

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659202

研究課題名(和文) 繊維芽細胞から造血幹細胞へのリプログラミング技法

研究課題名(英文) Direct reprogramming of fibroblasts to hemetopoietic stem cells

研究代表者

伊藤 克彦 (Itoh, Katsuhiko)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90281097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：以下の事を行った。(1) SCL遺伝子のレポーター・マウス系統を作成し、このマウスの胎児繊維芽細胞を標的として候補遺伝子のスクリーニングを行った。(2) 候補遺伝子の「ある組み合わせ」で、極めて少数の細胞でEGFP発現を示唆する結果を得たが、通常のマウスへの移植実験で、この細胞の造血再構築能を確認出来なかった。(3) c-kit遺伝子にCrisprにて変異導入したマウスを用いた造血幹細胞検出法を作成したが、造血再構築能を保持する細胞は、検出出来なかった。

以上のより、上記の「候補遺伝子」は、繊維芽細胞を造血幹細胞へリプログラム出来ないと結論した。

研究成果の概要(英文)：We have done following experiments; (1) We generated SCL-reporter mouse strains and have screened "candidates genes" using fibroblasts derived from these mouse strains. (2) Although the transduction of a certain combination of "candidates genes" seemed to induce EGFP expression in a small population of transduced cells, these cells could not reconstitute hematopoiesis in recipient mice. (3) We have generated the mutant mouse strains harboring the mutations in the c-kit locus by Crispr and examined the hematopoietic reconstitution ability of the cells described in (2). These cells could not reconstitute hematopoiesis in recipient mice. Thus, we have concluded that our "candidates genes" could not reprogram fibroblasts to hematopoietic stem cells.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：再生医学

1. 研究開始当初の背景

山中らは、4つの転写因子を導入する事で、分化した体細胞を pluripotency を持つ細胞 (iPS) へと変換した (Cell 126:663 2006)。幾つかの転写因子の導入で、GrafらはB細胞 (Cell 117:663 2004)、T細胞 (Immunity 25:731 2006)、繊維芽細胞 (PNAS 105:6057 2008)を単球へ、Meltonらは膵外分泌腺細胞を内分泌細胞(-cell)へ (Nature 455:627 2008)、Wernigらは繊維芽細胞を神経細胞へ (Nature 463:1035 2010)、Ieda, Srivastavaらは心筋細胞へ (Cell 142:375 2010)変換した。

これらは、幾つかの転写因子の組合せを導入する事で、細胞をフレキシブルに「リプログラム」することが可能である事を示していた。

2. 研究の目的

分化した体細胞を、multipotency を持つ造血幹細胞へ、直接リプログラミングする因子の組合せを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

SCLの発現をEGFPでレポートするマウスの胎児繊維芽細胞を用いて、造血幹細胞様の培養細胞に特異的に発現する転写因子群から、分化した体細胞を造血幹細胞様細胞へと変換するのに最も効率的な因子の組合せを同定する。

4. 研究成果

(1) 造血幹細胞様の培養細胞に特異的に発現する転写因子群の同定：造血幹細胞様の培養細胞と、マウス骨髄中の lineage 陽性細胞で表出している遺伝子とを比較して、造血幹細胞様の培養細胞に特異的に発現する転写因子群の同定を行った。また、同定した遺伝子とマウス骨髄中の c-Kit 陽性・Sca-1 陽性・lineage 陰性細胞群 (KSL 細胞) に発現する転写因子群とを比較し、候補遺伝子を同定した。驚いた事に、幾つか

の KSL 細胞に特異的に発現する転写因子の発現が、造血幹細胞様の培養細胞では、極めて少なかった。同定した候補遺伝子は、レトロウイルス・ベクターに組み込んだ。

(2) SCL-EGFPneo トランスジェニックマウス (Tg/SCL-EGFP) の作成：Greenらにより解析された SCL 遺伝子の転写制御領域と EGFP を含む配列を導入したマウスを作成したが、KSL 細胞での EGFP の発現が確認出来なかった。そのため、flox-CAG プロモーターを更に入れた配列をマウスに導入して KSL 細胞で EGFP の発現が確認できたマウス3系統を作製したが、CRE を発現させて CAG プロモーターを削除後、KSL 細胞での EGFP の発現が確認出来なかった。そこで、SCL 遺伝子を含む BAC (Bacterial artificial chromosome) クローンの SCL 遺伝子の第二エクソン領域を flox-CAG プロモーター、及びEGFPとNeoRを含む配列に置き換え、これを導入したマウスを2系統作成した。CAG-Cre マウス系統と、上記のマウスの系統を掛け合わせたマウスで未熟な造血系細胞でEGFP発現を確認した。

(3) 上記のマウスより胎児繊維芽細胞を作成し、作成した胎児繊維芽細胞を標的として候補遺伝子のスクリーニングを始めた。このスクリーニングで、候補遺伝子の「ある組み合わせ」で、稀に極めて少数の細胞でEGFP発現誘導を示唆する結果を認めた。しかし、この極めて少数の細胞は、ストローマ細胞との共培養や増殖因子の添加では、増やす事が出来なかったため、放射線照射した通常のマウスへの移植実験で造血の再構築能を確認出来なかった。

(4) 造血幹細胞検出の感度を上げるため、c-kit 遺伝子の一部を Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (Crispr) 技法を用いて変異導入したマウスを作成した。このマウスへの移植によっ

ても、上記の細胞での造血再構築能は、確認出来なかった。

以上より、私達の同定した候補遺伝子の組み合わせでは、分化した細胞を造血幹細胞へとリプログラム出来ないと結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計19件)

1. Fukuda RI, Tsuchiya K, Suzuki K, Itoh K, Fujita J, Utsunomiya A and Tsuji T. HTLV-I Tax regulates the cellular proliferation through the down-regulation of PIP3-phosphatase expressions via the NK-kB pathway. (2012) *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, 3: 95-104.
2. Schwartz CM, Tavakoli T, Jamias C, Park C-C, Maudsley S, Martin B, Phillips TM, Yao PJ, Itoh K, Ma W, Rao MS, Arenas E and Mattson MP. Stromal factors SDF1a, sFRP1, and VEGFD induce dopaminergic neuron differentiation of human pluripotent stem cells. (2012) *J. Neurosci. Res.*, 90: 1367-1381.
3. Masuda T, Itoh K, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nakazawa N, Sakurai T, Liu Y, Tokuchi H, Fujita T, Zhao Y, Nishiyama H, Tanaka T, Fukumoto M, Ikawa M, Okabe M and Fujita J. Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109: 10885-10890.
4. Nambu Y, Hayashi T, Jang KJ, Aoki K, Mano H, Nakano K, Osato M, Takahashi K, Itoh K, Teramukai S, Komori T, Fujita J, Ito Y, Shimizu A and Sugai M. In situ differentiation of CD8 $\alpha\beta$ T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. (2012) *Sci. Rep.*, 2: 642.
5. Sumitomo Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Liu Y, Fujita T, Sakurai T, Candeias M, Itoh K, Chiba T and Fujita J. Identification of a novel enhancer that binds Sp1 and contributes to induction of cold-inducible RNA-binding protein (cirp) expression in mammalian cells. (2012) *BMC Biotechnology*, 12:72.
6. Hara, T., Shitara, S., Imai, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yao, H., Tani-Ichi, S., and Ikuta, K. (2012) Identification of IL-7-Producing Cells in Primary and Secondary Lymphoid Organs Using IL-7-GFP Knock-In Mice. *J. Immunol.* 189, 1577-1584
7. Imayoshi, I., Hirano, K., Kitano, S., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2012) In vivo evaluation of PhiC31 recombinase activity in transgenic mice. *Neurosci. Res.* 73, 106-114
8. Imayoshi, I., Hirano, K., Sakamoto, M., Miyoshi, G., Imura, T., Kitano, S., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2012) A multifunctional teal-fluorescent Rosa26 reporter mouse line for Cre- and Flp-mediated recombination. *Neurosci. Res.* 73, 85-91
9. Imayoshi, I., Tabuchi, S., Hirano, K., Sakamoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., Yamanaka, A., and Kageyama, R. (2012) Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR2.0.

- Neurosci. Res.
10. Liang, B., Hara, T., Wagatsuma, K., Zhang, J., Maki, K., Miyachi, H., Kitano, S., Yabe-Nishimura, C., Tani-Ichi, S., and Ikuta, K. (2012) Role of hepatocyte-derived IL-7 in maintenance of intrahepatic NKT cells and T cells and development of B cells in fetal liver. *J. Immunol.* 189, 4444-4450
 11. Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M and Fujit J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 432: 22-27.
 12. Sakurai T, Kudo M, Watanabe T, Itoh K, Higashitsuji H, Arizumi T, Inoue T, Hagiwara S, Ueshima K, Nishida N, Fukumoto M and Fujita J. Hypothermia Protects against Fulminant Hepatitis in Mice by Reducing Reactive Oxygen Species Production. (2013) *Dig. Dis.*, 31: 440-446.
 13. Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., and Kageyama, R. (2013). Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science* 342, 1203-1208.
 14. Kuroki, S., Akiyoshi, M., Tokura, M., Miyachi, H., Nakai, Y., Kimura, H., Shinkai, Y., and Tachibana, M. (2013) JMJD1C, a JmjC Domain-Containing Protein, Is Required for Long-Term Maintenance of Male Germ Cells in Mice. *Biol. Reprod.*
 15. Kuroki, S., Matoba, S., Akiyoshi, M., Matsumura, Y., Miyachi, H., Mise, N., Abe, K., Ogura, A., Wilhelm, D., Koopman, P., Nozaki, M., Kanai, Y., Shinkai, Y., and Tachibana, M. (2013) Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase Jmjd1a. *Science.* 341, 1106-1109
 16. Tani-Ichi, S., Shimba, A., Wagatsuma, K., Miyachi, H., Kitano, S., Imai, K., Hara, T., and Ikuta, K. (2013) Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 612-617
 17. Deguchi, K., Nagamatsu, G., Miyachi, H., Kato, Y., Morita, S., Kimura, H., Kitano, S., Hatada, I., Saga, Y., Tachibana, M., and Shinkai, Y. (2013) Posttranscriptional regulation of histone lysine methyltransferase GLP in embryonic male mouse germ cells. *Biol. Reprod.* 88, 36
 18. Huong le, T., Kobayashi, M., Nakata, M., Shioi, G., Miyachi, H., Honjo, T., and Nagaoka, H. (2013) In vivo analysis of Aicda gene regulation: a critical balance between upstream enhancers and intronic silencers governs appropriate expression. *PLoS One.* 8, e61433
 19. Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I. Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T and

Akashi K. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogenic engraftment. (2014) Exp. Hematol., 42: 163- 171.

〔学会発表〕(計1件)

第61回日本実験動物学会総会
「CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子
編集マウス作製の実際」宮地均、伊藤克彦、
他、20014。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 克彦 (ITO Katsuhiko)
京都大学 医学研究科 准教授
研究者番号: 90281097

(2) 研究分担者

宮地 均 (MIYACHI Hitoshi)
京都大学 ウイルス研究所 技術専門職
員
研究者番号: 90599200

(3) 連携研究者

該当なし