

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 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：2013～2014

課題番号：25670556

研究課題名(和文) 新しいiPS干渉法による膵 細胞誘導因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel inducing factors pancreatic beta cells by iPS modified technology

研究代表者

石井 秀始 (ISHII, Hideshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授(常勤)

研究者番号：10280736

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)：新しい『iPS(induced pluripotent stem cells)干渉法』により、膵臓 細胞へ直接リプログラミングを誘導する細胞内因子を同定した。【新規性】膵臓 細胞に特化して直接リプログラミングする因子は未だない。【有用性】再生医学の画期的シーズ。【先進性】高度な再生医療を、簡便で安全な方法で実現。【トランスレーショナル研究】先端医科学の臨床医学への展開。本研究において膵 細胞を誘導する因子候補として新しい技術であるiPS干渉法により複数のニーズを得ることができた。現在に引き続き生物学的な機能の研究を進め、知的財産の整備を進めており早期の臨床応用に向けて研究を加速化する。

研究成果の概要(英文)：To identify critical factors for induction of pancreatic beta cells, we developed novel technology of induced pluripotent stem (iPS) interfering method. The study of gene expression allowed the identification of several factors, which play roles in induction and maintenance of pancreatic beta cells. The present study would open an avenue to new efficient approach for human diabetes.

研究分野：外科学

キーワード：再生医療 再生医学 細胞・組織 発生・分化 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

【iPS 干渉法】京都大学 山中伸弥教授は、ES 細胞で特異的に発現している遺伝子を分化細胞に導入して iPS 細胞を誘導した (Cell, 2006, 2007)。iPS 干渉法は、特定の臓器細胞への新しい分化誘導因子を同定するために、分化現象が iPS 誘導とは逆方向のベクトルであることを利用する原理である。すなわち、iPS 誘導ととともに、発現ライブラリーを同時に遺伝子導入すれば、ライブラリー中に含まれていたリプログラミング拮抗因子が同定できる。この因子こそが、特定の臓器細胞への直接分化を誘導する因子としてきわめて有力な候補である。【直接リプログラミング】iPS 細胞のリプログラミングは一旦万能性細胞を経てから各分化細胞に誘導されるものであるが、iPS 干渉法は強力な分化因子として、直接リプログラミングを誘導できる (万能性細胞を経ない)。将来の再生医学の応用においてきわめて重要である。

2. 研究の目的

分化細胞を用いて、膵細胞に直接リプログラミングする強力な分化誘導因子を同定、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。本法を膵以外の消化器臓器に応用する (肝・腸の再生医学基盤)。

3. 研究の方法

(1) 稀性難病患者 (MODY3 症候群) の分化細胞からリプログラミング

iPS 細胞を樹立し、そこから膵細胞を誘導、疾患メカニズムを解析した (iPS 細胞から膵細胞の誘導法)。また間葉系脂肪細胞から新しい誘導方法 (マイクロ RNA による) を開発し、間葉系脂肪細胞からリプログラミングして iPS 細胞を誘導する方法を開発した (リプログラミングに必要なコア転写因子解析; Cell Stem Cell, 2010)。更に、iPS 干渉法のために、インスリン-マ Min6 細胞株 (インスリンを自律性に産生分泌する腫瘍細胞株) の網羅的発現プロファイルを取得した (NCBI/GEO data set)。これは生理的グルコース濃度の範囲内で濃度依存性にインスリン分泌する細胞である (グルコース・インスリン応答性あり)。

(2) iPS 干渉法

インスリン-マ Min6 細胞株で、分化細胞と比較して、特異的に発現している上位 50 個遺伝子をレトロおよびレンチウイルスベクターに搭載し高発現システムを構築した (iPS 研究で実績のある系を採用)。これらを、iPS 転写因子 (Oct3, Sox2, Klf4, c-Myc) 搭載ウイルスベクター同時に導入した。導入した細胞の iPS コロニー数の減少 (GFP のみの対照と比較) を指標として細胞コアネットワーク構成転写因子を同定した。

膵細胞のコア転写因子の同定 (第一段階):

BL6 マウスから膵細胞を採取し上記の iPS 干渉法を実施。膵細胞から出発してリプログラミングを行うと、組織としてのエピジェネティック記憶が残存するために、膵細胞コアネットワークが高感度で同定できた。これを第一段階としてスクリーニングを行った。

間葉系脂肪幹細胞細胞を用いた確認 (第二段階):

次に、間葉系脂肪幹細胞を用いて上記(1)で同定した因子の iPS 干渉法を実施。この操作により、膵細胞を出発点としてスクリーニングされた上記(1)因子が、他系統の脂肪幹細胞を出発点としても利用できるかどうか、着実に段階を追って確認できた。膵細胞への分化誘導は (CMRL1066 + B27 + HGF+ IGF) で培養、分子レベルでの確認は遺伝子発現解析・免疫染色・グルコースインスリン応答性を ELISA で測定した。

【抽出した転写因子セットで膵細胞が分化誘導できない場合の対応】

誘導十分条件として不足因子があると考え、同定した膵細胞コアネットワークの遺伝子候補を 75, 100, 125, 200 まで増やして検討した。全転写因子は約 2000 であり、膵臓器特異的な因子は 5% (100 個) であるから、2 倍の coverage であり十分である。

【脂肪細胞から膵細胞が誘導できない時の対応】

準備段階の経験から、出発材料の変更 (皮膚や胎児由来の繊維芽細胞等) でほぼ解決可能。

(3) 個体レベルでの解析

糖尿病モデルマウス作成:

ヒト I 型糖尿病 (膵細胞の荒廃でインスリンの絶対的不足) の治療モデルとして、SCID マウスへ膵細胞を破壊する Streptozotocine (STZ) を腹腔内投与し、糖尿病モデルマウスを作成した。血糖値が 400mg/dl 以上の高血糖状態になり、かつマウスの生存率が良い STZ 濃度及びマウスの週令を検討した。

糖尿病マウスの治療実験:

iPS 干渉法で解明したコア転写因子を用いて、自己 (同系マウス) 細胞から膵細胞を誘導し、自家 (同系) 移植を実施した (治療実験)。移植は腎皮膜下に実施、血糖値測定により糖尿病改善効果を調べた。腎臓の組織切片で生着率、遺伝子発現、インスリン分泌能を検討し、マウスで経口糖負荷試験 (OGTT) を実施、移植片のグルコース応答性を調べた。

(4) 他の消化器臓器への応用解析

上記の成果を膵以外の消化器臓器の幹細胞 (肝・腸) へ応用。肝では、肝細胞の網羅的発現解析を実施、分化細胞の発現と比較してコア転写因子群を同定した。同定したリストからウイルスベクター搭載、iPS 転写因子 (Oct3, Sox2, Klf4, c-Myc) 搭載ウイルスベクターを同時に導入し、iPS コロニー数の減少 (GFP のみの対照と比較) を指標として細

胞コアネットワーク構成転写因子を同定した(肝臓に対するiPS干渉法)。また腸では、腸管細胞(HCT)の網羅的発現解析、コア転写因子群を同定、iPS転写因子を同時に導入、コロニー数の減少を指標として細胞コアネットワーク構成転写因子を同定した(腸管に対するiPS干渉法)。

4. 研究成果

京都大学 山中伸弥教授は、ES細胞で特異的に発現している遺伝子を分化細胞に導入してiPS細胞を誘導した(Cell, 2006, 2007)。iPS干渉法は、特定の臓器細胞への新しい分化誘導因子を同定するために、分化現象がiPS誘導とは逆方向のベクトルであることを利用する原理である。本研究では細胞の分化誘導に関わる重要な因子をiPS干渉法という新しい技術で同定することを試みた。その結果、まず細胞レベルにおいて重要な機能を発揮する因子を複数同定することができた。これらの因子は現在動物実験での前臨床試験を進めている。これらの因子の中には従来の基礎研究から予想できるものと想定外のものがあり、いずれも幹細胞の再生という重要な課題に対して有力な候補となることが強く期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- 1) Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., Ochiya, T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.*, 7;5:3591, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4591.
- 2) Lovat, F., Ishii, H., Schiappacassi, M., Fassan, M., Barbareschi, M., Galligioni, E., Gasparini, P., Baldassarre, G., Croce, CM., Vecchione, A. LZTS1 downregulation confers paclitaxel resistance and is associated with worse prognosis in breast cancer. *Oncotarget*, 28;5(4):970-977, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4011598/>
- 3) Fukusumi, T., Ishii, H., Konno, M., Yasui, T., Nakahara, S., Takenaka, Y., Yamamoto, Y., Nishikawa, S., Kano, Y., Ogawa, H., Hasegawa, S., Hamabe, A., Haraguchi, N., Doki, Y., Mori, M., Inohara, H. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 111(3):506-514, 2014. DOI:10.1038/bjc.2014.289.
- 4) Hasegawa, S., Eguchi, H., Nagano, H., Konno, M., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Nishida,

N., Koseki, J., Nishimura, T., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J. Cancer*, 111(8):1572-1580, 2014.

DOI: 10.1038/bjc.2014.454.

- 5) Hamabe, A., Hirofumi, Y., Konno, M., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 α in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci.*, 105(9):1100-1108, 2014. DOI: 10.1111/cas.12487.
- 6) Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotoh, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 111(43):15526-15531, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1407717111.
- 7) Colvin, S. H., Nishida, N., Koseki, J., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Cancer Stem Cells of the Digestive System. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 44(12):1141-1149, 2014. DOI:10.1093/jjco/hyu146.

[学会発表](計4件)

- 1) 石井秀始: Innovative drug discovery for intractable cancer stem cells、第76回日本血液学会学術集会、2014年10月31日~11月2日、大阪
- 2) 石井秀始、他: 難治性消化器癌に対する革新的治療法、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、横浜
- 3) 石井秀始: 創薬標的としての癌幹細胞エピゲノム代謝、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~27日、横浜
- 4) 石井秀始: Innovative Medicine for Gastrointestinal Cancer Stem Cells、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月28日~30日、横浜

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・特任教授
(常勤)

研究者番号: 10280736

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

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

三森 功士 (MIMORI Koshi)
九州大学・大学病院・教授
研究者番号：50322748

永野 浩昭 (NAGANO Hiroaki)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10294050

江口 英利 (EGUCHI Hidetoshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90542118