

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

§ 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

人工的な遺伝子導入による細胞のリプログラミング現象による細胞の幹細胞化の誘導は、再生医療などの治療において非常に有用視されている技術である。一方、このようにして誘導された細胞を用いた再生医療においては腫瘍化などの懸念が払拭されていないことも現実である。当研究では、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生理的に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て研究を遂行している。

これまで既存の血管の中にその細胞だけで血管構築が可能な血管内皮幹細胞の存在を明らかにした。今年度、この内皮幹細胞の自己複製能について言及し、モノクローリンを用いた肝障害モデルを用いて、内皮幹細胞が自己複製しうることを解明した。また一個の内皮幹細胞を移植して、長期に肝臓内で血管構築に参画しうる様子をとりとらえることに成功した。またこの内皮幹細胞の発生として既に血管内皮細胞に分化決定してから内皮幹細胞が発生する可能性について解析を行ってきた。ある特定の臓器において、内皮細胞が内皮幹細胞化する現象をとらえられ、この現象に

かかわる機序が判明しつつあるが、具体的内容の公表は控える。本研究費を用いて血管形成に関わる分子機序の解析を行い、網膜の血管新生の終了過程が、内皮細胞に作用する **apelin** により、アストロサイトの成熟化を間接的に誘導することによって生じることを解明して報告した¹⁾。また、血管新生開始時の **VE-Cadherin** 発現抑制における **microRNA125b**²⁾に関する報告を行った。さらに血管周囲のストロマ細胞の機能解析とその細胞に発現する **CD44** のモノクローナル抗体の作製について発表し^{3, 4)}、**Galectin-3**がマクロファージの動員を誘導することによる血管新生の亢進効果を明らかにした⁵⁾。またアドレノメジュリンの網膜血管形成促進における機能解析を行った⁶⁾。

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

我々はこれまでは乳類において、種々の臓器の幹細胞レベルで発現の亢進している **PSF1** 遺伝子の機能解析から、この **PSF1** は酵母と同様 **SLD5**, **PSF1,2,3** の4分子で **GINS** 複合体を形成し、DNA 複製に関わることを示し、またノックアウト胚の解析結果、染色体均等分配に関わることを示してきた。さらに **PSF1** は急速な幹細胞の自己複製に必須であることを示してきた。**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** 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れ得る。そこで、**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して研究を遂行してきた。

外来性に **PSF1** を過剰に発現させると内因性の **PSF1** の発現が抑制されることが判明し、**PSF1-Flag** 遺伝子を導入した安定発現細胞株を樹立した。本細胞を用いて、内因性の **PSF1** の負の制御機構を解析した。この細胞では興味深いことに、ヒストン脱アセチル化抑制により、**PSF1** の **short form** の発現が誘導され、**PSF1** を外来性に過剰発現していない親株細胞ではこのような現象は認められなかった。造血幹細胞でも **CD34** 陰性の休眠期の造血幹細胞では **short form** の **PSF1** が観察されることから、幹細胞休眠が **PSF1** の発現制御と関わっていることが示唆された。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 1.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*, **139**: 1327-1335, 2012 (DOI:10.1242/dev.072330)
- 2.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*, **32**(4),414-421, 2013 (DOI:10.1038/onc.2012.68)
- 3.Kinugasa Y, Takakura N. Monoclonal antibody selectively recognizing murine but

not human CD44. *Hybridoma (Larchmt)*, **31**(4):262-6, 2012

(DOI:10.1089/hyb.2012.0021)

4. Matsui T, Kinugasa Y, Tahara H, Kanakura Y, Takakura N. Possible role of mural cell covered mature blood vessels in inducing drug resistance in cancer-initiating cells. *Am J Pathol (in press)*

(DOI:10.1016/j.ajpath.2013.01.019)

5. Jia W, Kidoya H, Yamakawa D, Naito H, and Takakura N. Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. *Am J Pathol (in press)*

(DOI:10.1016/j.ajpath.2013.01.017)

6. Sakimoto S, Kidoya H, Kamei M, Naito N, Yamakawa, Sakaguchi H, akabayashi T, Nishida K, and Takakura N. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. *PLoS One (in press)*

(DOI:10.1371/journal.pone.0058096)

(3-2) 知財出願

① CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)