

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14531

研究課題名(和文)次世代細胞系譜追跡法の開発による幹細胞探索

研究課題名(英文) Identification of stem cells by developing next generation lineage tracing methods

研究代表者

上野 博夫 (Ueno, Hiroo)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：60332368

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)：幹細胞は重要な生命現象の鍵となる重要な細胞であるが、幹細胞の定義に照らして正確に同定されていると言える成体幹細胞・がん幹細胞はごく少数に留まる。細胞系譜追跡法は汎用性が大きいですが、同時に1種類の幹細胞マーカーしか使えないため非常に特異性の高いマーカーが既知でなければ幹細胞の存在を証明できないという欠点がある。本研究では旧法を改良し、2種類の幹細胞マーカーが共発現した細胞に蛍光蛋白質を発現させるレポーターマウスを構築した。また、さらに、単一幹細胞の動態をより正確に追跡し、幹細胞クローナリティ解析の統計的精度向上のために超多色(5-35色レインボーマウス)を構築した。

研究成果の概要(英文)：Stem cells are very important cells that have roles in maintaining tissue homeostasis. However, not many adult stem cells have been accurately identified. To identify adult stem cells, genetic lineage tracing method has been one of the most powerful method. However, the defect of the original method was that it can utilize basically only one stem cell marker. However, in many cases, very specific markers have not been identified for adult stem cells. In this project, we created two systems to identify adult stem cells. One is that two-step lineage tracing method in which stem cells that coexpress two markers can be labeled, and another is super multicolor lineage tracing method in which stem cells can be labeled with 10-35 different colors. We have already made the constructs for two methodologies and we are currently generating mice.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 発生工学

1. 研究開始当初の背景

成体組織幹細胞は組織のがん化、老化、障害時修復など重要な生命現象の中核的存在であり、再生医療応用だけでなく、分子標的療法、がん幹細胞標的療法開発を視野に、より多くの組織における成体幹細胞・がん幹細胞を正確に同定する事は極めて重要な課題である。これまでに多くの組織の成体幹細胞・がん幹細胞が報告されているが、幹細胞の定義に照らして、正確に同定されていると言える成体幹細胞・がん幹細胞はごく少数に留まる。

ある幹細胞候補細胞が幹細胞である事を証明するためには、その定義に照らして単細胞レベルにて自己複製能と分化能を合わせ持つ事を証明する必要がある。何故ならば幹細胞を細胞集団として解析すると、複数系統の細胞が混在している可能性が常につきまとい、多能性の証明、また幹細胞・一過性増殖細胞・分化細胞の階層構造の解析が困難となるからである。

現在単細胞レベルにての幹細胞の同定には主に2つの方法が用いられている。一つは単一幹細胞移植による組織の再構成能の検定。

幹細胞マーカー CreERT2 ノックインマウスとレポーターマウスによる細胞系譜追跡法である(図1)。前者では造血幹細胞移植の例に見る様に複数の幹細胞マーカー共陽性細胞を FACS で純化できるため得られる幹細胞の純度を上げる事ができる。しかし細胞移植が可能でない多くの臓器では適応できない。一方の細胞系譜追跡法は汎用性が高いが、同時に1種類の幹細胞マーカーしか使えないため非常に特異性の高いマーカーが既知でなければ幹細胞の存在を証明できないという欠点がある。

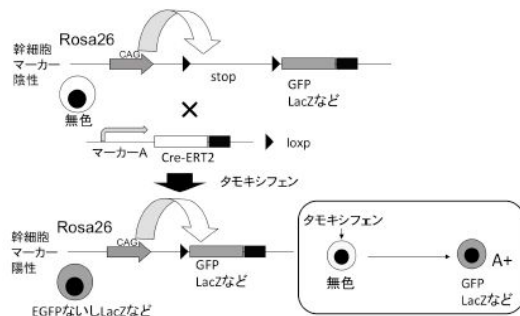


図1 細胞系譜追跡法の原法
1999年にSorianoによって報告された方法。CreERT2を幹細胞マーカー(A)陽性細胞に発現させ、タモキシフェンを投与するとloxP配列が切り出され細胞がGFPなどのレポーター遺伝子陽性となる。またこの細胞の子孫細胞は全てレポーター遺伝子を発現している。この方法は非常に特異的な幹細胞マーカーがあれば強力な方法であるが、通常はその様なマーカーを見つけるまでが大変であり、この方法によって新たに幹細胞を見つけるのには適していない。

2. 研究の目的

細胞系譜追跡法の基本型は図1に示した方法であるがこの方法の適応範囲は狭い。本研究では図1を改良し、2種類の幹細胞マーカーが共発現した細胞に蛍光蛋白質を発現させるレポーターマウスを構築する(図2)。また、さらに、単一幹細胞の動態をより正確に追跡し、幹細胞クローナリティ解析の統計的確度向上のために超多色(5-35色レインボーマウス)を構築する。

3. 研究の方法

(1) 2種類のマーカー遺伝子共陽性細胞を特異的に標識する(図2)レポーターコンストラクトを作製する。

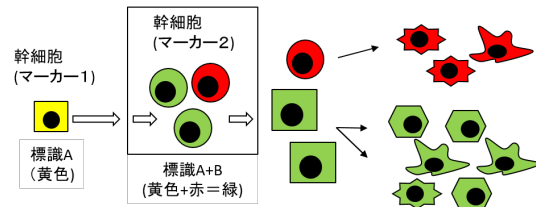


図2 2段階細胞系譜追跡法を用いた解析

(2) GFP, mCerulean, mOrange, mCherryに加え mKeima を有するレインボーコンストラクトを作製する。このコンストラクトでは Cre が4セットの変異 loxP 配列の内1セットを切り出す事で5色キメラとなる。

(3) (1) を Rosa26tkneo ベクターに組み込む。このようにして作製した targeting vector を R1 ES 細胞に遺伝子導入してノックイン ES クローンを得る。

(4) (2) のコンストラクトについては Rosa26領域を含む BAC クローンに挿入したクローンを得る。

4. 研究成果

(1) 2段階細胞系譜追跡を行うために、3種類のマウス(幹細胞マーカー遺伝子1発現細胞に標識を誘導するドライバーマウス(CreER)、2遺伝子の標識を連続誘導可能な新規レポーターマウス、遺伝子1発現細胞のうち、幹細胞マーカー遺伝子2を発現した細胞に対して2つ目の標識を誘導するドライバーマウス(Flippase))を掛け合わせて利用する。

1st marking — タモキシフェン誘導時に遺伝子1を発現していた細胞が Venus で標識される。

2nd marking — さらに、Doxycycline の投与時に2つめの遺伝子2を発現していた細胞が、Venusに加えて mKeima で標識される仕組みである。およびのマウスを新たに作出する必要がある。

2段階細胞系譜追跡法レポーターコンストラクトの構築

レポーターコンストラクトを含む pBluescript plasmid を構築した。

蛍光蛋白質発現誘導の確認 (in vitro)

ES細胞へのエレクトロポレーションの前に、設計通りに同一細胞に2色の標識を誘導できるかを確認した。個体での2段階細胞系譜追跡 (& &) を模倣するために、今回新たに構築したレポーターコンストラクトを含むプラスミドと共に Cre 発現プラスミドと Flippase 発現プラスミドを COS7 細胞にトランスフェクションした。

同一細胞に標識 A (Venus) と標識 B (mKeima) の 2 つの蛍光蛋白質が発現したため、図 2 のような、*in vivo* で目指す 2 段階細胞系譜追跡法と同じ標識を *in vitro* で確認することができた。

(2) 超多色細胞系譜追跡法の開発のために、従来の 4 色のレインボーコンストラクトを改良して、5 色のレインボーコンストラクトを作製した。

5-color rainbow コンストラクトの構築

pBluescript ベクターに CAG promoter、4 つの loxP (およびその変異体) 配列、蛍光蛋白質 cDNA と pA を挿入し、5-color rainbow コンストラクトを構築した。

タモキシフェンによる蛍光蛋白質の発現誘導の確認 (*in vitro*)

マウスの個体化に進む前に 5 色での色分けが可能であるかを *in vitro* で確認するために、CAG-CreERT2 ベクターと 5-color rainbow ベクターとを 293 細胞に co-transfection し、タモキシフェンを培地に添加して組換えを行った。タモキシフェン添加前には GFP のみが発現していて、添加後には mKeima, mCerulean, mOrange, mCherry の蛍光も観察されるようになったため (図 3)、Cre-loxP システムが正しくはたらいて 5 色の色分けが可能でコンストラクトが、設計通りに構築されたことを確認した。

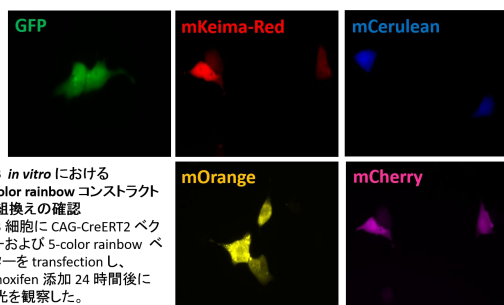


図3 *in vitro* における 5-color rainbow コンストラクトの組換えの確認
293 細胞に CAG-CreERT2 ベクターおよび 5-color rainbow ベクターを transfection し、tamoxifen 添加 24 時間後に蛍光を観察した。

(3) (1) の plasmid からレポーターコンストラクトを切り出して全体を pRosa26-1 vector に挿入することで、targeting vector を完成させた。また、これを R1 ES 細胞に遺伝子導入してノックイン ES クローンを得た。現在、マウス個体化を行っている。

(4) (2) のコンストラクトについては Rosa26 領域を含む BAC クローンに挿入したクローンを得る予定であったが、技術的な問題が生じたため、別のアプローチを取ることにした。

Rosa26-triple 5-color rainbow mouse ターゲティングベクターの構築

新たに構築した 5-color rainbow コンストラ

クトを改変し、複数個、直列につなげたコンストラクトを作製した。これにより、Cre による組換えで生じる色数が増加することが期待できる。このレポーターコンストラクトでも、*in vitro* での組換えを確認した。コンストラクトを切り出して全体を pRosa26-1 vector に挿入することで、targeting vector を完成させた。また、これを R1 ES 細胞に遺伝子導入してノックイン ES クローンを得た。現在、マウス個体化を行っている。

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 8 件)

JKS Yan, CY Janda, J Chang, GXY Zheng, KA Larkin, VC Luca, LA Chia, AT Mah, A Han, JM Terry, A Ootani, K Roelf, M Lee, J Yuan, X Li, CR Bolen, J Wilhelmy, PS Davies, H Ueno, RJ von Furstenberg, P Belgrader, SB Ziraldo, H Ordonez, SJ Henning, MH Wong, MP Snyder, IL Weissman, AJ Hsueh, TS Mikkelsen, KC Garcia, and CJ Kuo (2017) Non-equivalence of wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem cell self-renewal **Nature** (査読無) doi:10.1038/nature22313 May 11; 545(7653): 238-242

Jinshu Xu, H Ueno, Chelsea Xu, Binglai Chen, Irving Weissman, and Pin-Xian Xu (2017) Identification of mouse cochlear progenitors that develop hair and supporting cells in the organ of Corti. **Nature Communications** (査読無) May 11; 8: 15046. doi:10.1038/ncomms15046.

Hirotsugu Yanai, Naho Atsumi, Toshihiro Tanaka, Naohiro Nakamura, Yoshihiro Komai, Taichi Omachi, Kiyomichi Tanaka, Kazuhiko Ishigaki, Kazuho Saiga, Haruyuki Ohsugi, Yoko Tokuyama, Yuki Imahashi, Shuichi Ohe, Hiroko Hisha, Naoko Yoshida, Keiki Kumano, Masanori Kon and Ueno H. (2017) Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion. **Scientific Reports** (査読有)

[学会発表](計 6 件)

上野博夫 「organoids of tongue and esophagus」EMBO | EMBL Symposium 2016 年 10 月 13 日ハイデルベルク (ドイツ)

上野博夫 「超多色細胞系譜追跡法による新規成体幹細胞、がん幹細胞の同定」第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会 2016 年 9 月 15 日ナレッジキャピタルコングレ・コンベンションセンター (大阪)

上野博夫 「多色細胞系譜追跡法による
幹細胞・発生研究」第15回日本再生医療
学会総会 2016年3月17日大阪国際会議
場(大阪)

〔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://www3.kmu.ac.jp/pathol1/index.html#>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 博夫 (UENO, Hiroo)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：60332368

(2) 研究分担者

厚海 奈穂 (ATSUMI, Naho)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：90612151

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし

