

# 細胞運命情報解析技術開発サブチーム

## Subteam for Manipulation of Cell Fate

チームリーダー 三好 浩之  
MIYOSHI, Hiroyuki

幹細胞は、自分自身を複製する能力（自己複製能）と体の組織や器官を形成する様々な細胞を作り出す能力（多分化能）を持つ未分化な細胞である。近年、この幹細胞を利用した再生医療が非常に期待されているが、その実現のためにはまず幹細胞の未分化性の維持、増殖、分化といった細胞の運命がどのようなメカニズムによって決定されているのかを明らかにすることが必要である。我々は、おもに造血幹細胞を研究対象として、どのような情報によって幹細胞の運命が決定されているのかを解明し、幹細胞の試験管内での人工操作を可能にするような技術開発を試みている。

### 1. 造血幹細胞における遺伝子発現解析（山口，形山，清水<sup>\*1</sup>，野田<sup>\*1</sup>，三好）

造血幹細胞においてどのような遺伝子が発現しているのかを知ることが、自己複製や多分化能維持のメカニズムを解明するうえで非常に有意義な情報であると思われる。これまでもマイクロアレイを使用した遺伝子発現解析が行われているが、それらの解析で使用している造血幹細胞の純度は必ずしも高くなかったり、また比較している対象も分化した血液細胞や他の幹細胞であったりと、必ずしも有益な情報とは言い難いものである。そこで、マウス骨髓より9種類のモノクローナル抗体とFACSを用いて、長期または短期の骨髓再構築が可能な造血幹細胞を高純度に単離し、これらの造血幹細胞の遺伝子発現プロファイルを比較するため、マイクロアレイ解析を行った。この解析によって得られた情報をもとに、造血幹細胞の自己複製や多分化能維持などに重要な役割を担っていると予想される遺伝子のcDNAあるいはsiRNA（small interfering RNA）をレンチウイルスベクターを用いて造血幹細胞に導入し、その遺伝子の機能解析を*in vitro*および移植による*in vivo*で行う予定である。

### 2. 組織幹細胞の可塑性とリプログラミングに関する研究

#### (1) 造血幹細胞の可塑性の検討（井上<sup>\*1</sup>，野田<sup>\*1</sup>，三好）

組織幹細胞は、生理的なターンオーバーや損傷によって失われた細胞を補充することにより各組織の恒常性を保っており、各組織幹細胞はその組織を構成する細胞への分化能のみを持つと考えられてきた。しかしここ数年、組織幹細胞には組織の枠を越えた分化能、すなわち可塑性が備わっていることを示す結果が次々と報告されている。組織幹細胞の可塑性を利用することにより、再生医療への応用も期待されている。そこで我々は昨年度より、マウス造血幹細胞の可塑性をクローナルに検討してきたが、その結果、造血幹細胞には可塑性はないか、あるとしても血球系以外の細胞への分化の頻度は極めて低いと考えられた。本年度は、腎機能不全モデルマウスを用いて、骨髓移植による腎機能再生効果の検討を行っている。

(2) 核移植による組織幹細胞のリプログラミングに関する研究（野田<sup>\*1</sup>，三好）

体細胞核移植クローン技術は、医療や畜産など多岐にわたる分野での応用が期待されている。しかしながら、体細胞クローン動物の産出率が極めて低いことやクローン動物に生じる様々な異常が大きな問題となっている。これらの問題を解決するためには、再プログラム化のメカニズムを明らかにし、正確でかつ効率のよい再プログラム化を行うための技術開発が必要である。そこで我々は、BRC 遺伝子工学基盤技術室との共同研究により、マウスの組織幹細胞を核ドナーとしたクローン胚あるいは個体を作出し、他の体細胞との発生効率の比較を行うことにより、組織幹細胞のクローン核ドナーとしての利用性と再プログラム化能力の評価を行い、リプログラミングのメカニズム解明の手がかりとなる研究を目指している。本年度は、成体マウスの骨髓より単離した造血幹細胞を核ドナーとしたクローン胚を作出し、卵丘細胞の場合と比較検討した。造血幹細胞は2 cell への発生率は卵丘細胞と同程度に高いものの、4 cell および胚盤胞への発生率は非常に低く、クローン産仔の産出率も非常に低かった。造血幹細胞は多分化能を持つ未分化な細胞であることから、終末分化した体細胞よりも再プログラム化され易いのではないかと予想されたが、その再プログラム化能力は予想に反して低いことが明らかとなった。今後、造血幹細胞クローン胚における遺伝子の発現解析を行うと同時に、終末分化した血球細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞を核ドナーとしたクローン胚も作出し、比較検討を行う予定である。

### 3. レンチウイルスベクターの基礎研究への応用（山口，形山，森川，清水<sup>\*1</sup>，伊藤<sup>\*1</sup>，Kim<sup>\*1</sup>，三好）

レンチウイルスベクターは、もともと非分裂細胞を標的とした遺伝子治療用のベクターとして開発されたが、遺伝子機能解析のためのベクターとして基礎研究においても非常に有用であると考えられる。そこで、レンチウイルスベクターを基礎研究に利用するために改良を行っている。各種幹細胞あるいは各組織の体細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入する際、導入遺伝子を効率よく発現させるためには、レンチウイルスベクターに組み込むプロモーターの選択が重要である。そこで、BRC 細胞材料開発室との共同研究により、マウスおよびサル ES 細胞における各種

プロモーターの発現効率を比較した結果、EF-1 $\alpha$  プロモーターの発現効率が最も高いことが分かった。また、BRC 遺伝子工学基盤技術室との共同研究により、レンチウイルスベクターを用いてマウス受精卵に遺伝子導入を行うことによりトランスジェニックマウスを作製し、各組織における各種プロモーターの発現効率を比較している。

昨年度開発した siRNA 発現レンチウイルスベクターによる遺伝子発現抑制の系を用いることにより、PPAR $\gamma$  遺伝子の発現抑制によって脂肪細胞への分化が抑制されることを示した。また、Tet 発現調節機構を利用して、siRNA 発現の On, Off の調節が可能なベクターを作製した。

#### 4. IgA 腎症における免疫グロブリン Fc $\alpha/\mu$ 受容体の機能解析 (宮本<sup>\*2</sup>, 三好)

IgA/IgM 抗体に対する Fc 受容体 Fc  $\alpha/\mu$ R は、免疫細胞に発現して病原微生物と IgA や IgM で構成される免疫複合体の細胞内取込みに関与することが報告されており、生体防御機構での重要性が示唆されてきた。一方、Fc  $\alpha/\mu$ R の発現は、免疫細胞の他、腎臓でも認められる。慢性糸球体腎炎の主因である IgA 腎症は、腎糸球体メサンジウム領域への IgA 沈着が認められ、腎炎発症の要因であると考えられている。そこで我々は、IgA 腎症において Fc  $\alpha/\mu$ R タンパクの機能異常が生じている可能性を明らかにする目的で解析を行っている。まず、マウスおよびヒトの腎臓 mRNA から、既知 Fc  $\alpha/\mu$ R mRNA のスプライシングバリエーションと推測される数種の cDNA クローンを同定し、これらバリエーションの発現様式を解析している。さらに、IgA 腎症では Fc  $\alpha/\mu$ R が存在しないために IgA 産生の制御が行われず、結果として過剰な IgA の沈着が引き起こされると考え、Fc  $\alpha/\mu$ R 遺伝子欠損マウスを作製し、腎臓の組織学的・分子生物学的解析を行っている。

\*1 研修生, \*2 基礎科学特別研究員

Stem cells are defined as undifferentiated cells capable of making identical copies of themselves and giving rise to specialized cells that make up the tissues and organs of the body. The potential use of stem cells for regenerative therapy is enormous, but before they can be used clinically, the mechanisms that regulate their proliferation and differentiation must be clarified. We are studying to identify the signals that control hematopoietic stem cell fate and hope to develop technologies for manipulating stem cells in vitro.

#### 1. Gene expression analysis of hematopoietic stem cells

Gene expression profiling of hematopoietic stem cells (HSCs) would be worthwhile to elucidate the regulatory mechanisms of self-renewal and preservation of multilineage differentiation potential of HSCs. We have carried out gene expression profiling by microarray in rigorously purified long-term self-renewing HSCs (LT-HSCs) and short-term self-renewing HSCs (ST-HSCs). Genes that seem to play an important role in self-renewing HSCs will be analyzed by transferring cDNA or siRNA (small interfering RNA) of corresponding genes into HSCs using lentiviral vectors.

## 2. Studies on the plasticity and reprogramming of tissue-specific stem cells

### (1) Plasticity of hematopoietic stem cells

In many adult tissues, self-renewing multipotent stem cells are maintained and serve to replace cells that have a limited life span or to regenerate cells after injury. Such tissue-specific stem cells were believed to be limited to generate the specific types of cells present in the tissue in which the stem cell resides. However many recent reports have suggested that tissue-specific stem cells can transdifferentiate into other cell types. To determine whether HSCs have plasticity, a single HSC from GFP transgenic mice was transplanted into lethally irradiated non-transgenic mice and analyzed various tissues from engrafted recipients. GFP-positive cells were hardly detected in the non-hematopoietic cells analyzed. Our results indicate that transdifferentiation of HSCs into nonhematopoietic cells is an extremely rare event even if HSCs have plasticity. We are now evaluating the therapeutic effect of bone marrow transplantation on renal failure of mice carrying mutant mitochondrial DNA.

### (2) Reprogramming of tissue-specific stem cells by nuclear transfer

Cloning by nuclear transfer has enormous potential applications. However, somatic cell cloning has been inefficient and developmental abnormalities are frequently observed. So far ES cells have proven to be the most effective cell type for somatic cloning. It has been therefore suggested that tissue-specific stem cells may serve as efficient nuclear donors. To address this issue, we performed nuclear transfer using HSCs as donors. The results showed that the cloning efficiency of HSCs was lower than that of the differentiated somatic cell types tested. HSC nuclei may rarely be reprogrammed on transfer into the oocyte.

## 3. Development of lentiviral vectors for basic research

Lentiviral vectors have been developed for gene therapy targeting nondividing cells. We have made several modifications to lentiviral vectors for use in basic research. It is important to choose an optimal promoter for transgene expression. We have shown that lentiviral vectors are capable of efficient gene transfer into mouse and monkey ES cells and the EF-1 $\alpha$  promoter facilitates efficient expression of the GFP transgene. We have generated transgenic mice by injecting lentiviral vectors with several promoters into the perivitelline space of single-cell embryos, and analysis of each promoter activity in various tissues is now in progress.

Using siRNA expressing lentiviral vectors, we have shown that downregulating PPAR $\gamma$  gene expression resulted in inhibition of preadipocyte-to-adipocyte differentiation. To facilitate tetracycline-regulated expression of siRNA, we have constructed lentiviral vectors containing the tetracycline operator site in the H1 promoter and the tetracycline repressor gene.

## 4. Functional analysis of Fc $\alpha/\mu$ receptor in IgA nephropathy

Fc  $\alpha/\mu$ R, which binds both IgM and IgA, is expressed on the majority of immune cells and is involved in the primary stages of the immune response to microbes. Therefore, Fc  $\alpha/\mu$ R may play an important role in the initial stages of immunity. Fc  $\alpha/\mu$ R is also detected in non-hematopoietic organs including the kidney. IgA nephropathy is the most common form of glomerulonephritis, leading to progressive renal failure in almost one third of pa-

tients. The disease is characterized by mesangial deposits of IgA, though the pathogenesis of IgA nephropathy remains unknown. Accordingly, we examined the potential function of Fc  $\alpha/\mu$ R leading to IgA nephropathy. First, we identified isoforms of Fc  $\alpha/\mu$ R that may have several functions in kidney. Subsequently, we have generated mice lacking the Fc  $\alpha/\mu$ R gene, and histological and molecular analysis of the kidney in Fc  $\alpha/\mu$ R-deficient mice is now in progress.

## Staff

### Head

Dr. Hiroyuki MIYOSHI

### Members

Dr. Kazufumi KATAYAMA  
Dr. Tomoyuki YAMAGUCHI  
Dr. Akitomo MIYAMOTO<sup>\*1</sup>  
Ms. Azusa MORIKAWA<sup>\*2</sup>  
Ms. Hiromi SHINGAI<sup>\*3</sup>

---

<sup>\*1</sup> Special Postdoctoral Researcher

<sup>\*2</sup> BioResource Technical Staff

<sup>\*3</sup> Assistant

### in collaboration with

Dr. Atsuo OGURA (Bioresour. Eng. Div., BRC)  
Dr. Yukio NAKAMURA (Cell Eng. Div., BRC)  
Dr. Takashi HIROYAMA (Cell Eng. Div., BRC)  
Dr. Kimiko INOUE (Bioresour. Eng. Div., BRC)  
Ms. Narumi OGONUKI (Bioresour. Eng. Div., BRC)  
Ms. Hiromi MIKI (Bioresour. Eng. Div., BRC)

### Trainees

Mr. Shin-ichi INOUE (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
Ms. Yuki ITO (Grad. Sch. Compr. Hum. Sci., Univ. Tsukuba)  
Ms. Si-Nae KIM (Grad. Sch. Life Sci. Biotech., Pochon CHA Univ., KOREA)  
Mr. Shin-ichi NODA (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)  
Ms. Natsumi SHIMIZU (Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

## 誌 上 発 表 Publications

### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

Ojima K., Uezumi A., Miyoshi H., Masuda S., Morita Y., Fukase A., Hattori A., Nakauchi H., Miyagoe-Suzuki Y., and Takeda S.: “Mac-1<sup>low</sup> early myeloid cells in the bone marrow-derived SP fraction migrate into in-

jured skeletal muscle and participate in muscle regeneration”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**, 1050–1061 (2004). \*

Soda Y., Tani K., Bai Y., Saiki M., Chen M., Izawa K., Kobayashi S., Takahashi S., Uchimaru K., Kuwabara T., Warashina M., Tanabe T., Miyoshi H., Sugita K., Nakazawa S., Tojo A., Taira K., and Asano S.: “A novel maxizyme vector targeting a *bcr-abl* fusion gene induced specific cell death in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia”, *Blood* **104**, 356–363 (2004). \*

Gyobu H., Tsuji T., Suzuki Y., Ohkuri T., Chamoto K., Kuroki M., Miyoshi H., Kawarada Y., Katoh H., Takeshima T., and Nishimura T.: “Generation and targeting of human tumor-specific Tc1 and Th1 cells transduced with a lentivirus containing a chimeric immunoglobulin T-cell receptor”, *Cancer Res.* **64**, 1490–1495 (2004). \*

Katayama K., Wada K., Miyoshi H., Ohashi K., Tachibana M., Furuki R., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakajima A., Kadowaki T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kamisaki Y., and Mayumi T.: “RNA interfering approach for clarifying the PPAR $\gamma$  pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA”, *FEBS Lett.* **560**, 178–182 (2004). \*

Miyagishi M., Sumimoto H., Miyoshi H., Kawakami Y., and Taira K.: “Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells”, *J. Gene Med.* **6**, 715–723 (2004). \*

Kawano Y., Yoshida T., Hieda K., Aoki J., Miyoshi H., and Koyanagi Y.: “A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death”, *J. Virol.* **78**, 11352–11359 (2004). \*

Nishitsuji H., Ikeda T., Miyoshi H., Ohashi T., Kannagi M., and Masuda T.: “Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells”, *Microbes Infect.* **6**, 76–85 (2004). \*

Sumimoto H., Miyagishi M., Miyoshi H., Yamagata S., Shimizu A., Taira K., and Kawakami Y.: “Inhibition of growth and invasive ability of melanoma by inactivation of mutated BRAF with lentivirus-mediated RNA interference”, *Oncogene* **23**, 6031–6039 (2004). \*

Sumimoto H., Yamagata S., Shimizu A., Miyoshi H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miyagishi M., Taira K., and Kawakami Y.: “Gene therapy for human small-cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference”, *Gene Ther.* **12**, 95–100 (2005). \*

(総 説)

Miyoshi H.: “Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors”, *Methods in Molecular Biology*

246, 429–438 (2004).

[単行本・Proc.]

(総説)

三好浩之: “Flow-FISH 法によるテロメア長の測定”, 細胞工学別冊: フローサイトメトリー自由自在, 秀潤社, 東京, pp. 147–151 (2004).

三好浩之: “遺伝子導入法 (レンチウイルスベクター)”, 実験医学別冊: 免疫学的プロトコール, 羊土社, 東京, pp. 127–137 (2004).

#### □ 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Noda S., Kim J., Aoki F., Miyoshi H., and Ogura A.: “Development of embryos cloned from hematopoietic stem cells”, 37th Ann. Meeti. Soc. of the Study of Reproduction, (University of British Columbia)), Vancouver, Canada, Aug. (2004).

(国内会議)

井上貴美子, 越後貫成美, 三木洋美, 野田慎一, 金慎文, 青木不学, 三好浩之, 小倉淳郎: “造血幹細胞をドナーとしたクローン胚発生効率の検討”, 第 51 回日本実験動物学会総会, 長崎, 5 月 (2004).