

江良 択実

熊本大学 発生医学研究所 教授

iPS 細胞を用いた組織幹細胞誘導の確立と分子基盤の解明

§1. 研究実施の概要

本研究では、ES/iPS 細胞から中間段階細胞を明らかにしながら、間葉系幹細胞を中心に組織幹細胞の分化誘導条件を確立し、その分化の分子機構を明らかににすることがねらいである。22 年度は、マウス ES 細胞を分化誘導して得られる中間段階細胞分画を FACS にて純化した後、いくつかの増殖因子を用いて培養し、間葉系細胞をこの分画から誘導することに成功した。またヒト iPS 細胞をシングル細胞で維持培養、さらにシングル細胞で単層培養による分化誘導が行えるシステムを確立した。さらに間葉系幹細胞で働く分子として、ES 細胞の分化系から新たに、DNA 結合ドメインを持つ転写因子と考えられる機能不明分子を単離した。この分子は、これまでに間葉系細胞の増殖を負に制御して働くことを明らかにした。一方、分化経路を明らかにするには、細胞の起源の解明が必須である。そこで、間葉系幹細胞の起源と幹細胞特異的に分子の機能を解析するために、間葉系幹細胞のマーカー遺伝子に Cre リコンビネースを組み込んだコンストラクトを作製し、現在ノックイン ES 細胞を樹立中である。さらに、どの中胚葉分画が間葉系幹細胞の起源であるかを調べるためにマーカー遺伝子への Cre リコンビナーゼを挿入したノックインコンストラクトを作製し、マウス ES 細胞に導入中である。

一方、血液細胞分化の研究では、ES 細胞から分化誘導した血液細胞集団を放射線照射マウスに移植し、T リンパ球系列と骨髄球系列の長期にわたるドナーの寄与を認めた。このうち一部については、二次移植が可能であった。

腎前駆細胞分化研究では、中間中胚葉で発現する転写因子の遺伝子座に蛍光蛋白 GFP を挿入した ES 細胞を樹立し、中間中胚葉の誘導条件を検討した。さらに ES 細胞から作製したマウスの中間中胚葉を採取し、遺伝子発現及び機能を調べた。

また、iPS 細胞の核構造解析では、核構造体やクロマチン因子を認識する多数の特異抗体を用いて解析し、いくつかの点で iPS 細胞を特徴づける結果を得た。さらに、高次エピゲノム解析において、クロマチン境界を形成するインスレーター結合因子の集積ゲノム部位の ChIP-Chip 解析

を進めている。

§ 2. 研究実施体制

(1)「江良」グループ

① 研究分担グループ長:江良 択実(熊本大学、教授)

② 研究項目

- ・ ES/iPS 細胞から中間段階細胞(神経上皮・中胚葉)への分化誘導方法の開発
- ・ 中間段階細胞から間葉系幹細胞、造血幹細胞への分化誘導方法の開発
- ・ 間葉系幹細胞、造血幹細胞の分化経路の解明
- ・ 間葉系幹細胞、造血幹細胞分化の分子機構の解析とエピゲノム解析

(2)「西中村」グループ

① 研究分担グループ長:西中村 隆一(熊本大学、教授)

② 研究項目

- ・ ES/iPS 細胞から中間中胚葉系細胞への分化誘導方法の開発
- ・ 中間中胚葉系細胞から腎前駆細胞への分化誘導方法の開発
- ・ 腎前駆細胞分化の分子機構の解析とエピゲノム解析

(3)「中尾」グループ

① 研究分担グループ長:中尾 光善(熊本大学、教授)

② 研究項目

- ・ iPS 細胞とその分化誘導における高次エピゲノムの解析
- ・ iPS 細胞とその分化誘導における細胞核構造の解析

§3. 研究実施内容

江良グループ

間葉系幹細胞の中胚葉を経由する分化経路解析では、マウス ES 細胞の分化系で PDGFR・と VEGFR2 (ヒトでは KDR) といった2つの表面マーカーを組み合わせて用いることで、中胚葉系細胞の分離に成功している。21 年度に誘導条件を確立した。その成果を基に 22 年度は、中胚葉系細胞分画を FACS にて分離し、間葉系細胞への分化誘導方法を確立した。この細胞は、血清添加の培地では増殖が難しかったが、増殖因子の添加培地では、一ヶ月以上試験管内にて増殖が維持された。長期に維持された細胞の形態は線維芽細胞様を呈している。

ヒト iPS 細胞の培養では、Rock inhibitor とファイブロネクチン添加下で、シングル細胞で維持

培養、さらにシングル細胞で単層培養による分化誘導が行えるシステムを確立した。

次に、ES 細胞の分化系から新たに、DNA 結合ドメインを持つ転写因子と考えられる機能不明分子を単離した。作製したノックアウトマウス(KO マウス)の初代胎仔線維芽細胞(MEF)の解析から間葉系細胞の増殖を負に制御することが明らかとなった。

間葉系幹細胞の起源と幹細胞特異的に分子の機能を解析するために、間葉系幹細胞のマーカ遺伝子に Cre リコンビネース遺伝子を組み込んだコンストラクトを作製し、現在ノックイン ES 細胞を樹立中である。さらに、どの中胚葉分画が間葉系幹細胞の起源であるかを調べるために、沿軸中胚葉マーカ遺伝子への Cre リコンビネーゼを挿入したノックインコンストラクトを作製し、マウス ES 細胞に導入中である。一方、ヒト iPS 細胞では、神経上皮分化経路を研究するために、神経上皮細胞のマーカの遺伝子座に GFP のレポーター遺伝子を導入したコンストラクトを作製したので現在 iPS 細胞へ導入中である。

血液細胞分化の研究では、多能性幹細胞から造血幹細胞を誘導する方法を開発するために、マウス ES 細胞から試験管内で分化誘導した前駆細胞の骨髄造血再建能を検討した。ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞および CD41 陽性細胞を種々の条件下でそれぞれ無血清培養し、得られた血液細胞集団をコンペティター細胞とともに放射線照射マウスに移植した。移植後 16 週以上を経たマウスの解析により、血管内皮細胞および CD41 陽性細胞の両群において、T リンパ球系列と骨髄球系列の長期にわたるドナーの寄与を認めた。血管内皮細胞に由来する一例では短期間の二次移植が可能であった。ES 細胞から一定の自己複製能を有する血液前駆細胞を誘導できることが確かめられた。

造血幹細胞の発生分化を追跡するために、造血幹細胞と血液前駆細胞で特異的に発現する転写因子を EGFP キメラタンパクとして検出するノックイン ES 細胞およびノックインマウスを作製した。FACS 解析により成獣骨髄の c-Kit(hi) Sca-1(+)細胞が EGFP 陽性となることを確認した。ES 細胞の試験管内分化系において造血幹細胞の発生をモニターできるか今後検討を続ける。

西中村グループ

腎臓は間葉と尿管芽との相互作用から形成され、前者において転写因子 Sall1 を高発現する分画には糸球体や尿細管に分化する多能性ネフロン前駆細胞が存在する。一方、尿管芽は集合管と尿管に分化し、腎臓と膀胱が接続される。この間葉と尿管芽という2つの細胞群は、中間中胚葉から発生するため、iPS 細胞等から中間中胚葉を誘導することは腎臓再生への第一歩となる。そこで、中間中胚葉で発現する転写因子の遺伝子座に蛍光蛋白 GFP を挿入した ES 細胞を樹立し、中間中胚葉の誘導条件を検討した。いくつかの培養条件で、GFP 陽性細胞が誘導されたが、生体内の中間中胚葉における遺伝子発現と機能的アッセイがない現状では、ES 細胞から誘導されたものが中間中胚葉であるかを判定することは困難である。そこで上記 ES 細胞から作製したマウスの中間中胚葉を採取し、遺伝子発現及び機能を調べた。前者はマイクロアレイで、後者は独自に開発した腎前駆細胞コロニー形成法を用いて、予備的結果を得ている。今後、これらと ES 細胞から誘導された細胞との異同を検討する計画である。

中尾グループ

iPS 細胞の核構造を定量的に評価するために、ヒト由来の iPS 細胞 (201B7)、線維芽細胞 IMR90、癌細胞 HeLa について、ハイスループット・イメージ解析 (オリンパス社 Celaview RS100) を実施した。iPS 細胞の核認識を容易にするために、フィーダー細胞を用いた通常培養条件 (Repro Stem (ReproCELL) と bFGF)、fibronectin と ROCK 阻害剤 (Y-27632) を用いた単一細胞培養条件を検討した。後者では、前者と同様に Oct3/4 や Nanog 等のマーカー遺伝子の発現は維持されていたが、本解析には通常培養条件でコロニー形成する iPS 細胞を用いた。核構造体やクロマチン因子を認識する多数の特異抗体を用いて解析し、幾つかの要素が iPS 細胞を特徴づけることが分かった (特許出願の準備中)。この要素の定量解析を用いた iPS 細胞の同定法を検討している。

高次エピゲノム解析について、iPS 細胞と IMR90 を用いて、クロマチン境界を形成するインスレーター結合因子 CTCF の集積ゲノム部位を ChIP-Chip 解析で同定し、合わせてヒストンの翻訳後修飾等を解析した。癌化と iPS 化に対するバリアーとして働く p15/p16/ARF 遺伝子領域の高次エピゲノムを検討した。iPS 化の過程は、アポトーシスや細胞老化で抑制されると考えられるが、CDK 阻害因子 p15/p16/ARF が関わることが報告されている。iPS 細胞を特徴づける p15/p16/ARF 遺伝子群の発現様式と高次エピゲノム構造が示唆されたことから、詳細な解析および iPS 細胞の同定法の開発を進めている。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数 (国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数 (国内 0 件)