

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659454

研究課題名（和文） 最終分化細胞の前駆細胞への転換 一幹細胞を標的としない組織再生の試み一

研究課題名（英文） Conversion of Terminally Differentiated Cells to Progenitor Cells - A Trial of Tissue Regeneration Not by Targeting Stem Cells

研究代表者

池田 正明（IKEDA MASAOKI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20193211

研究成果の概要（和文）：

p53 および RB ががん抑制遺伝子によって制御される経路は、最終分化細胞の分化と増殖抑制に重要な役割を担っている。そこで本研究は、最終分化細胞の脱分化と再増殖を誘導するため、これらの二つのがん抑制経路における ARID (AT-rich interaction domain) DNA 結合タンパク質 DRIL1 および DRIL2 の役割を解析した。その結果、(1) DRIL1 は p53 と協調的に働いて細胞周期停止に関与する *p21/WAF1* の転写活性化を活性化すること、(2) DRIL1 および DRIL2 は E2F 標的遺伝子の転写活性化と細胞増殖において重要な役割を担っていること、さらに (3) DRIL2 の発現が骨分化に必要であることが分かった。さらに最終分化細胞の脱分化と再増殖を誘導するためには、DRIL1 あるいは DRIL2 をノックダウンに加えて、p53 および RB の機能を抑制する必要があることが示唆された。以上の知見は、最終分化細胞の前駆細胞への転換において重要な知見をもたすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The pathways regulated by p53 and RB tumor suppressors play important roles in differentiation and irreversible cell-cycle arrest in terminally differentiated cells. To induce dedifferentiation and proliferation of terminally differentiated cells, we investigated functional roles of DRIL1 and its closely related DRIL2, family members of ARID (AT-rich interaction domain) DNA-binding proteins, in these major tumor suppressor pathways. We found that DRIL1 cooperates with p53 to activate pro-arrest *p21^{WAF1}* transcription, and that DRIL1 and DRIL2 play important roles in E2F-target gene expression and cell cycle progression, and that DRIL2 function is required for osteogenic differentiation. In addition, our results suggest that, in addition to DRIL1 or DRIL2 knockdown, inhibition of p53 and RB functions is required for inducing dedifferentiation and proliferation of terminally differentiated cells. These results provide important insights to the conversion of terminally differentiated cells into progenitor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1000000	0	1000000
2010年度	1000000	0	1000000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
総計	3100000	330000	3430000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

組織中で盛んに分裂している細胞は、幹細胞ではなく、分化方向が決定された前駆細胞と呼ばれる細胞である。したがって、前駆細胞を賦活化し、増殖を活性化できれば失われた組織の再生が可能となると考えられる。しかしながら、心筋や神経細胞に限らず、組織中の分化した多くの細胞は不可逆的に増殖能を失っており（最終分化）、再び分裂することはないと考えられている。

細胞分化に伴う細胞特性の変化には、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を活性化したり不活性化したりする後生的修飾（エピジェネティック）が関与している。したがって、終末分化細胞の不可逆的増殖停止細胞は、増殖に必要な遺伝子の発現がエピジェネティックな制御を受けて発現しないように抑制されているためであると考えられる。したがって、最終分化細胞の増殖を誘導するためには、増殖を制御している遺伝子のエピジェネティックな抑制を解除させる必要がある。

真核細胞のクロマチン DNA は、核マトリックスに結合し、ループ構造をとるとともに、様々な機能分子が集積している核ボディ（核ドメイン）と呼ばれる核内構造と相互作用している。この様な核内高次構造は、エピジェネティックな遺伝子発現制御の核内基盤として重要な役割を担っている。これまでの研究により、核マトリックス結合因子 DRIL1 は、核内の主要な構成要素（クロマチン DNA、核ボディ、核マトリックス）の全てと相互作用することが示されている。申請者らは DRIL1 の発現抑制が、大規模なクロマチン構造の変化を引き起こすことを示唆する結果を得ている。したがって、DRIL1 は、エピジェネティックな遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることが予想される。

2. 研究の目的

失われた組織を再生させる源となる細胞として、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が、再生医療の切り札として大きな注目を集めている。しかしながら、iPS 細胞を選択的に目的の細胞を分化誘導する手法はまだ確立されていない。これに対して本研究は、組織中の最終分化した細胞の増殖能を活性化し、盛んに分裂する前駆細胞に転換させることを試みる。具体的には核マトリックス結合因子の発現を一過性にコントロールすることに

より、最終分化細胞におけるエピジェネティックな増殖抑制制御を解除し、増殖能の高い前駆細胞に転換することを目指す。この最終分化細胞の前駆細胞化により、口腔領域を含む多くの組織における、新たな再生法の開発につながる成果を得ることを目的とする。

3. 研究開始当初の方法

まず、核マトリックス結合因子 DRIL1 の機能解析をおこない、(1) DRIL1 発現を抑制（ノックダウン）することにより、DRIL1 が核内高次構造との相互作用に必須な因子であること、(2) DRIL1 の発現をコントロール（発現抑制あるいは過剰発現）によって、ゲノムのエピジェネティックな修飾の変換が起こることを明らかにする。(3) そのエピジェネティックな修飾の解除が、増殖制御遺伝子の抑制を解除し、最終分化細胞において持続的な再増殖（前駆細胞化）を引き起こすために有効かどうかを検討する。

(1) 核内高次構造の相互作用における DRIL1 の役割

以上の予備的実験結果を踏まえ、まず、核内高次構造の相互作用における DRIL1 の役割を明らかにする。そのために siRNA あるいは shRNA を発現するアデノウイルスベクターを用いて DRIL1 の発現を抑制（ノックダウン）し、その結果として起こる核内高次構造（クロマチン、核ボディ、核マトリックス）の相互作用の変化を解析する。以上の実験により、核内高次構造の相互作用における DRIL1 の役割が明らかになると考えられる。

(2) DRIL1 発現コントロールによるエピジェネティック制御の変化

次に細胞にアデノウイルスベクターを用いて DRIL1 を過剰発現させるか、ノックダウンし、その結果として起こるゲノムのエピジェネティックな修飾の変化を解析するとともに、それに伴う遺伝子発現の変化を明らかにする。

(3) 終末分化細胞の再増殖（前駆細胞化）と組織再生の試み

以上の解析結果を踏まえて、最終分化細胞の再増殖（前駆細胞化）を試みる実験をおこなう。

4. 研究成果

研究開始当初は、DRIL1の機能を解析する予定であったが、研究の結果、本研究の目的を達成するためには、DRIL1と類似したARID3ファミリータンパク質であるDRIL2およびDRIL3の発現も抑制する必要があることがわかった。そこで、DRIL1/2/3に特異的なsiRNAによる発現抑制系あるいはアデノウイルスを用いた過剰発現系を確立し、研究をおこなった。

癌抑制遺伝子p53およびRBは、細胞分化、細胞増殖および細胞死の制御に重要な役割を担っている。最近、p53およびRBがん抑制経路の機能を抑制すると、成体の最終分化した骨格筋細胞における脱分化と再増殖を引き起こすことが報告された。したがって、最終分化細胞の前駆細胞への転換には、細胞増殖や細胞の生存を制御している癌抑制遺伝子p53およびRBの機能抑制が重要であると考えられる。そこでまず、p53およびRBがん抑制経路におけるDRIL1/2/3の機能解析をおこなった。

(1) p53経路におけるDRIL1/2/3の役割

p53標的遺伝子の活性化におけるDRIL1/2/3の機能解析をおこなった結果、(1) DRIL1は、細胞周期停止に関与するp53標的遺伝子の一つである $p21^{WAF1}$ のプロモーター領域に *in vivo* および *in vitro* で結合すること、(2) DRIL1はp53と協調的に働いて $p21^{WAF1}$ の転写を活性化すること、(3) siRNAあるいはshRNAを発現するアデノウイルスベクターを用いてDRIL1の発現を抑制（ノックダウン）すると、DNA傷害による $p21^{WAF1}$ 転写活性化が抑制されること、(4) DRIL1はp53タンパク質の安定化にも寄与していることが分かった (Lestari, et al., 2012)。したがって、以上の結果は、DRIL1が細胞周期停止に関与するp53標的遺伝子の転写活性化に重要な役割を担っていることを示している。

さらにDRIL2とDRIL3のノックダウンし、p53標的遺伝子の発現における影響を調べた結果、アポトーシス関連p53標的遺伝子の発現が転写レベルで抑制された。したがって、DRIL1に加えて、DRIL2とDRIL3もp53標的遺伝子の転写活性化に関与していることが明らかになった。(投稿準備中)。

さらにDRIL1およびDRIL2の発現をノックダウンし、その結果として起こる核内高次構造の変化を解析した結果、PML核ボディの数が顕著に増加することが分かった。この結果は、DRIL1がPML核ボディの構成要素の

一つであるsp100タンパク質と相互作用し、PML核ボディの制御に関与するというこれまでの報告と一致する。

(2) RB経路におけるDRIL1/2/3の役割

転写因子E2Fは、細胞周期の進行に中心的な役割を担っている。RBは、E2Fの転写機能を抑制することによって、細胞周期を負に制御している。RB癌抑制経路におけるDRIL1/2の役割を調べるため、siRNAを用いてDRIL1/2のノックダウンをおこなったところ、DRIL1/2の発現を抑制するとE2F標的遺伝子の転写活性化および細胞増殖が抑制されることが分かった。さらにDRIL1/2の発現を抑制すると、E2F1を過剰発現させてもE2F標的遺伝子の転写活性化が起きないことが分かった(投稿中)。

(3) 終末分化細胞の再増殖

以上の結果は、DRIL1/2/3がp53およびRB経路に重要な役割を果たしていることが明らかになった。最近、ヒト293細胞株のDRIL1をノックダウンすると、未分化胚性幹細胞様に変化することが報告された。この報告は、DRIL1の発現を抑制すると、ゲノムのリプログラミングと細胞の脱分化が起こるという本研究の予想と一致する。しかしながら、DRIL1/2は細胞増殖において重要な役割を担っているため、ヒト正常繊維芽細胞を用いてDRIL1/2をノックダウンすると細胞増殖が抑制された。上述の293細胞株においては、p53およびRBがん抑制経路が抑制されていることが知られている。したがって、DRIL1/2/3のノックダウンによって起こる増殖抑制を解除するためには、p53およびRBの機能を阻害することが必要であると予想される。そこで、DRIL1/2/3とともにp53およびRBのノックダウンを同時におこなったところ、DRIL1/2/3による増殖抑制が解除されることが分かった。さらに終末分化細胞と共に不可逆的に増殖を停止している老化したヒト繊維芽細胞を用いてノックダウン実験をおこなったところ、DRIL2の機能が老化したヒト繊維芽細胞の再増殖に重要であることが分かった。現在、DRIL1/2/3、p53およびRBに対するsiRNAをヒト正常細胞に導入した後、種々の幹細胞培養条件下で培養し、未分化幹細胞あるいは前駆細胞への分化転換が起きるかどうかを調べている。

今後、クロマチンと核内高次構造との相互作用およびゲノムのエピジェネティックな修飾の変換についての検討をおこなう予定である。したがって本研究の成果は、最終分化細胞の前駆細胞への転換法、あるいは未分化間

葉系幹細胞の長期間培養法の確立など再生医療に有用な技術開発に寄与する可能性がある。

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 12 件)

1. Lestari W, Ichwan SJA, Otsu M, Yamada S, Iseki S, Shimizu S, Ikeda MA Cooperation between ARID3A and p53 in the transcriptional activation of p21WAF1 in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 710-716 (2012)
2. Ma, T, Yamada S, Ichwan SJA, Ohtani K, Iseki S, Otsu M, Ikeda MA Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 931-937 (2012)
3. Wimardhani SY, Sunia DF, Freisleben H-J, Septelia Wanandi SI, Ikeda MA: Cytotoxic effect of chitosan against oral cancer cell lines is molecular-weight-dependent and cell-type-specific. *Int. J. Oral Res.* 3; e1 (2012)
4. Kato T, Esaki M, Matsuzawa A, Ikeda Y, NE5A1 is required for functional maturation of Sertoli cells during postnatal development, *Reproduction*, in press.
5. Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, Ikeda MA: Essential Role of Caspase-8 in p53/p73-Dependent Apoptosis Induced by Etoposide in Head and Neck Carcinoma Cells. *Molecular Cancer* 10: 95 (2011)
6. Ikeda Y, Matsunaga Y, Takiguchi M, Ikeda MA: Expression of cyclin E in postmitotic neurons during development and in the adult mouse brain. *Gene Expr Patterns.* 11, 64-71 (2011)
7. Suda N, Shibata H, Kurihara I, Ikeda Y, Kobayashi S, Yokota K, Murai-Takeda A, Nakagawa K, Oya M, Murai M, Rainey WE, Saruta T, Itoh H. Coactivation of SF-1-mediated transcription of steroidogenic enzymes by Ubc9 and PIAS1. *Endocrinology.* 152: 2266-2277, (2011)
8. Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Mori S, Tsumura M, Okada S, Ohta T, Ohtani K, Kobayashi M, Takihara Y: Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 21529-21534 (2010)
9. Liu J, Uematsu H, Tsuchida N, Ikeda MA: Association of Caspase-8 Mutation with Chemoresistance to Cisplatin in HOC313

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 989-994 (2009)

10. Murugan AK, Hong NT, Cue TTK, Hung NC, Munirajan AK, Ikeda MA, Tsuchida N: Detection of two novel mutations and relatively high incidence of H-RAS mutations in Vietnamese oral cancer. *Oral Oncology*, 45, e161-166 (2009)
11. Ozono E, Komori H, Iwanaga R, Ikeda MA, Iseki S, Ohtani K: E2F-like elements in p27(Kip1) promoter specifically sense deregulated E2F activity. *Genes Cells*, 14, 89-99 (2009)
12. Althunibat OY, Hashim, RB, Taher M, Daud JM, Ikeda MA, Zali BI: In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. *European Journal of Scientific Research* 37, 376-387 (2009)

[学会発表] (計 28 件)

1. Teng Ma Shumpei Yamada, Solachuddin J. A. Ichwan, Sachiko Iseki, Kiyoshi Ohtani, Megumi Otsu, Masa-Aki Ikeda "Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation." 3rd Cancer Targets and Therapeutics, Las Vegas, Nevada, USA, February 27-28, 2012.
2. Khandakar A S M Saadat, Endrawan Pratama, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda "Role of ARID3A and ARID3B in Cell Growth and E2F-target gene expression." 2nd Heidelberg Forum for Young Life Scientists, Heidelberg, Germany, February 23- 24t 2012.
3. Teng Ma Shumpei Yamada, Solachuddin J. A. Ichwan, Sachiko Iseki, Kiyoshi Ohtani, Megumi Otsu, Masa-Aki Ikeda "Inability of p53-Reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation." 2nd Heidelberg Forum for Young Life Scientists, Heidelberg, Germany, February 23- 24t 2012.
4. 池田やよい、加藤朋子、生殖腺特異的 SF-1 ノックアウトマウスの精巣におけるセルトリ細胞の分化異常, 第 117 回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 甲府, 2012.
5. Widya Lestari, Solachuddin J.A Ichwan, Megumi Otsu, Shumpei Yamada, Shihoko Shimizu, Masa-Aki Ikeda "Role of ARID3A in p53-mediated Transcriptional Transactivation of p21Waf1/Cip1." 第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、横浜

6. Teng Ma, Shumpei Yamada, Solachuddin J. A Ichiwan, Kiyoshi Ohtani, Megumi Ostu, Masa-Aki Ikeda "Inability of Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation." 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
7. Khandakar A S M Saadat, Endrawan Pratama, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda "Role of ARID3A and ARID3B in Cell Growth and E2F-Target Gene Expression." 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜
8. Yuniardini Septorini Wimardhani, Dewi Fatma Suniarti, Hans-Joachim Freisleben, Septelia Inawati Wanandi, Masa-Aki Ikeda "Inhibition of two chitosans with different molecular weight against the growth of several oral cancer cell lines." Congress of Indonesian Dental Association, April 1, 2011, Bali, Indonesia.
9. Ikeda Y, Kato T, Postnatal development of the gonad specific SF-1 KO mouse testis. The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting, Boston, 2011
10. 加藤朋子, 池田やよい, 生殖腺特異的 SF-1 ノックアウトマウスにおける生殖腺の組織学的解析, 第 84 回日本内分泌学会学術総会, 神戸, 2011
11. Yuniardini Septorini Wimardhani, Dewi Fatma Suniarti, HJ Freisleben, Septelia Inawati Wanandi, Masa-Aki Ikeda "Low Molecular Weight Chitosan: Antitumor Efficiency against Oral Cancer Cells" The 25th International Association for Dental Research South East Asian Regional Meeting, October 28-30, 2011, Singapore.
12. Yuniardini Septorini Wimardhani, Dewi Fatma Suniarti, HJ Freisleben, Septelia Inawati Wanandi, Masa-Aki Ikeda "Low Molecular Weight Chitosan: Mechanism of Antitumor Activity against Oral Cancer Cells." FDI-IDA Joint Meeting, November 12-13, 2011, Semarang, Indonesia.
13. Juan Liu, Nobuo Tsuchida, Masa-Aki Ikeda "Caspase-8 and p53/p73 deficiencies confer resistance to drug induced apoptosis in head and Neck carcinoma cells" 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪
14. Ikeda Y, Takiguchi M, Ikeda M-A, Cyclin E expression in early neural stem cells during adult hippocampal neurogenesis Keystone Symposia: Stem Cell Differentiation and Dedifferentiation, 2010
15. Ikeda Y, Kato T, Takiguchi M, Effects of gestational diethylstilbestrol treatment on gonadal differentiation, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010
16. Ikeda Y, Takiguchi M, Ikeda M-A, Effects of voluntary physical activity on cyclin E expression in the subgranular layer of the mouse hippocampal dentate gyrus. Neuroscience 2010 (40th Annual Meeting), San Diego, 2010
17. Ichwan Solachuddin J. A., Masa-Aki Ikeda "In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in human oral cancer cell lines by thymoquinone" 第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 22 日～24 日、大阪
18. Teng Ma, Shumpei Yamada, Ichwan Solachuddin J. A., Megumi Ostu, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda "Effect of Nutlin-3 on p53 resistance in tumor cells lacking the ability to phosphorylate Ser46 on p53" 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同年会、2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸
19. 池田やよい, 滝口雅人, 松永裕子, 池田正明, マウス海馬歯状回顆粒下層における細胞増殖因子サイクリン E の発現, Neuro2010(第 33 回日本神経科学大会/第 53 回日本神経化学学会大会/第 20 回日本神経回路学会大会合同大会), 神戸, 2010
20. Yayoi Ikeda, Masahiko Takiguchi, Masa-Aki Ikeda "Cyclin E expression in early neural stem cells during adult hippocampal neurogenesis" Keystone Symposia "Stem Cell Differentiation and Dedifferentiation" February 15 - 20, 2010, Keystone, Colorado, USA.
21. 池田やよい, 生殖腺発生に働く転写調節因子へのエストロゲン暴露の影響. 第 82 回日本内分泌学会学術総会, 群馬, 2009 (シンポジウム)
22. 池田やよい, 卵胞細胞特異的 SF-1 ノックアウトマウスの卵巣分化. 第 82 回日本内分泌学会総会, 群馬, 2009
23. 池田やよい, 胎生期 DES 暴露による生殖腺発生初期への影響, 日本解剖学会関東支部 第 19 回懇話会・シンポジウム, 2009
24. Ikeda Y, Matsunaga Y, Ikeda M-A, Expression of cyclin E in the cerebral and cerebellar cortices, 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009 Ichwan Solachuddin J. A., Muhammad Taher, Widya Lestari, M. Termidzi Junaidi, Masa-Aki Ikeda "Anti-cancer properties of and Thymoquinone, constituents of Nigella sativa, on oral cancer cell lines" 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日～12 日、横浜

研究者番号：

25. Juan Liu, Nobuo Tsuchida, Masa-Aki Ikeda “Drug-specific Effects of Caspase-8 and p53/p73 Alterations on Chemosensitivity in Head and Neck Carcinoma Cells” 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日～12日、横浜
26. Philippe Olivier D. L., Masa-Aki Ikeda “Spatiotemporal analysis of Cdk2 interaction with its regulatory proteins” 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日～12日、横浜
27. Teng Ma, Shumpei Yamada, Ichwan Solachuddin J. A., Megumi Ostu, Kiyoshi Ohtani, Masa-Aki Ikeda “Effect of Nutlin-3 on p53 resistance in tumor cells lacking the ability to phosphorylate Ser46 on p53” 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日～12日、横浜
28. Ikeda Y, Pelusi C, Parker KL, Abnormal ovarian development by granulosa cell-specific ablation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1, XXXVI International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 2009

[図書] (計2件)

1. Ichwan SJA, Bakhtiar MT, Ohtani K, Ikeda MA: Therapeutic Targeting of p53-Mediated Apoptosis Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Current Progress and Challenges, Tumor Suppressor Genes, Yue Cheng (Ed.), ISBN: 978-953-307-879-3, InTech. 6, 129-144 (2012)
2. Koibuchi N, Ikeda Y, Hormones and cerebellar development in “The Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders”. Eds. Manto M, Gruol D, Schmammann J, Koibuchi N, and Rossi F, Springer, in press.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 正明 (IKEDA MASA AKI)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究

科 准教授

研究者番号：20193211

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()