

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

- ・内皮 MP 細胞と肝臓内細胞との相互作用による内皮 SP 細胞化の誘導
- ・SP 細胞化にかかわる分子機構の解明
- ・SLD5 および PSF1 発現の可視化による体細胞の潜在的幹細胞化および幹細胞化獲得能の解析

§ 2. 研究実施の概要

研究項目 I. 内皮 MP 細胞と肝臓内細胞との相互作用による内皮 SP 細胞化の誘導

既存の血管の内皮細胞の中に、DNA dye を放出して染色されない Side population (SP) 細胞分画が存在し、これらの細胞は、試験管内での血管内皮細胞産生能、個体での長期血管再建能などが極めて高い幹細胞性を有する細胞であった。平成 24 年度までの研究で、肝障害モデルを用いて血管再構築モデルを完成させ、この系においても SP 内皮細胞には幹細胞性があることを解明した。平成 25 年度においては、この SP 細胞の発生に注目して解析し、胎児期から成体までの期間における SP 細胞の全内皮細胞中の割合を解析し得た。また、SP 細胞の発生源を探索し、どのような細胞からこの SP 細胞が発生してくるのかが明らかになった。SP 細胞化が生じるメカニズムを継続して解析していく。本研究と関連して、眼球網膜、脱落膜、脳内に存在する内皮 SP 細胞の存在に関して解析を行ない、加齢黄斑変性症モデルを構築して、内皮 SP 細胞の本疾患に対する関与を解析し報告した。

研究項目 II. SP 細胞化にかかわる分子機構の解明

MP 細胞、SP 細胞という細胞の同定法は、細胞表現型ではなく細胞の状況を観察している点が問題となっており、細胞表面マーカーで内皮幹細胞を同定することにより、幹細胞から分化した細胞の階層性の解析が可能となる。また、幹細胞化 (SP 細胞化) のリプログラミングが生じたことを認識するうえでも、内皮幹細胞を標識しうる細胞表面抗原の同定は必須である。そこで平成 25 年度も引き続き幹細胞特異的遺伝子の単離を実施した。結果としては、SP 細胞で特異的に発現している因子 SPEC1~3 (仮称) を同定した。3 遺伝子はいずれも糖鎖タンパク質であり、一部の未分化な血球細胞や内皮細胞で発現しているとされているが、内皮細胞での詳細な機能は明らかとなっていない。この中の SPEC1、2 を用いて内皮幹細胞を濃縮することに成功した。

研究項目 III. SLD5 および PSF1 発現の可視化による体細胞の潜在的幹細胞化および幹細胞化獲得能の解析

PSF1 と共に GINS 複合体を形成する SLD5 に関しては遺伝子欠損マウスの表現型を論文として発表した。SLD5 ノックアウトマウスは PSF1 ノックアウトマウスと同様に胎生 6.5 日目までに Egg cylinder の形成不全で致死となった。その原因として、内部細胞塊の細胞の増殖が抑制される為であることが判明した。PSF1 ヘテロ欠損マウスでは 5FU の半数致死量でも、造血幹細胞の急速増殖ができずに前マウスが致死となった為、SLD5 ヘテロ欠損でも同様の表現型が予想されたが、実際には SLD5 ヘテロ欠損では PSF1 ヘテロ欠損のような表現型は示さなかった。次に、PSF1 ががん幹細胞で高発現していることから、SLD5 もがん幹細胞の増殖機構に関与することが予想され、SLD5 ヘテロ欠損マウスと胃がん自然発症マウスを交配し、SLD5 の半量欠損が胃がんの発生にどのように影響を与えるかを観察した。その結果、SLD5 ヘテロ欠損マウスでは胃がんの成長遅延が生じることが判明した。以上の結果から、SLD5 は PSF1 と同様に ES 細胞のような未分化な多能性幹細胞の増殖機構には共通して重要な役割を果たすが、造血幹細胞では機能が異なる等、幹細胞の種類によって依存性が異なることが判明した。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. Wakabayashi T, Naito H, Takara K, Kidoya H, Sakimoto S, Oshima Y, Nishida K, Takakura N. Identification of vascular endothelial side population cells in the choroidal vessels and their potential role in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **54**: 6686-6693, 2013 (doi:10.1167/iov.13-12342)
2. Sakimoto S, Kidoya H, Kamei M, Naito N, Yamakawa, Sakaguchi H, Wakabayashi T, Nishida K, and Takakura N. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. *PLOS ONE*, **8**: e58096, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0058096)

3. 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.*, **182**; 1790-1799, 2013 (doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.019)
4. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on CAFs is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells*, **32**; 145-156, 2014 (doi:10.1002/stem.1556)
5. Sato Y, Yashiro M, Takakura N. Heregulin Induces Resistance to Lapatinib-mediated Growth Inhibition of HER2-Amplified Cancer Cells. *Cancer Sci.*, **104**; 1618-1625, 2013 (doi:10.1111/cas.12290)
6. Jia W, Kidoya H, Yamakawa D, Naito H, and Takakura N. Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. *Am. J. Pathol.*, **182**; 1821-1831, 2013 (doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.017)
7. Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes*, **62**; 1970-1980, 2013 (doi:10.2337/db12-0604)
8. Yamakawa D, Kidoya H, Sakimoto S, Jia W, Naito H, Takakura N. Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose Angiopoietin-1. *J. Biol. Chem.*, **288**; 12469-12477, 2013 (doi:10.1074/jbc.M112.433979)
9. Kawahara H, Naito H, Takara K, Wakabayashi T, Kidoya H, Takakura N. Tumor endothelial cell-specific drug delivery system using apelin-conjugated liposomes. *PLOS ONE*, **8**:e65499, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0065499)
10. Takakura N. Regulation of niche molecules for the maintenance of cardiac stem cells. *Circ J.*, **78**:69-70, 2013 (doi:10.1253/circj.CJ-13-1384)
11. Mohri T, Ueno M, Nagahama Y, Gong ZY, Asano M, Oshima H, Oshima M, Fujio Y, Takakura N. Requirement of SLD5 for Early Embryogenesis. *PLOS ONE*, **8**:e78961, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0078961)