

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670191

研究課題名(和文)細胞間接着シグナルを利用した革新的ダイレクト・リプログラミング法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel direct reprogramming method using cell adhesion signal

研究代表者

千葉 英樹 (Chiba, Hideki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00295346

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)：本研究では、細胞間接着シグナルを利用した全く新しいダイレクト・リプログラミング法を開発し、分化転換の効率と精度の飛躍的向上を目指した。我々は、細胞間接着分子クラウジン-6 (Cldn6)が胚性幹細胞の上皮分化を誘導することを見出した。そこで、ヒトCldn1/2/3/4/5/6遺伝子を単離し、それらのレンチウイルス発現ベクターを作製した。ヒト・マウス線維芽細胞に各Cldn分子を単独であるいは組み合わせて導入したが、上皮様細胞への分化転換は認められなかった。また各Cldn分子は、肝細胞への分化転換が報告されている転写因子群による分化転換効率を向上させなかった。今後、更なる工夫を試みる予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we are trying to develop a novel direct reprogramming method using cell adhesion signal to improve the efficiency and accuracy of transdifferentiation. We discovered that a cell adhesion molecule claudin-6 (Cldn6) triggered epithelial differentiation of embryonal stem cells. Therefore, we isolate human Cldn1/2/3/4/5/6 genes and constructed their expression vectors. When human and mouse fibroblasts were transfected with either each Cldn vector or their combination, epithelial differentiation was not observed. Although the specific combination of transcription factors induced direct reprogramming from fibroblasts to hepatic cells as reported previously, expression of Cldns did not improve the efficiency of hepatic transdifferentiation. Further study is required to apply cell adhesion signal for direct reprogramming.

研究分野：実験病理学

キーワード：再生医学 細胞間接着

1. 研究開始当初の背景

皮膚線維芽細胞などの体細胞に特定の組み合わせの転写因子を導入することによって、目的の機能細胞を作り出す『ダイレクト・リプログラミング』が注目されている。本手法は迅速性に優れ、がん化リスクも低いため、新たなテーラーメイド医療や再生医療の切り札として期待されている。しかし、その分化転換の効率と精度の改善が重大な課題として残されている。例えば現状では、本法で得られた心筋様細胞、神経様細胞、マクロファージ様細胞では、分化の指標となるマーカー分子の発現が不十分であり、転換前の線維芽細胞マーカーの発現が残存していることが知られている。

我々は、最近、胎生期上皮組織で最も早期に発現する細胞間接着分子クロードイン-6 (Cldn6)に着目し、この単一の細胞間接着分子が胚性幹細胞の上皮分化を誘導することを突き止めた。そこで本研究では、細胞間接着シグナルを利用した全く新しいダイレクト・リプログラミング法を開発し、分化転換の効率と精度の飛躍的向上を目指そうという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題の申請時における当初の研究目的は、細胞間接着シグナルを利用して、これまでにないダイレクト・リプログラミング法を創出することであった。具体的には、以下の二点を目的とした。

- (1) 特定の転写因子によるダイレクト・リプログラミングの効率と精度が、細胞間接着分子の共発現によって、飛躍的に改善されるかを *in vitro* と *in vivo* で明らかにする。
- (2) 細胞間接着シグナルと内因性・外因性転写因子とのクロストーク機構を解明する。

3. 研究の方法

- (1) ヒト Cldn1, Cldn2, Cldn3, Cldn4, Cldn5, Cldn6 cDNA を単離した。
- (2) これらの分子の N 末に GFP または Cherry を融合させた発現ベクターを作製した。また、これらの分子の N 末に 3xHA tag を付加した発現ベクターも構築した
- (3) (2) で作製した発現ベクターを HEK293T に導入し、各 Cldn 分子の発現を確認した。
- (4) マウス・ヒト線維芽細胞への発現導入を目的に、各分子のレンチウイルスベクターを作製した。

- (5) 作製したレンチウイルスベクターとウイルス粒子構造タンパク質を発現するベクターを HEK293T に導入した。

- (6) ヒト・マウス線維芽細胞を培養し、(4) で得られた各 Cldn 分子を発現するウイルス液を感染させた。

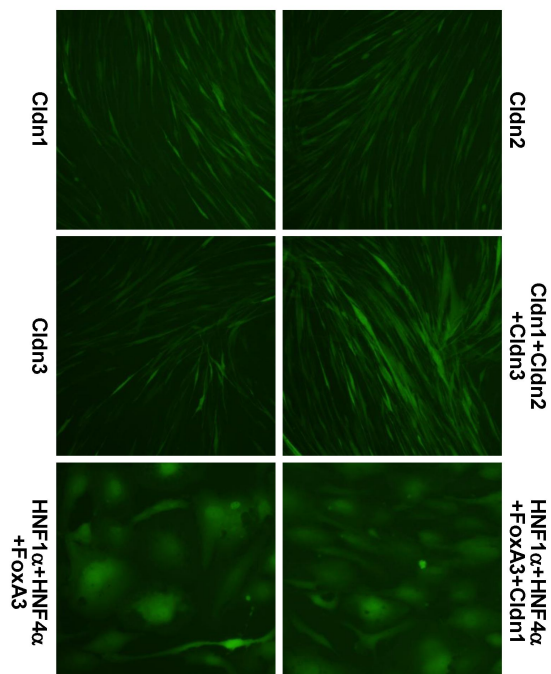
- (7) 肝細胞へのダイレクト・リプログラミングが報告されている転写因子群 (HNF1alpha, HNF4alpha, FoxA3) をクローニングし、ウイルス発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターをヒト線維芽細胞に導入した。

- (8) 上記転写因子発現ベクターと Cldn 発現ベクターを組み合わせ導入し、肝細胞へのダイレクト・リプログラミングへの影響を検討した。

4. 研究成果

- (1) ヒト Cldn1, Cldn2, Cldn3, Cldn4, Cldn5, Cldn6 cDNA を単独あるいは組み合わせ、ヒト・マウス線維芽細胞に導入したが、上皮様細胞への分化転換は観察されなかった。
- (2) HNF1alpha, HNF4alpha, FoxA3 をどのようしたヒト線維芽細胞では既報通り、上皮様細胞への形態変化が認められた。
- (3) 各 Cldn 分子は、上記転写因子による分化転換効率を向上させなかった。

図 1. Cldn1/2/3 分子のダイレクト・リプログラミングの影響



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 10 件)

Shimizu H, Yamagishi S, Chiba H, Ghazizadeh M. Methionine aminopeptidase 2 as a potential therapeutic target for human non-small cell lung cancers. *Adv Clin Exp Med*, 25: 117-128, 2016.

Kaneko T*, Kanno C*, Ichikawa-Tomikawa N*, Kashiwagi K, Yaginuma N, Ohkoshi C, Tanaka M, Sugino T, Imura T, Hasegawa H, Chiba H. The liver X receptor reduces proliferation of human oral cancer cells by promoting cholesterol efflux via up-regulation of ABCA1 expression. *Oncotarget*, 6: 33345-33357, 2015. *: equal contribution to this paper.

Kataoka M, Ishibashi K, Kumagai S, Yanagida T, Aikawa K, Chiba H, Kojima Y. Expression and function of lysophosphatidic acid receptor 1 in bladder cancer. *J Urol*, 194: 238-244, 2015.

Tanaka M, Ichikawa-Tomikawa N, Shishito N, Nishiura K, Miura T, Hozumi A, Chiba H, Yoshida S, Ohtake T, Sugino T.

Co-expression of S100A14 and S100A16 correlates with a poor prognosis in human breast cancer and promotes cancer cell invasion. *MBC Cancer*, 15:53, 2015.

Morhayim J, van de Peppel J, Demmers JA, Kocer G, Nigg AL, van Driel M, Chiba H, van Leeuwen JP. Proteomic signatures of extracellular vesicles secreted by nonmineralizing and mineralizing human osteoblasts and stimulation of tumor cell growth. *FASEB J*, 29: 274-285, 2015.

富川直樹, 杉本幸太郎, 柏木維人, 田中瑞子, 井村徹也, 千葉英樹. 細胞接着装置 - 構造・機能と疾患との関わり -. *病理解と臨床*, 32: 563-568, 2014.

Sakamoto M, Ieki N, Miyoshi G, Mochimaru D, Miyachi H, Imura T, Yamaguchi M, Fishell G, Mori K, Kageyama R, Imayoshi I. Continuous postnatal neurogenesis contributes to formation of the olfactory bulb neural circuits and flexible olfactory associative learning. *J Neurosci*, 34: 5788-5799, 2014.

Seki T, Sato T, Toda K, Osumi N, Imura T, Shioda S. A distinctive population of Gfap-expressing neural progenitors arising around the dentate notch migrate and form the granule cell layer in the developing hippocampus. *J Comp Neurol*, 522: 261-283, 2014.

末梢神経損傷に対する脂肪由来幹細胞移植治療の可能性. 素輪善弘, 井村徹也, 岸

田綱郎, 沼尻敏明, 松田 修, 西野健一. 創傷, 5, 158-165, 2014

Ning L, Kurihara H, Vega S, Ichikawa-Tomikawa N, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E. Laminin $\alpha 1$ regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF β pathway. *Am J Pathol*. 2014. 184 (6):1683-94.

[学会発表](計 13 件)

富川直樹, 柏木維人, 杉本幸太郎, 千葉英樹. クローデイン-6 の上皮分化誘導シグナルには、Src と Blk が機能している. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋, 2015.

柏木維人, 富川直樹, 杉本幸太郎, 千葉英樹. 幹細胞の上皮分化誘導機構において、核内受容体と Cldn6 シグナルがタイト結合分子の転写活性化に与える影響. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋, 2015.

柳沼奈々絵, 富川直樹, 柏木維人, 杉本幸太郎, 千葉英樹. タイト結合分子クローデイン-4 の上皮分化誘導能の解析. 第 104 回日本病理学会総会 名古屋, 2015.

富川直樹, 柏木維人, 杉本幸太郎, 千葉英樹. クローデイン-6 /Src ファミリーキナーゼシグナルは幹細胞の上皮分化を誘導する. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2015.

柏木維人, 富川直樹, 杉本幸太郎, 渡部哲也, 千葉英樹. 各種プロテインキナーゼ阻害剤を用いた、幹細胞における細胞間接着シグナル-核内受容体クロストーク機構の解明. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2015.

富川直樹, 柏木維人, 杉本幸太郎, 渡部哲也, 千葉英樹. 細胞間接着シグナルと核内受容体のクロストークによる幹細胞の新規上皮分化機構. 第 66 回日本細胞生物学会大会, 奈良, 2014.

Tetsuya Watabe, Naoki Ichikawa -Tomikawa, Kotaro Sugimoto, Korehito Kashiwagi, Hideki Chiba .

Claudin-6-mediated adhesion signal controls stem cell fate via Src-family kinases . 第 66 回日本細胞生物学会大会, 奈良, 2014.

柳沼奈々絵, 富川直樹, 柏木維人, 杉本幸太郎, 千葉英樹. タイト結合分子クローデイン-4 の上皮分化誘導能の解析. 第 103 回日本病理学会総会 広島, 2014.

渡部哲也, 富川直樹, 柏木維人, 杉本幸太郎, 千葉英樹. クローデイン-6 と Src-family kinases の相互作用は幹細胞の上皮分化を誘導する. 第 103 回日本病理学会総会 広島, 2014.

田中瑞子, 穴戸奈美子, 富川直樹, 千葉英樹, 杉野隆. S100A14・A16 の発現は

乳癌の不良な予後と相関し、乳癌細胞の浸潤を促進する。第 103 回日本病理学会総会 広島, 2014.

富川直樹、柏木維人、杉本幸太郎、渡部哲也、千葉英樹。クローデイン-6 による上皮分化誘導シグナルに關与する src family kinase 分子の同定。第 103 回日本病理学会総会 広島, 2014.

柏木維人、富川直樹、杉本幸太郎、渡部哲也、千葉英樹。幹細胞の運命決定における細胞間接着シグナルと核内受容体の新規クロストーク機構。第 103 回日本病理学会総会 広島, 2014.

菅野千敬、富川直樹、金子哲治、田中瑞子、柏木維人、井村徹也、杉野隆、千葉英樹。LXR アゴニストはコレステロール排出を促進して扁平上皮癌細胞の細胞増殖を抑制する。第 103 回日本病理学会総会 広島, 2014.

柏木 維人 (KASHIWAGI KOREHITO)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80468587

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：Inhibitor of Hepatitis C virus infection
発明者：富川直樹、千葉英樹、岡井研、大平弘正
番号：特許 2015-199019
出願年月日：2015 年 10 月 7 日
国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.fmu.ac.jp/home/p2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 英樹 (CHIBA HIDEKI)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：00295346

(2) 研究分担者

井村 徹也 (IMURA TETSUYA)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00405276

富川 直樹 (TOMIKAWA NAOKI)
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：80468587

田中 瑞子 (TANAKA MIZUKO)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：40583638