

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860365

研究課題名(和文) iPS細胞樹立過程には組織ごとの特異的ルートがあるのか

研究課題名(英文) Tissue-specificity in the reprogramming process.

研究代表者

有岡 祐子 (ARIOKA, YUKO)

名古屋大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10709497

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)：iPS細胞の樹立過程が発生の逆戻り過程、すなわち「終末分化細胞 組織幹細胞/前駆細胞 多能性幹細胞」を辿っているかは明らかにされていない。本研究では、対象組織を毛包細胞として、毛包細胞からのiPS細胞樹立過程を解析した。iPS細胞樹立過程において、一部毛包幹細胞マーカー(Lgr5)を発現する細胞集団の存在を認めた。しかし、これらは本来の毛包幹細胞とは性質が異なっていた。一方で、Lgr5を一過性に発現する細胞集団は、その後効率よくiPS細胞へと初期化されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：It remains unclear whether the reprogramming process shows the opposite direction of the development (differentiated cells tissue stem cells/progenitor cells iPS cells). To address this, we investigated the reprogramming process using hair follicles. Some cells transiently exhibited the hair follicle stem cell marker (Lgr5); however, the Lgr5-positive cells were unlike native ones. On the other hand, we found that the Lgr5-positive cells were efficiently converted into iPS cells.

研究分野：幹細胞学

キーワード：iPS細胞 体細胞初期化過程 組織幹細胞 組織特異性

1. 研究開始当初の背景

我々哺乳類は、「多能性幹細胞 組織幹細胞/組織前駆細胞 終末分化細胞」とう、組織特異的な発生過程を辿って受精卵から各組織へと成熟していく。これに対して、iPS細胞作製技術は、分化細胞から多能性幹細胞への初期化を可能にした。しかし、このiPS細胞樹立過程が発生の逆戻り過程、すなわち、「終末分化細胞 組織幹細胞/組織前駆細胞 多能性幹細胞 (= iPS細胞)」の経路を辿るかは明らかにされていない。一方で、iPS細胞作製技術を利用して、分化細胞から前駆細胞や組織幹細胞作製の試みがおこなわれており(引用文献 ) iPS細胞樹立過程(初期化過程)において、組織特異的な指向性を示す経路の存在が示唆される。

2. 研究の目的

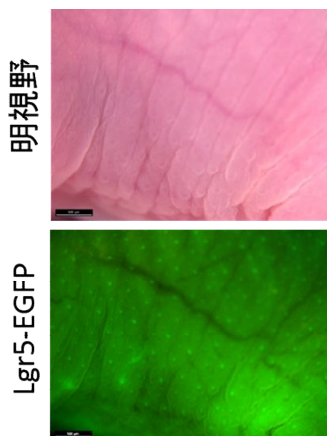
(1) iPS細胞の樹立過程に組織ごとの特異性や指向性があるかを明らかにする。組織幹細胞ステージを通過する細胞が存在するかどうか、また、組織幹細胞ステージ通過の有無でiPS細胞樹立効率に差があるかを調べる。

(2) (1)で特異性があった場合、疾患特異的な疾患由来細胞の場合に、iPS細胞樹立過程にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象組織

対象組織は毛包細胞とし、毛包細胞の分離は既存のプロトコルに従った(引用文献 )。毛包幹細胞マーカーとしてLgr5を利用した。研究協力者がすでにLgr5レポーターマウス(Lgr5-EGFP-IRES-CreERT2)を所有していたこと、かつ、Lgr5陽性毛包幹細胞の機能アッセイがすでに確立されていることが理由である(引用文献 )。本マウスは下図のとおり、新生児マウス表皮においてLgr5-EGFPシグナルを検出できる。



(2) マウス毛包細胞および胎児性線維芽細胞からの初期化誘導

生後0-2日目の新生児マウス(Lgr5レポーターマウス)から毛包細胞を分離した。フロ

ーサイトメーターを用いて、Lgr5陽性毛包細胞とLgr5陰性毛包細胞を分取し、レトロウイルスによる初期化誘導を実施した。胎児性線維芽細胞はE13.5-14.5胎児マウスから獲得した。

4. 研究成果

(1) 結果

Lgr5陽性毛包細胞は高効率に初期化される

まず、毛包幹細胞が含まれるLgr5陽性細胞だと初期化効率が高いのかどうかを確認するため、Lgr5陽性毛包細胞、Lgr5陰性毛包細胞、全毛包細胞(=Lgr5陽性細胞+Lgr5陰性細胞)の3群について、初期化誘導効率を比較した。アルカリフォスファターゼ染色陽性細胞の割合はLgr5陰性群で有意に多かった。(図1)しかし、初期化誘導効率の指標として多能性マーカー(NanogとSSEA1)の発現を確認したところ、Lgr5陽性毛包細胞を用いると高効率にNanog陽性かつSSEA1陽性細胞へと誘導されることが確認された(図2)。

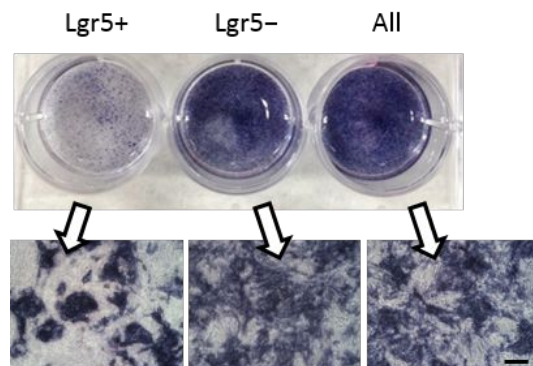


図1. アルカリフォスファターゼ染色結果

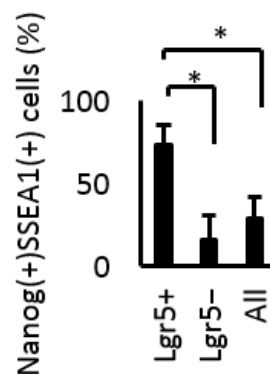


図2. Lgr5陽性毛包細胞(Lgr5+)とLgr5陰性毛包細胞(Lgr5-)の初期化効率比較

初期化誘導の過程でLgr5陰性毛包細胞から陽性細胞へ変化する細胞が存在する

次に、Lgr5陰性毛包細胞を初期化誘導した場合、Lgr5陽性ステージを通過する細胞がいるかを調べた。Lgr5陰性毛包細胞に初期化誘

導を実施すると、途中で GFP シグナル陽性 (= Lgr5 陽性) の細胞が一過性に出現した。しかし、その数は非常に少なく、GFP シグナル陽性細胞を十分量分取することが困難であった。同様に CreERT2 とタモキシフェンを利用した Lineage tracing を実施したところ、初期化の過程で、Lgr5 陰性毛包細胞から Lgr5 陽性ステージを通過する細胞の存在は明らかになったものの、やはりその数は非常に少ないことが明らかとなった (図 3)。

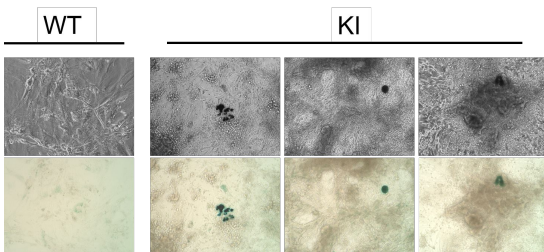


図 3 . 毛包細胞からの初期化過程における Lgr5 lineage tracing (WT:野生型マウス、KI:レポーターマウス)

胎児性線維芽細胞からの初期化誘導過程でも Lgr5 が一過性に発現する

Lgr5 は毛包幹細胞だけではなく、腎臓や肝臓等複数の組織幹細胞で発現していることが報告されている。毛包細胞でのさらなる検討は困難と判断し、組織特異性ではなく Lgr5 を種々の組織幹細胞マーカーとして捉え、他の組織からでも初期化過程の途中で Lgr5 陽性細胞が発現するかを確認した。初期化誘導が容易なマウス胎児性線維芽細胞を用いて検討したところ、初期化誘導して 10 日目頃から Lgr5 mRNA 発現の上昇と共に、Lgr5 陽性細胞 (= GFP 陽性) が出現することが明らかとなった (図 4)。胎児性線維芽細胞および iPS 細胞には Lgr5 は発現していないことから、初期化過程の中で一過性に Lgr5 陽性細胞が出現していると考えられた。

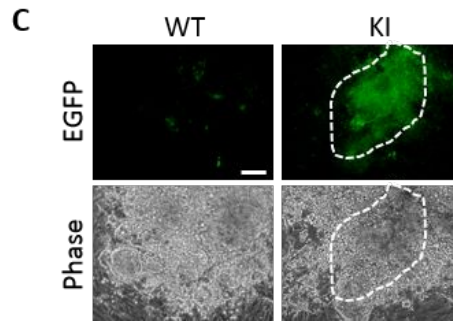
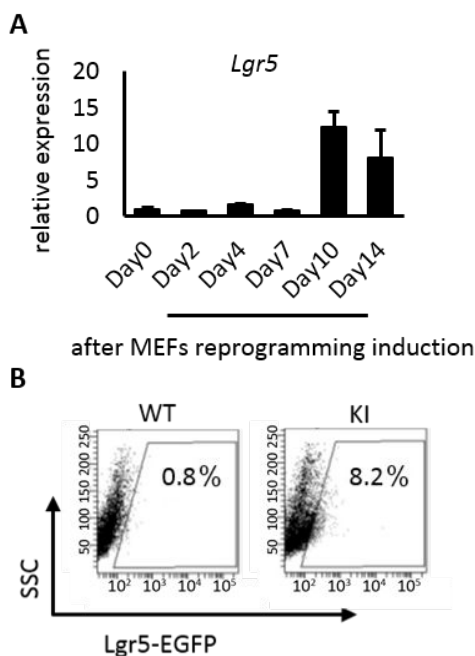


図 4 . 胎児性線維芽細胞からの初期化過程における Lgr5 陽性細胞の一過性発現 (A. 定量的 PCR による Lgr5 の mRNA 発現解析、B. フローサイトメーターによる Lgr5-EGFP 陽性細胞検出、C. 蛍光顕微鏡による Lgr5-EGFP 陽性細胞観察、WT:野生型マウス、KI:レポーターマウス)

胎児性線維芽細胞から一過性に発現した Lgr5 陽性細胞はその後効率よく初期化される

胎児性線維芽細胞の初期化過程において Lgr5 陽性ステージを通過した細胞と通過していない細胞で、その後の初期化効率に差があるかを調べるため、lineage tracing を実施した。Lgr5 陽性ステージ通過細胞 (= LacZ+) と通過しなかった細胞 (= LacZ-) をそれぞれフローサイトメーターにて分取し、フィーダー細胞上にて引き続き培養した。初期化の early マーカーであるアルカリフォスファターゼ 染色の結果、LacZ-にてより多くのアルカリフォスファターゼ 陽性コロニーが検出された。しかし、一方で、初期化の intermediate ~ late マーカーである Nanog 発現をみたところ、LacZ+にてより多くの Nanog 陽性コロニーが確認された (図 5)。

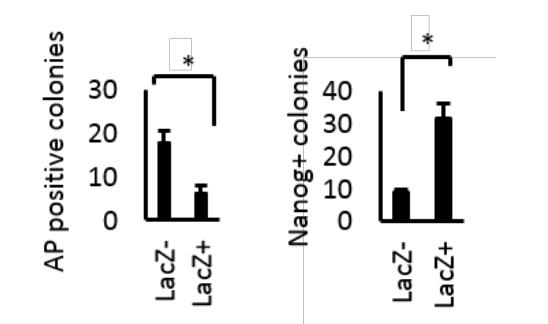


図 5 . Lgr5 陽性ステージ通過の有無による初期化効率の比較 (左:アルカリフォスファターゼ 染色陽性コロニー数、右: Nanog 陽性コロニー数、\*p<0.05)

Lgr5 そのものが初期化効率を高めるかを

調べるため、初期化誘導の過程で siRNA によって Lgr5 をノックダウンさせた。アルカリフォスファターゼ染色および Nanog 発現を解析したところ、Lgr5 発現低下による初期化への影響は認められなかった。

最後に、同様の解析を市販のヒト線維芽細胞を用いて実施した。マウスで得られた結果と同様に、初期化過程において一過性に Lgr5 陽性細胞が出現し、この一過性に出現した Lgr5 陽性細胞は、Lgr5 陰性細胞に比べると効率よく初期化されることが確認された(図6)。

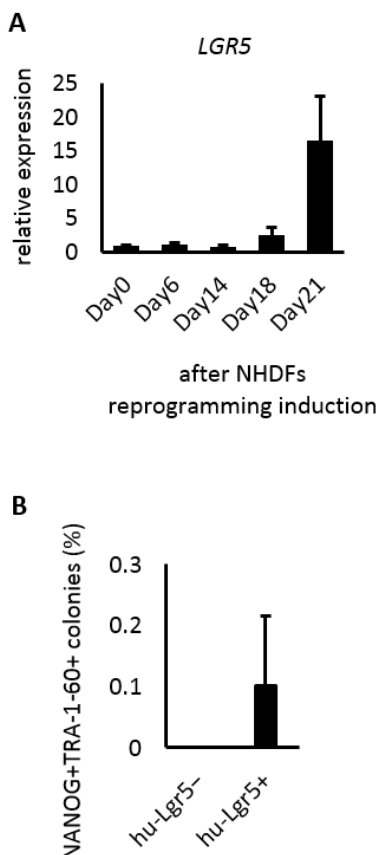


図6 ヒト線維芽細胞の初期化過程における Lgr5 陽性細胞の出現 (A. 定量 PCR による LGR5 mRNA 発現解析、B. Lgr5 陽性細胞と陰性細胞における初期化効率の比較)

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

初期化過程において Lgr5 を一過性に発現する細胞が存在し、Lgr5 陽性ステージを通過した細胞はその後効率よく iPS 細胞へと誘導されることが明らかとなった。これまで Lgr5 は組織幹細胞(あるいは前駆細胞)のマーカーのひとつとしてよく知られていたが、iPS 細胞樹立過程との関連は報告がされていなかった。本研究課題の成果により、iPS 細胞樹立過程における Lgr5 の新しい知見を与えることができたと考える。

(3) 今後の展望

ヒトでも同様の結果が得られたことから、

Lgr5 陽性細胞に着眼することで、効率良い iPS 細胞樹立方法開発への寄与が期待される。

<引用文献>

Masaki T et al.  
Cell., 2013, 152(1-2):51-67  
Ring KL et al.  
Cell Stem Cell., 2012, 11(1):100-9  
Lichti U et al.  
Nat Protoc., 2008, 3(5):799-810  
Jaks V et al.  
Nat Genet., 2008, 40(11):1291-9

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)

Yuko Arioka, Hiroyasu Ito, Akihiro Hirata, Katsunori Semi, Yasuhiro Yamada, Mitsuru Seishima. Behavior of leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5-expressing cells in the reprogramming process. Stem Cell Res., 2017, 20:1-9. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.scr.2017.01.012

[学会発表](計 0件)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有岡 祐子 (ARIOKA, Yuko)  
名古屋大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号: 10709497

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究

なし

(4) 研究協力者

山田 泰広 (YAMADA, Yasuhiro)  
京都大学・iPS細胞研究所・教授  
伊藤 弘康 (ITO, Hiroyasu)  
岐阜大学・医学系研究科・准教授