

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23650194
研究課題名（和文） ヒト ES 細胞の神経分化を制御するノンコーディング RNA の解析
研究課題名（英文） Analysis of non-coding RNAs regulating neural differentiation of human ES cells.
研究代表者 岡田 洋平 (OKADA YOHEI) 慶應義塾大学・医学部・特任講師 研究者番号：30383714

研究成果の概要（和文）：

ヒト ES 細胞・iPS 細胞から神経幹細胞へと分化誘導する過程において、ゲノムタイリングアレイによるゲノムワイドな転写産物解析を行い、神経分化と共に発現が上昇する non-coding RNA を同定した。さらに、同定した non-coding RNA の機能解析のための、培養システムを構築した。

研究成果の概要（英文）：

Several non-coding RNAs (ncRNAs) upregulated during neural differentiation of human embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) were identified by genome-wide transcriptome analysis. In addition, methods for the analysis of identified ncRNAs during neural differentiation of human ESCs were also established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経薬理学

キーワード：ヒト ES 細胞、ノンコーディング RNA

1. 研究開始当初の背景

高度で複雑な機能を持つヒト脳の発生には、ゲノム上の非翻訳領域から生み出される non-coding RNA(ncRNA)の関与が示唆されているが、ヒト神経発生におけるその実態は殆ど明らかにされていない。また、これまではヒト神経発生を *in vitro* で再現する適切なモデルが欠如しており、そのような ncRNA の機能解析は困難であった。

そこで、研究代表者はヒト ES/iPS 細胞から神経幹細胞を高効率に誘導し、神経発生モデルとして利用するシステムを構築してきた。

2. 研究の目的

ヒト ES 細胞由来神経幹細胞の誘導システ

ムを、ヒト神経発生の *in vitro* モデルとして活用し、神経分化誘導の各段階においてゲノムタイリングアレイによる転写産物解析を行って転写領域データベースを構築し、神経分化に伴って発現が上昇する転写領域(特に長鎖 ncRNA)を同定する。さらに、ノックダウンによる解析を行うためのヒト ES 細胞の神経分化誘導・機能解析システムを構築し、ヒト ES 細胞の神経分化に重要な役割を果たす ncRNA のスクリーニングおよび同定を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES 細胞/iPS 細胞の神経分化誘導に伴って発現が上昇する non-coding RNA(ncRNA)の同定

ヒト ES 細胞 (KhES1, 2, 3)、ヒト iPS 細胞 (201B7, 253G1) から神経幹細胞 (neurosphere) を誘導する過程において total RNA を採取し、ゲノムタイリングアレイを行い、ゲノムワイドな転写産物解析を行い、神経誘導に伴って発現が上昇する転写産物を解析する。同定した ncRNA については、定量的 RT-PCR により、発現変化を確認する。

(2) 迅速神経分化培養法の開発

多数の候補遺伝子の機能解析には、一過性発現による遺伝子導入が簡便で適しているが、短時間しか発現が得られないため、分化誘導を一週間以内で行うことができる神経分化誘導法を開発する。BMP の阻害剤である Dorsomorphine (Noggin)、および ALK 阻害剤である SB431542 などを用いて、接着培養系により迅速で高効率な神経分化誘導法を開発を行う。さらに、siRNA によるノックダウンシステムを構築する。

(3) Sox1 レポータートランスジェニックヒト ES 細胞の作成

神経系前駆細胞に特異的に発現する Sox1 は神経分化の指標として有用である。そこで、BAC (Bacterial artificial chromosome) クローンを用いて、ヒト ES 細胞の神経分化を可視化できるトランスジェニックヒト ES 細胞を作成する。

(4) siRNA によるヒト ES 細胞の神経分化を制御する ncRNA のスクリーニング

接着培養による迅速神経分化誘導法を用いて siRNA によるノックダウンを行うことで、神経分化の抑制効果を指標に、ncRNA のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1) ヒト ES 細胞/iPS 細胞の神経分化誘導に伴って発現が上昇する ncRNA の同定

ヒト ES 細胞 (KhES1, 2, 3)、ヒト iPS 細胞 (201B7, 253G1) から神経幹細胞 (neurosphere) を誘導する過程において、ゲノムタイリングアレイにより、ゲノムワイドな転写産物解析を行い、データベースを構築した。このデータベースを用いて、神経誘導に伴って発現が上昇する転写領域を 1000 個以上同定した。さらに、特に発現量が高く、神経系組織、および他の臓器組織での発現パターンから、神経系特異的であるもの約 80 個に、さらに、52 個の ncRNA については、定量的 RT-PCR により、神経分化に伴う発現上昇を確認した。

(2) 迅速神経分化培養法の開発

siRNA の一過性発現によるスクリーニングのため、BMP 阻害剤 Dorsomorphine (Noggin)

および ALK の阻害剤である SB431542 などを加えることで、接着培養による迅速で高効率の神経分化誘導法を開発した。この方法で分化誘導することで、分化誘導後 3-6 日目で通常の神経分化誘導と同等のレベルの Sox1 の発現が得られることを確認した。

さらに、invitrogen 社の Neon® をいたエレクトロポレーション法により siRNA を導入することで、内在性遺伝子 (GAPDH および SOX1) の発現を約 80% 程度抑制できるシステムを開発した。

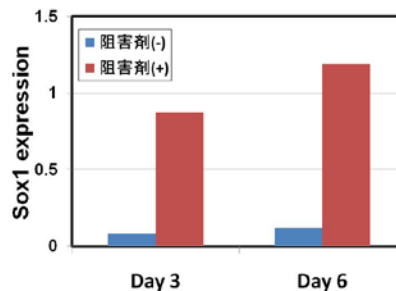


図 1 迅速神経分化誘導法による神経分化誘導。

(3) Sox1 レポータートランスジェニックヒト ES 細胞の作成

BAC クローンを用いて、ヒト Sox1 の遺伝子座に緑色蛍光タンパク Venus と Luciferase の融合タンパクである ffLuc のレポーターをノックインした BAC プラスミドを作成し、神経分化を定量可視化できるトランスジェニックヒト ES 細胞を作成した (Sox1-ffLuc ヒト ES 細胞)。9 株の Sox1-ffLuc ヒト ES 細胞株を樹立し、神経分化誘導による Sox1 の発現上昇に伴って、Luciferase の発光が上昇することを確認した (図 2)。

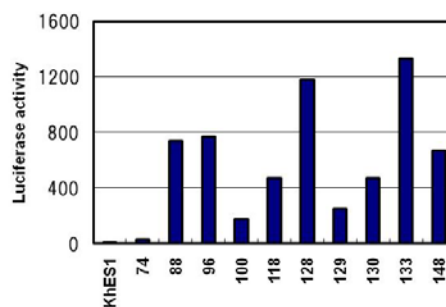


図 2 hSox1-dVenusLuc2 ヒト ES 細胞 : 74 以外の 9 株は神経分化誘導と共に Luciferase 活性が上昇。

(4) siRNA によるヒト ES 細胞の神経分化を制御する ncRNA のスクリーニング

同定した ncRNA に対する siRNA を導入して、迅速神経分化誘導を行い、SOX1 の発現を指標に神経分化に対する影響を解析し、ncRNA のスクリーニングを行い、少なくとも 15 個については、神経分化の抑制効果がみられることが確認できた。

今後、さらに多数の ncRNA のスクリーニングを進めると同時に、得られた結果の再現性の確認を行う。

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 15 件)『すべて査読あり』

- (1) Shofuda T, Kanematsu D, Fukusumi H, Yamamoto A, Bamba Y, Yoshitatsu S, Suemizu H, Nakamura M, Sugimoto Y, Furue KM, Kohara A, Akamatsu W, Okada Y, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y. Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells are a Promising Source for the Generation and Cell Banking, of Human Induced Pluripotent Stem Cells Cell Medicine, Part B of Cell Transplantation *in press*
- (2) Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K, Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells Circulation Research 112(3) 523-33, 2013
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.256149
- (3) Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced aggregation of androgen receptor in induced pluripotent stem cell-derived neurons from spinal and bulbar muscular atrophy. J Biol Chem. 288(12):8043-52. 2013
DOI: 10.1074/jbc.M112.408211
- (4) Kobayashi Y*, Okada Y*, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H: Pre-Evaluated Safe Human iPSC-Derived Neural Stem Cells Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Common Marmoset without Tumorigenicity. PLoS One. 7(12): e52787. 2012, *equally contributed first authors
DOI:10.1371/journal.pone.0052787
- (5) Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Suzuki T, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Narita M. Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer. PLoS One. 7(10): e44368. 2012
DOI: 10.1371/journal.pone.0044368
- (6) Shimada H, Okada Y*, Ibata K, Ebise H, Ota S, Tomioka I, Nomura T, Maeda T, Kohda K, Yuzaki M, Sasaki E, Nakamura M, Okano H*. Efficient Derivation of Multipotent Neural Stem/Progenitor Cells from Non-human Primate Embryonic Stem Cells PLoS One. 7(11): e49469, 2012, *equally contributed last authors, #corresponding authors
DOI: 10.1371/journal.pone.0049469
- (7) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidativestress and α -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue Mol. Brain. 5(1) 35, 2012
DOI: 10.1186/1756-6606-5-35
- (8) Yagi T, Kosakai A, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. PLoS One. 7(7):e41572. 2012
DOI:10.1371/journal.pone.0041572
- (9) Muto J, Imai T, Ogawa D, Nishimoto Y, Okada Y, Mabuchi Y, Kawase T, Iwanami A, Mischel PS, Saya H, Yoshida K, Matsuzaki Y, Okano H. RNA-Binding Protein Musashi1 Modulates Glioma Cell Growth through the Post-Transcriptional Regulation of Notch and PI(3) Kinase/Akt Signaling Pathways. PLoS One. 7(3):e33431. 2012
DOI:10.1371/journal.pone.0033431
- (10) Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Nagase H, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Suzuki T, Narita M. Effect of κ -opioid receptor agonist on the growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. Br J Cancer. 106(6):1148-52 2011
DOI: 10.1038/bjc.2011.574
- (11) Nori S*, Okada Y*, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H.

Grafted human induced pluripotent stem cell-derived neurospheres promotes motor functional recovery after spinal cord injury in mice Proc Natl Acad Sci U S A. 108(40):16825-30. 2011 **equally contributed first authors*
DOI: 10.1073/pnas.1108077108

- (12) Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. Hum. Mol. Genet. 20 (23): 4530-4539. 2011
DOI: 10.1093/hmg/ddr394
- (13) Kawahara H, Okada Y, Imai T, Iwanami A, Mischel PS, Okano H. Musashi 1 cooperates in abnormal cell LINEage protein 28 (Lin28)-mediated Let-7 family microRNA biogenesis in early neural differentiation. J Biol Chem. ;286(18):16121-30. 2011 *Selected for "Paper of the Week"*
DOI: 10.1074/jbc.M110.199166
- (14) Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Kuwahara R, Ohyama M, Amagai M, Matsuzaki Y, Yamanaka S, Okano H, Kawakami Y. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. Plos One 6 (1):e16182 2011
DOI:10.1371/journal.pone.0016182
- (15) Shiozawa S, Kawai K, Okada Y, Tomioka I, Maeda T, Kanda A, Shinohara H, Suemizu H, Okano HJ, Sotomaru Y, Sasaki E, Okano H. Gene targeting and subsequent site-specific transgenesis at the β -actin (ACTB) locus in common marmoset embryonic stem cells Stem Cells and Development. 20(9):1587-99. 2011
DOI:10.1089/scd.2010.0351

[学会発表] (計 42 件)

- (1) Okada Y, Miya F, Koike M, Tomisato S, Tokura T, Ishihara Y, Shimojo D, Hattori C, Kanematsu D, Kanemura Y, Kohda K, Sobue G, Yamanaka S, Yuzaki M, Uchiyama Y, Ikeda E, Tsunoda T, Okano H, Incompletely reprogrammed human iPSCs form glioma-like tumors through genomic instability during neural differentiation, CiRA International Symoisum 2013, Raising the Nex Generation of Stem Cell Research, Kyoto March 2013, CiRA International Symoisum 2013, Raising the Nex Generation of Stem Cell

Research, Kyoto, March 12, 2013

- (2) Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kuzumaki N, Kishi N, Akamatsu W, Amagai M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H, Modeling dysmyelinating neurological disorders using human iPSC-derived mature oligodendrocytes, CiRA International Symoisum 2013, Raising the Nex Generation of Stem Cell Research, Kyoto, March 11, 2013
- (3) 岡田洋平, iPS 細胞を用いた神経再生と病態解析 第 4 回岐阜脳神経研究会、岐阜、2013 年 2 月 2 日 (特別講演・招待講演)
- (4) 岡田洋平、宮冬樹、小池正人、富里周太、兼松大介、金村米博、幸田和久、柚崎通介、内山安男、池田栄二、角田達彦、山中伸弥、岡野栄之、不完全にリプログラミングされたヒト iPS 細胞由来神経幹細胞は分化誘導に伴うゲノム不安定化によりグリオーマ様腫瘍を形成する、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 12 日
- (5) 岡田洋平、岡野栄之、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の応用とその問題点 第 24 回日本脳循環代謝学会総会、広島、2012 年 11 月 9 日 (シンポジウム・招待講演)
- (6) 岡田洋平、多能性幹細胞・神経幹細胞を用いた神経再生と病態解析 第 13 回埼玉パーキンソン病治療研究会、大宮、2012 年 11 月 1 日 (特別講演・招待講演)
- (7) Okada Y, Miya F, Tomisato S, Kanemura Y, Koike M, Kohda K, Yuzaki M, Uchiyama Y, Tsunoda T, Yamanaka S, Okano H, Evaluation of human iPSC cells by neural differentiation and tumorigenicity, ISSCR 10th annual Meeting, Yokohama, June 15 2012
- (8) Ishihara Y, Okada Y, Koakutsu M, Okano H, Rapid and easy monolayer neural differentiation of human ES cells, ISSCR 10th annual Meeting, Yokohama, June 14, 2012
- (9) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Hayakawa H, Nihira T, Suematsu M, Suzuki N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H, Mitochondrial dysfunction and alfa synuclein accumulation in PARK2 IPSC derived neurons and postmortem brain, ISSCR 10th annual Meeting, Yokohama, June 14, 2012
- (10) Koakutsu M, Okada Y, Okano H, Exogenous signals oppositely affect adipocyte differentiation and neural differentiation of human ES/iPS cells,

- ISSCR 10th annual Meeting, Yokohama, June 14, 2012
- (11) Kobayashi Y, Okada Y, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H, Pre-evaluated safe human iPS clone derived neural stem cells promoted functional recovery after spinal cord injury without tumorigenicity in adult common marmosets, ISSCR 10th annual Meeting, Yokohama, June 14, 2012
- (12) Shimada, H., Okada Y., Tomioka, I., Sasaki, E., Nakamura, M., Okano, H.: Efficient derivation of neural stem cells from common marmoset ES cells and iPS cells. Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, Washington DC, USA, November 15, 2011
- (13) 吉田賢司、太田真一、原央子、岡田洋平、岡野栄之、神経前駆細胞特異的レポーターヒトES細胞の樹立、第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月15日
- (14) 岡田洋平、宮冬樹、金村米博、砂堀毅彦、小池正人、幸田和久、柚崎通介、内山安男、角田達彦、山中伸弥、岡野栄之、神経分化と造腫瘍性から迫るヒトiPS細胞の品質評価、第34回日本神経科学大会、横浜、2011年9月17日
- (15) Okada Y, Miya F, Kanemura Y, Koike M, Kohda K, Yuzaki M, Uchiyam Y, Tsunoda T, Yamanaka S, Okano H, Evaluation of human iPS cells by neural differentiation and tumorigenicity. 8th IBRO World congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 16 2011
- (16) Yoshida, K., Ota, S.-I., Hara, C., Okano, H., Okada Y. Generation and characterization of human ES cells carrying Sox1-reporter gene for neural differentiation. 8th IBRO World congress of Neuroscience, Florence, Italy, July 18, 2011
- (17) 岡田洋平、iPS細胞・神経幹細胞で神経系を再生する、兵庫県保険医協会 第79回総会特別講演、神戸、2011年6月19日(特別講演・招待講演)
- (18) Nori, S., Okada Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Toyama, Y., Yamanaka, S., Nakamura, M., Okano, H. Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice, ISSCR 9th annual

Meeting, Toronto, Canada, June 15-18, 2011

- (19) 岡田洋平、岡野栄之、神経分化と造腫瘍性から迫るヒトiPS細胞の品質評価、第52回日本神経学会学術大会、名古屋、2011年5月20日(シンポジウム・招待講演)

〔図書〕(計2件)

1. 海苔聡、辻収彦、岡田洋平、戸山芳昭、岡野栄之、中村雅也 iPS細胞を用いた脊髄損傷治療、*Brain Nerve* 64 (1), 17-27, 2012年1月、医学書院
2. 岡田洋平、岡野栄之、神経分化と造腫瘍性から迫るヒトiPS細胞の品質評価 臨床神経学 51(11)、1079-1080、2011年11月、日本神経学会

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：iPS細胞のクローンの選択方法、及びその選択方法に用いる遺伝子の選択方法

発明者：岡田洋平、岡野栄之、角田達彦、宮冬樹

権利者：学校法人慶應義塾

種類：PCT

番号：PCT/JP2012/054800

出願年月日：2012.2.27

国内外の別：PCT

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/okada/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 洋平 (OKADA YOHEI)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：30383714

(2) 連携研究者

角田 達彦 (TSUNODA TATSUHIKO)

理化学研究所・ゲノム医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：10273468

宮 冬樹 (MIYA FUYUKI)

理化学研究所・ゲノム医科学研究センター・研究員

研究者番号：50415311