

「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

高橋 淑子

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科・教授

神経堤細胞をモデルとした生体内での細胞リプログラミング法の開発

§ 1. 研究実施の概要

本 CREST 研究においては、神経堤細胞 (NC 細胞) を主なモデルとして、生体内で分化した細胞をリプログラミングさせるシステムを開発することを目標としている。NC 細胞リプログラミングには、転写因子やエピジェネティック因子などをさまざまに組みあわせた遺伝子操作が有効であると考えられる。平成 21 年度 (21 年 10 月～22 年 3 月末) においては、NC 細胞の生体内操作が可能なニワトリ胚を用いて、生体内リプログラミングに適した遺伝子操作法の開発と、導入遺伝子の時・空間特異的な発現システムの改良をおこなった。具体的には、エレクトロポレーション法の改良、Tol2 トランスポゾン法を用いた NC 細胞特異的な安定的遺伝子導入、そして Tet-on システムによる時期特異的な発現操作法の改良である。これに並行して、未分化 (あるいは幹細胞) NC 細胞に発現する Sox10 と EGFP を融合させた遺伝子を組み込んだ ES 細胞を確立し、それらを用いて Sox10-EGFP マウス胚を作製したところ、NC 細胞に由来する色素細胞前駆細胞や、感覚神経前駆細胞が EGFP で標識されていることを確認した。エピジェネティック因子の探索に関しては、主にカエル胚遺伝子注入法とショウジョウバエ遺伝学を用いたスクリーニングが進行しており、特にクロマチンの不活性化に働くヒストン H3 メチル化酵素 Ezh2 とその補助因子 Eed、そしてクロマチンの活性化を促進する脱メチル化酵素 Jmjd3 と Utx 遺伝子を単離同定した。NC 細胞系譜における発現の詳細な解析と発現ベクターの構築が進行している。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「高橋」グループ

① 研究分担グループ長: 高橋 淑子 (奈良先端科学技術大学院大学、教授)

② 研究項目

- ・ 生体内における NC リプログラミング法に向けた基盤作り(遺伝子導入法の開発)

(2)「國貞」グループ

① 研究分担グループ長:國貞 隆弘(岐阜大学、教授)

② 研究項目

- ・ 生体内における NC リプログラミング法に向けた基盤作り(NC 分化制御因子の検証)

(3)「荻野」グループ

① 研究分担グループ長:荻野 肇(奈良先端科学技術大学院大学、特任准教授)

② 研究項目

- ・ 生体内における NC リプログラミング法に向けた基盤作り(NC 分化制御因子の検証)

(4)「榎本」グループ

① 研究分担グループ長:榎本 和生(国立遺伝学研究所、准教授)

② 研究項目

- ・ NC リプログラミングにおけるエピジェネティック効果の検証(Loss of Function によるエピジェネティックス因子スクリーニング)

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

A. 高橋グループ(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

NC 細胞は、盛んに増殖を繰り返しながらさまざまな場所に移動する。トリ胚内の NC 細胞に、エレクトロポレーション法で遺伝子を導入する場合、従来法を用いると導入遺伝子が NC 細胞のゲノムに組み込まれないため、その発現は導入後約2日後に消失する。これらの問題を解決するために、自身がトリ胚用に開発した Tol2 トランスポゾン法を用いて解析を行っている。本年度は、Tol2 法の高効率化を行った。また Tol2 法と Tet-on 法と組合せることによって、長期的かつ時期特異的な遺伝子操作法を確立した(A-1)。

B. 國貞グループ(岐阜大学大学院 医学系研究科)

Sox10-IRES-EGFP マウスを樹立し、色素細胞前駆細胞や感覚神経前駆細胞などの神経堤由来細胞が特異的に標識されることを各前駆細胞のマーカーと二重染色することで確認した。これらの細胞は、12.5日胚から採取した背部皮膚および背根神経節からセルソーターを用いて EGFP+Kit+CD45-(色素細胞前駆細胞)および EGFP+Kit-CD45-(感覚神経前駆細胞)分画の細胞として精製できることを確認した。現在、これらの前駆細胞の分化能力を、神経堤細胞から色素

細胞・神経細胞への分化を支持する ST2 ストロマ細胞株との共培養により確認中である。さらに、Sox10-IRES-EGFP マウス ES 細胞を ST2 と共培養し、色素細胞前駆細胞が EGFP+Kit+CD45-細胞として出現することを確認した。以上の成果により、色素細胞前駆細胞や感覚神経細胞から iPS 細胞を経由せずに直接神経堤幹細胞や生体の皮膚に存在する神経堤由来の幹細胞 (SKP 細胞) へのリプログラミングを検証できる実験系が確立されつつある (B-1, B-2)。

C. 荻野グループ(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

カエル (*Xenopus tropicalis*) と哺乳類の間でのゲノム配列の比較解析に基づいて、NC 細胞を含む様々な組織で活性をもつエンハンサーを効率よく単離同定する技術を開発した (C-1, C-2)。またカエルのゲノム情報を元に、クロマチンの不活性化に働くヒストン H3 メチル化酵素 Ezh2 とその補助因子 Eed、及びこれらに拮抗してクロマチンの活性化を促進する脱メチル化酵素 Jmjd3 と Utx の遺伝子を単離同定し、その発現の詳細な解析をおこなった。

D. 榎本グループ(国立遺伝学研究所新分野創造センター)

ショウジョウバエ感覚ニューロンの突起形成・再編を指標として、感覚ニューロンの機能分化およびリプログラミングを簡便に評価でき得るアッセイ系の構築を試みた (D-1, D-2)。さらに、感覚ニューロンにおいて RNAi ノックダウンが効率よく働くよう、Dicer2 を感覚ニューロン特異的に過剰発現できる系統を作成し、実際に、RNAi 効率の飛躍的な上昇を確認した (D-3)。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

高橋グループ

A-1. Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y. and Miura, M.: Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with Tol2 transposon mediated gene transfer system. *Genes to Cells*, in press (2010)

國貞グループ

B-1. Yamada, Y., Aoki, H., Kunisada, T. and Hara, A.: Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. *Cell Stem Cell*, 8: 10-15 (2010)

B-2. Tamaoki, N., Takahashi, K., Tanaka, T., Ichisaka, T., Takeda-Kawaguchi, T., Iida, T., Kunisada, T., Shibata, T., Yamanaka, S. and Tezuka, K.: Dental Pulp Stem Cells as Source for iPS Cell Banks. *J Dent. Res.*, in press (2010)

荻野グループ

- C-1. Hellsten, U., Harland, R. M., Gilchrist, M. J., Hendrix, D. Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N. H., Shu, S., Taher, L., Blitz, I. L., Blumberg, B., Dichmann, D. S., Dubchak, I., Amaya, E., Fletcher, R., Gerhard, D., Goodstein, D., Graves, T., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Kawashima, T., Lindquist, E., Mead, P. E., Mitros, T., Ogino, H., Ohta, Y., Poliakov, A. V., Pollet, N., Robert, J., Salamov, S., Sater, A. K., Schmutz, J., Terry, S., Vize, P. D., Warren, W. C., Wells, D., Wills, A., Zimmerman, L. B., Zorn, A. M., Grainger, R., Grammer, T., Khokha, M. K., Richardson, P. M. and Rokhsar, D. S.: The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, in press (2010)
- C-2. Kurokawa, D., Ohmura, T., Ogino, H., Takeuchi, M., Inoue, A., Inoue, F., Suda, Y. and Aizawa, S.: Evolutionary origin of the Otx2 enhancer for its expression in visceral endoderm. *Dev. Biol.*, in press (2010)

榎本グループ

- D-1. Yasunaga, K., Kanamori T., Morikawa, R., Suzuki, E. and Emoto, K.: Dendrite reshaping of adult *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. *Developmental Cell*, in press (2010)
- D-2. Kato, U., Inadome, H., Shirouzu, H., Emoto, K., Kobayashi, T. and Umeda, M.: An aminophospholipid translocase complex P-type ATPase ATP8A1 and mROS3 regulates cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press (2010)
- D-3. Fang, X., Emoto, K. and Adler, P. N.: The *Drosophila* Furry protein interacts with Trc and is highly mobile in vivo. *BMC Dev. Biol.*, in press (2010)