

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659079

研究課題名（和文） miRNA を標的とした新しい再生治療法の開発

研究課題名（英文） Development of new regeneration therapy by targeting of miRNA

研究代表者

守内 哲也 (MORIUCHI TETSUYA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：20174394

研究成果の概要（和文）：miRNA を標的とした新しい再生治療法開発のために、SOX2 などの幹細胞特異的転写因子のプロモーター領域及びエンハンサー領域を用いてがん幹細胞分離システムを構築した。SOX2 プロモーターの活性が高い細胞集団を乳がん細胞株 MCF-7 より分離したところ、コントロールと比較して高い sphere 形成能を示した。この結果は、幹細胞特異的転写因子に着目することにより、がん幹細胞を分離できる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：To develop new regeneration therapy by targeting of miRNA, we generated cancer stem cell isolation system which detect stem cell-specific transcription factor expressions. We isolated SOX2 promoter activity positive cell population from MCF-7 and this population showed high activity of sphere formation compare with its control. This result indicates that the expression of stem cell specific transcription factor is useful to isolate cancer stem cell population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：幹細胞・再生医療・miRNA・がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞の自己複製能制御に関わる研究は、近年胎性幹細胞（ES 細胞）や、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を中心に行われてきた。iPS 細胞誘導因子の1つである LIN28 は、ES 細胞、胚性癌腫細胞、原発性腫瘍において、microRNA 前駆体（pri-miRNA）のプロセッシングを阻害することが報告されている。最近、miRNA の産生酵素である Dicer は、卵巣がんで発現が

低下し、発現低下はがんの悪性度と相関性があることが報告されている。これらの報告は、幹細胞には自己複製能を抑制する miRNA が存在することを強く示唆している。我々は、これまでがん転移を中心に研究を行ってきた。近年、がんには“がん幹細胞”と呼ばれる多分化能を有し、腫瘍形成能の極めて高い細胞集団が含まれ、この細胞集団が転移と密接な関わりを持つことが報告されている。がん幹細胞は成体幹

細胞と類似した遺伝子発現を有し、抗がん剤治療に対する高い耐性能を有していることから、がん治療における重要な課題となっている。がん幹細胞は、成体幹細胞と比較すると、自己複製能が亢進しているといわれている。従って、がん幹細胞を高純度に分離できれば、同様の技術を用いて成体幹細胞を分離し、両細胞より精製した miRNA を比較することにより、幹細胞において自己複製を抑制する miRNA を同定できる可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、幹細胞の自己複製抑制性 miRNA を同定し、同定した miRNA を標的とした新しい再生医療の開発を目指すことにある。この目的のために、幹細胞特異的転写因子 Oct4 と Sox2 の発現を指標として、高純度に幹細胞を得る方法を開発し、発現している miRNA を解析することで、自己複製を抑制する miRNA を同定する。同定した miRNA の発現を抑制することにより、組織再生が亢進することを証明する。

## 3. 研究の方法

[平成 22 年度]

### マウス大腸がん幹細胞分離

#### (1) 幹細胞特異的転写因子の発現を指標にした肝がん幹細胞集団の分離

幹細胞特異的転写因子マウス Oct4 の下流に、蛍光蛋白質 YFP を改変した Venus をコードする遺伝子を挿入したベクターを構築する。同様な転写因子 Sox2 のプロモーターと幹細胞特異的エンハンサー領域 SRR2 の下流に蛍光蛋白質 eCFP をコードする遺伝子を挿入したベクターを構築する。それぞれ、異なる薬剤耐性遺伝子を組み込み、凝集培養したマウス大腸がん細胞株 colon26 に遺伝子導入を行う。遺伝子導入の 2 日後にセルソーター (FACS Aria) によって Venus/eCFP 陽性集団及び、コントロールとして Venus/eCFP 陰性集団を分離する。同様に、Hoechst 33342 で染色した colon26 に verapamil を処理し、蛍光色素の排出が阻害された細胞集団 (Side Population: SP) と、影響を受けない細胞集団 (Non-SP) を比較対象として分離する。

#### (2) マウス大腸がん幹細胞の分離純度の解析

(1) によって分離した細胞集団の表面抗原 (CD133, CD44 など) の発現を FACS にて解析する。また、また分離した細胞集団を Balb/c マウスに移植し、腫瘍形成能を調べる。

#### (3) 大腸がん幹細胞の株化と、大腸がん幹細胞における Dicer 発現の薬剤薬剤誘導性制御

(1) によって分離した細胞集団を、それぞれ温度感受性ポリマーをコートした培養皿 (RepCell) で培養し、遺伝子導入した群を薬剤選択法により株化する。次に、大腸がん幹細胞株の Dicer 発現を抑制するために RNA 干渉を利用する。具体的にはプロモーター領域に TetO2 element を有する anti-Dicer short hairpin RNA 発現ベクターならびに tetR 発現ベクターを、肝がん幹細胞集団に遺伝子導入する。樹立した細胞株を再度 Venus/eCFP を指標に選別し、がん幹細胞集団の純度を上げる。この細胞株を Doxycycline 存在あるいは非存在下で培養し、*in vitro* に及び *in vivo* における細胞増殖、細胞分化に及ぼす Dicer の影響について解析する。

[平成 23 年度以降]

### マウス大腸幹細胞分離

#### (1) 幹細胞特異的転写因子の発現を指標にした大腸幹細胞集団の分離

がん幹細胞分離と同様の手法を用いて、マウス大腸より成体幹細胞を分離する。即ち、幹細胞特異的転写因子マウス Oct4 の下流に、蛍光蛋白質 YFP を改変した Venus をコードする遺伝子を挿入したベクターを構築する。同様な転写因子 Sox2 のプロモーターと幹細胞特異的エンハンサー領域 SRR2 の下流に蛍光蛋白質 eCFP をコードする遺伝子を挿入したベクターを構築する。それぞれ、異なる薬剤耐性遺伝子を組み込み、凝集培養したマウス初代培養大腸細胞に遺伝子導入を行う。遺伝子導入の 2 日後に FACS Aria によって Venus/eCFP 陽性集団及び、コントロールとして Venus/eCFP 陰性集団を分離する。同様に、Hoechst 33342 で染色した colon26 に Verapamil を処理し SP と、Non-SP を比較対象として分離する。によって分離した細胞集団の表面抗原 (CD133, CD44 など) の発現を FACS にて解析する。

#### (2) 大腸幹細胞の株化と、大腸幹細胞における Dicer 発現の薬剤薬剤誘導性制御

(1) によって分離した細胞集団を、RepCell で培養し、遺伝子導入した群を薬剤選択法により株化する。次に、大腸がん幹細胞株の Dicer 発現を抑制するために RNA 干渉を利用する。樹立した細胞株を再度 Venus/eCFP を指標に選別し、がん幹細胞集団の純度を上げる。この細胞

株を Doxycycline 存在あるいは非存在下で培養し、*in vitro*に及び *in vivo*における細胞増殖、細胞分化に及ぼす Dicer の影響について解析する。

### (3) 幹細胞における miRNA の発現解析

大腸幹細胞、大腸がん幹細胞から RNA 結合タンパク質免疫沈降法 (RIP) を用いて、Ago2-miRNA を抽出する。RIP は、DNA-結合タンパク質の DNA ターゲットを同定する方法としてよく知られているクロマチン免疫沈降法の変法であり、Ago2 と複合体を形成する miRNA を精製するために使用する。具体的には、Millipore 社の Magna RIP™ RNA-結合タンパク質免疫沈降キットと抗マウス Ago2 抗体 (和光純薬工業) を用いる。精製した RNA に illumina のプロトコールに従い両端に 2 種類のアダプターを付加した cDNA を合成する。cDNA 断片を、アダプター配列を利用して基板上に結合、増幅させる。シーケンス用プライマーを用いて、次世代シーケンサー (illumina) にて基板に配列した DNA の並列的なシーケンスを行う。両者を比較することで、がん幹細胞において多く発現している miRNA を同定する。

### (4) 大腸幹細胞における自己複製抑制性 miRNA の同定

(3) にて同定した miRNA について、siRNA を作成し、成体幹細胞株に導入する。導入した細胞株の足場非依存的な細胞増殖、表面抗原、幹細胞転写因子の発現を解析する。導入した siRNA のうち、自己複製能が亢進したものについて、*in situ* hybridization にてマウス大腸における局在を解析する。

### (5) 潰瘍性大腸炎モデルに対するおける miRNA 発現抑制の効果

マウスにデキストラン硫酸塩を経口投与し、潰瘍性大腸炎モデルを作製する。潰瘍性大腸炎マウスに、自己複製抑制性 miRNA の発現を siRNA 法により抑制した大腸幹細胞投与し、幹細胞の大腸の再生効果を解析する。

## 4. 研究成果

miRNA を標的とした新しい再生治療法開発のために、幹細胞特異的転写因子の発現を指標としたがん幹細胞の高純度精製システム樹立を行った。がん幹細胞の存在が報告されているヒト乳がん細胞株 MCF-7、T47D、MDA-MB-231 細胞を実験材料とし、マウスに転用可能なように、ヒト *SOX2* 及び *OCT4* 遺伝子プロモーター領

域及びエンハンサー領域において種間で保存された領域をクローニングし、その下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作成した。これらのベクターを、に遺伝子導入し、*SOX2* 及び *OCT4* の遺伝子発現量と比較を行った。幹細胞特異的転写因子のプロモーター活性は、実際の遺伝子発現のレベルと相関性があり、さらにルシフェラーゼ遺伝子を蛍光蛋白遺伝子 tdTomato と置換した場合、遺伝子導入した細胞の一部に蛍光蛋白の発現が認められた。この細胞集団を MCF-7 より分離したところ、幹細胞形成能を解析するアッセイの 1 つ sphere formation では、コントロールと比較して高い sphere 形成能を示した。またこの細胞集団では、*SOX2* プロモーター領域に結合領域が存在するが、*SOX2* 発現調節については未報告の転写因子の発現が上昇していた。現在、*SOX2* プロモーターに対する影響を解析中である。さらに、*SOX2* プロモーターに結合する因子の同定を TOFF-MASS 解析により行っている。更に CMV mini プロモーターの上流に、ヒト *LEFTY1* 遺伝子プロモーター領域に由来する KLF4 結合領域を挿入し、KLF 結合部位を複数回含むベクターを作成した。KLF4 結合領域に変異を導入したコントロールでは KLF4 への応答性は認められず、一方、作成したベクターは KLF4 依存的にルシフェラーゼ活性を誘導した。現在、ルシフェラーゼ遺伝子を tdTomato などの蛍光遺伝子と置換し、がん細胞株より KLF4 発現集団の分離を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Higuchi K, Iizasa H, (他 11 名) Differential Expression of Ezrin and CLP36 in the Two Layers of Syncytiotrophoblast in Rats. *Biol Pharm Bull.* 33 (8): 1400-1406 (2010). 査読有  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/33/8/33\\_8\\_1400/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/33/8/33_8_1400/_article)
2. Iizasa H, (他 10 名). Editing of EBV-encoded BART6 microRNAs controls their Dicer targeting and consequently affects viral latency. *J Biol Chem* 285 (43): 33358-33370 (2010). 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M110.138362
3. Nishimura T, Sai Y, Fujii J, Muta M,

Iizasa H, (他4名). Roles of TauI and system A in cytoprotection of rat syncytiotrophoblast cell line exposed to hypertonic stress. *Placenta*. 31 (11): 1003-1009 (2010). 査読有  
DOI: 10.1016/j.placenta.2010.08.003

[学会発表] (計14件)

1. 浜田淳一、Goudarzi Houman、古橋昌子、中根梨恵、中澤誠多朗、飯笹久、(他3名). ヒト悪性胸膜中皮腫細胞の in vitro 増殖能に及ぼす低酸素の影響. 第9回がんハイポキシア研究会、学習院大学目白キャンパス (東京) (平成23年11月26日)
2. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久、(他3名). 低酸素条件下の培養はヒト悪性胸膜中皮腫細胞の悪性を促進する. 第70回日本癌学会学術集会、名古屋国際会議場(名古屋) (平成23年10月3日)
3. 梁珊瑚、飯笹久 (他2名). 乳癌細胞株における *SOX2* プロモーター領域の解析. 第70回日本癌学会学術集会、名古屋国際会議場 (名古屋) (平成23年10月3日)
4. 梁珊瑚、飯笹久 (他5名). 乳癌細胞株における *SOX2* 発現調節領域の解析. 第6回北大若手研究者交流会、北海道大学医学部学友会館プラテ (札幌) (平成23年8月5日)
5. 飯笹久、(他10名). ウィルス由来 microRNA によるウィルス潜伏感染調節機構の解析. 第6回北大若手研究者交流会、北海道大学医学部学友会館プラテ (札幌) (平成23年8月5日)
6. ゴウダルジ・ホウマヌ、飯笹久 (他3名) ヒト悪性胸膜中皮腫細胞の低酸素培養条件下における増殖・運動・浸潤能の変化. 第20回日本がん転移学会学術集会、アクトシテイ浜松コンgresセンター (浜松) (平成23年7月3日)
7. Iizasa H, (他10名). A to I RNA editing of EB virus-derived BART6 miRNAs regulates their Dicer targeting and affects their viral latency. "RNA editing, Editing and Modification of RNA and DNA" Gordon Research Conference. Hotel Galveston (Galveston), TX (平成23年1月11日).
8. 飯笹久、(他10名). EB ウィルス由来 microRNA の A-to-I RNA 編集によるウィルス潜伏感染の調節. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド(神戸) (平成22年12月10日)
9. 飯笹久、(他4名). ウィルス由来

- microRNA によるウィルス潜伏感染の制御-A-to-I RNA 編集と miRNA. RNA フロンティアミーティング、富士教育研修所 (三島) (平成22年9月27日)
10. ゴウダルジ・ホウマヌ、浜田淳一、樋田泰浩、飯笹久、守内哲也. ヒト悪性中皮腫細胞株の樹立とその悪性形質の低酸素状態における変化. 第69回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場(大阪) (平成22年9月22日)
  11. 飯笹久、岩切大、高田賢蔵、浜田淳一、守内哲也. EBV コード BART6 microRNA の A-to-I RNA 編集は Dicer 標的を調節し、潜伏感染を変性させる. 第69回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場(大阪) (平成22年9月22日)
  12. Houman Goudarzi, Jun-ichi Hamada, Hisashi Iizasa, Yasuhiro Hida, Tetsuya Moriuchi. Cell biological properties of newly established human malignant mesothelioma cell lines in normoxic and hypoxic culture condition. 第4回若手研究者交流会、北海道大学学術交流会館 (札幌) (平成22年7月30日)
  13. 飯笹久、(他10名). EB ウィルス由来 microRNA の A-to-I RNA 編集～microRNA によるウィルス潜伏感染の調節～. 第7回 EB ウィルス研究会、北海道大学学術交流会館 (札幌) (平成22年7月9日)
  14. Iizasa H, (他10名). A → I RNA Editing Modulates Targeting of Dicer by Ebv-encoded MicroRNA Bart6 and Viral Latency. The 19th CDB Meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology". RIKEN Center for Developmental Biology (Kobe), Japan, (平成22年5月10日).

[図書] (計1件)

1. 飯笹久、医歯薬出版、A-to-I RNA 編集とウィルス感染-宿主防御因子としての ADAR1 の役割-. 特集 RNA 医学・医療-あらたな診断・治療を拓く、2011、573-578

[その他]

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/crg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守内 哲也 (MORIUCHI TETSUYA)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
研究者番号：20174394

(2)研究分担者

飯笹 久 (IIZASA HISASHI)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：80306662

(3)連携研究者

( )

研究者番号：