

「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

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

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の誘導条件の確立とこれらの中間段階細胞を可視化することで分離・同定を行う。また、ヒト iPS 細胞での維持培養の確立と分化誘導についてもそのシステムを整備する。

ES/iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化について、神経上皮細胞経路とそれ以外の経路について解析する。これら中間段階細胞と考えられる中胚葉系列の細胞を可視化するコンストラクトの作製を行った。コンストラクトの作製は現在も継続中である。また、マウス ES 細胞から中胚葉系細胞の分化誘導系を確立するために、すでに報告したマーカーである VEGFR2 と PDGFR α について無血清下での誘導方法を検討している。血清下での分化誘導条件はおおむね確立したので、現在これらの中胚葉細胞から間葉系幹細胞誘導を行っている。造血幹細胞と腎臓前駆細胞においてもマーカー分子の発現を指標に中間段階細胞の同定、分離を継続中である。今後は、マーカーを可視化した ES 細胞と iPS 細胞を樹立し、その分化誘導方法の確立や遺伝子発現解析を引き続き行ない、その後組織幹細胞誘導へ発展させる。一方、分化過程でのエピゲノム解析では、ES/iPS 細胞の分化誘導法の進行状況と協働しつつ、ヒト iPS 細胞における高次エピゲノムと細胞核構造の解析を実施中である。今後はクロマチン結合タンパク質等の網羅的エピゲノム解析 (ChIP-Chip または ChIP-Seq)、細胞核内構造体のイメージング解析を予定する。

§ 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では、マウス ES 細胞の分化系で PDGFR α 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。この知見を基に無血清培地での誘導条件の検討を行った。ヒト iPS 細胞でもこの2つのマーカーの染色パターンに同様の結果が導き出されるか検討中である。また、マウス ES 細胞の分化を誘導後、PDGFR α シングル陽性の中胚葉系細胞を FACS にて分離し、間葉系幹細胞への分化誘導方法を開発中である。

一方、神経上皮細胞から間葉系幹細胞の誘導では、神経上皮のマーカーである Sox1 遺伝子座に Green Fluorescence Protein (GFP)遺伝子を Knock-in 法にて導入したマウス ES 細胞を用いて、レチノイン酸添加下での単層あるいは細胞塊培養方法での GFP 陽性細胞誘導条件を検討した。

間葉系幹細胞の中胚葉分化経路を解明するために、中胚葉系特異的なマーカーを可視化した ES 細胞の作成も進めている。マウス ES 細胞を用いて GFP 陽性細胞の試験管内分化誘導を継

続中である。この ES 細胞を用いて作製したマウス胚(E7.5)での GFP の発現パターンを調べている。また、ES 細胞由来の中胚葉系細胞をさらに細かく分けるために特定の遺伝子座に他の可視化マーカーを導入するコンストラクトの作製を行っており、完成の一步手前に到達している。一方、ヒト iPS 細胞では、間葉系幹細胞を研究するために、ある遺伝子座に 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中である。

血液細胞分化の研究では、CBA/B6 F1 マウス由来 ES 細胞 KTPU8 を試験管内で分化誘導し、血管内皮細胞を経て分化した血液前駆細胞の骨髓造血再建能を評価する実験系を確立した。レシピエントには放射線照射された CBA/B6 F1 マウスを用い、Ly5.1 と Ly5.2 の発現パターンによりドナー由来血液細胞を検出することができる。KTPU8 から分化誘導した血管内皮細胞を一定の条件下で無血清培養し、得られた血液細胞集団をコンペティター細胞とともにレシピエントマウスに移植したところ、16 週後の末梢リンパ球およびマクロファージ・顆粒球中に低頻度ながらドナー由来細胞を検出した。さらにキメリズムを上昇させるために培養条件の検討を続けている。

造血幹細胞は胎性期において背側大動脈の腹側内皮細胞から発生すると考えられている。一方、ES 細胞から誘導される内皮細胞は、未分化内皮細胞もしくは静脈内皮細胞としての形質を示し、造血能は有するが造血幹細胞への分化効率はきわめて低い。ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞を動脈化することによる造血能への影響について検討するために、KTPU8 から誘導した側板中胚葉細胞を VEGF と cAMP の存在下で培養し血管内皮細胞へ分化誘導した。内皮細胞の動脈化は CXCR4 の発現上昇により確認されたが、逆に造血能は著しく減少した。内皮細胞を単に動脈化するだけでなく、さらに腹側化するためのシグナルについて検討を続けている。

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。しかし、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 GFP 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。またヒト iPS 細胞も、同様の手法で誘導条件を探索する予定である。

中尾グループ

iPS 細胞、そして江良・西中村グループが同細胞から誘導する組織幹細胞や分化細胞を用いて、高次エピゲノムの状態、細胞核構造の動的な特徴を明らかにし、プログラミング機構の実体を解析する。これらの知見から、iPS 細胞、その分化細胞の特徴についてモデル化し、iPS 細胞分化の分

子基盤を提示することを目指している。マウス胎児性線維芽細胞をフィーダー細胞として、既に樹立されたヒトiPS細胞を培養し、細胞形態、DNA染色(Hoechst33342)、各種の核構造因子等の蛍光イメージングを行った。その細胞形態の計測・定量化のための解析技術について、別途に整備した(特願 2009-223587、細胞核を構成する構造体の解析方法、及び細胞核の形態の解析方法)。また、iPS誘導した細胞群の中で、未分化性を有するコロニーと未分化性を有さないコロニーについてイメージ画像を蓄積してライブラリー化し、さらに各種の核内構造等の計測・定量化を組み合わせ、iPS細胞およびコロニーの判別を可能にする予定である。今後、高次エピゲノム解析に関して、iPS細胞およびその分化過程で動的に変化する遺伝子領域の解析を行う予定である。