

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007-2009

課題番号：19510199

研究課題名(和文) マウス ROSA26 ES 細胞に相当する「霊長類 ES 細胞の恒常的発現部位」の同定と利用。

研究課題名(英文) Identification and utilization of the ROSA26 locus in cynomolgus monkey embryonic stem cells.

研究代表者

池田 たま子(IKEDA TAMAKO) 自治医科大学・医学部・助教 研究者番号：10406035

研究成果の概要：

高い増殖能と分化能をもつ ES 細胞は、移植治療への応用が期待されている。その為の効率の良い分化方法や遺伝子導入には、恒常的遺伝子発現部位の発見と移植細胞の純化法の確立が必要となる。始めに、「遺伝子導入部位」についての検討を行った。マウス ES 細胞株 (ROSA26) は、未分化状態～三胚葉分化後も、ROSA 部位の発現は低下しない。しかし、霊長類 ES 細胞では、ROSA の様な恒常的遺伝子発現部位がみつからない。そこで、恒常的遺伝子発現部位をもつ細胞を探索し、恒常的発現部位を検討することを試みた。しかし、恒常的発現サル ES 細胞株からの発現部位を同定したが、恒常的発現部位の特定には至らなかった。次に、「ES 細胞の純化法」について検討を行った。純化を行う為には、単細胞培養が必須である。サル・ヒト ES 細胞は、単細胞継代すると効率にアポトーシスを起こすことが知られている。一方、マウス ES 細胞は、サル・ヒト ES 細胞に比べて増殖能が高く、単細胞継代が可能である。そこで、ROCK 阻害薬の効果が、サル ES 細胞でも応用できるかどうかを検討した。その結果、サル ES 細胞は、ROCK 阻害薬の使用により、単細胞培養が可能であることを発見した。さらに、マウスとサル ES 細胞の違いを検討することを試みた。ヒト ES 細胞・体細胞では発現がしないが、マウス ES 細胞のみに発現が認められる「ERas 遺伝子」に着目した。マウスでは、ERas 遺伝子は個体発生や ES 細胞の未分化性維持には関与しないものの ES 細胞にのみ発現し、ES 細胞の増殖性に関与する。しかし、サル細胞・組織における ERas 発現は、調べられていない。そこで、カニクイザルにおける ERas の発現を調べた。その結果、ERas 遺伝子の発現は、カニクイザル ES 細胞・体細胞では発現していることを発見した。さらに、ERas 遺伝子の細胞増殖能を調べた結果、増腫瘍性に関係無いことがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：基礎ゲノム科学・ゲノム発現

キーワード：ES細胞

1. 研究開始当初の背景

高い増殖能と分化能をもつES細胞は、移植治療への応用が期待されている。そのための効率の良い分化方法や移植細胞の純化に、特徴的な遺伝子導入技術が必要である。例えば、マウスの系では、マウスHOX-B4(Kyba M et al. Cell 2003)などの遺伝子導入を行ったマウスES細胞から、造血再構築に成功している。また、移植細胞の純化の例として、前神経幹細胞特異的に発現するSOX1-GFP遺伝子を導入したマウスES細胞の神経分化を行った後、GFPマーカを指標にして、前神経幹細胞だけを純化可能な系が存在する(Ying QL et al. Nat Biotechnology 2003)。しかし、造血幹細胞の遺伝子治療において白血病発症が危惧されている。原因は、遺伝子導入に用いたレトロウイルスベクターによる挿入変異にある (Hacein-Bey-Abina et al. Science 2003)。ES細胞に対する遺伝子導入を考える上でも、ランダムな導入法ではなく、より安全性の高い方法で可能にすることが望ましい。

ES細胞に導入した遺伝子は、分化後にsilencingを起こしやすい性質がある。そのため、ES細胞の遺伝子導入において、安全な上に分化後の恒常的発現が期待できる特異的部位の発見が必要である。

マウスES細胞には、ROSA26という細胞株がある。このROSA(マウスChromosome 6)という部位に β -galactosidase遺伝子が組込まれている。この細胞株は、未分化状態～三胚葉分化後も、 β -galの発

現は低下しない。そのため、このROSAは、恒常的な遺伝子発現部位として「相同組換え」に利用されている。しかし、霊長類ES細胞では、ROSAの様な恒常的遺伝子発現部位 (ROSA相当部位) がみつからない。そこで、本研究では、ヒトに近いサルES細胞をもちいて、ROSAの様な恒常的遺伝子発現部位を探索すること、さらに、マウスおよびサルES細胞の性質の違いを検討する。

2. 研究の目的

高い増殖能と分化能をもつES細胞は、移植治療への応用する為には、効率の良いES細胞株の樹立が必須である。しかし、ヒトES細胞は、マウスES細胞の様に、単細胞培養ができない。ヒトES細胞とマウスES細胞を比較した処、ERas遺伝子は、マウスES細胞に発現しているが、ヒトES細胞では発現していないと報告されていた。それ故、我々は、ERasが、単細胞培養のできない原因の一つではないかと考えた。そこで、ヒトES細胞の代用として、サルES細胞を用いて、ERasの発現および機能について検討した。

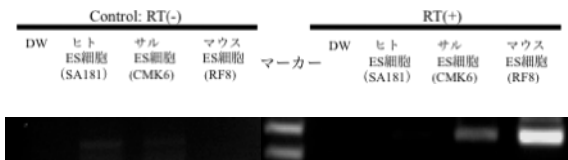
3. 研究の方法

初めに、カニクイザルにおけるERas遺伝子発現を検討する為、ヒト・マウス共通配列上で作製したprimerを作製した。カニクイザルES細胞 (CMK6)、カニクイザル組織 (脳・心臓・腸・脾臓・卵巣・骨格筋・肝臓・腎臓) から、ERasの発現を検討した。次に、ERas遺伝子の発現が

認められた為、カニクイザルES細胞 (CMK6) のmRNAから、カニクイザルERas配列を決定し、サル・マウスERas発現ベクターを作製した。さらに、カニクイザルERas遺伝子発現ベクターを用いて、カニクイザルストローマ細胞に遺伝子導入した。ERas遺伝子を強制発現させたカニクイザルERas発現ストローマ細胞を用いて、マウス・サルERasの機能の違いを検討した。

4. 研究成果

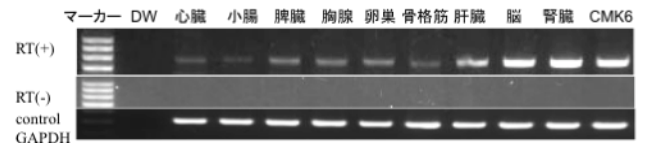
ERas遺伝子は、マウスES細胞では発現が認められるが、ヒトでは発現しない事が知られている。初めに、カニクイザルES細胞における発現を検討した。その結果、カニクイザルES細胞では、マウスES細胞より発現量は少ないが、発現している事がわかった。(図1)



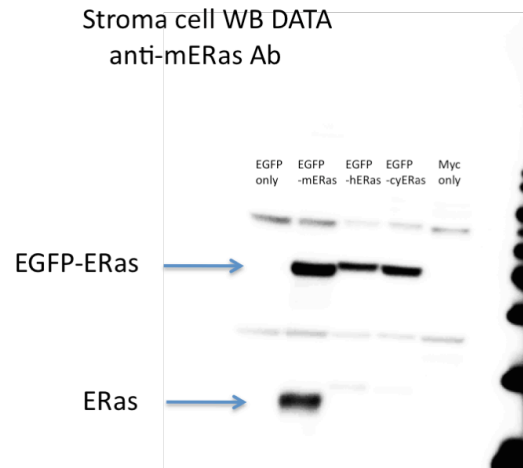
このカニクイザルES細胞から、カニクイザルERas遺伝子をクローニングし、遺伝子配列を比較した結果、マウスよりも、ヒトERasの遺伝子配列に近いものである事がわかった。

マウスERasは、未分化ES細胞にのみ発現が認められ、分化した細胞・組織には、発現しない事が知られている。また、ヒトにおいては、ESのみならず、体細胞にも発現しないが、ヒトの胃がん細胞では発現している報告がある。そこで、ERasカニクイザルの体組織における、ERasの

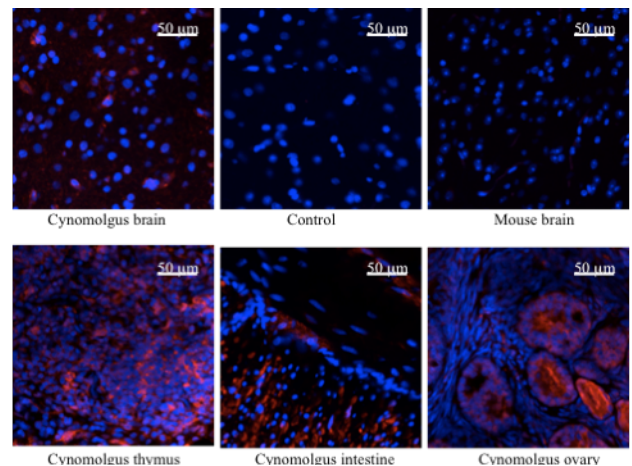
発現を調べた。その結果、カニクイザルの体細胞でも、発現が認められた。(図2)



京大山中先生に供与して頂いたERas抗体は、マウスの抗体であるので、サルへの交差性を検討した。その結果、サルERasへも、マウスより弱いですが、交差性を有することが確認された。(図3)

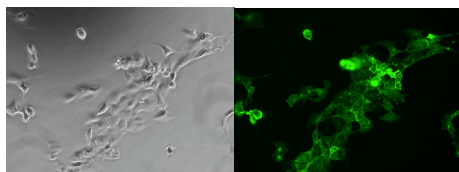


この抗体を用い、カニクイザルにおけるERasタンパク発現を免疫染色にて検討した。その結果、ERasタンパクは、各組織に発現していることがわかった。(図4)



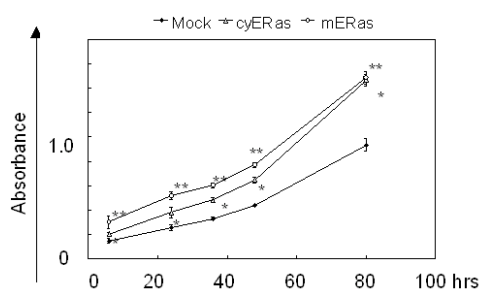
さらに、カニクイザルES細胞由来の奇形種において、サルERasの発現を検討を行った。奇形種は、NOGマウスにカニクイザル未分化ES細胞を接種して作製した。カニクイザルES細胞と、その細胞由来の奇形種由来のERasのmRNAの発現を比較した。奇形種では、カニクイザルERasの遺伝子発現は、ES細胞の5倍量であった。

次に、サル・マウスERas遺伝子の機能について検討した。ERas遺伝子の機能は、細胞増殖の亢進と増腫瘍性が知られている。そこで、カニクイザルストローマ細胞に、サルおよびマウスERas-GPF遺伝子を強制発現させた細胞株を作製した。これらの細胞株を、FACSの調べた処、遺伝子発現効率は、93%-97%であった。また、ERas遺伝子は、細胞膜裏打ちタンパクであり、ERas強制発現サルストローマ細胞には、膜への局在が認められた。(図5：サルERas遺伝子発現サルストローマ細胞)

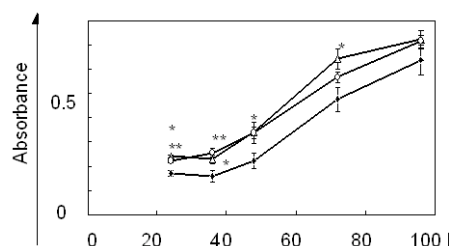


さらに、ERas遺伝子強制発現サルストローマ細胞の増殖機能をMTTアッセイにて調べた。

その結果、コントロールベクター発現細胞と比べ、増殖性が亢進している結果は得られなかった。(図6・7)



(図7では、図6のDATAを元に、測定始めの量を一致させ、増殖割合の比較を行ったもの)



以上の事から、ERas遺伝子は、カニクイザルにおいて、ES細胞および体細胞に発現している事を発見した。さらに、サルERas遺伝子は、細胞増殖亢進および増腫瘍性にはあまり関与しない事が示唆された。

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 7 件)

1. Masuda S, Kumano K, Suzuki T, Tomita T, Iwatsubo T, Natsugari H, Tojo A, Shibutani M, Mitsumori K, Hanazono Y, Ogawa S, Kurokawa M, Chiba S.

Dual antitumor mechanisms of Notch signaling inhibitor in a T-cell acute lymphoblastic leukemia xenograft model.

Cancer Sci. 2009 Dec;100(12):2444-50. Epub 2009 Aug 27. (査読あり)

2. Masuda S, Ageyama N, Shibata H, Obara Y, Ikeda T, Takeuchi K, Ueda Y, Ozawa K and Hanazono Y.

Co-transplantation with MSCs improves the engraftment of HSCs after autologous

intra-bone marrow transplantation in non-human primates. **Exp Hematol** 2009Oct; 37(10) : 1250-1257. (査読あり)

3. **Ikeda T**, Tanaka Y, Kishi Y, Muramatsu S, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu S, Takahashi K, Yamanaka S, **Hanazono Y**. ERas is expressed in cynomolgus cells and tissue. **Cell Transplant.** 18(4): 381-389.2009. (査読あり)

4. **池田 たま子**, 藤城 修平, 後藤 典子, 田中 裕次郎, 古川 裕, 長谷川 寛, 岸友紀子, 増田 茂夫, 高橋 和利, 山中 伸弥, **花園 豊**
ES細胞におけるERasの新たな作用機構
Jichi Medical Univ Journal , 31.110.2008(査読なし)

5. Kishi Y, Tanaka Y, Shibata H, Nakamura S, Takeuchi K, Masuda S, **Ikeda T**, Muramatsu S and **Hanazono Y**. Variation in the Incidence of Teratomas After the Transplantation of Primate ES Cells Into Immunodeficient Mice . **Cell Transplantation.** 17(9):1095-102. 2008. (査読あり)

6. Kishi Y, Inoue M, Tanaka Y, Shibata H, **Ikeda T**, Hasegawa M, and **Hanazono Y**. Knockout Serum Replacement (KSR) Shows A Suppressive Effect on Sendai Virus Transduction of Cynomolgus ES Cells. **Cloning and Stem Cells** . 10(3):307-12 . 2008 Sep (査読あり)

7. Tanaka Y, Nakamura S, Shibata H, Kishi Y, **Ikeda T**, Masuda S, Sasaki K, Abe T, Hayashi S, Kitano Y, Nagao Y, **Hanazono Y**.

Sustained macroscopic engraftment of cynomolgus embryonic stem cells in xenogeneic large animals after in utero transplantation. **Stem Cells Dev.** 17(2) : 367-381. 2008 Apr (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 千里ライフサイエンスセミナー : 2009. 1. 9 : 大阪
「大型動物を用いた幹細胞の研究～臨床応用をめざして～」 **花園 豊**
2. 佐野市民講座 : 2008. 11. 18 : 栃木
「再生医療について」 **花園 豊**
3. かわさきサイエンス&テクノロジーフォーラム 2008 : 2008. 11. 13 : 神奈川
「幹細胞を用いる再生医療の実現に向けて」 **花園 豊**
4. 平成 20 年度自治医科大学実験動物慰霊会の特別講演 : 2008. 10. 1 : 栃木
「iPS 細胞研究と動物実験」 **花園 豊**

5.自治医大シンポジウム:2008. 8. 30 栃木
ES 細胞における ERas の新たな作用機構
池田たま子, 藤城修平, 後藤典子, 田中裕次郎, 古川裕, 長谷川寛, 増田茂夫, 岸友紀子, 高橋和利, 山中伸弥, **花園 豊**

6. 幹細胞シンポジウム:2008. 5. 16-17:東京
ES 細胞における ERas の新たな作用機構
池田たま子, 田中裕次郎, 後藤典子, 岸友紀子, 増田茂夫, 高橋和利, 山中伸弥, **花園 豊**

7. 技術情報センターセミナー : 2008. 5. 15: 東京
「万能細胞利用における有効性及び安全性の評価」 **花園 豊**

8. 新日本科学講演会 : 2008. 4. 16 : 鹿児島
「サルを用いた研究 : 万能細胞利用の有効性と安全性の評価」 **花園 豊**

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 たま子 (IKEDA TAMAKO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10406035

(2) 研究分担者

花園 豊 (HANAZONO YUTAKA)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251246

(3) 連携研究者

なし

