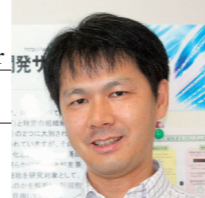


サブチームリーダー Subteam Leader

三好 浩之 (理博)

Hiroyuki MIYOSHI, Ph.D.



細胞運命情報解析技術開発サブチーム

Subteam for Manipulation of Cell Fate

ミッションと事業概要 Mission

幹 細胞は、自己複製能と多分化能を持つ未分化な細胞で、近年、再生医療への応用に大きな期待が寄せられている。当チームでは、特に造血幹細胞と多能性幹細胞を研究対象として、どのようなメカニズムによって幹細胞の未分化性の維持、増殖、分化といった細胞の運命が決定されているのかを解明し、幹細胞の試験管内での人工操作を可能にするような技術開発を目指している。

Stem cells are defined as primitive cells capable of both self-renewal and multi-lineage differentiation. In recent years, stem cells have received much attention for their use in regenerative therapy. We study the molecular mechanisms that regulate stem cell fate and hopes to develop technologies for manipulating stem cells in vitro.

平成21年度の成果

Research and Development in 2009-2010

(1) 造血幹細胞の体外増幅のための技術開発

造血幹細胞の老化のメカニズムを解明することにより、加齢に伴う血液疾患の治療やin vitroでの造血幹細胞増幅技術の開発に繋がると考え、老齢マウスの造血幹細胞を解析した。in vivoでの細胞分裂を調べたところ、若齢マウスと比較して老齢マウスの造血幹細胞は細胞分裂周期が顕著に遅く、加齢に伴い造血幹細胞の数は約2倍に増加するが造血幹細胞の個々の能力は低下していることがわかった。またin vitro培養系では、老齢マウスの造血幹細胞は未分化表現型を維持しながら分裂増殖する傾向があるが、増幅された未分化表現型細胞の幹細胞能力は、若齢マウスのものに比べ大きく低下していることがわかった。老齢マウスでは、造血幹細胞の増殖能力が低下するとともに幹細胞能力の低下した未分化表現型の細胞を多く作り出すような機能変化が生じていることが強く示唆された。

ミトコンドリア病モデルマウスを利用して、血球細胞におけるミトコンドリア呼吸欠損の影響を解析した。その結果、ミトコンドリア呼吸欠損により造血幹細胞の幹細胞能力が低下するが、これは造血幹細胞および前駆細胞の増殖には影響ないものの分化が阻害されることに起因することが示唆された。

(1) Development of methods for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells

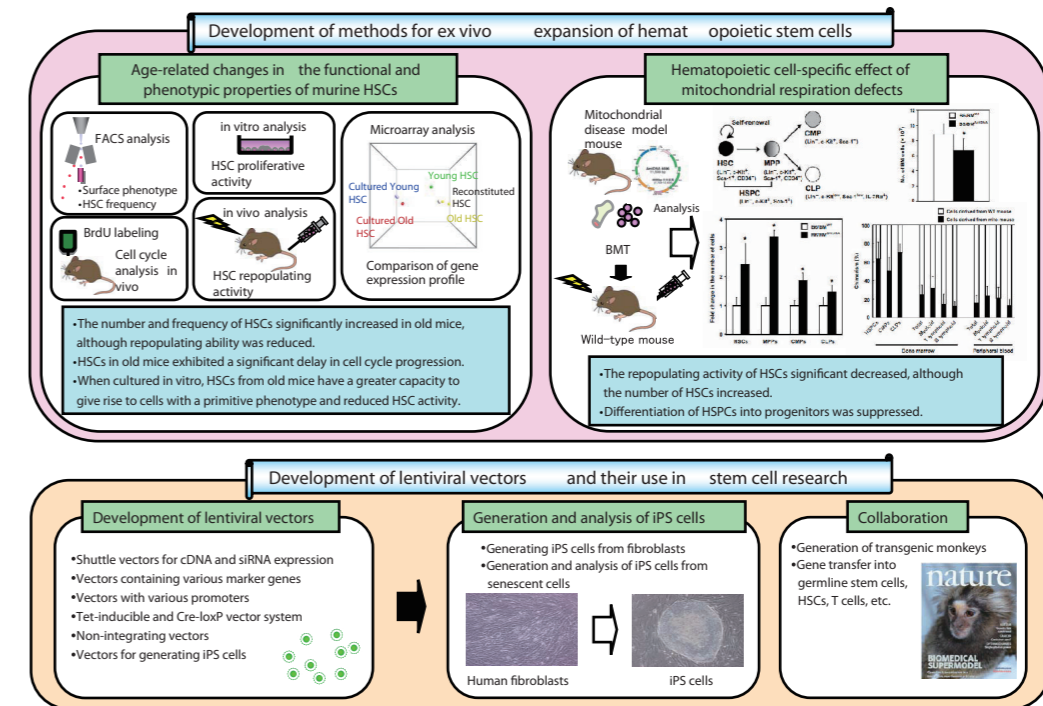
Hematopoietic stem cell (HSC) function is known to decline during replicative stress such as serial transplantation, ex vivo culture with cytokines, or even normal aging. This may

represent a difficulty of ex vivo expansion of HSCs without loss of stem cell activity. Therefore, understanding the mechanisms of HSC aging would provide useful information in achieving ex vivo expansion of HSCs. We investigated age-related changes in the functional and phenotypic properties of murine HSCs. The number and frequency of HSCs significantly increased in old mice, although repopulating ability of HSCs was reduced, which is consistent with other previous studies. HSCs in old mice exhibited a significant delay in cell cycle progression. When cultured in vitro, HSCs from old mice showed a greater capacity to give rise to cells with a primitive cell surface phenotype and reduced HSC activity. These results suggest that the increased number of HSCs in old mice may compensate for the decline in individual HSC activity and thus maintain steady-state hematopoiesis.

To investigate the hematopoietic cell-specific effect of mitochondrial respiration defects, we performed transplantation analysis using a mouse model of mitochondrial disease. The results showed that mitochondrial respiration defects resulted in a significant decrease in the total number and repopulating activity of bone marrow cells, although the number of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) increased. Our findings indicate that mitochondrial respiration defects modulate differentiation but not proliferation of HSPCs.

(2) 細胞老化の分子メカニズムに関する研究

線維芽細胞や造血幹細胞など多くの初代培養細胞には寿命があり、in vitroでの分裂回数は有限で老化する。in vitroで細胞を不変的かつ無限に増幅するための技術開発を行うため、リ



プログラミング技術を利用して細胞老化のメカニズムを明らかにしたいと考えている。現在、老化前後のヒト線維芽細胞とそれらの細胞から作製したiPS細胞の遺伝子発現やエピジェネティックな変化の差異の解析を行っている。

(2) Investigation of the molecular mechanisms underlying cellular senescence

Most mammalian somatic cells have a limited replicative potential and therefore they undergo a terminal growth arrest after a finite number of divisions in culture, a process termed cellular senescence. To establish conditions for stable and infinite expansion of cultured cells, we study the molecular mechanisms underlying cellular senescence using the technology for reprogramming cells. Currently, we generate induced pluripotent stem (iPS) cells from senescent human fibroblasts and characterize global gene expression profiles and epigenetic status.

(3) レンチウイルスベクターの開発と幹細胞研究での利用

細胞への遺伝子導入技術として基礎研究に幅広く利用できるよう、レンチウイルスベクターに様々な改良を行い、国内外の多数の研究者に提供している。今年度は、iPS細胞樹立のための様々なレンチウイルスベクターを作製し、ヒトおよびマウス胎児線維芽細胞等からiPS細胞を樹立した。染色体に組み込まれないレンチウイルスベクターを作製し、一過性にp53遺伝子のshRNAやSV40 large T抗原を発現させることにより、iPS細胞の樹立効率を高めることにも成功した。また、Tet発現調節機構を利用して1つのベクターでcDNA発現のOn、Off調節が可能なベクターを作製し、iPS細胞の樹立にも使用した。

共同研究の中でも特筆すべき成果の1つは、レンチウイルスベ

クターを使用してコモンマーモセットの受精卵にGFP遺伝子を導入することによりトランスジェニックサルを作成し、次世代にわたって導入遺伝子を受け継がせることに霊長類では世界で初めて成功したことである。

(3) Development of lentiviral vectors and their use in stem cell research

We have made many modifications to lentiviral vectors for using basic research and distributed these vectors to more than 350 Japanese and overseas scientists. In recent years, we have constructed several lentiviral vectors for generating iPS cells. Using non-integrating lentiviral vectors for transient expression of SV40 large T antigen or shRNA targeting p53, we were able to significantly increase the efficiency of iPS cell generation. We have also developed an "all-in-one" tetracycline-inducible lentiviral vector system for inducible cDNA expression, and have demonstrated that this vector system can be used to generate iPS cells.

One of the successful results from collaborative work is the generation of transgenic monkeys by injecting a lentiviral vector containing the GFP transgene into embryos of the common marmoset, and the transgene has been passed to the next generation for the first time in the world.