

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14361

研究課題名(和文) 任意の遺伝子を発現する細胞を分取する新技術の開発

研究課題名(英文) New technique to sort cells expressing a gene of interest

研究代表者

依馬 正次 (Ema, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ある遺伝子を発現する細胞だけ蛍光で光らせる技術は、造血幹細胞の純化など多くの研究領域で幅広く使用されている基幹技術である。具体的には、任意のmRNAに対する相補オリゴにナノゴールドを結合させ、mRNAとの相補結合によって初めて蛍光を発するSmartFlareシステムを使用することで、マウス多能性幹細胞をモデルとして検証した。マウスES細胞のナイーブマーカーであるRex1に対してSmartFlareオリゴを設計し、最適トランスフェクション濃度を決定した。さらにRex1陽性細胞をソートし、RT-qPCR法でナイーブマーカー発現を評価した結果、確かにRex1陽性細胞群を純化出来ていることを証明した。

研究成果の概要(英文)：A technique to highlight cells expressing gene of interest is a critical for hematopoietic stem cell research, and so on. Nano-gold was conjugated to a oligo complimentary to a gene of interest and used to know Rex1 positive cells in mouse ES cells. After purification with FACS, we have performed RT-qPCR methods and found that this technique is a powerful one to sort a population of cells expressing a gene of interest.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：細胞生物学 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

「ある遺伝子を発現する細胞だけを選別する」というプロセスは、幹細胞学、免疫学、血液学、再生医学、循環器学、分子生物学、生化学など、殆ど全ての研究分野において必要不可欠とされる技術である。例えば、免疫学では T 細胞の中でも Th1、Th2、Th17 などの亜集団があり、それぞれ重要な免疫応答過程に貢献しているが、それぞれのマーカーで見分けることで、生理機能の理解が進められている。再生医学領域で盛んに研究されている胚性幹 (ES, Embryonic Stem) 細胞や iPS (induced pluripotent stem) 細胞は、以前は均一な細胞集団と考えられてきたが、遺伝子発現レベルでは、Nanog、Stella (PGC7)、CD31 (PECAM1) などの遺伝子が不均一に発現していることが報告されている (Furusawa et al., Biol Reproduction 2004, Toyooka et al., Development, 2008, Hayashi et al., Cell Stem Cell, 2009)。CD31 を発現する細胞をフローサイトメトリーで分別し、陽性・陰性の画分を胚盤胞に移入すると、CD31 陽性細胞のみがキメラ貢献能を示すことが報告されている (Furusawa et al., Biol Reproduction 2004)。同様に Rex1-GFP ノックイン ES 細胞を樹立することで、転写因子 Rex1 を発現する細胞集団を分別したところ、Rex1 を発現する細胞のみがキメラ貢献能を有することが証明された (Toyooka et al., Development, 2008)。しかしながら、これらの証明には、抗体作製やノックイン ES 細胞の作製など、時間とお金がかかり、多くの遺伝子を対象とした実験を行うことは出来ない。

そこで本課題では、これらの方法を用いること無く、任意の mRNA に対して適用可能な蛍光イメージング方法である SmartFlare 技術 (Mirkin et al., J Am Chem Soc. 2007) を用いることに思い至った。

2. 研究の目的

「ある遺伝子を発現する細胞だけ、蛍光で光らせる」 - この技術は、造血幹細胞の純化や iPS 細胞の樹立など、幹細胞学、再生医療を始めとして多くの研究領域で幅広く使用されている基幹技術である。通常、その遺伝子が細胞表面抗原をコードする場合、抗原に対する抗体を数ヶ月-半年程度かけて作製し、フローサイトメトリーに使用できるかどうか評価するが、特異性の高い抗体が出来な

い場合も多く、研究者泣かせの実験である。また細胞内抗原の場合、細胞の透過処理によって抗体を透過させ、抗体が認識できるようにすることが可能であるが、生存率を低下 (また固定の必要性がある) させたり、煩雑な手順をすることになる。また、扱う動物種を変えると、同じ機能を担うはずの遺伝子産物の場合でも、アミノ酸配列が変わってしまうため、抗体が認識しなくなる場合がしばしば存在する。あるいは、その遺伝子の発現を再現できるようなレポーターマウス、例えば Nanog 遺伝子の場合、Nanog-GFP トランスジェーンを有するトランスジェニックマウスを作製し、GFP の蛍光で Nanog の発現を模倣したりすることに基づいている。これらの方法は一般的に時間とお金がかかるとともに、必ずしも成功するとは限らないものであった。

そこで、任意の mRNA に対する相補オリゴにナノゴールドを結合させ、mRNA との相補結合によって初めて蛍光を発する SmartFlare システムを使用することで、細胞を生きたまま選別できるかどうか、マウス多能性幹細胞をモデルとして検証することを目的として課題に取り組んだ。

3. 研究の方法

先ず未分化なマウス ES 細胞の Gapdh mRNA を可視化するための最適条件を見出すことを試みた。具体的には、Gapdh mRNA に対する SmartFlare オリゴを、マウス ES 細胞の培養液に添加し、培養し、経時観察する。この際 SmartFlare オリゴの濃度、細胞密度、培養時間、血清含培地・無血清培地、単一細胞処理直後かどうか (リバーストランスフェクション) という5つのパラメーターを変化させながら培養を行い、蛍光を発する細胞数をフローサイトメトリーにより定量化した。蛍光陽性細胞数が多く、蛍光強度 (= 細胞の endocytosis の取り込み効率の高さ) に注意しながら (有る一定の蛍光強度を示す集団のみゲートする) 蛍光強度を比較した。また、同時に生存率も評価することで、最適条件を見出した。

Rex1 mRNA に対する SmartFlare オリゴ (Cy5 (667 nm)) と、コントロールとして Gapdh mRNA に対する SmartFlare オリゴ (Cy3 (570 nm)) を添加し、培養した。その後、Rex1 陽性・陰性細胞をゲートして、FACS ソーターにより純化、この Rex1 陽性・陰性細胞から total RNA を調製した。さらに、Nanog、Esrrb、Stella、CD31、Tcl1

などの遺伝子発現を qRT-PCR 法により検討し、過去に報告された Rex1 陽性・陰性細胞の遺伝子発現様式 (Toyooka et al., Development, 2008) と一致するかどうか比較した。

これらの実験のポジティブコントロールとして、Rex1 遺伝子座に GFP が導入された Rex1-GFP ノックイン ES 細胞を用い (Toyooka et al., Development, 2008), Rex1 陽性・陰性細胞を単離、total RNA を調製し、マーカー遺伝子について qRT-PCR を行った。

4 . 研究成果

マウス ES 細胞のナイーブ (Naive) マーカーである Rex1 に対して SmartFlare オリゴを設計した。その後、オリゴの濃度、細胞密度、培養時間、血清含培地・無血清培地、単一細胞処理直後かどうか (リバーストランスフェクション) について、蛍光陽性細胞数が多く、蛍光強度が高い最適条件を選定するとともに生存率も評価した。結果として、単一細胞処理後にトランスフェクションを行うリバーストランスフェクション法が良い導入効率を示した。また血清含・不含培地の比較を行ったところ、血清不含培地で行うのが適していることが分かった。

決定した最適条件下で、Rex1 mRNA に対する SmartFlare オリゴ (Cy5 (667 nm) と、コントロールとして Gapdh mRNA に対する SmartFlare オリゴ (Cy3 (570 nm) を添加し、培養した。その後、フローサイトメーターを用いて Rex1 陽性および陰性細胞をソートし、RNA を精製した。RT-qPCR 法により、他のナイーブマーカー遺伝子 (Nanog, Esrrb, Stella, CD31, Tcf1 など) の発現を評価した結果、Nanog, Esrrb, Stella, CD31, Tcf1 遺伝子の発現は、Rex1 陰性のそれと比較して、Rex1 陽性画分において豊富に発現していることが分かった。この結果により、確かに Rex1 陽性細胞群を純化出来ていることが証明された。

以上のけっかにより、SmartFlare オリゴを用いることにより、内在性 mRNA の発現量に応じたシグナルが得られることが分かり、細胞の純化に適用できることが強く示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Jeon H, Waku T, Azami T, Khoa le TP, Yanagisawa J, Takahashi S, Ema M. Comprehensive Identification of Krüppel-Like Factor Family Members Contributing to the Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells and Cellular Reprogramming. PLoS One. 11(3):e0150715. (2016) (査読有り) doi: 10.1371/journal.pone.0150715.

[学会発表] (計 3 件)

全 孝静、和久 剛、浅見 拓哉、高橋 智、依馬 正次、マウス多能性幹細胞の未分化性維持およびリプログラミングに機能する転写因子 Klf の探索、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日 ~ 2015 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド

全 孝静、和久 剛、浅見 拓哉、高橋 智、依馬 正次、マウス多能性幹細胞の未分化性維持およびリプログラミングに機能する転写因子 Klf の探索、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜
浅見 拓哉、和久 剛、松本 健、全 孝静、高橋 智、依馬 正次、転写因子 Klf5 は初期胚発生において Fgf-ERK 経路の制御により多能性幹細胞の発生を制御する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab.rcals.jp/front>

6．研究組織

(1)研究代表者

依馬 正次 (EMA, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センタ

ー・教授

研究者番号：60359578

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()