

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790208

研究課題名（和文） 体細胞の初期化に関わる microRNA の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of microRNAs which are involved in reprogramming of somatic cells

研究代表者 小柳 三千代 (MICHIO KOYANAGI)

京都大学 物質 細胞統合システム拠点 研究員

研究者番号：90432327

## 研究成果の概要：

マウス、ヒトの線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 の 4 つの因子を導入することによって様々な細胞へと分化できる能力を持った ES 細胞と同様の性質を持つ細胞(iPS 細胞)ができる。この時、がん遺伝子 Myc を導入しなくても iPS 細胞を作製できること、また、Myc を除くと Myc を含む 4 因子で導入した場合と比較して iPS 細胞の誘導効率は減少するが、その際に、特定の microRNA をレトロウイルスを使って共発現させることによって、iPS 細胞の誘導効率が上昇することがわかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	270,000	2,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：ES 細胞、体細胞の初期化、microRNA、iPS 細胞、レトロウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

当研究室では、マウスの線維芽細胞に、4 つの遺伝子 (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) を発現させると、ES 細胞様の性質を有する細胞(以降 iPS 細胞, induced pluripotent stem cells と記す)を 1 万個に 1 個の割合 (0.01%) で得られることを発見し、報告した。(Takahashi K. & Yamanaka S. *Cell* 126: 663-676, 2006) しかしながら、この場合の初期化の効率は核移植を行った場合 (成功率 2%) に比べてきわめて低

く、また ES 細胞で発現している遺伝子の一部が発現していない、あるいは発現量が少ない点など異なる点もある。そこで、より効率よく初期化させ、より ES 細胞に近い iPS 細胞を作製する必要があった。

一方で、タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が全 RNA の約 53% を占めることがわかってきていた。当研究室で同定している 4 因子は全て coding RNA であ

り、また、iPS細胞においてどのようなncRNAが発現しているかについては全く不明であった。これらが体細胞の初期化にも関与している可能性は十分に考えられた。そこで、進化上保存されている短い（約19-23塩基）ncRNAであり、いまだ機能が未知な点の多いmicroRNA (miRNA)の中に、初期化に関わる因子があると考えて本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、体細胞の初期化に関わるmiRNAを同定し、その機能を明らかにすることを目的に研究を進めることを考えた。そして、これらのmiRNAと4つの遺伝子との発現を組み合わせることにより、初期化の効率を上昇させ、よりES細胞に近いiPS細胞を作製することを目標とした。また、初期化に関わるmiRNAの機能を解析することによって初期化の分子メカニズムの一端を明らかにできると期待した。

具体的には

(1)ES細胞・繊維芽細胞・iPS細胞各々においてmiRNAの発現がどのように異なっているのか

をまず明らかにしたいと考えた。これにより、ES細胞の分化多能性維持や体細胞の初期化に関わっている可能性のあるmiRNA候補を探索することができる。

(2)(1)で選別したmiRNAを4因子と共に、あるいは4因子のいずれかを抜いたものと共にマウス繊維芽細胞で発現させ、4因子のみを入れた場合と比べて

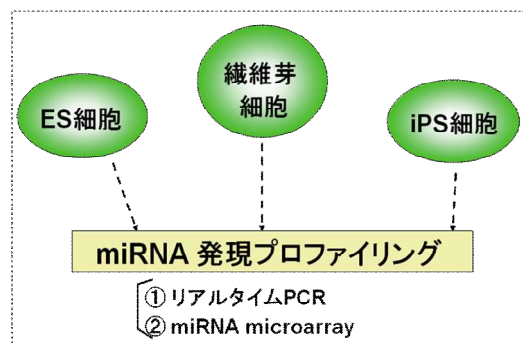
\* iPS細胞の作成効率が上昇する

\* よりES細胞に近いiPS細胞を産生する  
miRNAの組み合わせを見つける。これにより、実際に体細胞の初期化に関わっているのはどのmiRNAであるのかを明らかにすることができる。

(3)初期化で重要な役割を持つmiRNAについて標的となる遺伝子を同定し、その発現制御機構などを調べるなどの機能解析を行うことにより、初期化の分子メカニズムを明らかにする。

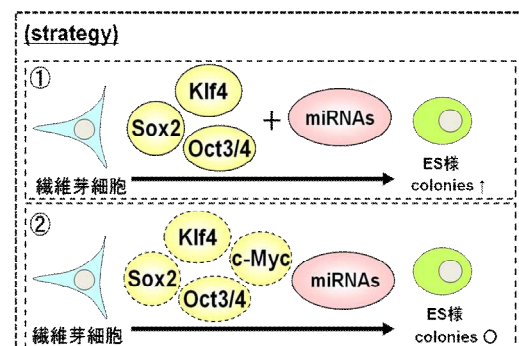
## 3. 研究の方法

(1)マウスとヒトのES細胞と繊維芽細胞、iPS細胞におけるmicroRNAの発現をリアルタイムPCR法、miRNAマイクロアレイによって調べる。



(2)(1)で同定したES細胞、iPS細胞で繊維芽細胞よりも高い発現を示すmicroRNA群を

マウス胎児繊維芽細胞あるいは尻尾線維芽細胞、ヒト成人皮膚細胞にMycなし3因子と共にレトロウイルスベクターを用いて導入し、マウス場合はNanogGFP陽性細胞、ヒトの場合はヒトES細胞様のコロニーの数を増やすmiRNAを探す。



マウス胎児繊維芽細胞あるいは尻尾線維芽細胞、ヒト成人皮膚細胞に既知の初期化因

子のいずれかと共にレトロウイルスベクターを用いて導入し、マウスの場合には NanogGFP 陽性細胞、ヒトの場合にはヒト ES 細胞様のコロニーを新たに形成する（4 因子のいずれかの機能を代替できる）miRNA を探す。

(3)(2)で同定した iPS 細胞化に積極的に関わる miRNA のターゲット等を含めて、機能を解析することによって、iPS 細胞化のメカニズムを探索する。

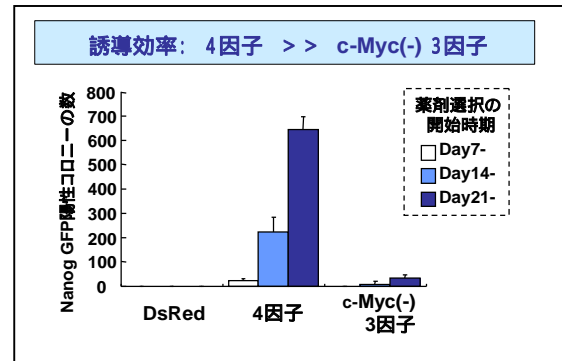
#### 4. 研究成果

リアルタイム PCR 法を用いて、マウス ES 細胞で高く発現しているマウスの miRNA155 種類について、各細胞における発現量を調べたところ、ES 細胞でのみ高く発現する miRNA 群、ES 細胞での発現が分化した細胞での発現よりも高い miRNA 群、第 1 世代 iPS 細胞で特異的に発現している miRNA 群を抽出することができた。

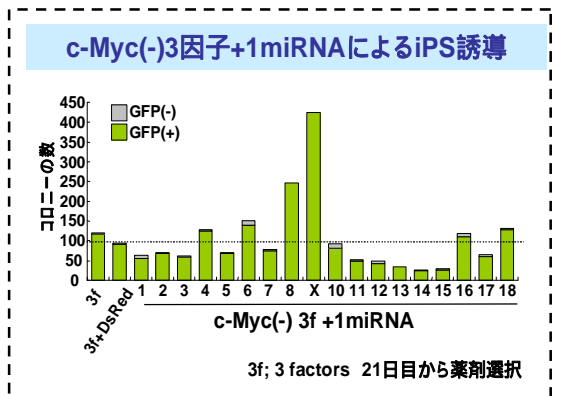
上記の miRNA 群を 4 因子あるいは Myc なし 3 因子と共発現させて、第 2 世代 iPS 細胞の誘導の系を用いて iPS 細胞化の効率を検討した。その過程で、我々は薬剤選択の時期を遅くすることによって Myc なしの 3 因子でも iPS 細胞を作製できることがわかった。

すなわち、従来の第 2 世代 iPS 細胞の誘導法（Nanog 遺伝子の発現が on になることによって薬剤耐性になる）では、レトロウイルスベクターを用いて 4 因子を導入した後、7 日目から薬剤選択を行っていたが、この方法では Myc を除いた 3 因子を導入しても、iPS 細胞となるコロニーは得られなかった。しかしながら、薬剤選択の開始時期を 14 日目から遅らせると、4 因子に比べると明らかにコロニー数は減少するものの、Myc なし 3 因子を導入した場合でも ES 細胞に非常に近い性質を持った iPS 細胞コロニーを得られるこ

とがわかったのである（次図）。



また、その後の解析で、これらの Myc なし 3 因子 iPS 細胞由来の子孫では腫瘍形成もおこらないことがわかった。



また、Myc を除いた 3 因子による誘導は、4 因子による誘導に比べると得られる全体的なコロニー数は少なく、コロニーが現れるまでの時間も長くなることがわかったが、microRNA-X を共発現させてマウス線維芽細胞からの多能性幹細胞誘導を行うと、iPS 細胞の誘導の効率、iPS 細胞化のスピードが上昇することがわかった。また、ヒトにおいても同様の手法で iPS 細胞化の効率を上昇させる miRNA を同定することができた。

がん遺伝子 Myc を導入しなくても iPS 細胞を作製できること、また、Myc を除くと Myc を含む 4 因子で導入した場合と比較して iPS 細胞の誘導効率は減少するが、その際に、

特定の microRNA をレトロウイルスを使って共発現させることによって、iPS 細胞の誘導効率が上昇することがわかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Masato Nakagawa\*, Michiyo Koyanagi\*, Koji Tanabe, Kazutoshi Takahashi, Tomoko Ichisaka, Takashi Aoi, Keisuke Okita, Yuji Mochiduki, Nanako Takizawa, Shinya Yamanaka  
“Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.” *Nature Biotechnology*, 101-106, 26(1), 2008)

[学会発表](計 2 件)

小柳 三千代 他 “マウス・ヒト体細胞の iPS 細胞化に関わる microRNA の探索とその機能解析” 第 31 回分子生物学会年会 + 第 81 回日本生化学会大会合同大会 (2008 年 12 月)

小柳 三千代 他 “マウス体細胞の初期化に関わる microRNA の同定とその機能解析” 第 30 回分子生物学会年会 + 第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007 年 12 月)

[図書](計 3 件)

小柳 三千代、山中 伸弥 “マウス線維芽細胞培養から誘導される多能性幹細胞” *遺伝子医学 MOOK 進み続ける細胞移植治療の実際 (上巻)* 2008 年 4 月

小柳 三千代、中川 誠人、山中 伸弥 “がん遺伝子 Myc を用いない人工多能性幹細胞の作成” *バイオインダストリー* 2008 年 4 月

小柳 三千代、山中 伸弥 “iPS 細胞の樹立と今後の展望” *臨床検査*  
2009 年 1 月

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称: 効率的な核初期化方法

発明者: 小柳三千代、山中伸弥

権利者: 京都大学

種類: 特許権

番号: 特願 2008 -312745

出願年月日: 2008 年 12 月 8 日

国内外の別: 国内

名称:

Screening and functional analysis of microRNAs which involve in reprogramming of murine somatic cell

発明者: 小柳三千代、山中伸弥

権利者: 京都大学

種類: 特許権

番号: PCT/JP2008/059586

出願年月日: 2008 年 5 月 23 日

国内外の別: 外国

[その他]

ホームページ等

[http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc02/ym\\_hp2009/](http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc02/ym_hp2009/)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 三千代 (KOYANAGI MICHIO)

京都大学 物質 細胞統合システム拠点  
研究員

研究者番号: 90432327