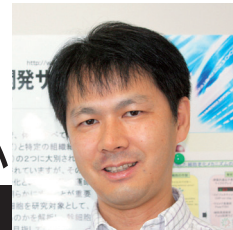


# 細胞運命情報解析技術開発サブチーム

Subteam for Manipulation of Cell Fate



サブチームリーダー 三好 浩之 (理博)  
Hiroyuki MIYOSHI, Ph.D.

## ミッションと事業概要

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、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23年度の成果 Development of Technology in 2011-2012

### (1) 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。分裂増殖が完全に停止した老化ヒト線維芽細胞からiPS細胞の樹立を試みたところ、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4因子のみの導入ではiPS細胞を樹立することはできず、Lin28、SV40 Large Tと2つの化合物の追加により、非常に低い頻度ではあるが樹立することができた。老化細胞由来iPS細胞の増殖や形態は、少なくとも継代数50までの段階では、コントロールiPS細胞と変わらない。現在、老化前後の細胞とそれらの細胞から樹立したiPS細胞の遺伝子発現やDNAメチル化のプロファイリングを行い、比較解析を行っている。

また、日本人の発症頻度が高い遺伝性早老症のウェルナー症候群の患者由来線維芽細胞からも、4因子とp53に対するshRNAを導入することによりiPS細胞を樹立することができた。iPS細胞から分化誘導した線維芽細胞では、患者細胞と同様の高いDNA損傷の蓄積が見られた。樹立したiPS細胞は、ウェルナー症候群の病態や老化メカニズムの解明のための有用な研究材料となると考えられる。

### (1) 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. We first tried to generate iPS cells from senescent human fibroblasts using four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc), but ended in failure. We succeeded in generation of iPS cells using lentiviral vectors expressing five factors (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, and Lin28) and non-integrating lentiviral vector for transient expression of SV40 large T antigen together with two chemical compounds, though the efficiency of iPS cell generation was quite low. There was no difference between iPS cells from senescent cells and control iPS cells for cell growth and morphology up to passage 50. We now analyze global gene expression profiles and DNA methylation status of iPSCs from senescent cells.

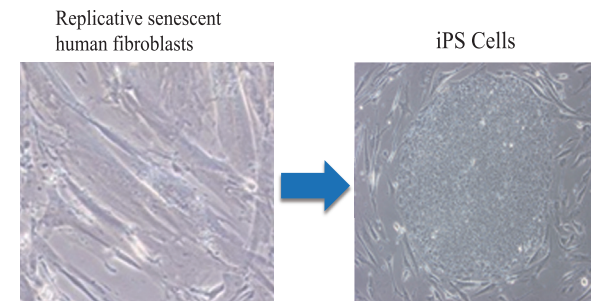
Werner syndrome (WS) is an autosomal recessive disease characterized by premature aging and relatively common in Japan. We succeeded in generation of iPS cells from fibroblasts derived from a WS patient using lentiviral vectors expressing four factors and non-integrating lentiviral vector for transient expression of shRNA targeting p53. Fibroblasts differentiated from WS iPS cells showed increased accumulation of DNA damage as seen in fibroblasts from WS patients. WS iPS cells could be useful for investigating the pathogenic mechanisms of WS and cellular senescence.

### (2) 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DNAバンクを通して提供している。

図1 老化ヒト線維芽細胞からのiPS細胞の樹立

Fig.1 Generating iPS cells from senescent human fibroblast



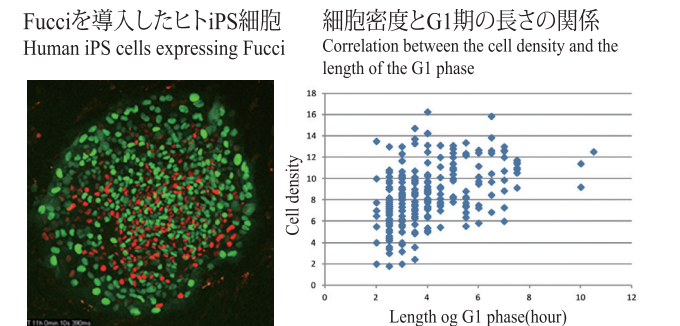
2011年は74人の研究者に提供した。iPS細胞樹立のための様々なレンチウイルスベクターを作製し、BRC内外の研究室と共同研究を行っている。また、細胞周期進行を可視化できる蛍光プローブFucciを発現するレンチウイルスベクターを作製し、多能性幹細胞に導入してタイムラプスイメージングを行った。多能性幹細胞のG1期は、がん細胞株などと比較しても非常に短く、ヒトiPS細胞では約3時間、マウスES/iPS細胞では1~2時間であった。また、がん細胞株などでは細胞密度に比例して必ずG1期も長くなるが、ヒトiPS細胞の場合、細胞密度が高いからといって、必ずしもG1期が長くなるとは限らないことが判明した。これらのことから、多能性幹細胞では強制的にG1期を短く保つ機構が働いていることが示唆された。また、娘細胞の細胞周期は母細胞の細胞周期とは無関係であることなど、多能性幹細胞の個々の細胞周期の詳細を明らかにすることができた。

### (2) 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 74 scientists in 2011 via DNA Bank. We have constructed a variety of lentiviral vectors for generating iPS cells and succeeded in generating iPS cells from various cells in collaboration with many laboratories inside and outside of BRC. We have also constructed a lentiviral vector for expressing a fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator (Fucci), which is able to visualize cell-cycle progression in living cells, and time-lapse imaging was performed on iPS and ES cells expressing Fucci. The length of the G1 phase was very short in human iPS cells (~3 hours) and mouse ES and iPS cells (1~2 hours) compared with HeLa cells. The G1 phase length increased in proportion to the cell density in both human iPS cells and HeLa cells, but human iPS cells with a short G1 phase also exist at high cell density. No correlation was observed for the G1 phase length in sequential cell division of iPS cells. These results suggest that proper regulation to keep the G1 phase length short is critical for iPS and ES cells.

図2 FucciによるヒトiPS細胞の細胞周期解析

Fig.2 Cell cycle analysis of human iPS cells expressing Fucci



## 職員とメンバー構成 Members

- サブチームリーダー [Subteam Leader]  
三好 浩之 Hiroyuki MIYOSHI, Ph.D.
- 開発研究員 [Research & Development Scientist]  
吉田 尚美 Naomi YOSHIDA, Ph.D.
- テクニカルスタッフ II [Technical Staff II]  
桐谷 純恵 Sumie TOGAYACHI
- アシスタント [Assistant]  
三宅 久美子 Kumiko MIYAKE
- 研修生 [Student Trainee]  
森田 早苗 Sanae MORITA  
橋爪 脩 Osamu HASHIZUME  
楊 正博 Masahiro YOU  
高木 瑞江 Mizue TAKAGI  
川邊 良佑 Ryosuke KAWABE  
津久井 里望 Satomi TSUKUI  
野口 涼平 Ryohei NOGUCHI  
池田 和弘 Kazuhiro IKEDA  
大西 彩紀子 Sakiko OHNISHI
- 研究支援/パートタイマー [Part-Timer]  
野口 満美子 Mamiko NOGUCHI

