

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

- ・ES/iPS 細胞から誘導した中間段階細胞からの間葉系幹細胞と造血幹細胞への分化誘導方法の開発と分化経路の解明
- ・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 (GFP 等) をマーカー遺伝子座に導入した ES/iPS 細胞の解析

### (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

- ・中腎及び後腎のネフロン前駆細胞の系譜解析
- ・マウス中間中胚葉段階から腎臓系譜への分化誘導
- ・マウス ES 細胞及びヒト iPS 細胞の誘導

### (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 細胞における標的遺伝子座の高次エピゲノムの解析
- ・iPS 細胞における細胞核構造の解析
- ・iPS 細胞とその分化誘導における解析

## § 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、平成 23 年度までにマウス ES 細胞由来の分画から間葉系幹細胞への分化誘導方法を確立した。得られた間葉系幹細胞は 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ことを明らかとした。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た。昨年度までに間葉系幹細胞の前駆細胞である細胞を誘導することに成功した。平成24年度は、これらの細胞の詳細な誘導条件検討とコロニー形成能(CFU-F)と多分化能について解析を進めた。一方、神経上皮様細胞由来と考えられる細胞のヒト iPS 細胞からの誘導条件を詳細に検討した。

一方、新たに単離した Phf14 分子のノックアウトマウス(KO マウス)を作成し、この分子の欠損が、1) 間質組織の増殖を促進すること、2) PDGF 受容体の発現を介して肺線維症に関与していることを明らかとした<sup>1)</sup>。

間葉系幹細胞の起源についての研究では、マウス発生時期においてそれぞれのステージでマウス胎仔について間葉系幹細胞の頻度を調べた。

ES 細胞・iPS 細胞から造血幹細胞を誘導するためには、造血幹細胞の発生それ自体の再現に加えて、発生した造血幹細胞の増幅とコンディショニングが骨髄造血再建の達成にとって重要である。平成 23 年度までに、転写因子の生細胞における発現量をタンパクレベルでモニターできる ES 細胞およびマウスを作製した。平成 24 年度は、このマウスの骨髄造血幹細胞を解析した。造血幹細胞の細胞周期調節機構を解析するツールとして、造血幹細胞の誘導法開発において有用な知見を与えると考えられる。

### 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経由してネフロン前駆細胞を誘導することは腎臓再生への第一歩となる。そこで、中間中胚葉とネフロン前駆細胞で発現する転写因子 Osr1 の遺伝子座に蛍光蛋白 GFP を挿入した ES 細胞及びマウスを樹立した。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のを見いだした。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。しかし上述の E9.5 におけるコロニー形成細胞は、マーカーからみて中腎前駆細胞と考えられたため、さらに各発生段階の中間中胚葉の遺伝子発現解析を行った。この情報を用いて、中間中胚葉からネフロン前駆細胞

胞への誘導条件を検討した。

### 中尾 グループ

ヒト iPS 細胞 (4 因子発現センダイウイルスで誘導した新規株、標準株の 201B7 と 253G1)、乳腺上皮細胞、線維芽細胞、HeLa 癌細胞について、詳細なイメージング解析を実施した。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。第一に、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行った。完全な iPS 細胞、不完全にリプログラムされた non-iPS 細胞 (Nanog 等の内因性発現なく、3 胚葉分化能を欠く) を検討し、iPS 細胞と non-iPS 細胞のコロニー形態は ~90% の正確度で区別可能であり、形態特徴に基づいた系統樹を作成した (論文投稿中)。第二に、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)。この方法を用いて、とくに、iPS 細胞に特徴的な PML ボディーの形成を認めた。

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 細胞では、p15/p16/ARF 遺伝子群は強く発現抑制されて、その一方、CTCF は極めて高発現していた。染色体コンフォーメーションキャプチャー (3C) 法等を用いて、iPS 細胞では、正常細胞と比較して、CTCF 結合部位の間の相互作用は低く、同遺伝子座は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。iPS 細胞のコロニー形態、核内構造、高次クロマチン構造が明らかになり、iPS 細胞の同定につながる成果を得た。

## §3. 成果発表等

### (3-1) 原著論文発表

1. Kitagawa M, Takabe A, Ono Y, Imai T, Nakao K, Nishikawa SI and Era T. “Phf14, a Novel Regulator of Mesenchyme Growth via Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Receptor- $\alpha$ .”, *J. Biol. Chem.* **287**(33): 27983-96, 2012. (DOI: 10.1074/jbc.M112.350074)
2. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hohjoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N and Era T. “Pathogenic mutation of ALK2 inhibits iPS cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification.”, *Stem Cells*, **30**(11):2437-49, 2012. (DOI:10.1002/stem.1221)
3. 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*, **11**(3), 553-555, 2012. (DOI:10.1111/j.1474-9726.2012.00809.x.)

4. Usui J, Kobayashi K, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R and Nakauchi H. “Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation.” *Am. J. Pathol.* **80**(6): 2417-2426, 2012. (DOI:10.1016/j.ajpath.2012.03.007)

**(3-2) 知財出願**

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)