的とする。

[方法／結果／考察 1] 致死量放射線照射した Flox-EGFP マウスに CAG-Cre マウス由来造血幹細胞移植を行い、種々の組織障害モデルにおいて、造血幹細胞との融合様現象により GFP が陽性になった体細胞を、幹細胞マーカーの比較的明らかになっている、肝臓、心臓および脳組織などから回収する。これらの幹細胞性について、マーカーだけでなく、sphere 形成能や in vivo 移植による多分化能などについても解析し、造血幹細胞による組織細胞の幹細胞化の可能性について検討する。／今回、CAG-Cre マウス由来骨髄による骨髄キメラマウスの作成に時間を要し、十分なサンプル調整ができなかった。／平成22年度においては豊富なキメラマウスを用いて、本検討を継続して行う。

研究項目 II. 体細胞初期化効率改善を目的とした DNA 複製因子 GINS の発現とその制御

[研究目的] 体細胞のリプログラミング化の頻度を向上させるために、リプログラミング現象を受けやすいための条件である、潜在的に細胞増殖活性を有する特殊な細胞を生体内で発見し、これら細胞の生理的意義を解析するとともに、潜在的細胞増殖に関わる分子の遺伝子制御について、造血幹細胞や ES 細胞、iPS 細胞をモデルとして解明する。

[方法／結果／考察 1]既存血管の中の成熟した CD31 陽性 VE-Cadherin 陽性の血管内皮細胞中に、正酸素では細胞周期が G0 であるのに対し、低酸素刺激で極めて増殖活性を復活させる細胞が side population (SP)内に存在することから、この細胞 (EC-SP 細胞)の潜在的細胞増殖活性を解析することにより、リプログラミングを受けやすい細胞の特性を解明することを目的として、本年度、EC-SP 細胞の発生段階における発現様式を解析した。／胎児期においては、EC-SP 細胞は存在しておらず、出生後徐々に増加して、出生後3週目にプラトーに達することが判明した (図1)。／EC-SP 細胞は、いわゆる幹細胞ではないことから、一旦成熟した血管内皮細胞が何らかの機構で、出生後幹細胞性の増殖能を獲得した細胞であると予想される。このような細胞が、成熟した血管内皮細胞からどのように発生するのかを、エピジェネティックな解析を用いて今後解析していく。

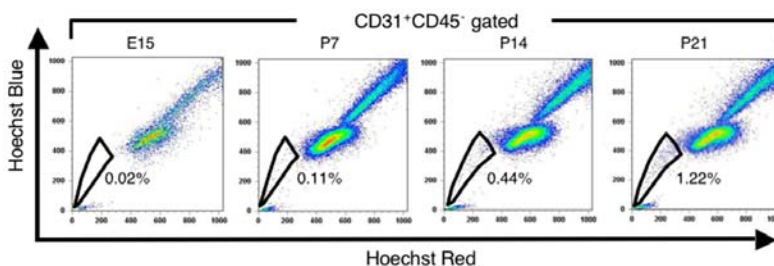


図1 CD31⁺CD45⁺ SP cells in the developing stage

[方法／結果／考察 2]酵母では DNA 複製に必須であることが判明している、GINS 複合体は、ほ乳類細胞では特に幹細胞分画の細胞に発現が高く、GINS 複合体構成メンバーの PSF1 のヘテロノックアウトマウスでは、PSF1 が半量となるだけで、造血幹細胞の長期維持に異常をきたし、また、5-FU 投与による骨髄破壊後の急速な造血幹細胞増殖に障害をきたす。今回、PSF1 の発現が、造血幹細胞の細胞周期に応じてどのように制御されるかを解析するために、骨髄より、CD34 陰性(休眠期)と CD34 陽性(増殖期)の造血幹細胞分画をセルソーターで回収し、これらの細胞における PSF1 の発現に関して検討を行った。／休眠中の造血幹細胞には、PSF1 は蛋白としては発現しておらず、増殖期の造血幹細胞に PSF1 の蛋白発現が観察された (図2a)。しかし、

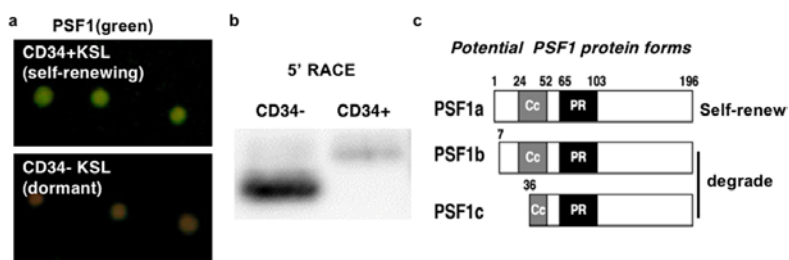


図2 DNA replication factors regulate status of cell cycle of HSCs

細胞周期に関係なく、PSF1 の mRNA は発現が観察されることから、5'RACE 法による、転写開始点を解析したところ、CD34 陽性の造血幹細胞では完全長の PSF1 が転写されていたが、CD34 陰性の造血幹細胞では、short form の不完全な mRNA が転写されていた (図2b,c)。このことから、造血幹細胞は、不完全な PSF1 を産生させることにより、DNA 複製を抑制し休眠期に自ら入る機構が予想される。今後、PSF1 のプロモーター領域でいかなる転写因子による制御が、この PSF1 の発現に関わるのかを解析して、幹細胞の細胞周期について検討を加える。