

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06779

研究課題名(和文) 多能性遺伝子の発現を指標にしたヒトiPS由来神経幹細胞の腫瘍原性に関する研究

研究課題名(英文) Development of pluripotent gene expression indicator using CRISPR/Cas9 genome editing and the study regarding tumorigenicity of human pluripotent stem cell-derived neural stem cells.

研究代表者

今井 貴雄 (Imai, Takao)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：10383712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、iPS細胞等の多能性幹細胞から分化誘導して作られる神経幹細胞が癌化してしまう可能性について、なぜ癌化が起こり得るのかを、独自の発想にてその分子メカニズムの解明を目指した研究である。CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集技術によって遺伝子改変を施したヒトES由来神経幹細胞を作成し、本来神経幹細胞では発現しないはずの多能性遺伝子の微小な発現の有無を評価することを企図した。また、体に備わる本来の神経幹細胞が増殖を活性に行いながらも癌化しにくいことが、RNA結合蛋白質とその標的となるRNAとの相互作用によって担われ、細胞老化の分子機構にも関係することが明らかとなる研究成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞、ES細胞といったヒト多能性幹細胞から分化誘導した神経幹細胞が内在的要因、外来環境の状態要因によって癌化し得ることについて、本研究過程において有用な知見が得られた。また、内在的なRNA結合蛋白質とRNAの相互作用が、増殖性を保持しつつ癌化しないための一つの分子機構を担っていることが明らかとなった。これらの成果が、ヒト多能性幹細胞から分化誘導された神経幹細胞について癌発生を未然に防ぐ対策の一部として使用されることが将来的に期待され、製剤としての神経幹細胞の品質向上が期待でき、社会に貢献できるものと考えられる。また、増殖性幹細胞と癌細胞の性質の類似点、差異点についての新規知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：This study intended to elucidate the molecular mechanism about the possibility that the neural stem cells produced from pluripotent stem cells such as iPS cells by differentiation induction may become to generate cancer cells. We designed to generate the recombinant human ES-derived neural stem cells that have been genetically modified by genome editing technology using CRISPR / Cas9 in order to evaluate the presence or absence of the microexpression of pluripotent genes that should not normally be expressed in neural stem cells. We also conducted research on the molecular mechanism that makes it difficult for the natural neural stem cells to become cancerous. We found that the interaction between a RNA binding protein and its target RNA contributed to such neural stem cells' character.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経幹細胞 多能性幹細胞 ゲノム編集 RNA結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

2006年、皮膚などの体細胞に少数の因子を導入し、培養することによって、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力と、ほぼ無限に増殖する能力をもつマウスの人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell : iPS細胞)が京都大学山中伸弥教授らによって開発された。その後、ヒトのiPS細胞も開発され、ヒトES細胞ではクリアできなかった倫理的な問題の障壁が無くなり、再生医学の原材料として多能性幹細胞が使用可能な時代へと突入した。しかし、iPS細胞を分化させて作出した細胞は、生体に移植すると腫瘍原性を提示することがあり、これが克服しなければならない問題となった。神経幹細胞は神経系の再生医学に供される細胞として注目を集めていたが、iPS細胞を含む多能性幹細胞から分化を行った場合、樹立した株系統によっては腫瘍細胞を生じることがあった。由来するiPS細胞株のリプログラミングのなされ方の違いが腫瘍発生に影響するとする可能性があったが、このヒトiPS細胞株由来-神経幹細胞について、生体に移植された際の腫瘍発生の原因については未解明であった。神経幹細胞は、内在的にSOX2, c-MycのiPS化に用いられる遺伝子が発現しており、神経幹細胞に特有の腫瘍発生のメカニズムが存在する可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究を申請した当初において、ヒトiPS細胞を用いた再生医療の現実化に向けて様々な組織の細胞への分化を可能にする技術の進展がなされていた。神経系組織における再生医学においては、モデル生物系を用いて脊髄損傷に対する神経幹細胞移植療法研究に induced Pluripotent Stem cell (以下iPS細胞)から分化処理を行った神経幹細胞が用いられており、有用性が確認されている。しかし、分化処理を施した神経幹細胞の腫瘍原性が問題になっているのが現実であった。この腫瘍原性のメカニズムを理解することを一つの目的とした。多能性遺伝子の発現を指標にして「ヒト多能由来神経幹細胞の腫瘍化の原因を解明する」ことを目的とした。

また、一方で、神経幹細胞が癌化せずに増殖可能な状態における細胞増殖制御の仕組みを理解する一つの局面として、神経幹細胞内在性のRNA結合蛋白質によるmiRNA制御の仕組みを明らかにすることについてもこの研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

申請当時において、新技術としてCRISPR-Cas9システムによるゲノム改変技術が普及されつつあり、この技術を動員して、iPS由来の神経幹細胞、あるいはES細胞由来の神経幹細胞のゲノム上の多能性遺伝子Oct4遺伝子座にレポーター遺伝子、機能性遺伝子をゲノム改変技術応用によって組み込み、Oct4遺伝子の遺伝子発現をモニターできる神経幹細胞の作出を行い、レポーターのシグナルを指標に神経幹細胞の挙動を増殖性や細胞老化度等の項目で評価を行った。

また、神経幹細胞に発現する*Musashi1*遺伝子が脳腫瘍細胞を含む多くのがん細胞にも発現しており、増殖性を促進することに寄与していること、しかしながら、神経幹細胞に強く発現しているが神経幹細胞には腫瘍性が無いことに申請者は着目した。この*Musashi*の機能を調節する因子の候補としてlet-7 miRNAが考えられていた。ヒトES細胞から分化誘導を行った神経幹細胞において、*Musashi1*の機能とlet-7の機能の相関関係をRNAi法により*Musashi*遺伝子の発現を減弱させた際のlet-7 sensor レポーター遺伝子の評価、細胞増殖性、細胞老化度の評価を行った。

4. 研究成果

本研究では、iPS細胞あるいはES細胞等の多能性幹細胞より分化誘導して産生された神経幹細胞に特有の腫瘍発生メカニズムが存在すると考え、培養下での細胞増殖時、ドナー細胞としての細胞移植時に癌化し得る分子メカニズム、また、癌化を防いでいる分子メカニズムについて、仮定としての多能性遺伝子の発現と神経幹細胞の内在的な遺伝子の働きを指標にして明らかにすることを主眼とした。

(1) 研究期間の当初においては、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム改変技術によって、ヒトES細胞由来神経幹細胞のOct4遺伝子座に各種レポーター遺伝子または機能性遺伝子の

組み込みを行った。ES 細胞由来神経幹細胞のゲノム上に存在する Oct4 遺伝子座のストップコドン、2A ペプチドを配した各種レポーター遺伝子または機能性遺伝子と入れ替える形で挿入し、細胞増殖の挙動を解析するための神経幹細胞株を単離し、取得した。この Oct4 遺伝子座にレポーター遺伝子を挿入した ES 由来の神経幹細胞株を用いて、多能性遺伝子 Oct4 の発現を複数の検証項目で評価した。

(2) 神経幹細胞が腫瘍化する可能性を探るにあたり、神経幹細胞の指標遺伝子である Musashi1 と、癌増殖抑制作用、細胞分化、細胞老化に関係している let-7 miRNA について、機能相関性を調べた。多くの種の癌細胞にも強く発現し、神経幹細胞において強く発現する Musashi1 蛋白質は let-7 に強く結合し、その機能を抑制すると考えられており、ヒト ES 細胞由来の神経幹細胞の増殖活性の調節には、Musashi1 蛋白質と let-7 の活性の拮抗性が関与している可能性が考えられた。ヒト神経幹細胞において siRNA 法を用いて musashi1 遺伝子の発現を減弱させた際の、let-7 の活性、増殖活性、細胞老化度について評価を行い、最終年度を含む研究期間の後半の成果とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1.

Iwaoka R, Nagata T, Tsuda K, **Imai T**, Okano H, Kobayashi N, Katahira M.
Backbone and side chain assignments of the second RNA-binding domain of Musashi-1 in its free form and in complex with 5-mer RNA.
Biomol NMR Assign. 2017.
査読有
doi: 10.1007/s12104-017-9760-9.

2.

Iwaoka R, Nagata T, Tsuda K, **Imai T**, Okano H, Kobayashi N, Katahira M.
Structural Insight into the Recognition of r(UAG) by Musashi-1 RBD2, and Construction of a Model of Musashi-1 RBD1-2 Bound to the Minimum Target RNA.
Molecules. 22: E1207, 2017.
査読有
doi: 10.3390/molecules22071207.

〔学会発表〕(計 6 件)

1.

発表学会：生命科学系学会合同年次大会（第40回日本分子生物学会）
発表者：岩岡 諒、永田 崇、津田 健吾、**今井 貴雄**、岡野 栄之、小林 直宏、片平 正人
演題名：立体構造解析及びモデリングによる Musashi1 タンパク質 RNA 結合ドメインの標的 RNA 認識機構の解明
会場：神戸ポートアイランド
会期：平成29年12月6日（水）～12月9日（土）
発表日：平成29年12月7日（木）
演題番号：2P-0118
形式：ポスター発表

2.

発表学会：Society for Neuroscience 74th Annual Meeting
発表者：Kyoko Kusano, **Takao Imai**, Hironori Kawahara, Hiroyoshi Inoue, Hideyuki Okano.
演題名：RNA-binding protein Musashi1 inhibits let-7 miRNA activity in neural stem/progenitor cells.
会場：米国・ワシントンDC, Walter E. Washington convention center
会期：平成29年11月11日（土）～11月15日（水）
発表日：平成29年11月14日（火）
演題番号：459.1 (Board No. A1) (session: Cell Cycle Mechanisms in Neurogenesis I)
形式：ポスター発表

3.

発表学会： Society for Developmental Biology 76th Annual Meeting
発表者： Arisa Abe, Megumi Matsumoto, Megumi Kumagai, Hideyuki Okano, Masaaki Ikeda, Hiroyoshi Inoue, Keiko Nakao, **Takao Imai**
演題名： Functional and pathological analysis of PABPN1, a responsible RNA-binding protein for oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) and muscle aging.
会場： 米国・ミネソタ州・ミネアポリス, Hyatt Regency hotel
会期： 平成29年7月13日（木）～7月17日（月）
発表日： 平成29年7月15日（土）
演題番号： program abstract number 269
形式： ポスター発表

4

発表学会： 第39回日本分子生物学会年会
発表者： 今井貴雄、松本恵、熊谷恵、井上浩義、岡野栄之、池田正明、中尾啓子
演題名： 眼咽頭筋ジストロフィー原因遺伝子 PABPN1 の持続性発現による疾患モデル作成および機能解析
会場： パシフィコ横浜
会期： 平成28年11月30日（水）～12月2日（金）
発表日： 平成28年11月30日（水）
演題番号： 1P-0714
形式： ポスター発表

5

発表学会： 第39回日本神経科学大会
発表者： Keiko Nakao, Megumi Matsumoto, Megumi Kumagai, Masaaki Ikeda, **Takao Imai**
演題名： Functional and pathological analysis of PABPN1, a responsible gene for oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD), that is introduced into mouse skeletal muscles by in vivo electroporation.
会場： パシフィコ横浜
会期： 平成28年7月20日（水）～7月22日（金）
発表日： 平成28年7月21日（木）
演題番号： P2-156
形式： ポスター発表

6.

発表学会： 第38回日本分子生物学会年会
発表者： 中尾啓子、松本恵、熊谷恵、溝井令一、荒木信夫、池田正明、今井貴雄
演題名： in vivo 電気穿孔法を用いて作成した眼咽頭筋ジストロフィー疾患モデルにおける原因遺伝子PABPN1の機能解析
会場： 神戸ポートアイランド（神戸国際展示場）
会期： 平成27年12月1日～12月4日
発表日： 12月3日
演題番号： 3P-1272
形式： ポスター発表

〔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〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者 無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。