

# 多能性幹細胞研究チーム

## Laboratory for Pluripotent Cell Studies

チームリーダー 丹羽 仁史  
NIWA, Hitoshi

当研究チームでは、主にマウス胚性幹細胞（embryonic stem cells：ES 細胞）を用いて、多能性幹細胞の自己複製と分化を制御する分子機構の解析を行っている。このような分子機構は（1）外界からの入力を受容、（2）核内における遺伝子発現制御、（3）細胞表現型の発現、の3過程に大別でき、現在これら全てについて、それらの関係を含めて関連分子の同定を進めている。

### 1. マウス ES 細胞の増殖を刺激する因子の検索（小川，北島 \*<sup>1</sup>，大塚，丹羽）

我々は昨年度、ACTH, LIF, KSR（Knockout Serum Replacement: Invitrogen）からなる、マウス ES 細胞を単一細胞から増殖させることが可能な無血清無フィーダー培養系を確立し報告した。興味深いことに、この培養条件下では、ES 細胞の多能性は完全に維持されるものの、その増殖速度は血清存在下に比べると著しく低下していた。そこで、ES 細胞の増殖を刺激する因子の候補として TGF $\beta$  super-family に着目し、その機能を解析した。この結果、Nodal や Activin は多能性に影響を与えることなく ES 細胞の増殖を更新させることを見いだした。

### 2. マウス ES 細胞における転写因子 Oct-3/4 の機能解析（升井，大塚，丹羽）

転写因子 Oct-3/4 の機能が ES 細胞の未分化状態維持に必須であることは、これまでの我々の解析によって明らかになっている。そこで次に、この転写因子がどのように下流遺伝子の発現を制御しているのか、マイクロアレイを用いた解析を進めてきた。この結果、数百にも及ぶ遺伝子の発現が、Oct-3/4 の発現量を変化させた 24 時間後には発現量を変化させていることが明らかになり、1 つの転写因子の標的が想像以上に多いことが示唆された。現在、幾つかの遺伝子に絞って機能解析を進めている。

### 3. 転写因子 Oct-3/4 の分子進化（関田 \*<sup>2</sup>）

我々のこれまでの解析から、Oct-3/4 は哺乳動物に特有な胚体外組織の分化に重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで、Oct-3/4 が進化論的に何時出現したのかを明らかにすべく、種々の脊椎動物に於いて、Oct-3/4 類縁遺伝子の単離を試みた。現在、これらの中でも最も興味深いカモノハシ Oct-3/4 について、ゲノム DNA 配列の決定を試みている。

### 4. マウス ES 細胞における遺伝子発現抑制法の検討（杉村 \*<sup>1</sup>，丹羽）

RNAi の種々の方法による遺伝子発現抑制効果をマウス ES 細胞においてしたところ、通常の培養細胞に比べると配列依存性が高く、かつその効果も弱いことが明らかになった。現在、これらの問題点を改善する方法を模索している。

### 5. マウス ES 細胞における細胞周期制御機構の解析（大塚，高橋，丹羽）

マウス ES 細胞においては、G1 期に特異な遺伝子発現の変化を示すことを見だし、現在その生理的意義について解析を進めている。

### 6. 未分化状態特異的に発現する遺伝子 Sox-2 の機能解析（升井）

HMG ボックスタンパクをコードする遺伝子 Sox-2 は、未分化細胞に特異的に発現することからその機能に興味を持ち、遺伝子ターゲティング法による解析を行った。この結果、Sox-2 の機能はマウス ES 細胞の多能性維持に必須であることが明らかになった。現在、その機能の詳細な解析を進めている。

### 7. マウス ES 細胞の原始外胚葉化機構の解析（豊岡）

マウス ES 細胞は通常の培養条件下で、可逆的に原始外胚葉様細胞に分化している。そこで、これらの2つの重集団において差次的に発現する遺伝子の探索を行い、幾つかの興味深い遺伝子を同定した。現在、これら遺伝子の機能解析を行っている。

### 8. マウス ES 細胞の原始内胚葉への分化機構の解析（矢木，升井，丹羽）

原始内胚葉の分化においては、転写因子 Gata-4,6 と Nanog の相互作用が重要であることを示唆するデータを得たので、現在この相互作用の直接的な証明を試みている。

### 9. マウス ES 細胞の栄養外胚葉への分化機構の解析（丹羽，豊岡，下里 \*<sup>3</sup>，高橋，矢木）

栄養外胚葉の分化においては、転写因子 Cdx-2 と Oct-3/4 の相互抑制機構が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

### 10. マウス ES 細胞の未分化状態維持における細胞骨格制御分子の役割（下里 \*<sup>3</sup>）

マウス ES 細胞で Rho ファミリー分子を強制的に活性化させると、分化誘導が可能であることを見いだしたので、現在その生理的意義の解析を進めている。

## 11. マウス ES 細胞における理想的発現調節系の開発 (升井)

テトラサイクリンによる発現誘導系を簡便に ES 細胞で利用するための新しいシステムを構築した。

\*<sup>1</sup> 訪問研究員, \*<sup>2</sup> ジュニア・リサーチ・アソシエイト, \*<sup>3</sup> 研修生

### Self-renewal and pluripotency

Their ability to self-renew indefinitely and to differentiate into cells of all three germ layer types (a differentiative capacity termed 'pluripotency'), makes embryonic stem (ES) cells one of the most promising subjects of study in regenerative medicine, as well as an attractive model system for research into a spectrum of developmental processes. However, the mechanisms by which ES cells are able to maintain these capabilities are incompletely understood, and a better understanding of the stemness of these cells will be necessary in order to be able to take best advantage of their remarkable properties.

Two of the biggest challenges that now face stem cell research are the determination of the factors that allow ES cells to generate limitlessly self-renewable progeny, and the identification of molecules that direct the dividing ES cell to produce daughter cells of specific types. Our research addresses both of these challenges, with the aims of developing solid scientific foundations and reliable technologies to support this exciting field of biomedicine.

### Inducing differentiation

The development of methods by which undifferentiated ES cells can be prompted to commit to a specific cell lineage is a field of central importance to the stem cell research community. Studying factors identified in work on knockout mice, we have been engaged in the analysis of transcription factors with potential roles in the development of extraembryonic cell lineages, extraembryonic endoderm and trophoderm. Extraembryonic endoderm derivatives include the parietal and visceral endoderm, which give rise to the yolk sac covering embryos in utero during development, and trophoderm derivatives, the source of the placenta that sustains the developing mammalian embryos.

In previous research, we showed that the overexpression of GATA transcription factors such as Gata-4 or Gata-6 resulted in the specific conversion of undifferentiated ES cells into extraembryonic endodermal cells, and that the exogenous expression of either of these factors simultaneously induced the expression of the other from the endogenous gene. New work suggests that the homeobox gene Cdx-2 can serve as a similar trigger for the induction of trophoderm from ES cells. Using regulable activation of Cdx-2 in vitro, we successfully induced ES cells to differentiate into trophoblast stem cells. Interestingly, we found that Cdx-2 can interfere with the function of Oct-3/4 and vice versa. Such reciprocal inhibition between Oct-3/4 and Cdx-2 might play an important role in determining trophoderm in pre-implantation development.

### Maintaining pluripotency

The POU-family transcriptional regulator Oct 3/4 was the first factor found to elicit multiple differentiative outcomes dependent on its expression level. ES cells expressing median levels of Oct 3/4 maintain their pluripotency,

while overexpression results in differentiation into primitive endoderm and mesoderm; its inhibition causes the cells to take up a trophodermal fate. These findings established Oct 3/4 as a primary regulator of pluripotency in ES cells, but the function of this regulator in the commitment of more specific lineages remains an open issue. We recently identified several candidates of downstream genes and functional analyses of them are now ongoing.

### ES cell growth in culture

This goal of controlling culture conditions to achieve specific outcomes is important to the growth of ES cells in vitro as well. We developed a serum- and feeder-cell free system for culturing mouse ES cells, which necessitates developing a detailed picture of both the extrinsic factors and the intrinsic networks that function in these cells in culture. Using this system, we identified that the TGF- $\beta$  superfamily can potentiate growth speed of mouse ES cells without affecting their pluripotency.

### Research Subjects

1. Growth stimulation of mouse ES cells in serum- and feeder-free culture system
2. Functional analysis of Oct-3/4 in mouse ES cells
3. Evolution of Oct-3/4
4. Establishment of new strategies for gene suppression in mouse ES cells
5. Cell cycle regulation in mouse ES cells
6. Functional analysis of Sox-2
7. Molecular analysis of differentiation event to primitive ectoderm
8. Molecular analysis of differentiation event to primitive endoderm
9. Molecular analysis of differentiation event to trophoderm
10. Relationship between cellular morphology and pluripotency
11. Establishment of ideal inducible expression system in mouse ES cells

### Staff

#### Team Leader

Dr. Hitoshi NIWA

#### Research Scientists

Dr. Shinji MASUI

Dr. Kazuya OGAWA

Dr. Satoshi OHTSUKA

Dr. Yayoi TOYOOKA

#### Technical Staff

Ms. Kadue TAKAHASHI

Ms. Rika YAGI

## Visiting Members

Dr. Itsuro SUGIMURA (Stem Cell Sciences KK)  
Mr. Hiroyuki KITAJIMA (Stem Cell Sciences KK)  
Ms. Yoko SEKITA (Fac. Med., Osaka Univ.)

## Trainees

Mr. Daisuke SHIMOSATO (Fac. Med., Kobe Univ.)

## 誌 上 発 表 Publications

### [雑誌]

(原著論文) \*印は査読制度がある論文

Ogawa K., Matsui H., Otsuka S., and Niwa H.: “A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells”, *Genes Cells* **9**, 471–477 (2004). \*

Miyagi S., Saito T., Mizutani K., Masuyama N., Gotoh Y., Iwama A., Nakauchi H., Masui S., Niwa H., Nishimoto M., Muramatsu M., and Okuda A.: “The *Sox-2* regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells”, *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4207–4220 (2004). \*

Okumura-Nakanishi S., Saito M., Niwa H., and Ishikawa F.: “Oct-3/4 and Sox2 regulate *Oct-3/4* gene in embryonic stem cells”, *J. Biol. Chem.* **280**, 5307–5317 (2005). \*

小川和也, 西中村隆一, 丹羽仁史: “幹細胞の自己複製に関与する Wnt シグナル”, *細胞工学* **23**, 647–650 (2004). \*

丹羽仁史, 小川和也, 北島裕幸: “ヒト ES 細胞の自己複製を制御する分子機構”, *細胞工学* **23**, 1260–1263 (2004). \*  
(総 説)

丹羽仁史: “序 ヒト ES 細胞: 夢と現実の狭間”, *細胞工学* **23**, 1254–1255 (2004).

### [単行本・Proc.]

(その他)

Niwa H.: “Mechanisms of stem cell self-renewal”, *Handbook of Stem Cells Vol. 1: Embryonic Stem Cells*, edited by Lanza R., Elsevier Academic Press, USA, pp. 45–52 (2004).

## 口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Niwa H.: “Quantitative effects of transcription factors governing cell fate determination of mouse ES cells”, 1st Pacific-Rim Int. Conf. on Protein Science (PRICPS 2004), (Protein Science Society of Japan and others), Yokohama, Apr. (2004).

Niwa H.: “From pluripotent stem cells to multipotent stem cells”, 33rd Ann. Scientific Meet. of the Int. Soc. for Experimental Hematology (ISEH 2004), New Orleans, USA, July (2004).

Niwa H.: “Essential role of *Cdx-2* for self-renewal of trophoblast stem cells”, Cold Spring Harbor Laboratory Meet. on Mouse Molecular Genetics 2004, Cold Spring Harbor, USA, Sept. (2004).

Niwa H.: “Cell fate commitment of embryonic stem cells”, 17th Naito Conf. on Molecular Basis of Maintenance and Differentiation of Stem Cells [I], (The Naito Foundation), Hayama, Nov. (2004).

(国内会議)

丹羽仁史: “ES 細胞における外来遺伝子発現技術とその応用”, 日本組織培養学会第 77 回大会, 名古屋, 5 月 (2004).

丹羽仁史, 高橋一恵, 矢木利香, 豊岡やよい: “栄養外胚葉分化に関わる転写因子の機能解析 2004”, 日本発生生物学会第 37 回大会, 名古屋, 6 月 (2004).