

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. 研究実施体制

(1)「江良」グループ

① 研究代表者: 江良 択実(熊本大学、教授)

② 研究項目

- ・ 間葉系幹細胞、造血幹細胞、腎前駆細胞へ分化すると考えられる中間段階細胞として中胚葉系細胞の誘導しそれぞれの幹細胞、前駆細胞の分離・同定
- ・ 間葉系細胞の分化・増殖の分子機構の解明
- ・ 可視化レポーター遺伝子をマーカー遺伝子座に導入した ES/iPS 細胞の樹立と可視化細胞の誘導条件の確立

(2)「西中村」グループ

① 主たる共同研究者: 西中村 隆一(熊本大学、教授)

② 研究項目

- ・ iPS 細胞から中間中胚葉への誘導法の開発
- ・ 生体内の中間中胚葉及び腎臓前駆細胞における遺伝子発現解析

(3)「中尾」グループ

① 主たる共同研究者: 中尾 光善(熊本大学、教授)

② 研究項目

- ・ iPS 細胞における細胞核構造とコロニー形態の解析
- ・ iPS 細胞における標的遺伝子座のクロマチンの解析
- ・ iPS 細胞とその分化誘導における解析条件の検討

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

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、昨年度までに、間葉系細胞への分化誘導方法を確立した。平成23年度はこの間葉系細胞について間葉系幹細胞としての自己複製能をコロニー法(CFU-F)にて検討した。間葉系幹細胞の3つの重要な子孫細胞である脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能力(多分化能)についても検討した。分離した細胞は CFU-F を形成する能力を持ち、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞への分化能を持つ間葉系幹細胞であることが明らかとなった。一方、ヒト iPS 細胞での分化誘導方法では、上述の中胚葉細胞の分化経路に加えて、神経上皮由来の間葉系幹細胞についても分化誘導の条件検討を進めている。

平成22年度までに ES 細胞の分化系から新たに単離した分子のノックアウトマウス(KO マウス)を作成した。このマウスは出生後すぐに呼吸不全にて死亡した。その原因は、肺間質細胞増加による肺胞壁の肥厚によると考えられる。さらなる解析の結果、KO 初代胎仔線維芽細胞(MEF)は正常に比べて増殖スピードが速く、受容体の発現が高いことが明らかとなった。この受容体発現の増加が、シグナル反応性の増加をもたらし、KO の線維芽細胞の増殖優位性につながったことを論証した。さらにプロモーター解析から発現を負に制御する転写因子であることが明らかとなった。KO マウスの表現形は肺で起こる間質性肺炎や線維症に極めて類似する。研究結果は、1)受容体シグナルが線維症に関与していること、2)そのシグナルが間質組織の増殖を促進することを示唆する。

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に CreERT2 リコンビナーゼ遺伝子を導入したマウスを作成した。このマウスではタモキシフェンを投与することで、外からリコンビナーゼ活性をコントロールすることができる。したがって、LoxP 配列を用いて遺伝子を KO する時期をコントロールすることができる。現在、解析候補分子の方もすでにマウス作製が終了しこのマウスと交配中である。

多能性幹細胞から造血幹細胞への分化誘導法を確立するために、23年度は OP9 細胞との共培養や胚様体形成を介さずに ES 細胞から試験管内で造血幹細胞を誘導することを試みた。ES 細胞由来の Flk-1 陽性中胚葉細胞から無血清単層培養により分化誘導した血液(幹)細胞を、放射線照射した同系成獣マウスに competitor 細胞と共に移植した。その結果、キメジムは低いものの3ヶ月以上の生着例を再現性よく観察し、少なくとも T リンパ球系列と顆粒球系列において ES 細胞由来の血球を検出した。また、上記の培養過程で造血幹細胞を生成する前駆細胞の表現型が経時的に変化することを観察しており、胎児における実際の pre-HSC の発生過程を試験管内で再現するものと考えられた。24年度は、この培養系の全行程を無血清化してさらに改良するとともに、造血幹細胞を生成する前駆細胞の精密な同定と、その分化過程に必要なシグナル分子の解析を行う。

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。コロニー形成能をもつネフロン前駆細胞は、E11.5 以降しか同定されていなかったが、E9.5 の *Osr1*-GFP 陽性分画に既に存在することを見いだした。一方、E8.5 でも *Osr1*-GFP を発現しているが、コロニー形成能はなく、E8.5 から 9.5 が、腎臓分化の最初のステップであることが示唆された。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

ヒト iPS 細胞(標準株 201B7 と 253G1、4 因子発現センダイウイルスで誘導した新規株)、乳腺上皮細胞、線維芽細胞、HeLa 頸癌細胞について、イメージ解析(オリンパス社 Celaview)を実施した。iPS 細胞は、フィーダー細胞を用いた通常培養条件を用いて、Oct3/4 や Nanog 等の発現および浮遊培養下の3胚葉分化能を確認した。核構造体やクロマチン因子を認識する特異抗体を用いて解析し、幾つかの要素で iPS 細胞を識別できることが判明した(2011 年特許出願)。さらに、イメージ分類ソフトウェアを用いて、iPS 細胞が形成するコロニー形態の分類を試みた。iPS 細胞と non-iPS 細胞について区別可能であり、形態学的な特徴に基づいた系統樹を作成できた(論文準備中)。

また、ChIP 解析を用いて、クロマチン因子 CTCF の集積ゲノム部位、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 CDK 阻害因子 p15/ARF/p16 遺伝子座の高次クロマチン構造を検討した。iPS 化の過程は、細胞老化で抑制されると考えられるが、同遺伝子座が関わるものが既に報告されている。iPS 細胞では、p15/p16/ARF 遺伝子群は強く発現抑制されており、一方、CTCF は高発現していた。染色体コンフォーメーションキャプチャー(3C)法等を用いた解析で、iPS 細胞は CTCF を介した緩いクロマチンループ形成と H3K4/K27 の両価性のメチル基修飾で特徴づけられた²⁾。このように、詳細なエピゲノム解析および iPS 細胞の同定法の開発を進めている。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T, and Yamada Y. “Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis.”, *Development*. 139(4): 667-677, 2012 (DOI: 10.1242/dev.072272).
2. Hirose A, Ishihara K, Tokunaga K, Watanabe T, Saitoh N, Chandra T, Narita M, Shinohara M, and Nakao M. “Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells.”, *Aging Cell* (in press). (DOI:10.1111/j.1474-9726.2012.00809.x.)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)