

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6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659148

研究課題名（和文）microRNA 導入による iPS 細胞樹立の試み

研究課題名（英文）Establish of iPS by expression of microRNA

研究代表者

渡邊 すみ子（WATANABE SUMIKO）

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60240735

研究成果の概要（和文）：

ヒト、マウス合計 20 ライン近い iPS からライブラリーを作成し、バイオインフォマティクスを用いて、高発現 miRNA を抽出し、これらについて発現ベクターを作成した。これを MEF, 未分化 iPS, embryoid body にそれぞれ発現させ、iPS 樹立効率、未分化性維持、分化効率について検討を加えた。複数の miRNA で、これらの効率に影響をあたえるものが見いだされたが、過剰発現の効率、安定性に問題があり、ベクターを改変し、スポンジタイプのベクターを評価したところ安定した過剰発現が得られた。

研究成果の概要（英文）：

miRNA expression pattern of human and mouse iPS was examined by qPCR array followed by bioinformatics, and a list of miRNA, which are expressing highly in iPS, was constructed. Expression vector of these miRNA was made, and they were introduced into MEF, immature iPS, and embryoid body to examine effects of these miRNA for efficiency to establish iPS, immaturity of iPS, and differentiation ability. Several types of expression vector had been constructed, and finally we got a vector expressing miRNA or its antagonized sequence stably and with high level.

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：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：miRNA, iPS, 分化

1. 研究開始当初の背景

近年 microRNA の重要性やその分子メカニズムが急速に明らかになっている。幹細胞の分野でも様々な報告が蓄積され始めた。例えば

ES 細胞で発現している microRNA (miRNA) の網羅的解析が行われ、また細胞内での miRNA の成熟に必須な酵素である Dicer, Dgcr8 のノックアウト ES の解析により、miRNA の ES 細

胞の増殖制御における重要性などが明らかになった。iPSの発見により再生研究はES細胞からiPSを用いた研究に中心軸が移ってきた。しかしiPSにおけるmicroRNA研究は特定のmicroRNAの増殖、分化能に対する役割についての研究が散見する程度である。iPS細胞の未分化性維持にmiRNAがどのように寄与するのか、またmiRNAを制御する事が臓器再生にどのようにbenefitがあるのかをシステマティックに検討する事は、安全で効率のよい再生医療の実現にとって明らかにすべき必須の課題である。ESにはmiRNA研究の蓄積があるが、ESとiPSは共通点を持つものの、その樹立方法は異っておりiPSを標的とした解析が必須である。

我々はこのような背景で、iPSに発現するmiRNAについて網羅的に解析するため、mRAP法を用いて、マウス、ヒトiPSについて全発現microRNAのライブラリーを作製し、全配列をシーケンシングし、バイオインフォーマティクスで解析した。その結果、これまで知られたES細胞に発現しているサブセットとはまったく異なるセットのmiRNAの発現がヒト、マウスで明らかになり、さらに興味深い事にわずかに数種類のmiRNAがiPSに発現するmiRNAの99%をしめていた。これらのmiRNAを用いて、iPSのマニピュレーションの効率化への活用を検討する事を計画した。

2. 研究の目的

これらのmiRNAがiPSの本態、さらには組織への分化誘導過程にどのような役割を果たすか、という事も重要課題であるが本研究ではこれらのmiRNAを線維芽細胞などに発現させる事でiPSの樹立が可能かどうかについて検討を加えることを目的とした。

3. 研究の方法

我々がmRAP法を用いて明らかにしたマウス、ヒトiPSに発現するmicroRNAを過剰発現させるベクターを構築し、様々な細胞に、単独であるいは組み合わせで、またiPS樹立に必要な4(3)転写因子との組み合わせで発現させ、

そのiPS樹立効率、速度を検討する。ソースとなる細胞種による差異も検討する。また樹立されたならばそのiPSのキャラクタリゼーションを行なう。樹立に効果のあるmicroRNAが同定されたなら、microRNAの「RNA」での導入を試み、染色体破壊のない安全なiPS樹立をめざす。

- (1) microRNA過剰発現系の構築とその評価
- (2) iPS作製のソースとなる細胞の選択と遺伝子導入法の決定
- (3) ソースとなる複数の細胞からの4因子導入によるiPS樹立効率とタイムコースの検討
- (4) ソースとなる細胞でのmicroRNAの過剰発現系の確認
- (5) 因子とmicroRNAの組み合わせの導入によるiPS樹立効率、タイムコースの検討の順で研究を進めることを計画した。

4. 研究成果

本研究では当初の計画としてはmiRNAのiPSにおける発現パターンをmRAP法をもちいて作成したライブラリーを用いて解析したものをを使うことを計画した。この方法でiPS特異的な発現をするmiRNAとして同定されたものがわずかに4種類のmiRNAであったため、これについて過剰発現、およびシード配列の相補鎖を発現するベクターをレトロウイルスベクター、CAGベクターで構築した。iPSおよび3T3細胞などでの過剰発現をqPCRで確認したがよい発現が得られなかったため、アームの変更などをくりかえし比較的安定に発現するベクターを作成した。これらをMEF, iPS, embryoid bodyなどに発現させ、その影響を検討した。一方、その際、qPCRをもちいて個々のmiRNAについて発現チェックをしていくうちに、このライブラリーの質に問題がある可能性がでてきた。事実、この間海外から発表された複数の論文によるiPS特異的な発現をするとされるmiRNAと我々のリストがまったく異なっていること、我々のmiRNAについてqPCRで発現チェックをおこなってみると、確かにiPSで高発現ではあるも

の、iPS に高発現な miRNA はこれのみではないことが示唆された。そこで、qPCR アレイを用いて、新たに miRNA の発現チェックをおこなった。再生医療実現化プロジェクト東大拠点としておこなったヒト iPS の qPCR アレイによる miRNA 発現解析の手法を使い、mRAP 法でもちいたマウス iPS について、400 種近い miRNA の発現パターンを解析し、バイオインフォマティクスを用いて、高発現 miRNA を抽出し、新たなリストを作成した。このリストでは、MEF, TTF などをコントロールとし、また embryoid body を作成したときに時系列でどのように miRNA の発現パターンが変わっていくかについても把握することで、miRNA の利用の目的 (iPS 樹立効率、未分化性維持、分化効率など) によって、どの miRNA の過剰発現、あるいは機能抑制をおこなうかを選択して検討する事が可能になった。次に、これらについて発現ベクターを作成した。これを MEF, 未分化、embryoid body にそれぞれ発現させ、iPS 樹立効率、未分化性維持、分化効率について検討をくわえた。複数の miRNA で、これらの効率に影響をあたえるものが見いだされたが、過剰発現の効率、安定性に問題があり、ベクターを改変し、近年海外より報告されたスポンジタイプのベクターを改変し、過剰発現ベクターを構築し評価したところ安定した過剰発現が得られたので、このシステムに変更し、MEF からの iPS 樹立に集中して、検討を続けている。iPS の miRNA による樹立は、本研究期間にも論文などで報告があったが、追試に問題があったり、効率が低いなど決め手となる技術開発にはいたっていない。本研究で確立した発現情報はきわめて質が高く、これをもちいて、単一の miRNA ではなく、複数の miRNA を組み合わせ発現させることにより、安定した miRNA による iPS の樹立にいたることが期待される。このため、その時点での最新の修飾 RNA、導入方法、などを検討し、さまざまな組み合わせの中から最適なものを選択し、発現ベクターとの比較実験を行なう事を今後の研究の発

展として計画している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Iida, A., Shinoe, T., Baba, Y., Mano, H., Watanabe, S. (2011) Dicer plays essential roles for retinal development by regulation of survival and differentiation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 52, 3008-3017
- (2) Nakamura, Y., He, X., Kato, H., Wakitani, S., Kobayashi, T., Watanabe, S., Iida, A., Tahara, H., Warman, M. L., Watanapokasin, R., Postlethwait, J. H. (2011) Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage. 査読有 *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 64-71
- (3) Iwagawa, T., Ohuchi, S., Watanabe, S., Nakamura, Y. (2012) Selection of RNA aptamers against mouse embryonic stem cells. *Biochimie*, 査読有 94, 250-257
- (4) Baba, Y., Satoh, S., Otsu, M., Sasaki, E., Okada, T., and Watanabe, S. (2012) In vitro cell subtype-specific transduction of adeno-associated virus in the mouse and marmoset retinal explant culture, *Biochimie*, 94, 2716-2722
- (5) Saito, R., Nakauchi, H., Watanabe, S. (2012) Serine/Threonine kinase Melk regulates proliferation and glial differentiation of retinal progenitor cells. *Can. Sci.*, 査読有 103, 42-49
- (6) 細胞移植による組織の再生とその実現化をささえる技術開発 日本 AEM 学会誌 *Journal of the japan society of applied electromagnetics and mechanics V 20*, 2011, 583-588

〔学会発表〕（計 2 件）

(1) Siti Razila, Watanabe, S. Identification of the expression pattern of microRNAs in iPS cells, and analysis of their roles in maintenance of iPS cell immaturity
ISRF 2012, Omaha, USA

(2) Watanabe, S. Studies of retinal cell lineage and differentiation mechanisms by using cell surface antigens
July 22, 2012, Berlin, Germany

〔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

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/moldev/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 すみ子 (WATANABE SUMIKO)
東京大学・医科学研究所・特任教授
研究者番号：6 0 2 4 0 7 3 5

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし