

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670100

研究課題名(和文)ダイレクトリプログラミングによる乳腺幹細胞の創出

研究課題名(英文)Generation of mammary stem cells by direct reprogramming

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)：分化した乳腺上皮細胞(MEC)を乳腺幹細胞へ脱分化することが報告されているSLUG/SOX9を一過的に過剰発現させるベクター系を構築し、発現させたMECから乳腺の再構築が確認されたが、効率が著しく悪かった。そこで、ドナーマウスをrtTA発現マウスに変更、乳腺幹細胞維持培養法の検討、高効率化遺伝子スクリーニング、を実施した。研究期間内に乳腺幹細胞維持培養法の確立に成功した。また、幹細胞性を評価可能なレポーターマウスを複製し、これらの技術を統合することにより簡便に効率よくスクリーニング可能となった。しかしながらまだ効率を著しく向上させるダイレクトリプログラミング制御因子の同定には至っていない。

研究成果の概要(英文)：We constructed gene expression vector systems, which allow transient expression of slug/sox9 genes known to force mammary epithelial cells to dedifferentiate into mammary stem cells. We observed, as reported, that slug/sox9 expressed MEC reconstituted proper mammary ducts when transplanted, although the efficiency was quite low. To solve this problem, we changed donor mice to those expressing rtTA, established culture technology for maintaining mammary stem cells (MaSC), and screened genes enhancing efficiency of dedifferentiation. Among them, we successfully established the MaSC culture technology. In addition, we newly produced a reporter mouse for stemness. With these technologies, we now established screening system of genes enhancing dedifferentiation, easily, rapidly, and efficiently. However, we have not yet discovered any new direct reprogramming genes strongly leading to produce MaSCs.

研究分野：分子生物学

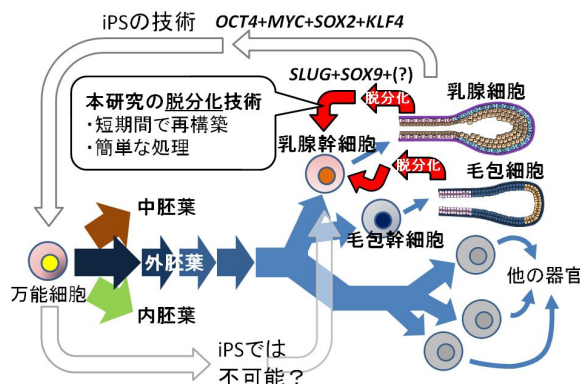
キーワード：幹細胞 細胞分化 組織形成 乳腺

1. 研究開始当初の背景

1年間に乳癌と診断される人は5万人をこえ、約1万人が死亡する。乳癌は比較的前後がよいが、乳房切除により患者のQOLは損なわれる。マウスの実験では乳腺幹細胞を移植すると、乳汁産生機能をもった完全な乳腺が再構築することが広く知られている。ヒトにおいても乳腺細胞集団の中に僅かに乳腺幹細胞が存在することが *in vitro* の系統解析と免疫不全マウスに異種移植した組織再構築実験から示されている。マウスにおいて *SLUG* と *SOX9* という2つの転写因子を強制発現させると、成熟した乳腺上皮細胞が乳腺幹細胞に脱分化することが報告された (Cell 148:1015, 2012)。しかし、ヒト乳腺幹細胞を人為的に創出する手法や、乳腺上皮以外の細胞からの直接的な乳腺幹細胞の作製技術は確立されていなかった。この技術の確立を目指すことで乳癌における再生医療への応用が期待された。

2. 研究の目的

あらゆる臓器に分化能を持つ多能性幹細胞の研究が行われているが、乳腺においても乳腺幹細胞が存在する。しかしその数はごく僅かであり、研究や医療への応用を阻んでいる。幹細胞を増やす技術に iPS 作製技術があるが、これは多細胞生物の最も初期に近い万能状態にまでリプログラミングしてしまうものである。目的の組織幹細胞へ分化させるためにはこの初期細胞から未解明な多段階の処理や多くの時間を必要とし、そのために質の悪い分化状態をもつ組織を作り出してしまう恐れがある。そこで、初期化を経由せず、組織特異的幹細胞までの、よりダイレクトな脱分化技術があれば乳腺再生医療につながる極めて有用な研究ツールとなることが予想された。本研究ではヒトの乳腺幹細胞を脱分化によって作製する技術の創出を目指し、そのために必要なマウス細胞を用いた既存の脱分化現象を効率化させる技術の開発や改良および未知な効率化因子の同定を目的とした。

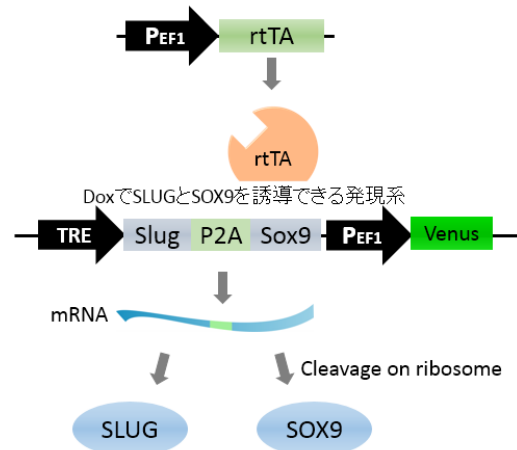


3. 研究の方法

(1) 一過的遺伝子発現システムの構築

マウス細胞で報告のある *Slug*、*Sox9* を同時に一過的に発現させることのできる vector システムを構築した。

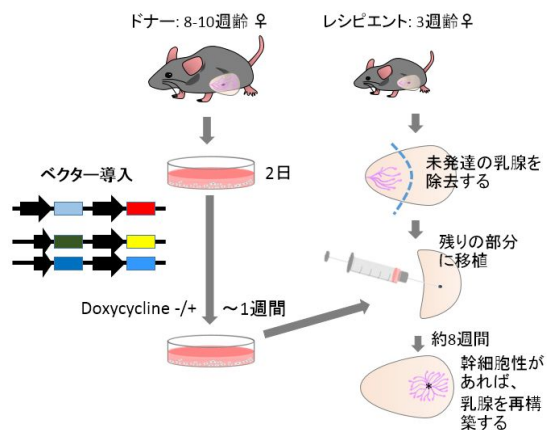
脱分化ベクターの作製



(2) マウスでの脱分化効率の検討

想定的に脱分化処理を行った細胞を3週齢レシピエントマウスの cleared-fat pad へ移植し、>8w 経過後に摘出して carmine 染色を行うことで乳腺の再構築の効率を検証した。

乳腺幹細胞性を調べる実験方法



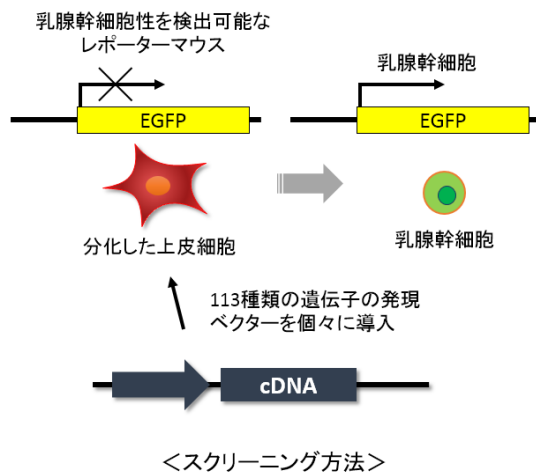
(3) 幹細胞維持培養法の確立

様々な文献情報により、間質系の細胞と混

合培養すると組織幹細胞の維持が可能になることが報告されていたため、幹細胞性をEGFPの発現によってレポートすることのできる新たに作製したマウスから乳腺幹細胞を含む乳腺上皮細胞を回収し、間質細胞や試薬の様々な混合条件の検討を行い、乳腺幹細胞の維持の高効率化が図れるかどうかを検討した。

(4) 脱分化効率化因子の探索

上記レポーター細胞に様々な脱分化候補遺伝子の発現ベクターを1つ1つ導入し、(3)で開発した新規培養法を用いてレポーターであるEGFPの発現が見られるかどうかをin vitroでの培養条件で観察した。



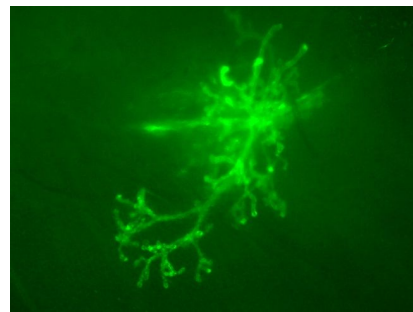
4. 研究成果

(1) 一過的遺伝子発現システムの構築

分化した乳腺上皮細胞を乳腺幹細胞へ脱分化させるとされるSLUGとSOX9の2つの遺伝子のレトロウイルスベクター一過的遺伝子発現システムを構築した。両遺伝子をP2Aペプチド配列で挟む工夫を施し、1つのベクターで2つの遺伝子を効率良く発現できることを確認した。

(2) マウスでの脱分化効率の検討

このvectorとrtTA発現vectorのウイルスを、マウスMammary epithelial cell(MEC)に共感染させ、その後にDoxを添加し、SLUGとSOX9の誘導発現を蛋白レベルで確認し、文献と同じmorphologyの変化を観察することができた。これらのMECを3週齢マウスのcleared fat-padに移植し、2ヶ月後に摘出したところ、効率は低いが乳腺の再構築が確認され、先行論文の再現性を確認することができた。しかしながらレトロウイルスベクター系はpackagingや濃縮において実験者への

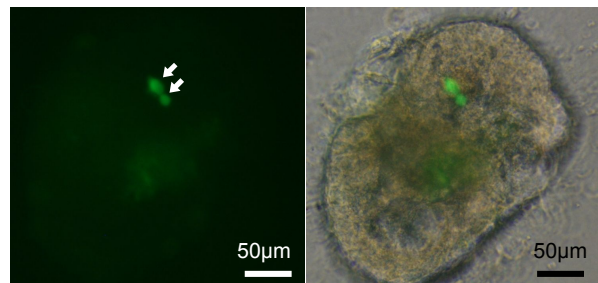


Slug/Sox9を乳腺上皮細胞へ発現させて再構築した乳腺

危険が伴い、導入までの培養時間がかかり、かつ効率もそれほど高くないことから、別のベクター系を開発する必要性があった。そこでpiggyBac transposon vectorおよびelectroporation法を組み合わせるシステムを着想し、これを構築した。また、rtTAを全身に発現するマウスをドナーに用いることで高効率化を図った。これらのベクターの設計・作製やelectroporationの設定の条件検討による最適化を行い、従来よりも時間と手間が著しく短縮され、かつ導入効率が改善された結果を得ることができた。

(3) 幹細胞維持培養法の確立

上記の幹細胞性を示すレポーター細胞を用いて幹細胞の維持を向上させる報告のある試薬、マトリゲル、様々な間質系の細胞株の組み合わせの条件検討を行ったところ、EGFPの発現を長期にかつ安定に持続させることのできる組成を導くことができた。レポーターであるEGFPの発現が見られる培養プレートから回収した細胞をcleared-fat padに移植したところ、乳腺を正しく構築したことから、これまでに報告のない新規な乳腺幹細胞の安定維持培養法を確立することができたと考えられる。



乳腺幹細胞安定維持培養技術の確立。7日間培養しても幹細胞性(幹細胞性レポーターによる緑色蛍光(矢印))を維持し、分裂も観察された。

(4) 脱分化効率化因子の探索

文献情報や各種データベースから任意に

選別された脱分化誘導候補遺伝子の発現ベクター113種類を個々にMECに導入したが、レポーター細胞のEGFPレポーター蛋白質の強い発現を示す遺伝子は存在しなかった。但しこの結果は(1)で開発された高効率なtransposon-electroporation法では無く、低効率なレトロウイルスベクター系を用いた結果であるため、それが原因で因子が同定できなかった可能性も否定できないものの、選別した遺伝子の中に単独では強い脱分化活性が含まれないこと、多数の因子の組み合わせが脱分化の効率化に必要な可能性、など様々な仮説を立てられることができた。また、レポーター細胞の極めて低いbackgroundレベルを確認することができた。一方iPS化4因子を同時に導入したものではありません。EGFPの発現を示したことから使用している細胞は幹細胞化の検出には問題ないと判断された。MECをiPS化したものではcleared fat-padに移植しても乳腺の再構築が起こらなかったことから、初期化まで誘導してしまうと分化能力を失うこと、多能性幹細胞を乳房組織環境に入れただけでは組織の再生は起こらず、何らかの分化プログラムが必要なが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

小林舜、遺伝子機能解析に用いるマウス乳腺組織構築系の開発、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

三上紘史、SLUGとSOX9による乳腺上皮細

胞の幹細胞化に伴うp53経路の活性化、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

伊原辰哉、発現制御可能な遺伝子改変マウス乳腺組織の作製、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

三上紘史、幹細胞化を利用したマウス乳腺への簡便なトランスジーン技術の確立、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔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〕
ホームページ：
<http://www.biomed.sci.waseda.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者
仙波 憲太郎 (SEMBA, Kentaro)
早稲田大学・先進理工学研究科・教授
研究者番号：70206663

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし