

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670604

研究課題名(和文)キメラ系性能を持つ真のヒト多能性幹細胞の樹立

研究課題名(英文)Establish the pluripotent stem cells having the function of chimeric formation

研究代表者

今野 雅允 (KONNO, Masamitsu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：80618207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胚を用いて、8細胞期及び胚盤胞期に蛍光標識したヒト多能性幹細胞を移植し動物性集合胚の作成を行った。倫理的な問題を考慮し、これらの胚は子宮に戻すことはせず試験管内培養を行うためヒトとのキメラ個体が発生することは決して無いキメラ胚培養後細胞を酵素処理によりバラバラにしセルソーターを用いて蛍光標識のあるヒト由来細胞と他種動物由来細胞を分け、ヒト由来細胞の遺伝子発現解析、タンパク質発現解析を行いキメラが形成されることの確認(他種動物胚内でヒト由来細胞があらゆる組織の細胞に分化していることの確認)を行った。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cell which marked fluorescence injected in mouse 8 cell and a blastocyst. The embryos dispersed by enzyme processing after the chimera embryo culture and investigated the gene expression analysis of a man origin cell and a protein manifested analysis. And we confirmed the case that a man origin cell differentiates into a cell of all organizations in the other kind animal embryo.

研究分野：消化器外科

キーワード：再生医学 移植・再生医療 核酸

#### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究の発展により、多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)や組織幹細胞(脂肪組織由来間葉系幹細胞)から様々な組織への分化誘導法が開発され多数の報告がなされている。しかしながらこれまでの分化誘導の報告の大多数が生体外において作成し、細胞療法を行うためのソースとしては有用であるが、臓器障害を有し、移植以外の選択肢の無い多くの患者では細胞療法のみで完全に臓器不全を補完することは極めて困難である。そこで三次元の組織の作成を目指し膵臓の無いマウス体内でのラット膵臓の作成や、膵臓の無いブタに健常なブタの膵臓を作成する報告がなされ、異種の受精卵内にヒト iPS 細胞や ES 細胞を移植し発生させることで異種の体内でヒトの臓器を作成することが有望であると考えられている。マウス ES、iPS 細胞は異種動物の細胞とキメラ化し、その状態のまま正常に受精卵を発生させ個体を得ることが可能であるが、マウス ES 細胞よりも発生が進んだマウス胚盤用上層幹細胞(EpiSC)はキメラ系性能を持たないことが知られている。そしてヒト ES、iPS 細胞はマウス ES、iPS 細胞と性質に大きな違いがあり、マウス EpiSC とより多くの共通点を持つことからキメラ系性能を持たないと考えられている。

#### 2. 研究の目的

受精卵由来新規マイクロ RNA を同定しキメラ形成能を有するヒト iPS 細胞の樹立を目指す。

#### 3. 研究の方法

##### **候補 microRNA の更なる絞り込み、誘導 microRNA の決定(ハイスループットスクリーニング)**

既に絞り込んでいる種類の microRNA のレンチウイルスベクターを作成した。作成したレンチウイルスをヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)へ様々な組み合わせで導入(最大 4096 通り、週 100 通りの組み合わせで実験を行えば約 40 週で終了)、その後マウス ES 細胞の培養条件(白血病抑制因子: LIF 存在下 マウス ES 細胞の未分化維持に必須)で培養を行い培養 20 日に遺伝子発現解析、免疫染色、ウエスタンブロットティング、X 染色体の不活化状態の確認などを行うことでマウス ES 細胞と同等のヒト多能性幹細胞の樹立を行った。

##### **樹立したヒト多能性幹細胞が多分化能を持つことの確認**

樹立したヒト多能性幹細胞を未分化維持に必須な LIF 非存在下で培養し身体のあらゆる細胞に分化可能であることを遺伝子発現解析、免疫染色、ウエスタンブロットティングなどを行い確認した。

##### **樹立したヒト多能性幹細胞がキメラ形成能を持つことの確認**

マウス胚、ブタ胚の 8 細胞期～胚盤胞期に蛍光標識したヒト多能性幹細胞を移植し動物性集合胚の作成を行った。

倫理的問題を考慮し、これらの胚は子宮に戻すことはせず試験管内培養を行うためヒトとのキメラ個体が発生することは決して無い。キメラ胚培養後細胞を酵素を用いてバラバラにしセルソーターを用いて蛍光標識のあるヒト由来細胞と多種動物由来細胞を分け、ヒト由来細胞の遺伝子発現解析、タンパク質発現解析を行いキメラが形成されることの確認(他種動物胚内でヒト由来細胞があらゆる組織の細胞に分化していることの確認)を行った。

##### **樹立したヒト多能性幹細胞の最適な培養法の確立**

樹立した多能性幹細胞を様々な成長因子(LIF, Activin, FGF2 等)や阻害剤(GSK3i, ERKi 等)様々な濃度、組み合わせで培養し、形質を維持したまま安定して培養出来る最適な条件を検討した。

#### 4. 研究成果

12 種類の microRNA のレンチウイルスベクターを作成した。作成したレンチウイルスをヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)へ様々な組み合わせで導入、その後マウス ES 細胞の培養条件で培養を行い培養 20 日目に多能性関連遺伝子及びタンパク質を遺伝子発現解析、免疫染色、ウエスタンブロットティングで確認、また Xist の発現レベルにより X 染色体の不活化状態の確認などを行なった。また分化能を確認するために樹立したヒト多能性幹細胞を分化培地で培養し様々な細胞に分化可能であることを確認した。マウス胚を用いて、8 細胞期及び胚盤胞期に蛍光標識したヒト多能性幹細胞を移植し動物性集合胚の作成を行った。倫理的問題を考慮し、これらの胚は子宮に戻すことはせず試験管内培養を行うためヒトとのキメラ個体が発生することは決して無いキメラ胚培養後細胞を酵素処理によりバラバラにしセルソーターを用いて蛍光標識のあるヒト由来細胞と他種動物由来細胞を分け、ヒト由来細胞の遺伝子発現解析、タンパク質発現解析を行いキメラが形成されることの確認(他種動物胚内でヒト由来細胞があらゆる組織の細胞に分化していることの確認)を行った。結果としてキメラ系性能を持つヒト多能性幹細胞の樹立には至っていないが、今後は樹立した多能性幹細胞を様々な成長因子(LIF、Activin、FGF2 等)や阻害剤(GSK3i、ERKi 等)様々な濃度、組み合わせで培養し、形質を維持したまま安定して培養出来る最適な条件を検討し、確立することで将来キメラ動物を用いてヒト臓器を作成する際の細胞の安定供給技術を確立する。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- 1) Konno, M., Ishii, H., Koseki, J., Tanuma, N., Nishida, N., Kawamoto, K., Nishimura, T., Nakata, A., Matsui, H., Noguchi, K., Ozaki, M., Noguchi, Y., Shima, H., Gotoh, N., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. *Regen. Therap.*, 1, 63-71, 2015.  
DOI: 10.1016/j.reth.2015.01.001
- 2) Konno, M., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Matsui, H., Dewi, DL., Ozaki, M., Noguchi, Y., Mimori, K., Gotoh, N., Tanuma, N., Shima, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Embryonic microRNA-369 Controls Metabolic Splicing Factors and urges Cellular Reprograming. *PLoS One*, 10(7):e0132789, 2015.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0132789.
- 3) Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating  $\beta$ -oxygenation pathway in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 46(3):1181-1191, 2015.  
DOI: 10.3892/ijo.2015.2833.
- 4) Hasegawa, S., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Marubashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. Cyclin G2: A novel independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncol. Lett.*, 10(5):2986-2990, 2015.  
DOI: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2015.3667>
- 5) Yabe, SG., Iwasaki, N., Yasuda, K., Hamazaki, TS., Konno, M., Fukuda, S., Takeda, F., Kasuga, M., Okochi, H. Establishment of maturity-onset diabetes of the young-induced pluripotent stem cells from a Japanese patient. *J. Diabetes. Investig.*, 6(5):543-547, 2015.  
DOI: 10.1111/jdi.12334.
- 6) Baek, SJ., Ishii, H., Tamari, K., Hayashi, K., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyo, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Cancer stem cells: The potential of carbon ion beam radiation and new radiosensitizers (Review). *Oncol Rep.*, 34(5):2233-2237, 2015.  
DOI: 10.3892/or.2015.4236.
- 7) Asukai, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Nishida, N., Koseki, J., Noguchi, K., Hasegawa, S., Ogawa, H., Yamada, D., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Marubashi, S., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. Ishii, H. Prognostic impact of peritumoral IL-17-positive cells and IL-17 axis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma *Ann. Surg. Oncol.*, Suppl 3:1524-1531, 2015.  
DOI: 10.1245/s10434-015-4782-y.
- 8) Ogawa, H., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Colvin, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Marubashi, S., Kobayashi, S., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol. Clin. Oncol.*, 3(3):563-571, 2015.  
DOI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4471544/>
- 9) Takahashi, H., Nishimura, J., Kagawa, Y., Kano, Y., Takahashi, Y., Wu, X., Hiraki, M., Hamabe, A., Konno, M., Haraguchi, N., Takemasa, I., Mizushima, T., Ishii, M., Mimori, K., Ishii, H., Doki, Y., Mori, M., Yamamoto, H. Significance of Polypyrimidine Tract-Binding Protein 1 Expression in Colorectal Cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 14(7):1705-1716, 2015.  
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0142.
- 10) Ogawa, H., Wu, X., Kawamoto, K., Nishida, N., Konno, M., Koseki, J., Matsui, H., Noguchi, K., Gotoh, N., Yamamoto, T., Miyata, K., Nishiyama, N., Nagano, H., Yamamoto, H., Obika, S., Kataoka, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One*, 10(5):e0127119, 2015.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0127119.
- 11) Miyo, M., Yamamoto, H., Konno, M., Colvin, H., Nishida, N., Koseki, J., Kawamoto, K., Ogawa, H., Hamabe, A., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Tumour-suppressive function of SIRT4 in human colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 113(3):492-499, 2015.  
DOI: 10.1038/bjc.2015.226.
- 12) Noguchi, K., Eguchi, H., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Wada, H., Marubashi, S., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Susceptibility of pancreatic cancer stem cells to reprogramming. *Cancer Sci.*, 106(9):1182-1187, 2015.  
DOI: 10.1111/cas.12734.

- 13) Nishikawa, S., Konno, M., Hamabe, A., Hasegawa, S., Kano, Y., Fukusumi, T., Satoh, T., Takiguchi, S. Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. Surgically resected human tumors reveal the biological significance of the gastric cancer stem cell Markers CD44 and CD26. *Oncol Lett.*, 9, 2361-2367, 2015.  
DOI:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4467359/>

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 今野雅允、他：EMT 制御に関わる核内 PKM2 の機能解析、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場(愛知)
- 2) 西田尚弘、今野雅允、石井秀始、他：ヒストン脱メチル化酵素 KDM5B の大腸癌進展機構への関わり、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場(愛知)
- 3) 小関準、今野雅允、石井秀始、他：FTD がもたらす DNA 二本鎖構造への相互作用変化の理論的解析、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場(愛知)
- 4) 今野雅允、石井秀始、他：消化器癌幹細胞の浸潤転移能獲得における癌特異的代謝酵素の重要性、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19 日、米子全日空ホテル(鳥取)
- 5) 西田尚弘、今野雅允、石井秀始、他：ノンコーディング RNA の消化器癌進展への関わり、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19 日、米子全日空ホテル(鳥取)

〔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〕

該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今野 雅允 (KONNO Masamitsu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
助教  
研究者番号：80618207

### (2) 研究分担者

石井 秀始 (ISHII Hideshi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授  
(常勤)  
研究者番号：10280736