

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15022

研究課題名(和文) 乳腺幹細胞への高効率なダイレクトリプログラミング因子の同定

研究課題名(英文) Screening for genes involved in efficient reprogramming directly into mammary stem cells

研究代表者

仙波 憲太郎 (Semba, Kentaro)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：70206663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：レポーターマウスの乳腺上皮細胞(MEC)の不死化に成功しスクリーニングが効率化した。当初期待していた115個の遺伝子には活性がなく、より大きな遺伝子セットを評価する必要があった。そこでアノテーションされていないnon-coding RNAなどを含む遺伝子セットを大量に評価可能な実験系としてトランスポゾンを用いた遺伝子発現・同定技術を考案した。開発したベクターをレポーター細胞に導入し、4つの陽性クローンを得ることに成功した。その内1クローンから候補遺伝子が同定され、さらに解析を進めているところである。また、トラップ法の技術を応用し、幹細胞化遺伝子の機能評価のための各種技術を構築した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in immortalization of reporter mouse mammary epithelial cells (MECs), which allow us to screen genes involved in dedifferentiation, efficiently. 115 genes, which had been first under expectation as associated genes with dedifferentiation, unfortunately did not activate reporter cells. Thus, there was a need to evaluate larger gene sets. Then we developed a gene trap system for expression of genes covering more broad set including non-coding RNA using a transposon system. This is powerful technique one because there is no need to prepare cDNA libraries. Using this convenient and efficient system, we isolated 4 positive clones. Among them, we identified a candidate gene possibly involving regulation of stemness, and now are analyzing its function both in vitro and in vivo. Moreover, by applying the technique of the trap method, various technologies for evaluating the function of genes regulating stemness were also developed.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：細胞分化 組織形成 乳腺 幹細胞 ダイレクトリプログラミング

1. 研究開始当初の背景

年間の乳癌診断者数は 5 万人を超え、その約 20%は死亡する。癌の除去・予防のための乳腺組織の切除は患者の QOL を著しく損なわせている。マウスでは乳腺幹細胞を乳房に移植するだけで乳汁産生機能を持つ乳腺組織が自発的に再生することが明らかとなっており、この技術がヒトに応用できれば患者の QOL は著しく改善される。ところが、乳腺幹細胞は非常に数が少ない上、特異的マーカーも見つかっておらず精製法も確立されていない。一方、乳腺幹細胞および分化した細胞の(癌)幹細胞化は乳癌の発症・悪性化メカニズムに深く関わっている。こういった乳腺幹細胞に関わる癌の研究や解析、まだ見つかっていない乳腺幹細胞のマーカーの探索、再生医療を目指す基盤研究のために乳腺幹細胞の多量取得が必要となっていた。ところが、通常の組織内では数が少なくその誘導技術が必要であった。しかし、ES細胞やiPS細胞などの多分化能を持つ幹細胞からの分化誘導は極めて困難であった。そこで、極めて挑戦的であったが分化した乳腺上皮細胞からの脱分化技術によるアプローチを試みた。

2. 研究の目的

高効率で質の高い乳腺幹細胞を誘導する技術の創出を目指す。そのために幹細胞性を評価することのできるレポーターマウス細胞を用いてスクリーニングを行い、幹細胞化や幹細胞性の維持に必要な遺伝子を同定する。

3. 研究の方法(図 1)

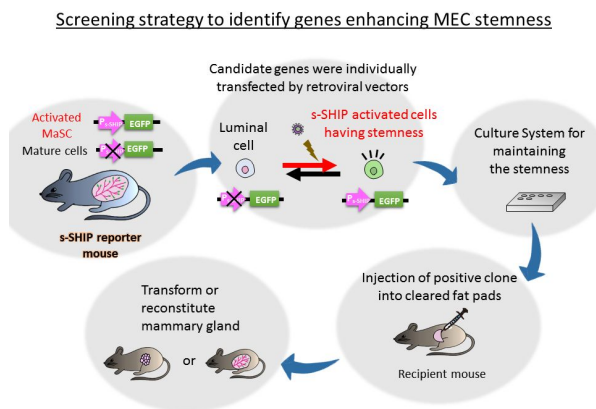


図 1. 幹細胞化制御遺伝子同定法の概略

質の高い乳腺幹細胞を効率良く・簡便に同定するために、申請以前より幹細胞性を評価することが可能なレポーターマウスの作製を行っていた。また、幹細胞を維持させる培養技術の開発を行っていた。それらを用いてスクリーニングを行った。具体的な手順は以下の通りである。

- (1) 乳腺組織特異的幹細胞化誘導遺伝子候補を文献調査やバイオインフォマティクスを駆使して抽出・選別する。
- (2) Gateway システムを用いてエンタリーベクターにクローニングされた遺伝子を導入効率の高いレトロウィルス発現ベクターに組み込む。細胞への導入効率を高めるため精製度の高い DNA 精製を行う。
- (3) 乳腺幹細胞を選択可能なレポーターマウス細胞と独自の乳腺幹細胞培養技術を用いて遺伝子スクリーニングを行う。レポーターには EGFP と puromycin 耐性遺伝子が同時に発現されるように工夫してあるため、これらの指標を用いることで陽性クローンの単離が効率良く進められると考えられた。
- (4) 候補遺伝子が得られた場合、乳腺を除去したマウス乳房へ移植し、再構築能を評価する *in vivo* 評価系(図 2)や mammosphere アッセイといった *in vitro* 評価系によって乳腺幹細胞性の評価を行う。

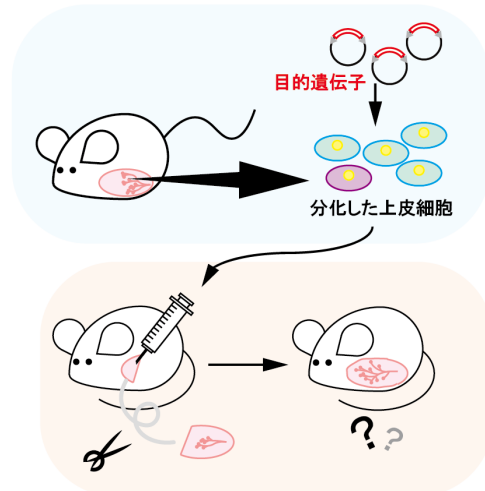


図 2. マウスの乳房を用いて乳腺の再構築能をみることによる幹細胞性の評価

4. 研究成果

- (1) スクリーニングに用いるレポーターマウスの乳腺上皮細胞(MEC)を不死化することに成功し、毎回 primary 培養することなく大量のドナー細胞を用意することができるようになり、スクリーニング作業が高効率に行えるようになった。
- (2) 文献情報や各種データベースから選別された脱分化誘導候補遺伝子 115 個をレポーター細胞に導入し、レポーター発現を弱く呈した 2 遺伝子が同定された。しかし、そ

の後の *in vitro* および *in vivo* の解析・検証から幹細胞化活性を有していないと判断された。

- (3) non-coding RNA のような遺伝子を含むより大きな遺伝子セットを評価の対象にすることのできるトラップ法によるスクリーニングを考案した(図 3, 4)。
これはトランスポゾンのもつ任意の DNA 断片をゲノムにランダムに挿入するという性質を利用したもので、*in silico* 解析からは認証されない遺伝子を含む遺伝子セットを、ライブラリーの作製を経ず、毎回異なるレポーターで大量に発現させ評価できる点で極めて有用であると考えられた。

Genome-wide gene trap screening as another screening strategy

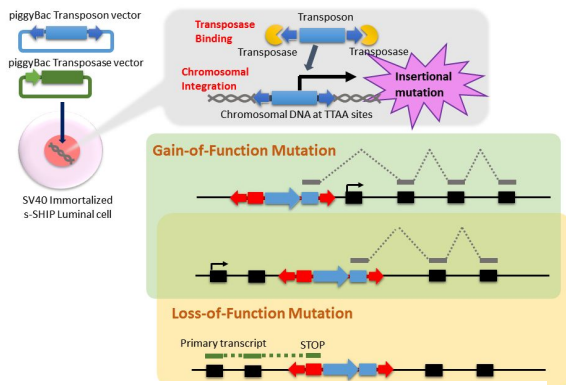


図 3. Gene trap 法の原理

Gene trap screening strategy and trap vector construction

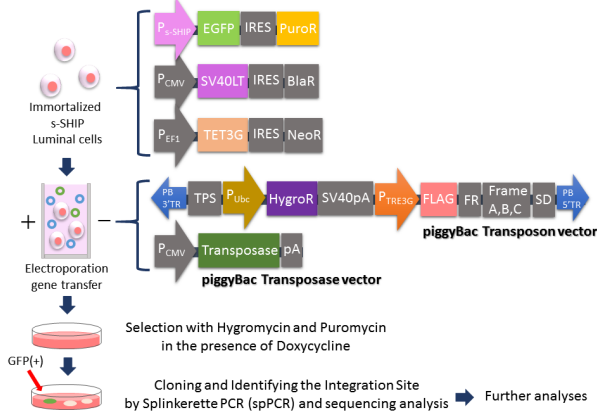


図 4. Gene trap 法に開発した各種ベクターとスクリーニングの概要

- (4) この遺伝子トラップ法を用いて遺伝子スクリーニングを行ったところ、レポーターのマーカが陽性なクローンが 4 クローン得られた(図 5)。さらにこの中の 1 クローンから候補遺伝子を同定することに成功した。この遺伝子は幹細胞化の報告が無く、さらに解析を進めている。

Clones obtained through gene trap screening

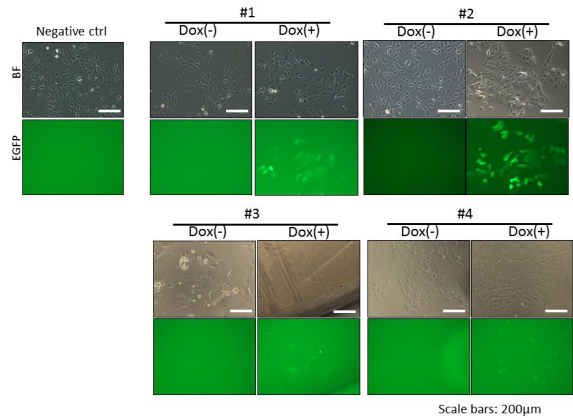


図 5. スクリーニングで得られた陽性クローン。この後トラップされたベクターのゲノム上の挿入部位の解析から幹細胞制御遺伝子候補を推定した。

- (5) 幹細胞化遺伝子スクリーニングに用いるベクターの開発の他にも以下のようなトランスポゾンベクター系を構築した。

- プロモータートラップ法によるレポーター細胞作製技術
- 転写因子によって誘導される遺伝子の同定技術
- 幹細胞など遺伝子導入が困難な細胞に対する過剰発現技術
- 蛍光蛋白質融合による局在マーカーの同定技術
- 蛍光蛋白質再構成法による結合因子探索技術
- マウスでの遺伝子導入乳腺の再構築技術

である。

これらの技術開発によって、ダイレクトプログラミング因子候補遺伝子の *in vitro/in vivo* 機能解析を優位に進めることが可能となった。

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)

(1) Kosuke Ishikawa, Yuta Kobayashi, Yutaro Wakabayashi, Shinya Watanabe and Kentaro Semba, "A highly sensitive trap vector system for isolating reporter cells and identification of responsive genes", *Biology Methods & Protocols*, 2018, in press, 査読有

(学会発表)(計 7件)

(1) 石川公輔、仙波憲太郎、高感度トラップベクターを用いたレポーター細胞の作製、日本癌学会学術総会、2017

(2) 多ヶ谷紘壮、石川公輔、渡辺慎哉、仙波憲太郎、乳がん遺伝子解析のためのマウス in vivo 発現系の開発、日本癌学会学術総会、2017

(3) 石川公輔、仙波憲太郎、高感度トランスポゾントラップベクターを用いた遺伝子発現応答細胞の単離、日本がん分子標的治療学会、2017

(4) 若林佑太郎、石川公輔、仙波憲太郎、高感度トランスポゾントラップベクターを用いた薬剤刺激応答細胞単離技術の開発、日本がん分子標的治療学会、2017

(5) 小林雄太、石川公輔、渡辺慎哉、仙波憲太郎、高感度トランスポゾントラップベクターを用いた刺激応答細胞と遺伝子の単離技術の開発、日本分子生物学会年会、2016

(6) 上岡有紀乃、石川公輔、仙波憲太郎、BACベクターを用いた遺伝子導入乳腺再構築、日本分子生物学会年会、2016

(7) 石川公輔、渡辺慎哉、仙波憲太郎、Development of highly sensitive promoter-trap vector system、日本癌学会学術総会、2016

(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

6. 研究組織

(1)研究代表者

仙波 憲太郎(Semba Kentaro)
早稲田大学・大学院理工学術院・教授
研究者番号:70206663

(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

()