

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

人工的な細胞のリプログラミングではなく、生体内で実際に生じる生理的な細胞のリプログラミング過程を明確にその分子機序を解明することで、この方法を増強させて組織を再生する方法を模索することを研究のねらいとする。これまで我々は造血幹細胞が組織内で他の細胞に幹細胞性を誘導しうることを見だし、また脂肪組織の細胞液性成分が骨髄細胞を心筋細胞に分化させること、さらには成体の末梢血管のすでに成熟した血管内皮細胞の中から、新たに血管内皮細胞の幹細胞化した細胞が発生することを見いだしてきた。そして、幹細胞性の細胞増殖に酵母では DNA 複製因子として知られている GINS 複合体のなかでも PSF1 が、幹細胞の休眠状態と自己複製状態を mRNA の発現様式を異ならせて制御していることを見いだしてきた。以上の研究に関して本年度、昨年度に引き続き造血幹細胞による他細胞の幹細胞化につき、造血幹細胞に由来する microvesicle に注目して解析を行ったが、microvesicle による細胞の幹細胞化を確認することはできなかった。今後、膜融合やナノチューブに着目して解析を継続する。また、成熟した血管内皮細胞が血管内皮幹細胞へリプログラミングする過程を解析するために、肝障害モデルを用いた肝臓への内皮細胞移植による長期血管再構築モデルを開発した。今後このモデルを用いて、血管幹細胞へのリプログラミングについて、血管幹細胞で発現が亢進することを見いだした複数の遺伝子の発現の追跡により検討していく。また、PSF1 の1st イントロンを含む上流5Kb において十分に PSF1 プロモーター活性があることが確認され、特に E2F 結合領域が PSF1 のプロモーター活性を左右することが判明した。今後 E2F ファミリーのどれが実際に結合するのかを解明し、休眠中の幹細胞と自己複製中の幹細胞での E2F 結合領域のゲノム動態を解析する。

§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

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

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] 放射線(1000 cGy)照射した loxP-CAT-loxP-EGFP トランスジェニックマウス(8 週齢)に、CAG-Cre トランスジェニックマウスより調製した骨髄細胞(2×10^6 cells/mouse)を静注し、骨髄キメラマウスを作製した。骨髄移植 7 週間後に、Doxorubicin (Adriacin® in saline; 15 mg/kg B.W.)を腹腔内単回投与し、急性ドキシソルビシン心筋症を誘導した。ドキシソルビシン投与 4 週間後のマウス心臓より凍結切片(10 μ m; 30 sections/heart)を作製し、EGFP 陽性細胞(骨髄細胞融合細胞)の有無を調べた。／ドキシソルビシン投与により、心筋層は菲薄化しており、心筋障害モデルそのものは成功していることが判明した。一方、心筋障害部位に骨髄から造血幹細胞あるいは血液細胞が侵入し、心筋細胞と細胞融合を生じれば、Cre-LoxP システムが働き、心筋細胞は EGFP 陽性となるはずである。しかし、今回検索した限りでは心組織内に EGFP 陽性細胞は認められなかった。／骨髄細胞と心筋細胞の融合様現象が今回の解析では認められなかったことから、本方法により融合現象を解析することは困難と判断した。以前より、造血幹細胞と心筋細胞の融合そのものは頻度が低いことが示されてきており、異なる方法での造血幹細胞の体細胞(今回は心筋細胞)の幹細胞化あるいは前駆細胞化の解析が必要であると考えられた。

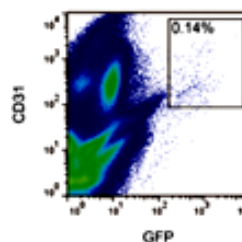
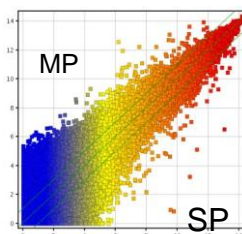
[方法／結果／考察 2] 野生型マウスの骨髄を CAG-Cre マウス由来造血幹細胞で再構築させ、本マウスにがん細胞株を移植後、担がんマウスの腫瘍内、末梢血、および骨髄から造血幹細胞をファクスにて分画採集し、試験管内にて24時間培養を行う。この培養上清から超遠心法により microvesicle を回収する。この microvesicle を試験管内で培養中の Flox-EGFP を発現させたがん細胞に添加し、EGFP 陽性のがん細胞が発生するかを解析する。／造血幹細胞から得られた microvesicle に Cre 遺伝子が含まれていることが確認できたが、この microvesicle をリポフェクトアミン法およびセンダイウイルスを用いた方法にて導入を試みたが、EGFP を発現するがん細胞が得られなかった。／microvesicle 中には Cre 遺伝子が含まれていることから、これが蛋白とし

て翻訳されていれば、がん細胞は EGFP 陽性になることが予想されたが、その発現には至らなかった。Vesicle が導入されても、vesicle の細胞内での溶解ができていないか、導入される Cre 遺伝子の mRNA に問題がある可能性がある。今後、この機序を突き止めるのは困難であり、他の方法で、実際に造血幹細胞と融合したがん細胞のがん幹細胞化ががん組織の悪性化に関与するかの他の方法による解析が必要である。

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] 平成21年度の解析により、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) 内に存在することを解明し得た。これらの細胞を用いて、main population (MP) と発現遺伝子がどのように異なるのかをマイクロアレイを用いて解析する。また昨年度の解析において、SP 細胞は胎児期においては存在しておらず、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から、出生後成熟した血管内皮細胞が何らかのリプログラミングをうけて幹細胞性の増殖能を獲得すると予想された。そこで、出生後のマウスの MP 細胞が SP 細胞になり得るのかを、これまで造血幹細胞の長期骨髄再建能を解析するようなモデルを血管内皮細胞で構築する。／マイクロアレイの解析結果(図)、SP 細胞では Paccin1, CDCa8, E-selectin, Glycam1 の発現が極めて亢進しており、PCR 解析でも確認された。これらの分子の抗体染色は解析中であるが、Glycam1 の ISH により末梢血管の一部に染色されることが確認された。また、MP 細胞から SP 細胞へのリプログラミングが生じ得るかどうかの確認のために、MP 細胞を用いた長期血管再構築のモデルマウスの作成を行った。8 週齢の C57BL/6 マウスに、肝臓内皮細胞障害を誘発する薬剤として知られる Monocrotaline を腹腔内投与し Recipient とする。このマウスに CAG-EGFP マウスの肝臓から単離した血管内皮細胞を移植して、障害を受けたマウス肝臓に生着するか否かを解析した。4週間後の肝臓の解析において、全血管内皮細胞中 0.14% が移植した内皮細胞に置き換わっていることが判明した(図)。／マイクロアレイで抽出した分子を用いて、SP 細胞の局在解析を継続するが、末梢血管に存在する血管内皮細胞の幹細胞システムとして論文を投稿する予定である。また、樹立した長期血管再構築モデルを用いて、MP から SP へのリプログラミングが生じるかを解析して、その分子機序を探索する。



[方法／結果／考察 2] PSF1 の翻訳開始点から5Kb 上流のプロモーター領域を単離し、転写因子の結合情報をもとに、プロモーター領域の部分切断により、どの領域が PSF1 プロモーター活

性に影響を及ぼすかを解析する。／5Kb 上流のプロモーター領域のみでプロモーター活性があることが Luc を用いた解析で判明した。そこで、5Kb 上流の転写因子結合領域のなかで、幹細胞の増殖と関与することが示唆されてきている E2F の結合領域に注目し、PSF1 の 1st イントロン +18 位、と-4551 に存在する E2F 結合領域をスプライシングさせたプロモーターを作成したところ、+18 位の領域がきわめて必須であることが判明した。／PSF1 プロモーター活性の必須領域が判明したことから、PSF1 遺伝子発現の抑制されている休眠期の細胞で、この領域がいかに制御を受けているのか、DNA 動態を解析する。

§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 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)