

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659870

研究課題名(和文)インスレーターの解除による細胞のリプログラミングと骨細胞への直接分化転換の試み

研究課題名(英文)Direct reprogramming to osteocytes by modulating insulator function

研究代表者

池田 正明 (IKEDA, Masa-Aki)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20193211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インスレーターの働きを解除するためARID3A遺伝子の発現を抑制することにより、ゲノムのリプログラミングを促進し、ヒト線維芽細胞を骨細胞に直接分化転換(ダイレクト・リプログラミング)することを試みた。ヒト線維芽細胞にARID3A遺伝子に特異なsiRNAを導入した後、幹細胞化を促進・維持する小分子化合物・増殖因子を様々な組み合わせで添加した。ヒト線維芽細胞から骨・脂肪細胞への分化転換を指標に機能的なスクリーニングをおこなった結果、siRNAの導入をおこなわなくとも、ヒト線維芽細胞を骨・脂肪細胞に直接分化転換できる小分子化合物・増殖因子の組み合わせを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to inhibit insulator functions by siRNA-mediated ARID3A silencing and thereby facilitate reprogramming. In order to convert human fibroblasts into osteocytes, we tested the effects of siRNA-mediated ARID3A silencing and various combinations of small chemical compounds and growth factors on epigenetic reprogramming of fibroblasts. We found a combination of small chemical compounds and growth factors that directly converted fibroblasts into osteocytes and adipocytes without using siRNA-mediated ARID3A silencing.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分化転換 療 リプログラミング インスレーター 骨細胞 ARID3A 線維芽細胞 間葉系幹細胞 再生医

1. 研究開始当初の背景

分化転換の効率を上げるためには、ゲノムのリプログラミングを効率的におこなうことが必要である。リプログラミングには、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を活性化あるいは不活性化するエピジェネティック（後生的修飾）な制御を解除する必要がある。核内のゲノムは多数の領域に区画化されることにより、それぞれの領域に固有のエピジェネティックな遺伝子の発現制御がおこなわれている。インスレーターは、ゲノム区画の境界に存在し、隣接するエンハンサーや不活性化クロマチンの影響を遮断する「仕切り」としての作用があることが知られている。

核マトリクス結合因子 ARID3A は、特異的な DNA 塩基配列に結合する性質をもつことが知られている。最近、(1) ARID3A をノックダウンするとヒト胎児腎細胞由来 293 細胞の形質が胚性幹細胞 (ES) 細胞様に変化することが報告された。申請者らは、(2) ARID3A の DNA 結合配列を同定し、それらがインスレーターの近傍に多数存在することを見出した。(3) さらに ARID3A の発現抑制することにより、インスレーターによって制御されている遺伝子の発現が変化すること、(4) 広範囲なクロマチン構造の変化がおこることを示唆する結果を得た。以上の知見は、ARID3A の抑制が、広範囲なゲノムのリプログラミングを促進するための有効な手段の一つであることを示唆している。

2. 研究の目的

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を介さずに直接必要な細胞に変化させる技術は直接分化転換 (ダイレクト・リプログラミング) と呼ばれ、再生医療の新しい手法とし

て大きな注目を集めている。しかしながら、現状では分化転換効率が低いため、臨床への応用には多くの課題が残されている。本研究は、(1) 核マトリクス結合因子 ARID3A の発現を人為的に抑制し、エピジェネティック制御に重要なインスレーター (ゲノムを区画化する仕切り) による区画化を解除する。これにより、効率的かつ広範囲なゲノムのリプログラミングを促進することを試みる。(2) さらにゲノムの区画化の解除と同時に、目的の細胞を誘導するマスター制御遺伝子の導入することにより、繊維芽細胞から骨細胞への効率的な直接分化転換を目指した。

3. 研究の方法

(1) ヒト線維芽細胞の分化転換

ゲノムのリプログラミングを促進するため、ARID3A 特異的 siRNA を導入し、ゲノムの区画化に関与するインスレーターによるエピジェネティックな発現制御を解除する。

次に当初の計画では、アデノウイルスベクターを用いて目的の細胞を誘導するために必要なマスター制御遺伝子 (RUNX2、OCT4 など) を組み合わせて導入し、ゲノムをリプログラミングする予定であった。ところが、研究の結果、幹細胞化を促進・維持することが報告されている小分子化合物・増殖因子を添加することによっても同様の結果が得られることが分かったため、小分子化合物・増殖因子のスクリーニングをおこなった。

上記で得られた細胞を分化誘導培地で培養することにより、骨細胞に直接分化転換させることを試みた。

(2) エピジェネティック制御の変化

定量 RT-PCR 法などにより、RUNX2 が制御する骨分化関連遺伝子 (Osterix

など)の発現誘導を指標に骨分化に有効な導入遺伝子および培養条件を検討した。

以上の結果として起こるエピジェネティックな修飾(DNA塩基のメチル化およびヒストンの化学修飾)の変化をクロマチン免疫沈降(ChIP)法およびバイサルファイトシーケンス法等により解析した。

4. 研究成果

研究代表者らは、ARID3Aの機能解析をおこなってきたが、その過程でARID3Aの発現を抑制すると、細胞のエピジェネティックな制御が部分的に改変されること、しかしながら、ARID3A単独の発現抑制では、ヒト正常細胞の形質を変化させるには不十分であることを見出した。そこで、ARID3Aの発現抑制に加えて、幹細胞化を促進・維持する小分子化合物・増殖因子について機能的な検索をおこなった。

ヒト線維芽細胞から骨・脂肪細胞への分化転換を指標に機能的なスクリーニングをおこなった結果、当初の予想に反して、特定の遺伝子の発現抑制やマスター制御遺伝子の導入をおこなわなくとも、ヒト線維芽細胞を骨・脂肪細胞に分化転換できる小分子化合物・増殖因子の組み合わせを見出した。

以上の結果は、特定の小分子化合物・増殖因子を組み合わせることによって、ヒト線維芽細胞の分化転換が可能であることを示唆している。

一方、研究代表者らは、上記の線維芽細胞を用いた実験の対照として、骨・軟骨・脂肪細胞に分化することが知られている骨髄由来間葉系幹細胞を用いた実験を平行しておこなった結果、以下に述べる興味深い知見を得た。

間葉系幹細胞は再生医療に有望な細胞の

供給源であると期待されている。しかしながら、高い多分化能を保った間葉系幹細胞を長期間、大量に増やすことは困難であった。研究代表者らは前述と同様の手法を用いて種々の増殖因子や小分子化合物をスクリーニングした結果、高い多分化能を保ったヒト間葉系幹細胞を大量に長期間培養できる方法を見出した。さらにこの方法は、60歳以上の高齢者から採取した間葉系幹細胞の大量培養にも有効であった。現在さらに最適な培養条件の検討をおこなっている。

以上の成果は、これまでにない新しい細胞培養法の開発と硬組織の再生医療への応用につながる可能性がある。

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 7 件)

1. Auerkari EI, Joewono V, Handjari DR, Sarwono1 AT, Suhartono AW, Eto K, Ikeda MA Expression of p27Kip1 and E-cadherin in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma of Indonesian Patients. *Open Dentistry J.* (査読 有)8, 136-143 (2014) (doi: 10.2174/1874210601408010136)
2. Ichwan SJ, Al-Ani IM, Bilal HG, Suriyah WH, Taher M, Ikeda MA. Apoptotic Activities of Thymoquinone, an Active Ingredient of Black Seed (*Nigella sativa*), in Cervical Cancer Cell Lines. *Chin J Physiol.* (査読 有) 57, 249-55 (2014) (doi: 10.4077/CJP.2014.BAB190)
3. Yuniardini S Wimardhani, Dewi F Suniarti, Hans J Freisleben, Septelia I Wanandi, Nurjati C Siregar, Masa-Aki Ikeda Chitosan Exhibites Anticancer Activity Through Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Oral Cancer Cells. *J. Oral*

- Sci.* (査読有) 56, 119-126, 2014 (doi.org/10.2334/josnusd.56.119)
4. Chung YM, Park S-H, Tsai W-B, Wang S-Y, Ikeda MA, Berek JS, Chen DJ, Hu MC FOXO3 signalling links ATM to the p53 apoptotic pathway following DNA damage. *Nature Communications* (査読有) 3, 1000 (2012) (doi:10.1038/ncomms2008)
 5. 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.* (査読有) 417, 710-716 (2012) (doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.003)
 6. 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.* (査読有) 417, 931-937 (2012) (doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.161)
 7. 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.* (査読有) 3; e1 (2012) (doi.org/10.2334/josnusd.56.119)
- [学会発表](計 14 件)
1. Ikeda, MA: Keynote Speaker “Mesenchymal Stem Cells and Bone Tissue Engineering - Overview and Our Approach – Regional Oral Biology Scientific Meeting 2014, October 30 – 31, 2014 Depok, Indonesia.
 2. Zhang Kui, Shohei Kasugai, Masa-Aki Ikeda “Maintenance of Stemness in Mesenchymal Stem Cells during Long-Term Culture.” 第 79 回口腔病学会学術大会、2014 年 12 月 5 日- 6 日、東京
 3. Ikeda Y, Ikeda MA “Immunohistochemical detection of cyclin E in non-proliferating neurons of the mouse adult hippocampal dentate gyrus.” Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting, November 15 - 19 2014, Washington, DC, USA
 4. Endrawan Pratama, Sachiko Iseki, Masa-Aki Ikeda “Critical roles for ARID3B in Expression of Proapoptotic p53-Target Genes and Cell Death Following DNA Damage.” 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日- 27 日、横浜
 5. Endrawan Pratama、井関祥子、池田正明 “アポトーシス関連 p53 標的遺伝子の発現と細胞死誘導における DNA 結合因子 ARID3B の重要な役割” 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25 - 27 日、福岡
 6. Saadat KASM, Ma T, Lestari W, Pratama E, Ohtani K, Ikeda MA “ARID3B silencing inhibits E2F-mediated transcription and cell proliferation.” 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日- 6 日、神戸
 7. Tsuchida N, Ikeda MA, Kanazawa S, Ishino Y, Kaji K, Salvatore, G, Santoro M, Vecchio G “Alpha-L-fucosidase (FUCA1) is a p53 target gene, and is expressed at low levels in anaplastic thyroid carcinomas.” 18th World Congress on Advances in Oncology and 16th International Symposium on Molecular Medicine. 10-12 October, 2013, Crete, Greece *J Mol Medicine* vol 32 supplement 1 page 536
 8. Ikeda, MA: Main Lecture “ Association of caspase-8 and p53/p73 deficiencies with chemoresistance in oral carcinoma cells

- “ The 16th Scientific and Refresher Course in Dentistry (KPPIKG 2013), Jakarta, Indonesia, February 27 – March 2, 2013
9. 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, February 23rd- 24th, 2012, Heidelberg, Germany.
 10. Ikeda MA, Liu J, Uematsu H, Tsuchida N “Roles of caspase-8 and p53/p73 deficiencies in mitochondria-dependent and drug-induced apoptosis in head and neck carcinoma cells.” 17th World Congress on Advances in Oncology and 15th International Symposium on Molecular Medicine. 11-13 October, 2012, Crete, Greece
 11. 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.” Molecular Control of Bone Remodeling 6th Global COE International Symposium, January 23rd- 25th, 2012, Tokyo.
 12. 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, Feb 27-28, 2012, Las Vegas, Nevada, USA
 13. Khandakar A S M Saadat ,Widy Lestari, Teng Ma, Endrawan Pratama , Ikuo Morita, Sachiko Iseki, Kiyoshi Ohtani , Masa-Aki Ikeda “ARID3A and ARID3B play critical roles in Cell Growth and E2F-target gene expression.” EMBO Young Scientist’s Forum, 2012, June 14- 16, 2012, Istanbul, Turkey.
 14. 池田 正明. Effects of p53-reactivating

compounds Nutlin-3 and RITA on p53 resistance in tumor cells deficient for p53Ser46 phosphorylation、第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会、郡山、2012 年 9 月 15 - 16 日

〔図書〕(計 1 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)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

池田 正明 (Masa-Aki IKEDA)

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

(3)連携研究者