

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24年度の成果

Development of Technology in 2012-2013

(1) 造血幹細胞の体外増幅のための技術開発

造血幹細胞の体外増幅技術の開発は長年の課題となっている。しかしながら、未だにどのようなシグナルによって造血幹細胞の増殖や分化が制御されているのかはよくわかっていない。造血幹細胞の性状を明らかにするため、細胞周期進行を可視化できる Fucci 蛍光プローブ mKO2-hCdt1 (G1-Red) と mAG-hGeminin (S/G2/M-Green) を発現するトランスジェニックマウスを作製した。造血幹細胞分画 (CD34-KSL: CD34-/c-Kit+/Sca-1+/Lineage-) は、95% 以上の細胞が G0/G1 期にあることが確認されたが、mKO2-hCdt1 (G1-Red) の発現は強い細胞が多いものの、弱い細胞もありヘテロな集団であることがわかった (図 1 A)。そこで造血幹細胞能力に差があるのかどうかを競合的骨髄再構築アッセイにより検討したところ、Red++ 細胞にのみ高い骨髄再構築能力がみられた (図 1 B)。この結果は、Fucci の蛍光強度によって造血幹細胞分画の純度をさらに高めることができることを示すものである。

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

Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells (HSCs) has long been a challenging and important goal for wide clinical use. However, little is known about the molecular mechanisms underlying HSC growth and differentiation. We generated transgenic mice expressing a fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator (Fucci), which consists of mKO2-hCdt1 (G1-Red) and mAG-hGeminin (S/G2/M-Green), for a better understanding of the biology of HSCs. Analysis of HSC fraction (CD34-KSL: CD34-/c-Kit+/Sca-1+/Lineage-) confirmed that more than 95% of the cells are in G0/G1 phase although

mKO2-hCdt1 (G1-Red) was heterogeneously expressed. An *in vivo* competitive repopulation assay revealed that repopulating activity resided largely in the Red++ cell population. This result indicated that HSCs can be further purified on the basis of the fluorescence intensity of the Fucci.

(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。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。また、網羅的遺伝子発現および DNA メチル化の比較解析においても差はほとんど見られなかった。現在、iPS 細胞から線維芽細胞へ分化誘導し、継代培養後の細胞老化について比較解析を行っている。

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、4 因子と Glis1 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。

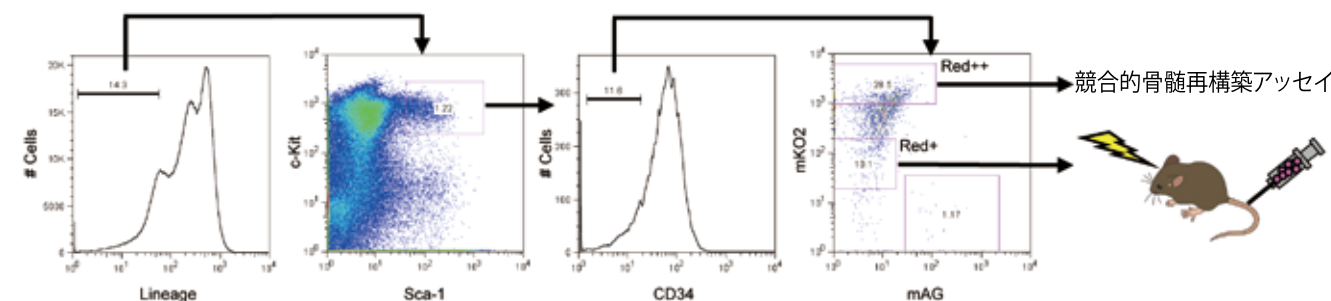


図 1A Fucci トランスジェニックマウスの造血幹細胞分画の解析

Fig. 1A Analysis of HSC fraction in Fucci transgenic mice

(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. 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 as well as global gene expression profiles and DNA methylation status. We now analyze cellular senescence of fibroblasts differentiated from iPS 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 Glis1. 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.

(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 DNA バンクを通して提供している。2012 年は 115 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。

(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 74 scientists in 2012 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.

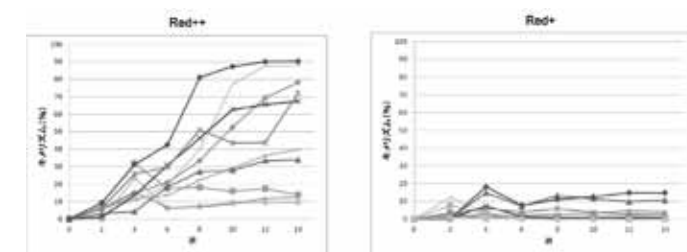


図 1 B 競合的骨髄再構築アッセイの結果 (末梢血でのキメラリズム)

Fig. B Results of *in vivo* competitive repopulation assay

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]
榎谷内 純恵 Sumie TOGAYACHI
- アシスタント [Assistant]
三宅 久美子 Kumiko MIYAKE
- 研修生 [Student Trainee]
橋爪 脩 Osamu HASHIZUME 楊 正博 Masahiro YOU
川邊 良佑 Ryojoke 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 小野村 由衣 Yui ONOMURA

