

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 30 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659617
 研究課題名（和文）マイクロ RNA による安全で革新的なリプログラミング法の開発

研究課題名（英文） Novel Innovative Safety Reprograming Technology by MicroRNAs.

研究代表者
 石井 秀始（ISHII HIDESHI）
 大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授
 研究者番号：10280736

研究成果の概要（和文）：
 わが国発の iPS (Induced pluripotent stem cells) 細胞の樹立成功（4つの転写因子遺伝子の導入によるリプログラミング）以来、数多くの萌芽的な研究が創成されている。私達は iPS とは根本的に原理を異にする方法により、挿入変異のない万能幹細胞の創出を手掛けてきた。この私達の新法は人工合成オリゴ・マイクロ RNA 単独（非コード遺伝子）により新規万能幹細胞 miPS (microRNA-induced pluripotent stem cells) を創出するものであり、本申請では、消化器幹細胞から癌化の回避に配慮した新しい miPS 技術により直接リプログラミング誘導して再生医学に応用可能な消化器幹細胞を増幅調整、将来の臨床応用に向けた次世代のリプログラミング方法として基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：
 For innovative cancer therapy, we studied the novel methods to induce microRNA-based induced pluripotent stem cells (miPS) by introduction of synthetic oligo microRNA. This novel technology would be able to apply the broad range of gastrointestinal diseases such as human cancer.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般
 キーワード：再生医学、外科学、ES 細胞

1. 研究開始当初の背景（表1）

京都大学 山中伸弥教授の iPS は、ES 細胞と分化細胞との転写因子をコードする遺伝子発現の網羅的プロファイル比較により、ES 細胞で特異的に発現している遺伝子の選別操作を実施して分化細胞から ES 細胞を誘導したものである。一方で、私達の miPS は、ES 細胞と分化細胞のマイクロ RNA 発現の網羅的プロファイル比較により、ES 細胞で特異的に発現しているマイクロ RNA1000 個から3つまで選別を繰り返し、それを基にして分化細胞から ES 細胞の誘導に成功した。重

要な点として、miPS は合成オリゴ RNA によるものであり、挿入変異による癌化はないとされている。

	iPS 4種の遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)	miPS 3種の miRNAs
誘導因子	ES細胞で発現している遺伝子 (転写因子等) 4個ないし3個	ES細胞で発現しているマイクロRNA (非コードRNA) 3個
ベクター	ウイルス由来またはプラスミド (低効率では蛋白質) ゲノム挿入変異の危険性あり	ベクターなし (理論上)ゲノム挿入変異の危険性なし
効率	レトロウイルスベクターで、1-0.1% 他は更に1/100~1/1000	レトロウイルスベクターと同程度* *予備実験で1-0.1%

2. 研究の目的

肝・腸・膵の分化上皮を対象にして、miPS 技術により、それぞれの消化器幹細胞を誘導し、試験管内、および将来の臨床応用に繋げる小動物実験（ヒト化マウス）を実施し、直接リプログラミングを促進する因子、阻害する因子を究明し精度を高めることを検討。

3. 研究の方法

(1) 合成オリゴマイクロ RNA によるリプログラミング

ES と iPS で発現し脂肪由来細胞 ADSC で発現していないマイクロ RNA 群を抽出、Nanog プロモーター-GFP トランスジェニックマウスから作成した ADSC に導入、GFP 発現を指標としてスクリーニング、その結果、3つのマイクロ RNA 群(mir-200c, mir-302, mir-369)を抽出、ヒト・マウス ADSC およびヒト・マウス線維芽細胞において3つのマイクロ RNA 導入により ES 用遺伝子群の発現および免疫染色が誘導され、誘導された miPS からは、アルブミン（内胚葉）、Sma（中胚葉）、Tubb3（外胚葉）、Gap（外胚葉）の分化が誘導可能であった。網羅的な遺伝子解析を試みても miPS は iPS や ES と類似した発現パターンを示した。3つのマイクロ RNA を線維芽細胞に導入30日後に ES 様遺伝子発現。miPS の Nanog/Oct4 プロモータは脱メチル化、エピジェネティック修飾、網羅的な遺伝子解析結果、miPS は iPS や ES と類似。また、ヒト脂肪由来細胞[ADSC]およびヒト線維芽細胞[HDF]において3つのマイクロ RNA を導入、miPS を免疫不全マウスに移植すると3胚葉分化を示した。

(2) 消化器（肝・腸・膵）別のプロファイル

ヒト・マウス消化器の幹細胞を FACS で分離・濃縮。

（肝幹細胞 EpCAM+Scal1+CK19+Alb+、腸管幹細胞 Lgr5+CD44+CD133+、膵幹細胞 EpCAM+CD44+CD133+）。細胞からマイクロ RNA を抽出し、ヒト・マウスマイクロ RNA1000 個の網羅的発現解析。分化した消化器上皮細胞と消化器幹細胞との発現を比較し、消化器幹細胞で特異的に発現するマイクロ RNA を抽出。

(3) 消化器別 miPS の誘導

候補マイクロ RNA をグループ化して因子を除していくことで必要にして十分な最小のマイクロ RNA 群に到達する。指標は、Nanog 等の未分化関連遺伝子の発現。

(4) 消化器組織培養

消化器臓器の中長期培養が可能となってきた。特に従来から困難とされた消化管が、2009年に私達を含む内外の研究で培養法に重要な工夫が施され、細胞を Spondin1 とコラーゲンの存在下で空気圧に曝すこと

で3ヵ月以上の長期培養が得られる。それを基盤として、本申請では miPS 誘導と組み合わせる。マウスおよびヒトで、各種臓器（消化器[胃、大腸]）、線維芽細胞、脂肪由来細胞等の材料と比較検討。

(5) 従来法の比較とメカニズム解析

●他方法との比較：ゲノム挿入変異がないものの1つとして、センダイウイルスが注目されている。そこでセンダイウイルス搭載 iPS と miPS を比較検討、作成された細胞の癌化（動物実験）、分化能力（試験管内および動物実験移植実験）を研究。

●誘導のメカニズム：iPS が転写因子ネットワークを介して未分化性と多分化能を獲得すると考えられるが、miPS はマイクロ RNA が標的遺伝子の非翻訳領域に結合して抑制的に作用する過程が入力であるために、『マイクロ RNA 群』の下流にある『転写因子等遺伝子群』を解析する必要があり、本研究では、3つのマイクロ RNA の作用が収束される重要な共ハブ因子を同定し、miPS 誘導に関わるバイオフィオマティクスを解明した。

●阻害する因子・促進する因子：私達を含む内外の研究で、癌抑制遺伝子（TP53：172 変異、P16 欠損）、癌遺伝子（Kras：12, 14 変異）が諸刃の剣として高 RP 効率と癌化に繋がることが示唆される。癌化を回避しながら一時的にこれらを制御する重要性が示唆され、有効な RP 誘導・有効な診断法・癌化予測法を具現化するために新規創薬としての標的を解明。

(6) 本研究の成果を次ぎに繋ぐ

消化器臓器の損傷・欠損モデル（術後再建モデル）、ヒト化マウス（免疫系を骨髄移植でヒト化し、ヒトの微小環境に類似させた個体レベルでの小動物モデル）を用いて、個体レベルでの有用性を検討。

4. 研究成果

合成オリゴマイクロ RNA によるリプログラミング研究の成果として、ヒト脂肪由来細胞及びヒト線維芽細胞において、リプログラミング効率の誘導性を検討した結果、転写因子によるリプログラミング(中山因子)と同じレベルであることが明らかとなった。

また消化器臓器のプロファイリングにより、臓器特異的な遺伝子発現を明らかにした。

さらに消化器臓器別のマイクロ RNA の発現を解明した。その情報に基づいて miPS の誘導をこころみた。その結果、消化器組織培養において他の方法と比較して遜色ないリプログラミングの効率を達成することが出来た。また誘導メカニズム解析により重要な共ハブ因子(転写因子ネットワーク)を介した機構が明らかとなった。リプログラミングを阻害する因子として癌遺伝子及び癌抑制遺伝子を新たに明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- 1) Suzuki, Y., Haraguchi, N., Takahashi, H., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Ishii, H., Doki, Y., Mori, M., Yamamoto, H. SSEA-3 as a novel amplifying cancer cell surface marker in colorectal cancers.
Int. J. Oncol. 42(1):161-167, 2013.
- 2) Ohta, K., Haraguchi, N., Kano, Y., Kagawa, Y., Konno, M., Nishikawa, S., Hamabe, A., Hasegawa, S., Ogawa, H., Fukusumi, T., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Nishimura, T., Noguchi, Y., Ozaki, M., Kudo, T., Sakai, D., Satoh, T., Fukami, M., Ishii, M., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H.
Depletion of Jarid1b induces cellular senescence in human colorectal cancer.
Intern. J. Oncol. 42(4):1212-1218, 2013 .
- 3) Hashiguchi, Y., Nishida, N., Mimori, K., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Ishii, H., Mochizuki, H., Hase, K., Doki, Y., Mori, M.
Down-regulation of miR-125a-3p in human gastric cancer and its clinicopathological significance.
Int. J. Oncol. 40(5):1477-1482, 2012.
- 4) Yokobori, T., Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Tanaka, F., Sato, T., Toh, H., Sudo, T., Iwaya, T., Tanaka, Y., Onoyama, I., Kuwano, H., Nakayama, K. I., Mori, M.
Copy number loss of FBXW7 is related to gene expression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma.
Int J Oncol. 41(1):253-259. 2012.
- 5) Nishikawa, S., Ishii, H., Haraguchi, N., Kano, Y., Fukusumi, T., Ohta, K., Ozaki, M., Sakai, D., Satoh, T., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M.
Genotoxic therapy stimulates error-prone DNA repair in dormant hepatocellular cancer stem cells.
Exp. Ther. Med. 3(6):959-962, 2012.
- 6) Ohkuma, M., Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Kim, H.M., Shimomura, M., Hirose, H., Yanaga, K., Mori, M.
Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenosquamous carcinoma stem cells.
Ann. Surg. Oncol. 19(4):1357-1364, 2012.
- 7) Kim, H.M., Haraguchi, N., Ishii, H., Ohkuma, M., Okano, M., Mimori, K., Eguchi, H., Yamamoto, H., Nagano, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M.
Increased CD13 expression reduces reactive oxygen species, promoting survival of liver cancer stem cells via an epithelial-mesenchymal transition-like phenomenon.
Ann. Surg. Oncol. 19:S539-S548, 2012.
- 8) Nishida, N., Nagahara, M., Sato, T., Mimori, K., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Ishii, H., Sugihara, K., Doki, Y., Mori, M.
Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic microRNA clusters.
Clin. Cancer Res. 18(11):3054-3070, 2012.
- 9) Nishikawa, S., Dewi, D.L., Ishii, H., Konno, M., Haraguchi, N., Kano, Y., Fukusumi, T., Ohta, K., Noguchi, Y., Ozaki, M., Sakai, D., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M.
Transcriptome study of dormant gastrointestinal cancer stem cells.
Int. J. Oncol. 41(3): 979-984, 2012.
- 10) Dewi, D.L., Ishii, H., Haraguchi, N., Nishikawa, S., Kano, Y., Fukusumi, T., Ozaki, M., Saito, T., Sakai, D., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M.
Dicer 1, ribonuclease type III modulates a reprogramming effect in colorectal cancer cells.
Int J Mol Med. 29(6): 1060-1064, 2012.
- 11) Hoshino, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Nishikawa, S., Tomokuni, A., Kano, Y., Fukusumi, T., Saito, T., Osaki, M., Sakai, D., Satoh, T., Eguchi, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H.
Hypoxia and TP53 deficiency for induced pluripotent stem cell-like properties in gastrointestinal cancer.
Intern. J. Oncol. 40(5): 1423-1430, 2012.

〔学会発表〕(計5件)

- 1) 浜部敦史 他13名
Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5 (Lgr 5) のヒト腸管における発現解析

- 第23回日本消化器癌発生学会総会、
2012年11月15日、徳島
- 2) 西川晋平 他14名
胃癌幹細胞の同定とその生物学的解析
第23回日本消化器癌発生学会総会、
2012年11月15日、徳島
- 3) 石井秀始
Cancer stem cell research for
innovative cell-modifying
technologies
第74回日本血液学会学術集会
2012年10月19日、京都
- 4) 石井秀始
先端医療：がん幹細胞理論に基づく新規
治療開発
第10回日本臨床腫瘍学会学術集会、
2012年10月19日、大阪
- 5) 石井秀始
Induced Pluripotent Stem Cell
Reprogramming for Innovative
Cell-Modifying Technology in Cancer.
第33回日本炎症・再生医学学会シンポ
ジウム2012年7月5日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 秀始 (ISHII HIDESHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教
授
研究者番号：10280736

(2) 研究分担者

森 正樹 (MORI MASAKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190999