

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462400

研究課題名(和文) ヒト腎癌細胞のiPS化における細胞記憶に着目した新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Search for novel therapeutic target molecules focusing on cellular memory in iPS conversion of human kidney cancer cells

研究代表者

出射 真奈 (idei, mana)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00639213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：26年度では、ヒト腎癌由来iPS細胞を新規に10-20クローン樹立し、初期化をマイクロアレイにより評価した。初期化が確認されたクローンに対して、iPS化前後でDNAメチル化の差異を解析し、ヒトES細胞データとの比較により、万能性を規定する遺伝子群と癌を規定する遺伝子群を決定した。に誘導した癌幹細胞をSCIDマウスへ移植し、増殖能を指標として癌幹細胞と確認された腫瘍を切り出し、癌腫であることを組織学的に確認した。26年度に得られた癌を規定する遺伝子群とメチル化プロファイルを比較し、ヒト腎癌における細胞記憶を規定する遺伝子群を同定した。以上より、4つの新規治療標的遺伝子が同定された。

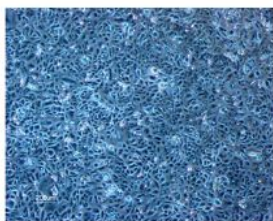
研究成果の概要(英文)：For the clones whose initialization was confirmed, the difference in DNA methylation was analyzed before and after iPS conversion, and a gene group defining universality and a gene group defining cancer were determined by comparison with human ES cell data. After fiscal year 27, iPS cells derived from human renal carcinoma established in fiscal year 26 were treated exosome purified from the cancer cell culture supernatant and induced to differentiate into cancer stem cells. Next, the induced cancer stem cells were transplanted into SCID mice, and tumors confirmed as cancer stem cells were excised using the proliferative ability as an index, and it was histologically confirmed that they are carcinomas, not teratomas. Finally, the effect on cancer by siRNA treatment or forced expression of the identified gene was examined. From the above, four novel therapeutic target genes have been identified.

研究分野：再生医療

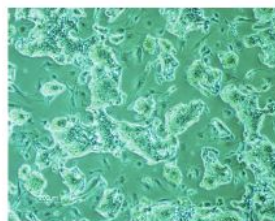
キーワード：iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞の樹立により、再生医療の臨床応用に期待が集まっているが、iPS 技術は再生医療のみならず、多方面への応用が可能である。ヒト iPS 細胞にはヒト ES 細胞とは異なり、樹立の基となる細胞記憶が残されており、例えば血液から樹立した iPS 細胞は血液系へ分化しやすく、細胞記憶のメカニズムとして DNA メチル化の関与が報告されている(Nature 2010, 467, 285-290)。我々は文部科学省再生医療の実現化プロジェクト(東大 iPS 拠点事業)において、iPS 細胞における細胞記憶のメカニズムを解明すべく、様々なヒト細胞から iPS 細胞を樹立し、iPS 化前後における包括的 DNA メチル化解析を行って来た。本研究においては、ヒト腎癌細胞の iPS 化前後のメチル化プロファイル変化から細胞記憶を担う遺伝子群を同定し、ヒト腎癌に対する新規治療標的分子を絞り込む事を目的とする。さて、正常細胞からの iPS 細胞樹立は確立した技術となりつつあるが、癌細胞からの iPS 細胞樹立の報告は少ない。その理由として、癌細胞自体にゲノムの変異等が存在する為、初期化が困難と考えられている。一方我々は文部科学省再生医療の実現化プロジェクトにおいて、293GPG レトロウイルス産生細胞株を開発した。この細胞株は培養上清を標的細胞に添加するだけで効率良く iPS 化を可能とするもので、これらを用いることにより、ヒト腎臓細胞ガン株 OS-RC2 から iPS 細胞を樹立した。OS-RC2 から樹立した iPS 細胞 (OR2-i) は正常細胞から樹立した iPS 細胞同様に、未分化マーカーを発現し、テラトーム形成等、多分化能を持つ事が確認

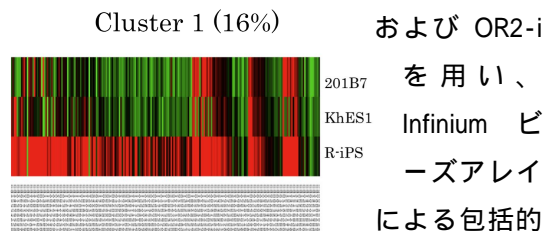


ヒト腎細胞癌 (OS-RC2)

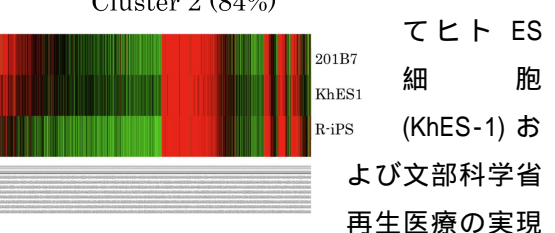


ヒト腎細胞癌由来iPS細胞 (OS-RC2-i)

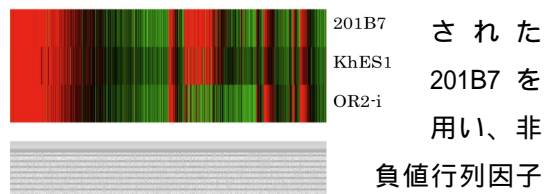
された。次に、これまで申請者らが正常腎臓上皮細胞(HRE)から樹立した iPS 細胞(R-iPS)



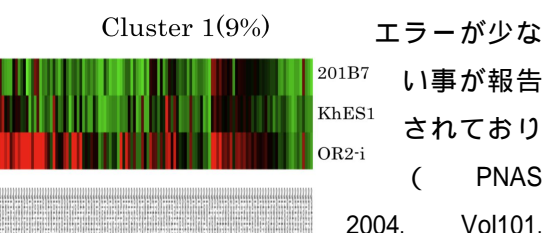
Cluster 1 (16%) および OR2-i を用い、Infinium ビーズアレイによる包括的 DNA メチル化解析を行った。万能性を規定する



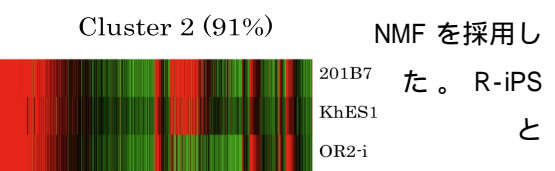
Cluster 2 (84%) コントロールとしてヒト ES 細胞 (KhES-1) および文部科学省再生医療の実現化プロジェクト内で完全に初期化された iPS 細胞と確認



Cluster 2 (91%) された 201B7 を用い、非負値行列因子分解 (Non-negative Matrix Factorization: NMF)を用いてクラスター解析を行った。クラスター解析には様々な方法存在するが、Infinium 解析等の大量のデータ処理には最も



Cluster 1 (9%) エラーが少ない事が報告されており (PNAS 2004, Vol101, 4164) 共同研究者である東京大学先端研

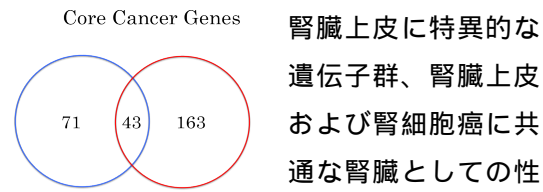


Cluster 2 (91%) NMF を採用した。R-iPS と KhES-1&201B7 の NMF クラスター

解析の結果、R-iPS にのみ高メチル化を認めるクラスター 1、3 者に共通したクラスター 2 に分かれた。すなわち、クラスター 1 は

腎臓由来 iPS 細胞の細胞記憶を規定する遺伝子群、クラスター 2 は万能性を規定する遺伝子群と考えられた。

OR2-i 樹立基の細胞である OS-RC-2 は腎臓上皮由来の癌細胞であることから、二つのクラスター 1 をベン図で比較することにより、



腎臓上皮に特異的な遺伝子群、腎臓上皮および腎細胞癌に共通な腎臓としての性質を規定する遺伝子群、腎臓癌に特異的な遺伝子群の 3 つに別

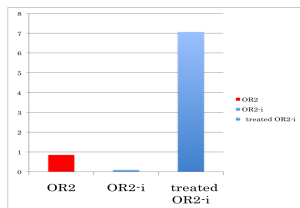


れた。すなわち、上図 7 1 の腎臓癌に特異的な遺伝子が腎臓癌由来 iPS 細胞の癌としての細胞記憶を規定する遺伝子群と考えられた。



最近 iPS 細胞を癌細胞培養上清で培養することにより、癌幹細胞への分化誘導可能であることが報告されているが (2012, PloS One)、

我々は腎細胞癌培養上清の exosome を精製し、これによる OR2-i の癌幹細胞への誘導を試みた。SCID マウスへの移植実験では、下図に示すように、腎細胞癌 OS-RC-2 (写真左および



グラフ OR2) に比較し OR2-i の exosome 処理により (写真右およびグラフ treatedOR2-i)、10 倍以上増殖力を持つことが明らかになった。ガンにおける細胞記憶とは、ガン細胞、癌細胞由来 iPS 細胞および癌細胞由来 iPS 細胞から誘導された癌幹細胞全てに保存されている遺伝子群と考えられ、本研究においては、3 者に共通して DNA メチル化レベルが保存されている遺伝子を明らか

とする。さらに、腎細胞癌で確立した手法を用い、10-20 種類のヒト由来癌細胞において解析を行い、ヒト癌に共通した細胞記憶を規定する遺伝子群を同定することにより、あらゆるガンに共通した、あらゆるガン治療に有効な、新規治療標的分子を絞り込む。

## 2. 研究の目的

申請者らは文部科学省再生医療の実現化プロジェクト (東大 iPS 拠点事業) において、種々のヒト細胞から iPS 細胞を樹立し、包括的な解析を行ってきた。最近正常細胞から樹立した iPS 細胞には、樹立前の細胞記憶が残され、分化誘導能の違いが報告されているが、申請者らは同プロジェクトにおいて、ヒト腎臓細胞ガン株 OS-RC2 から樹立した iPS 細胞にはガン細胞特異的な細胞記憶が残され、一定の培養環境下で、再度ガン化する事を突き止めた。iPS 細胞に残された細胞記憶とは、細胞の本質を規定する遺伝子と言え、ガン iPS 細胞における細胞記憶を司る遺伝子こそ、最も有望なガン治療標的分子と考えられる。本研究においては、ヒト腎臓細胞の iPS 化前後のメチル化プロファイル変化から、ヒト腎臓 iPS 細胞における細胞記憶を担う遺伝子群を同定し、ヒト腎臓に対する新規治療標的分子を絞り込む。

## 3. 研究の方法

本研究では、ガン iPS 細胞における細胞記憶を担う遺伝子群を同定し、あらゆるガン治療に有効な、新規治療標的分子を絞り込む。25 年度では、ヒト癌由来 iPS 細胞を新規に 10-20 クローン樹立し、初期化をマイクロアレイにより評価する。初期化が確認されたクローンに対して、iPS 化前後で DNA メチル化の差異を解析し、ヒト ES 細胞データとの比較により、万能性を規定する遺伝子群と癌を規定する遺伝子群を決定する。26 年度以後では、25 年度で樹立したヒト癌由来 iPS 細胞

胞を癌細胞培養上清から精製した exosome 処理し、癌幹細胞へ分化誘導する。次に誘導した癌幹細胞を SCID マウスへ移植し、増殖能を指標として癌幹細胞と確認された腫瘍を切り出し、奇形腫ではなく、癌腫であることを組織学的に確認する。組織学的に癌と確認された腫瘍から DNA を抽出し、25 年度に得られた癌を規定する遺伝子群とメチル化プロファイルと比較し、両者に共通した、ヒト癌における細胞記憶を規定する遺伝子群を同定する。最後に、同定された遺伝子の siRNA 処置や強制発現による、癌に対する作用を検証する。

### 25 年度: ヒト癌細胞由来 iPS 細胞を樹立し、初期化の確認とメチル化解析を行う

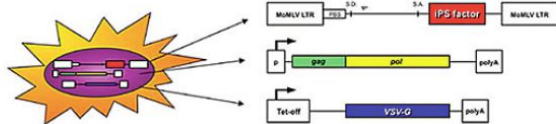
#### A: ヒト癌細胞由来 iPS 細胞の樹立(連携研究者中内、分担研究者菱川との共同研究)

理研より供与されている由来組織の異なる 10-20 種類のヒト癌細胞より iPS 細胞を樹立する。iPS 樹立に際しては、Plate E 法を用いるが、効率が悪い場合、293GPG 細胞株を使用する。

#### 1) Plate E 法

- 1、**ウイルス産生**: 山中 4 因子を導入する為に Plate E 細胞に 4 因子のベクターと pSVGL-1 を transfection し、48 時間御

- 293GPG 細胞株 (PNAS 1996; 93: 11400) レトロウイルス産生システム
  - VSV-G エンベロープシュードタイプレトロウイルス粒子を産生
    - ウイルス濃縮が容易: 高力価ウイルスによる高い感染効率を実現
    - ウイルス上清は凍結して保存が可能: 安定性に優れ、iPS 細胞樹立工程を効率化
- ウイルス産生細胞株の樹立
  - 293GPG-MXs-hOCT3/4/mOct3/4
  - 293GPG-MXs-hSOX2/mSox2
  - 293GPG-MXs-hKLF4/mKlf4
  - 293GPG-MXs-hcMYC/mcMyc
- さらに安定なクローンの樹立に成功
  - 同一ロットのウイルス上清を大量に産生することが可能



に得られたウイルスを回収する。

**遺伝子導入**: Polybrene 4μg/ml の存在下で、24 時間ウイルス液中で培養し、4 因子を導入する。

**コロニー選択**: 一日おきに培地を交換し、2 1 日コロニー形成を観察し、コロニーを選択する。

**未分化能の確認**: クローンの未分化能を PCR、FACS で評価し、クローンを選択する。

**II) 293GPG 細胞株法: Plat-E よりも高力価ウイルスが安定して得られる利点がある**

#### B: 樹立した癌細胞由来 iPS 細胞の包括的遺伝子発現解析(連携研究者油谷との共同研究)

未分化マーカーの発現確認のみでは初期化評価は不十分であり、包括的遺伝子発現により評価を行う。申請者は iPS 拠点事業において、ヒト ES 細胞 (KhES-1,2,3) および京大山中研究室で樹立された iPS (201B7) が非常に近いマイクロアレイプロファイルを示す事を確認しており、新規に樹立した iPS 細胞とこれらの遺伝子発現を比較することにより、初期化を検証する。マイクロアレイ解析は連携研究者油谷の指示により実施する。

#### C: iPS 化前後での DNA メチル化プロファイル解析

A, B により、10-20 のガン iPS クローンが得られ、iPS 化前のガン細胞とのメチル化プロファイルの比較を行う。解析には連携研究者油谷が行っている Infinium 解析を用い、ハイスループット処理を行う。Infinium 解析 (約 45000 の CpG サイト) において、iPS 化前後で、signal 変化が 0.2 以内のものを Core、signal が 0.5 以上上昇するものを High、0.5 以上低下するものを low と定義してクラスター解析等を行う。さらに、High CpG プロモータ (GC>0.55, CpG>0.75) 領域においても同様の解析を行い、全てのガン iPS 細胞に共通した Core, High, Low 遺伝子群を絞り込む。

Core 遺伝子群: ガン細胞でメチル化レベルが保存され、ガンに共通した形質

を規定する。

High 遺伝子群：遺伝子発現を OFF とすることで、ガンの性質を失わせる遺伝子群と考えられる。

Low 遺伝子群：遺伝子発現を ON とすることで、ガンの性質を失わせる遺伝子群と考えられる。

26年度以降：癌 iPS 細胞における細胞記憶決定遺伝子の同定と生物学的作用の検証する

#### A: 癌幹細胞誘導前後での DNA メチル化プロファイル解析

腎細胞癌以外の癌細胞から樹立した iPS 細胞においても、腎細胞癌由来 iPS 同様の手法を用い、癌幹細胞 (Cancer Stem Cell)へと誘導し、SCID マウスへの移植で癌幹細胞への誘導を確認後、メチル化プロファイルを解析する。

1、2012 年に発売された、exosome 精製キット(Total Exosome Isolation: Invitrogen)を用い、癌細胞培養上清から exosome を精製し、精製した exosome 処理により、癌由来 iPS 細胞を癌幹細胞へと誘導する。

2、2、誘導した癌幹細胞を SCID マウスへ移植し、腫瘍を組織的に検証し、癌種のみ DNA を抽出する

3、3、癌幹細胞による腫瘍と確認された DNA を Infinium 解析を行い、25年の結果と比較して、Core, High, Low に分類される標的遺伝子群を絞り込む。

#### 4. 研究成果

26年度では、ヒト腎癌由来 iPS 細胞を新規に 10-20 クローン樹立し、初期化をマイクロアレイにより評価した。初期化が確認されたクローンに対して、iPS 化前後で DNA メチル化の差異を解析し、ヒト ES 細胞データとの比較により、万能性を規定する遺伝子群と癌を規定する遺伝子群を決定した。に誘導した癌幹細胞を SCID マウスへ移植し、増殖能を指標として癌幹細胞と確認された腫瘍を切り出し、癌腫であることを組織学的に確認し

た。26年度に得られた癌を規定する遺伝子群とメチル化プロファイルを比較し、ヒト腎癌における細胞記憶を規定する遺伝子群を同定した。以上より、4つの新規治療標的遺伝子が同定された。

#### 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 1 件)

World J Stem Cells. 2016 Sep 26;8(9):288-96.doi:10.4252/wjsc.v8.i9.288.

Roles and regulation of bone morphogenetic protein-7 in kidney development and diseases. Tsujimura T1, Idei M1, Yoshikawa M1, Takase O1, Hishikawa K.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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

出射真奈 (IDEI, Mana)  
東京大学・医学部付属病院・特任研究員  
研究者番号：00639213

##### (2)研究分担者

菱川慶一 (HISHIKAWA, Keiichi)  
慶応大学・医学部・特任准教授  
研究者番号：50255460

##### (3)連携研究者

藤田敏郎 (FUJITA, Toshiro)  
東京大学・先端科学技術研究所・特任教授  
研究者番号：10114125

油谷浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)  
東京大学・先端科学技術研究所・特任教授  
研究者番号：10202657