研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		ヒト iPS 細胞からの造血における力学ストレスの役割の解明			
研究テーマ (欧文) AZ		Dissecting roles of biomechanical forces in hematopoietic development			
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓)コハラ	名)ヒロシ	研究期間 B	2014 ~ 2015年
	漢字 CB	小原	洋志	報告年度 YR	2015年
	ローマ字 CZ	Kohara	Hiroshi	研究機関名	九州大学/東京大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		東京大学医科学研究所 ALA 先端医療学社会連携研究部門・特任講師			
<p>概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)</p> <p>本研究では、純化した iPS 細胞より分化誘導した造血能性内皮細胞を用いて、力学ストレス（せん断応力・張力）が endothelial-hematopoietic transition (EHT；血管内皮細胞から造血幹細胞が産み出される現象）に与える効果とその分子メカニズムについて理解することを最終的な目標として次の実験を行った。</p> <p>1. 造血能性内皮細胞の分化誘導 申請者が留学先で確立した造血能性内皮細胞の培養系が、現在の所属研究室で樹立されたヒト iPS 細胞を用いて再現可能であることを以下の手順で確認した。 具体的には、ヒト iPS 細胞を胚様体形成法により分化誘導し、培養 10 日目に磁気ビーズ細胞分離法を用いて VE-cadherin 陽性細胞を分取した。細胞はフィブロネクチン処理した培養皿上でサイトカイン存在下で 7 日間培養したのち、フローサイトメトリー解析により血球マーカー CD45 陽性細胞の出現を認めた。</p> <p>2. レポーター細胞株の樹立 EHT の結果として誘導される血球の機能評価を飛躍的に進めるため、造血系マーカー (RUNX1、TAL1) のプロモーター下流で <u>レポーター遺伝子を発現するヒト iPS 細胞株</u> を樹立した。 広島大学大学院理学研究科 山本卓教授との共同研究で構築した TALE ヌクレアーゼ (TALEN) を用いて RUNX1 および TAL1 遺伝子の終始コドン直前を標的としたゲノム編集を行い、蛍光タンパク質 (GFP あるいは DsRed-Express) と薬剤耐性遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子あるいはピューロマイシン耐性遺伝子) を挿入した iPS 細胞を樹立した。薬剤耐性を獲得した iPS 細胞を選択し、標的部位にレポーター遺伝子が挿入されていることを PCR 解析により確認した。引き続き蛍光タンパク質発現解析を実施する。</p> <p>3. 力学ストレスを負荷する培養装置の作製 九州大学大学院工学研究院機械工学部門 工藤奨教授との共同研究として、培養細胞にせん断応力と張力を単独あるいは同時に負荷できる培養装置を開発した。 本装置内で一定期間安定に細胞を培養できる可能性について検討している。</p>					
キーワード FA	造血	造血能性内皮細胞	力学ストレス		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Overall goal of our work is to understand the role of biomechanical stress on endothelial-hematopoietic transition (EHT), which is the first step of embryonic hematopoiesis. To this end, we performed the following experiments:

1. Establishment of in vitro EHT model
Hematopoietic differentiation was induced from human iPS cells by embryoid formation (EB) method. At day 10 of EB differentiation, VE-cadherin(+) cells were isolated, plated on fibronectin-coated plastic dish, and cultured for 7 days in the presence of hematopoietic cytokines. Flow cytometric analysis revealed that CD45(+) hematopoietic cells were induced from VE-cadherin(+) endothelial-lineage cells.
2. Establishment of reporter cell lines
In collaboration with Prof. Takashi Yamamoto (Hiroshima University), genome editing of RUNX1 and TAL1 locus was performed by using newly developed TALE nuclease (TALEN) targeting RUNX1 and TAL1 stop codon. Fluorescent proteins (GFP or DsRed-Express) and drug resistance gene (Neomycin or Puromycin resistance gene) were inserted, and genome edited iPS cells were cloned by drug resistance. Successful insertion of transgenes were confirmed by PCR analysis.
3. Development of novel culture system to apply biomechanical stress to cells
In collaboration with Prof. Susumu Kudo (Kyushu University), we have developed the culture system to apply fluid shear stress and tension. Now we are investigating the availability of this machine for long-term cell culture.