

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2012～2014
課題番号：24659594
研究課題名(和文)体性細胞から成熟心筋細胞への分化誘導法の構築

研究課題名(英文)Somatic cell to CMs by miRNA

研究代表者

五條 理志 (Gojo, Satoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90316745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：miRNAを含むnon-coding RNA(ncRNA)は遺伝子発現制御に関わっており、miRNAを用いたiPS細胞への誘導が複数報、報告されてきた。我々はこの手法を応用した心筋分化を試みたが効率的なリプログラミング現象を再現できなかった。この原因としてホスト細胞のRNA環境が重要な意味を持つと予想し、この変化に着目した。この結果、リプログラミング誘導初期に発現が一過性に増加するncRNA RNY1を発見した。このRNY1をsiRNAにてこの発現を抑制するとiPS細胞への誘導効率が低下した。この結果からRNA環境のコントロールすることでリプログラミング効率を向上できる可能性を示唆できた。

研究成果の概要(英文)：Non-coding RNAs(ncRNAs) are involved in the regulation of most biological processes such as cancer, embryonic development, and cellular reprogramming. However, little is known about their roles in iPSC reprogramming. To elucidate the changing of non-coding RNAs during iPSC reprogramming, human fibroblasts TIG1 were infected with OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC(OSKM). Total RNAs from OSKM-TIG1 were analyzed for the ncRNAs expression. Expression of Y-RNA1 transiently increased during early stage (Day 0 to 9 after the transduction), and the localization was cellular cytoplasm. To evaluate the effect of the selected ncRNA, Y-RNA1, we assessed the efficacy of iPSCs reprogramming by the knockdown and over-expression experiments. The siRNA for Y-RNA1 was introduced to TIG1, where Y-RNA1 expression lessens to less than 10%, compared with conventional iPSC reprogramming. Our data demonstrate that Y-RNA1 is essential role for iPSC reprogramming, and works at the early stage of the process.

研究分野：再生医療

キーワード：ncRNA miRNA 再生医療 心筋分化誘導

1. 研究開始当初の背景

iPSC の発見は、遺伝子導入による細胞の分化が可能であることを証明されており、同技術を用いた神経細胞や肝細胞、軟骨細胞、心筋細胞の作製法が次々と報告された (T Vierbuchen, Nature, 2010、S. Sekiya Nature 2011、K Hiramatsu, J Clinical Inv, 2011、M Ieda, Cell, 2010)。これらの技術は Direct reprogramming や Direct conversion (Transdifferentiation) と呼ばれており、通常、単機能細胞への分化誘導は Direct conversion とされている。しかし、報告されている Direct conversion の方法では、機能的未成熟性、低誘導効率、誘導期間の長さが問題である。特に体細胞から心筋細胞への Direct conversion である induced CardioMyocyte: iCM でも、その誘導効率の低さが指摘されていた。発表されている iCM のマイクロアレイデータを独自に解析したところ、分化誘導状態の未成熟さが顕著であった。そこで私たちは microRNA (miRNA) を用いた iPSC 作製法と iPSC 誘導の途中で心筋細胞への分化を誘導する Direct conversion とは異なる心筋分化誘導法 (以下 Re-direction 法と呼称する) に着目し、これらを組合せた新しい心筋分化誘導法の構築を目的とした。

2. 研究の目的

Direct reprogramming や Direct conversion といった技術は細胞の分化状態を変化させ、体細胞から様々な細胞への分化誘導を可能にした。しかし、Direct conversion によって分化した細胞の多くは分化状態が未成熟なため、成熟した機能細胞への誘導法の確立が重要な課題となっている。そこで本研究は現在まで報告された Direct conversion とは異なる手法を用いた体細胞の非ウイルス性心筋分化誘導系の構築とその特性解析を目的とする。この手法はより成熟した心筋細胞への分化誘導の可能性が高く、薬剤試験や心筋分化誘導因子の特定といった様々なアプリケーションへの応用、更に前臨床試験に向けた基盤研究となりえる重要な課題である。しかしながら本系は再現が我々の手技では再現できなかった。

そこで細胞内の RNA 環境の差がその原因であると予想し、リプログラミング誘導時の細胞内の ncRNA の発現変化を LncRNA array kit を用いて評価し、細胞内の RNA 環境について解析、誘導初期に大きく変化している因子の特定とそのリプログラミング誘導効率の評価を目的とした。

3. 研究の方法

レトロウイルス、強制発現系エピソーマルベクターを用いて miR-302 クラスター (miR-302bcad, -367) を強制的に長期間、誘導する系を構築した。しかしながら通常のリプログラミング因子 (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, OSKM) と比較して細胞のリプログラミングがヒト胎児性肺由来線維芽細胞 TIG-1 (図 1) において観察されなかったことから、我々の系では再現できないと判断した。この原因は細胞内の RNA 環境に關与していると予想し、OSKM によるリプログラミング誘導時における ncRNA の発現変化を解析し、リプログラミングに關与している因子の特定を試みた。ncRNA の解析には LncRNA array kit を用いて、リプログラミング誘導細胞の ncRNA の発現変化を経時的に評価し、統計学的に有意に変化している因子を特定した。特定した因子は siRNA にてノックダウンし、リプログラミング効率への影響を評価した。

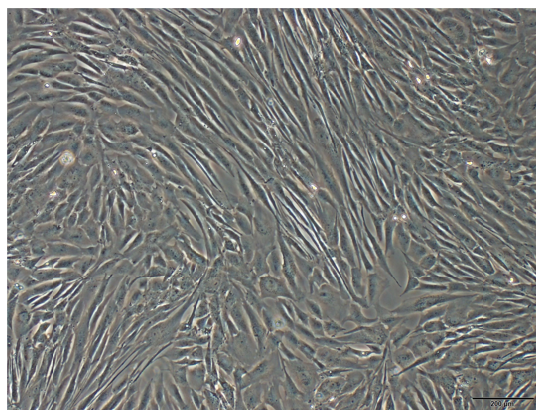


図 1 ヒト胎児性肺由来線維芽細胞 TIG-1

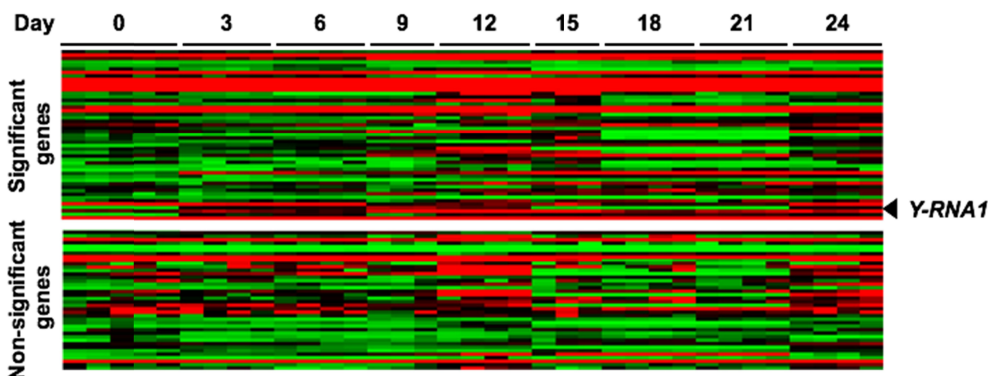


図 2 リプログラミングによる ncRNA の発現変化 (Heatmap)

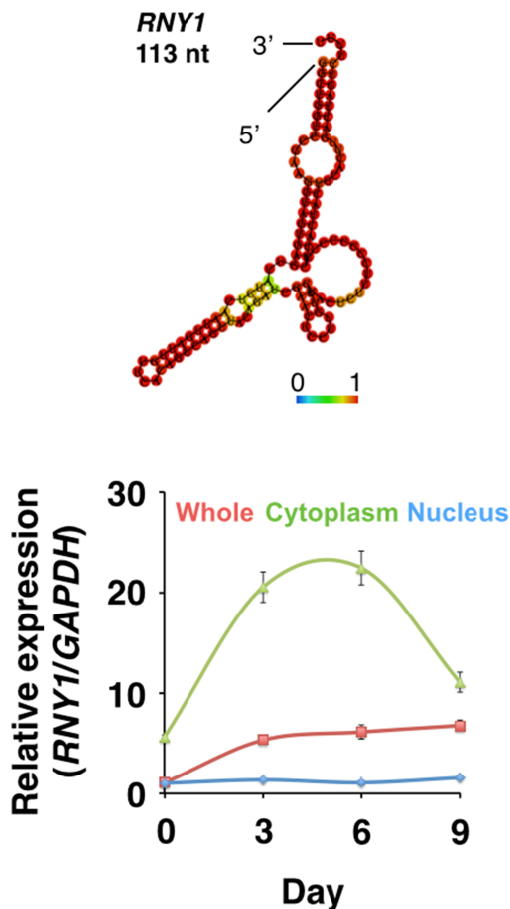


図3 Y-RNA1の二次構造と細胞内局在

4. 研究成果

リプログラミング誘導初期における経時的な変化を統計解析した結果、有意な変化を示す30種のncRNAsを特定できた(図2)。これらのうち、P値の最も低い因子であったY-RNA1について更なる解析を試みた。Y-RNA1は113塩基の小さなRNA分子で、強力な二次構造を保持し(図3上)、リプログラミング誘導初期にその発現量を細胞質内で増加させることが明らかとなった(図3下)。

この因子をsiRNAにてノックダウンした細胞にリプログラミング因子を導入させたところ、細胞の形態維持(図4)、細胞数の増加(図5左)、幹細胞マーカー遺伝子発現の減少(図5右)、9日目におけるALP陽性細胞数の減少(図6)、24日目におけるiPSCコロニー数の減少(図6)が観察された。また強制発現系では差がないことも明らかとなった(図6)。さらにマイクロアレイによる解析も試みたところ、誘導三日目におけるY-RNA1ノックダウン細胞では細胞増殖能の亢進が観察された(図7)。これらの結果から、Y-RNA1をノックダウンすることでリプログラミング効率が減少していることが示唆された。

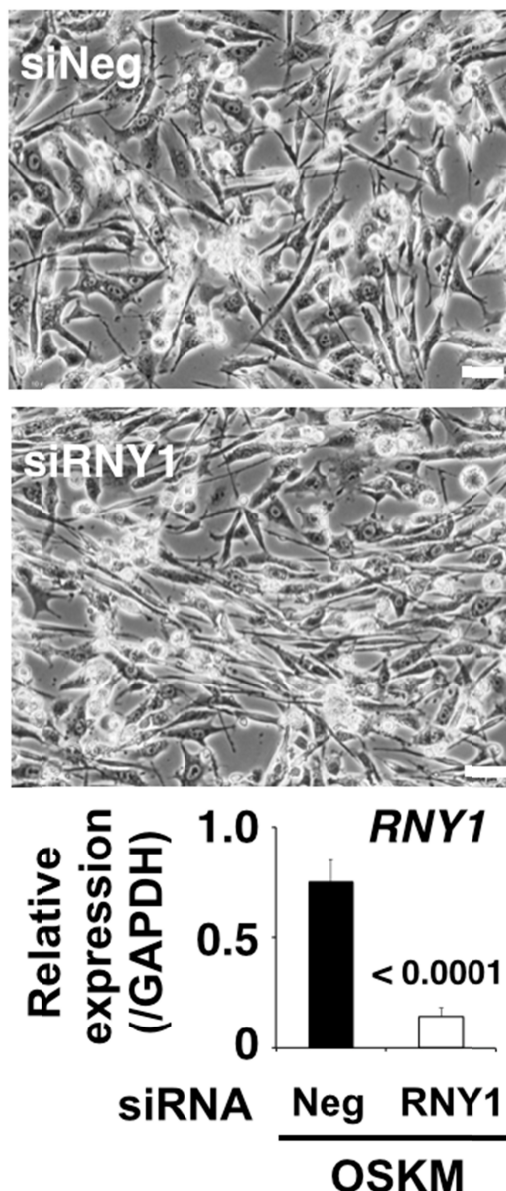


図4 siRNAによる細胞増殖能の変化とsiRNAによるノックダウン効率 (Day3)

以上のことからY-RNA1はリプログラミングにおける細胞内のRNA環境に大きな役割を担っている可能性があり、これらを今後解析することで効率的な細胞リプログラミングに繋がることが予想される。この結果は細胞内のncRNAが外部からの刺激に迅速に対応することを意味している。またY-RNA1はがん細胞にて発現が高いことも報告されており(Asselbergs FA., Anal Biochem. 2003)、リプログラミング以外への関与も示唆される。このことからY-RNA1の制御はリプログラミングのみならず、癌細胞の動態にも関与している可能性もある。

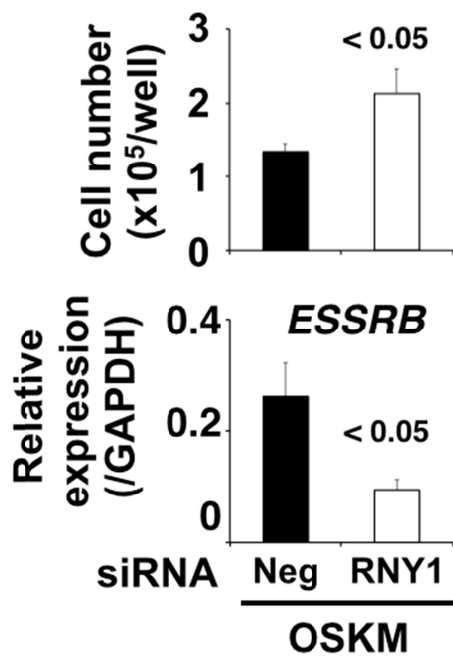


図5 siRNAによる細胞増殖能と幹細胞マーカー遺伝子発現

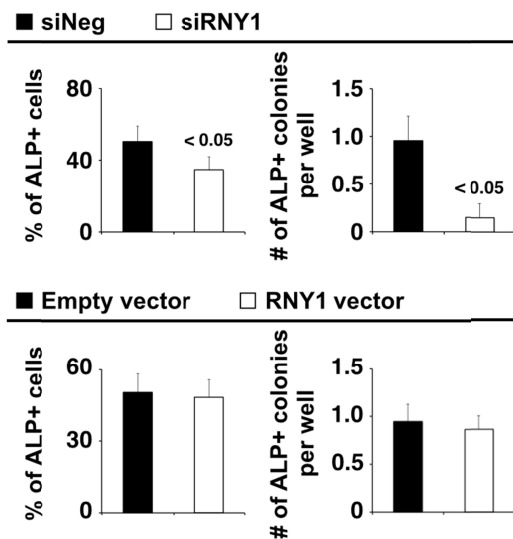


図6 siRNA(上段)と強制発現ベクター(下段)によるALP陽性細胞数(Day9)とALP陽性コロニー数のカウント(Day24)

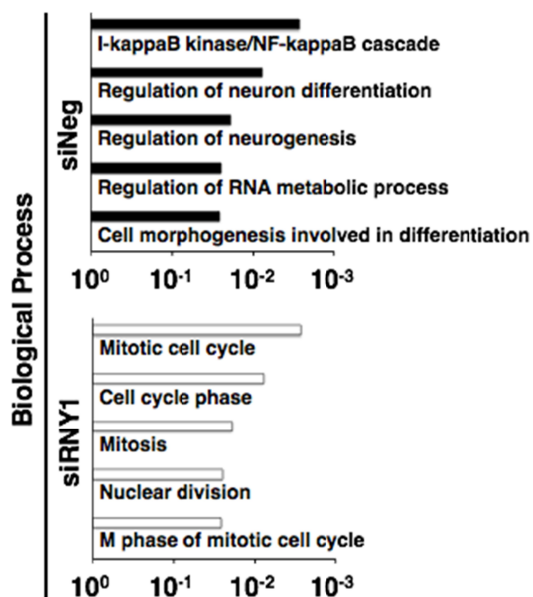
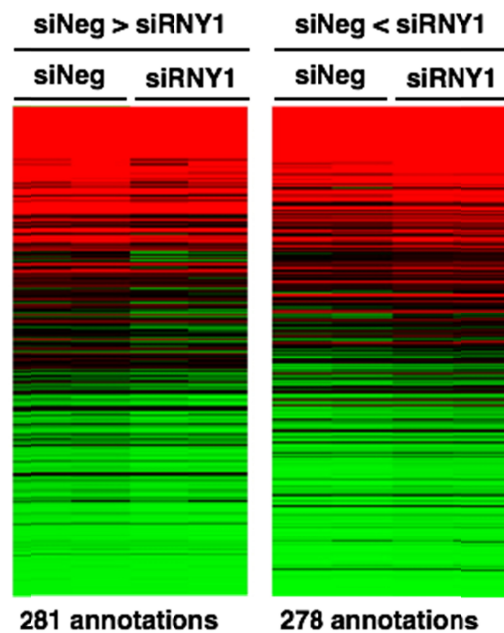


図7 マイクロアレイ解析結果

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0件)
Manuscript in preparation
〔学会発表〕(計1件)
Kami D., Kitani T., Toyoda M., Gojo S.,
Non-coding Y-RNA1 is essential for iPS cell
reprogramming., International Society for
Stem Cell Research 13th Annual Meeting.,
June 24th 2015, Stockholm, Sweden.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)
該当なし

○取得状況（計 0 件）
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
五條 理志 (GOJO, Satoshi)
京都府立医科大学大学院医学研究科・教授
研究者番号：90316745

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし