

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. 研究実施体制

(1) 「高倉」グループ

① 研究代表者: 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

§ 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)

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

がん細胞が骨髄造血幹細胞との細胞融合様現象でがん幹細胞化する発見に立脚し、また近年各臓器における骨髄細胞と組織細胞の細胞融合様現象による組織の再構築の可能性が示唆されてきており、成熟細胞の幹細胞へのリプログラミングが正常細胞で生じる現象かどうかを解析し、もし生じるならばその分子機序を明確にすることを研究の目的とした。

そこで、障害心筋細胞と心筋障害を与えたマウスの骨髄から回収した造血幹細胞(活性型)との細胞融合様現象について、単純な共培養およびセンダイウイルスを用いた強制的細胞融合により、心筋細胞が心筋幹細胞様細胞へと変化する可能性について解析したが、今回心筋細胞の幹細胞化の誘導は観察できなかった。

内皮幹細胞化誘導に関する解析をあわせて行っているが、公表は控える。一方、既存血管において血管内皮細胞の幹細胞様細胞が存在することについては論文報告した¹⁾。また網膜の血管新生の終了過程において、内皮細胞に作用する apelin による機能が、アストロサイトの成熟化を介して生じることを解明して報告した²⁾。また、血管形成に関する研究成果として、血管成熟におけ

る APJ/apelin の機能³⁾ および血管新生開始における microRNA125b⁴⁾ に関する報告を行った。

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

従来の研究成果により、DNA 複製および染色体均等分配に関わることを示してきた GINS 複合体構成 4 分子(SLD5, PSF1, 2,3)の中でも、SLD5, PSF1 が、急速な幹細胞の増殖に非常に重要な役割を果たすことを明確にしてきた。PSF1 や SLD5 の発現制御は、持続的に細胞増殖を誘導する上で有用である。iPS 細胞化が試験管内で誘導される際に、p53 欠損など細胞増殖がリプログラミングに必要とされるように、生体内で成熟した細胞が幹細胞化する際にも、PSF1 や SLD5 の発現が誘導されて、増殖活性を再度持ち得た細胞が、幹細胞化するのではないかと考えら得る。そこで、本研究項目では、PSF1 の発現制御機構を明らかにして、PSF1 発現誘導によるリプログラミング化効率の改善をめざす。

昨年度までの解析により、PSF1 の 1st イントロンの E2F 結合領域が、PSF1 のプロモーター活性に極めて影響を与えることが判明した。そこで、E2F ファミリーのどの転写因子が重要であるのかを、PSF1 の高発現細胞株である NIH3T3 細胞においてノックダウンを行った。しかし、予想通り、一つの E2F ファミリー分子をノックダウンしても他のファミリー分子が相補的に働いた可能性が高く、ひとつの遺伝子のノックダウンでは PSF1 プロモーター活性には影響を及ぼさなかった。また、PSF1 遺伝子プロモーター領域のゲノム動態の解析について以下のように研究を遂行した。以前の経験上、PSF1 を過剰に発現させると細胞死が誘導されることを見いだしていたことからヒントを得、PSF1 遺伝子を過剰発現させることによっても、生存する細胞では内因性の PSF1 の発現が抑制されている可能性があると考え、PSF1-Flag 遺伝子導入を行った。すると、予想通り生存する細胞では、PSF1-Flag は発現するものの、内因性の PSF1 の発現が抑制されていた。本細胞を用いれば内因性の PSF1 の負の制御機構が明らかになることが判明し、来年度の研究課題とした。

研究項目Ⅲ. GINS 抑制因子による iPS 細胞の細胞死誘導

iPS 細胞の細胞死を誘導する化合物の開発は、iPS 細胞を用いた再生医療の実現化を加速させると考えられる。従来より、ES 細胞増殖に必須の PSF1, SLD5 をターゲットにしたこれら分子の阻害剤を開発し、今後 iPS 細胞が臨床応用される際の予防的治療薬として貢献することを目的に研究を行ってきた。そのなかで、PSF1-SLD5 の結合を抑制する化合物を天然物ライブラリーから抽出し、PSF1-SLD5 結合抑制活性を有する 18 個のアミノ酸から構成されるペプチドを単離した。この活性化ドメインを解析し、最終的に 6 個のアミノ酸まで絞り込んだ。これらのペプチドを用いて ES 細胞の増殖に対する効果を判定したところ、50 μ M 程度の高濃度でようやく細胞死の誘導能が観察された。6 個のアミノ酸によるペプチドにおいて、さらにどのような構造が PSF1-SLD5 の結合ポケットに入り込んでいるのか、そして、50 μ M という高濃度による作用点を nM レベルまで引き下げることができるかが重要なポイントであるが、本 CREST のミッションとやや離れた研究項目であることもあり、本研究項目は平成23年度をもって終了とした。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J.*, 31, 842-855, 2011
(DOI: 10.1038/emboj.2011.465)
2. Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Goda N, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. *Development* (in press) (DOI: 10.1242/dev.072330)
3. Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* (in press) (DOI: 10.1038/onc.2011.489)
4. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Sakimoto S, Takakura N. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene* (in press) (DOI: 10.1038/onc.2012.68)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)