

# 幹細胞研究グループ

## Laboratory for Stem Cell Biology

グループディレクター 西川 伸一

NISHIKAWA, Shin-Ichi

多細胞生物発生過程における細胞社会と個々の細胞の関係性について理解することを主要目的としている。このため、幹細胞システムと中胚葉発生過程を対象に選り研究を行う。成熟個体においては様々な幹細胞システムが成立している。そこでは、幹細胞の増殖と分化がまわりをとりまく微小環境により厳密に調節されている。最も未熟な幹細胞を支える微小環境は特別にニッチと呼ばれ、研究が続いているがその実態は分かっていない。我々は、毛根とそこに存在する色素細胞に焦点をあて、ニッチの細胞学的、分子生物学の実態を研究し、幹細胞全般に共通の原理を探る。一方、ES細胞分化培養を用いて、中胚葉細胞の分化についても研究を行う。中胚葉分化は body organization に従って形成される様々な分泌分子のネットワークにより調節されると考えられ、その方向での研究が盛んであるが、細胞を完全に生態から切り離して分化を操作できるかについて研究するとともに、血管や血液など代表的中胚葉系細胞の分化機構を明らかにする。

1. 幹細胞の活性化機構に関する研究（大沢，吉田，森山，麥，西川（伸））

色素細胞は毛根内で独立の幹細胞システムを形成することで coat color を維持している。色素細胞は毛根内の bulge region と hair matrix の2箇所存在を認めるが、このうち毛根の bulge 領域に存在する色素細胞が最も未熟な幹細胞であることを証明した。更に、いったん活性化された幹細胞が、ニッチに再度会うことで元の幹細胞へ戻れることも明らかにした。この結果は、これまで考えられてきた不当分裂や、幹細胞増幅などの幹細胞活性が様式以外の幹細胞システムを構想できることを示している。本年は、色素細胞間細胞システムがどの様式で維持されるのかを調べた。まず、共焦点顕微鏡を用いて幹細胞と活性化後の細胞を区別できるマーカー分子を確定した。このマーカーを用いて、ヘアサイクル各期の色素細胞を調べ、色素細胞システムでは幹細胞が活性化されると全ての細胞が一度は活性期に入り、決して幹細胞が自己再生するわけではないこと、代わりに活性化した細胞の一部がニッチに入って、もう一度幹細胞に戻るといふこれまで考えてこられなかった様式をとる幹細胞システムであることが明確になった。

この様式を支える分子機構を明らかにするためには、幹細胞特異的に発現している分子を同定することが重要であるが、このために幹細胞や活性化細胞を1個ずつ採取し、single cell cDNA ライブラリーの作成するプロジェクトに従事している。これを可能にするために、(1)色素細胞を残したまま毛根を採取する方法の確立、(2)色素細胞が GFP で特異的に標識されたマウス系統の樹立、(3)ゲノム DNA の増幅が全く起こらない RT-PCR 方法の確立を行った。こ

れと平行して、色素細胞特異的、タモキシフェン誘導的に遺伝子ノックアウトを行うためのマウスの開発を行っている。

2. ES細胞を用いた中胚葉誘導機構の研究（江良，古沢\*，河崎，西川（里）桜井，武部，多田，幸谷，西川（伸））

我々は中胚葉系幹細胞の分化、増殖を分子レベルで解明するために In vitro ES cell differentiation システムを用いて解析を進めている。In vitro での胚性幹細胞（ES細胞）分化システムは、哺乳類での発生メカニズムを研究するための優れたモデルシステムの1つといえる。個体レベルの研究の多くが細胞を1つの集団として、その位置に基づき解析を行うのに対し、このシステムでは1つひとつの細胞をそれぞれ個々の細胞レベルで解析できる。さらに、任意の時期に分化中間段階の細胞を同定して分化能力をリアルタイムでモニタリングしたり、生化学的な解析、あるいは遺伝子ライブラリーの作成に耐えうる十分な細胞数を cell sorting を用いて純化することができる。ES細胞の段階で簡単に遺伝子を外部から操作することによって、遺伝子を強制的に発現させたり、また逆に欠損させたりすることも可能である。本研究の目的は中胚葉系幹細胞を可視化、同定し、その分化と自己複製のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにすることにある。

Day7.5 の mouse embryo では PDGF  $\alpha$ R が paraxial mesoderm と extraembryonic endoderm に、また FLK1 が lateral mesoderm と extraembryonic mesoderm に発現することが判明している。さらに E-cadherin は ectoderm と endoderm cell で強く発現している。この発現を利用して、ES細胞から分化してきたそれぞれの中胚葉 subpopulation を精製し、PCR で代表的遺伝子の発現を調べた。Paraxial mesoderm 特異的に発現する bHLH family の転写因子である Mesogenin は、PDGF  $\alpha$ R 陽性 E-Cadherin 弱陽性分画のみで特異的に発現し、lateral and extraembryonic mesoderm 特異的に発現する forkhead family の転写因子である HFH-8 は、PDGF  $\alpha$ R 陰性 FLK1 陽性分画に発現していた。この結果は ES細胞培養においてそれぞれの中胚葉 subpopulation が確かに誘導、精製されたことを意味している。

こうして純化した細胞の運命が決定されているのか、また未熟な ES細胞を完全に除去できるのかを調べる目的で、免疫不全マウスの皮下、あるいは腎臓皮膜下への移植（*In vivo* でのアッセイ）を行っている。現在、筋肉、骨、軟骨へに運命決定した前駆細胞の純化に成功している。これと平行し、側版中胚葉と傍軸中胚葉への分化を比較的早い lineage specification のステップとして捉え、両者の遺伝子発現プロファイリングを2つの方法で進めている。まず、両者の違いの基礎データを得るために、それぞれから調整した cDNA

同士で差し引いた library (Subtraction Library) を作成するし、いくつかの興味ある遺伝子についてはノックアウトマウスを中心にその機能解析を進めている。もう 1 つの方法としてアフィメトリックスの DNA アレーを用いてそれぞれの細胞を解析した。現在それぞれの系列に特異的遺伝子を同定し、その中に存在する新規遺伝子について in situ hybridization で発現プロファイルを調べると同時に、それぞれの遺伝子についてノックアウトマウス、ES 細胞へのトランスフェクションを行い機能解析を進めている。

これまでの研究では、残念ながら axial mesoderm が全くカバーされていなかった。これは適当な表面マーカーを得られなかったためである。この細胞を標識するために、goosecoid 遺伝子に GFP をノックインした ES 細胞を作成し、axial mesoderm の誘導条件を検討した。これまでの培養法では、axial mesoderm はただか 2~3% しか誘導されなかったが、新しい無血清培地を様々な増殖因子と組み合わせることにより、80~90% の細胞が GFP 陽性であるという条件を確立した。同じ培地を使っても lateral mesoderm, paraxial mesoderm はそれぞれ 20% 程度誘導される条件しか確立していない。このように、axial mesoderm 誘導条件が決定したことで、mesoendoderm の分化として興味をもたれている、notochord と definitive endoderm の分岐点を調節する分子機構や、再生医療で重要な内胚葉の分化を段階的に研究する方法が確立したといえる。

中胚葉誘導における細胞接着の役割についても研究を続けた。昨年度の研究で、E-cadherin による細胞同士の接着が中胚葉細胞誘導には必要で、一種の community effect が存在することを明らかにした。この研究では当面この E-cadherin による細胞接 ES 細胞に E-cadherin 以外の様々な接着分子を導入し、その分化を調べる実験系を構築した。特に Tet-inducible に VE-cadherin を発現させる系を確立し、E-cadherin の機能を代償できることが明らかになりつつあるが、更に研究が必要である。

これに加えて、中胚葉由来の血管内皮、血液細胞の分化機構について、京都大学分子遺伝学教室と共同で研究を行い、(1) 血管のリモデリングに関わる Ang1 の役割の解明、(2) 血管内皮において、VEGFR3 が VEGFR2 シグナルの抑制因子として働くこと、(3) ES 細胞から血管内皮への分化を研究するための無血清培地の開発、それを用いた VEGFR1 分子の機能解明などを行った。

#### \* 基礎科学特別研究員

The major aims of Stem Cell Biology Group are (1) to understand the molecular basis of stem cell niche that regulate stem cell activity, and (2) to understand the molecular basis underlying mesoderm cell specification from the early multipotent progenitor.

Concerning the first aim, we have specified the bulge region of hair follicle as the localization of melanocyte stem cells. Thus far, we showed that the melanocyte in the bulge bear all necessary attributes for stem cells. Namely, MSC in the bulge represent the stem cell compartment that is; (1) slow cycling, (2) produce a large number of progenies, and (3) reconstitute a new stem cell system. In addition, we have shown for the first time that stem cell that are in-

troduced into transit amplifying compartment (TAC) can go back to stem cell stage when they are associated with niche.

In this year, we investigated the mode of stem cell self-renewal and activation. Using molecular markers that can distinguish stem cell compartment (SC) from TAC, we stains hair follicles during its initial stage of hair follicle activation. Our analysis demonstrated clearly that there is no self-renewal of stem cells in the melanocyte system. Instead, when stem cells are activated, all of them differentiate into TAC, but some of which can differentiate back to SC.

We are currently establishing a system that is required for determining the molecular basis underlying this mode of stem cell maintenance and activation. We have established three novel methods. First, we established a condition to prepare the hair follicle with intact melanocytes associated. Secondly, we established a strain of mouse in which melanocytes are specifically labeled by GFP. Finally, we have established a method of cDNA preparation from a single cell without contamination of genomic DNA amplification. Using these newly developed methods, we are currently comparing the gene expression profiling of SC and TAC. We hope to identify the molecule involved in stem cell maintenance in the niche. In parallel, we are attempting to produce mouse strains that allows us to introduce null mutation melanocyte specifically and inducibly by tamoxifen addition. This strain of mouse will be useful for assessing the function of molecules in future.

ES cell is useful to dissect the cell specification process that occur in the earliest stage of embryogenesis. For the last couple of years, we have developed surface markers that can define paraxial and lateral mesoderms. In addition, we established a culture system that allows ES cell differentiation to these mesoderm cells without formation of embryoid body. These innovations that we have brought in ES cell differentiation culture enabled us to dissect the process of mesoderm differentiation from multipotent progenitors. We wanted to use this system for identifying molecules that are involved in the divergence to each mesoderm lineages. We have been attempting to determine the genes that are involved in divergence of mesoderm subsets by gene subtraction between Flk1+PDGFR V-E-cadherin- lateral mesoderm and Flk1-PDGFR V+E-cadherin- paraxial mesoderm. In addition, gene expression pattern of each population was analyzed by using DNA chips. We have obtained both known and unknown genes, and the latter group is being analyzed in terms of expression. A list of genes cloned from these attempts will be presented in the review meeting. We have identified a number of genes that are expressed specifically in paraxial mesoderm as well as lateral mesoderm. To analyze the function of a molecule that is expressed in the mesenchyma cells in the tail bud, gene knock out is under progress.

As our previous method to define mesoderm subset can not cover axial mesoderm, we established a ES cell line to which a GFP gene was knocked into the *goosecoid* gene. As expected, this ES cell line allows us to define and purify *goosecoid+* mesoendoderm cells that can give rise to axial mesoderm and endoderm. As the proportion of GFP+ cells induced in our serum-containing culture condition is less than 1%, we developed a serum free condition that allows selective generation of GFP+ cells. Those cells are now being analyzed by cDNA array technology.

All these progresses now allowed us to investigate the molecular mechanisms underlying the diversification of

mesoderm subsets from primitive ectoderm.

### *Research Subjects and Members of Laboratory for Stem Cell Biology*

1. Cellular and molecular basis of stem cell niche
2. Community effect in mesoderm cell differentiation
3. *In vitro* differentiation of mesoderm cells
4. Cellular dynamics in mesoderm cell differentiation *in vitro*

#### *Group Director*

Dr. Shin-Ichi NISHIKAWA

#### *Research Scientists*

Dr. Takumi ERA  
Dr. Masatake OSAWA  
Dr. Masahiro YASUNAGA  
Dr. Yusuke YOSHIDA  
Dr. Chikara FURUSAWA \*

---

\* Special Postdoctoral Researcher

#### *Visiting Members*

Dr. Mitsuhiro OKADA (Inst. Biowed. Res. Innovation)  
Dr. Martin Jakt (Inst. Biowed. Res. Innovation)

#### *Technical Staff*

Ms. Satomi NISHIKAWA  
Ms. Mariko MORIYAMA  
Ms. Maho YAMAMOTO  
Ms. Kotomi KAWASAKI

#### *Trainees*

Ms. Ai KOTANI (Kyoto Univ.)  
Ms. Su San MAK (Kyoto Univ.)  
Mr. Hidetoshi SAKURAI (Nagoya Univ.)  
Mr. Shinsuke TADA (Kyoto Univ.)  
Mr. Atsushi TAKEBE (Kobe Univ.)

#### *Assistant*

Ms. Maya IWASE  
Ms. Sakura YUOKA

---

### 誌 上 発 表 Publications

[ 雑誌 ]

( 原著論文 ) \* 印は査読制度がある論文

Yoshida H., Naito A., Inoue J., Satoh M., Santee-Cooper S. M., Ware C. F., Togawa A., Nishikawa S., and Nishikawa S.: "Different cytokines induces surface lymphotoxin- $\alpha\beta$  on IL-7 receptor- $\alpha$  cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches", *Immunity* **17**, 823–

833 (2002). \*

Uemura A., Ogawa M., Hirashima M., Fujiwara T., Koyama S., Takagi H., Honda Y., Wiegand S. J., Yancopoulos G. D., and Nishikawa S.: "Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells", *J. Clin. Invest.* **110**, 1619–1628 (2002). \*

Nishioka E., Tanaka T., Yoshida H., Matsumura K., Nishikawa S., Naito A., Inoue J., Funasaka Y., Ichihashi M., Miyasaka M., and Nishikawa S.: "Mucosal addressin cell adhesion molecule 1 plays an unexpected role in the development of mouse guard hair", *J. Invest. Dermatol.* **119**, 632–638 (2002). \*

Murakami H., Okawa A., Yoshida H., Nishikawa S., Moriya H., and Koseki H.: "Elbow knee synostosis (*Eks*): a new mutation on mouse Chromosome 14", *Mamm. Genome* **13**, 341–344 (2002). \*

Nishimura E. K., Jordan S. A., Oshima H., Yoshida H., Osawa M., Moriyama M., Jackson I. J., Barrandon Y., Miyachi Y., and Nishikawa S.: "Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination", *Nature* **416**, 854–860 (2002). \*

Matsumura K., Hirashima M., Ogawa M., Kubo H., Hisatsune H., Kondo N., Nishikawa S., Chiba T., and Nishikawa S.: "Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3", *Blood* **101**, 1367–1374 (2003). \*

Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Matsumura K., Kawasaki K., Shibuya M., and Nishikawa S.: "A chemically defined culture of VEGFR2<sup>+</sup> cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells", *Blood* **101**, 2261–2267 (2003). \*

Fukuda K., Yoshida H., Sato T., Furumoto T., Mizutani-Koseki Y., Suzuki Y., Saito Y., Takemori T., Kimura M., Sato H., Taniguchi M., Nishikawa S., Nakayama T., and Koseki H.: "Mesenchymal expression of Foxl1, a winged helix transcriptional factor, regulates generation and maintenance of gut-associated lymphoid organs", *Dev. Biol.* **255**, 278–289 (2003). \*

### 口 頭 発 表 Oral Presentations

( 国際会議等 )

Yoshida H. and Nishikawa S.: "Lineage negative IL-7R $\alpha$  positive  $\alpha 4\beta 7$ -integrin positive cells in fetal liver are the population committed to T-lineage lymphocyte and/or peripheral lymphoid organ inducer cells", 3rd Int. Workshop of Kyoto T Cell Conf. (12th Ann. Meet.), Kyoto, Apr. (2002).

Yoshida H., Naito A., Inoue J., and Nishikawa S.: "The distinct cellular and molecular mechanism lymph node and Peyer's patch development", 14th GCC Int. Conf. on Lymphatic Tissues and Germinal Centres in Immune Reactions, Groningen, The Netherlands, June (2002).