

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
（再生医療関係研究分野））

「iPS 細胞等の安定供給と臨床利用のための基盤整備」

分担研究報告書

「幹細胞のストック実施と管理」

研究分担者	森 正樹	大阪大学 消化器外科学	教授
研究協力者	石井 秀始	大阪大学 癌創薬プロファイリング学	特任教授
研究協力者	今野 雅允	大阪大学 消化器癌先進化学療法開発寄附講座	助教

【研究要旨】

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に準拠した形で、確実な保管、情報管理を達成するための基盤技術の開発として、iPS/ES 細胞の品質保全に関わる学術的情報を整備する。具体的に高品質の iPS/ES 細胞の生殖細胞系列への寄与に関わる高度に保存されたゲノム領域を指標としてエピゲノム制御に基づく転写ネットワークを網羅的に解明し、その下流としてのメカニズムを明らかにした。その機構には iPS/ES 細胞の代謝制御に関わる一連の分子制御が解明され、嫌気性解凍系と酸化的リン酸化の分子メカニズムを明らかにした。ミトコンドリアの質を指標として iPS/ES 細胞の品質を評価するための基盤を構築した。これらの成果は、高品質の iPS/ES 細胞の維持と管理に於いて重要な基盤を構築することが出来た。

A. 研究目的

高品質の iPS/ES 細胞の構築と管理を目指して研究を進めることは、将来の再生医療の実現に向けて極めて重要である。一方、私達は、特定のゲノム領域に高度されているマイクロ RNA が iPS/ES 細胞の品質を規定する上で重要である知見を得た。そこで本事業では、マウス及び人の重要なゲノム領域に注目し、ゲノム科学的に普遍性の高い情報に基づく高品質の iPS 細胞の管理を目的として、分子論的な究明を実施した。近未来の再生医療分野における医学応用を目指して、基盤を構築するのが目的であり意義である。

B. 研究方法

1. マウスゲノムの解析

私達の従来の研究と合わせて比較的品质の高い iPS/ES 細胞のゲノムにおいて保存されている領域の網羅的な解析を進めた。重要ゲノム領域からマイクロ RNA を抽出した。前年度に引き続き、比較ゲノム学的手法により、マウスの iPS/ES 細胞の生殖細胞系列への寄与に関わる高度に保存されたゲノム領域の抽出と、ヒトの相同領域の抽出を実施し、DNA の一次配列、単塩基置換、発現ユニット情報を統合した。

2. 機能解析

iPS/ES 細胞の試験管内での分化誘導の条件下において上記のマイクロ RNA を研究し、下流の分子を探索した。マイクロ RNA 導入

試験による下流分子の探索を発現アレイ解析およびプロテオミックス解析で実施した。得られた結果は、分子細胞生物学的な手法で確認し検討した。

(倫理面への配慮)

本研究においては関連指針等を遵守し、大阪大学倫理委員会の承認を経て慎重に研究を進める。常に人権を尊重した研究を実行し、患者の不利益とならないよう最大限の配慮を行うこととする。

C. 研究結果

1. マウスゲノムの解析

マウスと人のゲノム比較によって特定のマイクロ RNA を分子論的に究明した。

2. 機能解析

マイクロ RNA の顆粒の解析の結果、従来知られていなかった新しいパスウェイを明らかにすることができた。それらは既存の遺伝子のスイッチオン・オフに関わる機構であり細胞の代謝制御を通じて iPS/ES 細胞の質の維持に大きく関わるということが明らかとなった。特に、マイクロ RNA によって制御される酸化リン酸化の鍵酵素がミトコンドリアの機能を介して iPS/ES 細胞の維持に重要な役割を果たすことを明らかにした。この技術は iPS/ES 細胞の効率の良い誘導と初期の発生分化誘導の制御にも重要であることが明らかとなった。前年度に引き続いた研究により、胎生期のみで発現するインプリント領域に位置する特定のマイクロ RNA は、その成熟・プロセッシングの過程で Ago に加えて特徴ある蛋白質複合体を形成し、翻訳調節の制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

D. 考按

我々の研究によりゲノムのクロマチン状況から代謝制御にまで至る新しい分子メカニズムとしてマイクロ RNA を軸とした機構を明らかにすることができた。マイクロ RNA は探査の核酸であり人工合成可能であることから創薬展開が大きく期待される。

前年度に引き続いた事業展開により、本研究で明らかにした制御系は人工合成されたマイクロ RNA 分子により細胞生物学および医療に於ける介入（検査、診断、および治療の展望）が可能であることから、近未来の医療として重要なシーズ情報を内包すると期待される。現在、特許整備中である。

E. 結論

幹細胞のストック実施と管理に於いて、開発中の上記の新技术の開発事業を展開し、単細胞ならびに iPS 等の高品質を担保した保存と維持を実現するために基本となる基盤を構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. Int. J. Oncol. 46(3):1181-1191. 2015.

2. Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotho, 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.
3. 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.
4. Koga, C., Kobayashi, S., Nagano, H., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Ishii, H., Umeshita, K., Doki, Y., Mori, M. Reprogramming Using microRNA-302 Improves Drug Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Ann. Surg. Oncol.*, Suppl 4:S591-600, 2014.
5. 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.
6. Okano, M., Konno, M., Kano, Y., Kim, H., Kawamoto, K., Ohkuma, M., Haraguchi, N., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Human colorectal CD24+ cancer stem cells are susceptible to epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Oncol.*, 45(2):575-580, 2014.
7. Wada, N., Kurokawa, Y., Nishida, T., Takahashi, T., Toyokawa, T., Kusanagi, H., Hirota, S., Tsujinaka, T., Mori, M., Doki, Y. Subgroups of patients with very large gastrointestinal stromal tumors with distinct prognoses: a multicenter study. *J. Surg. Oncol.*, 109(2):67-70. 2014.
8. 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.
9. 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. *B. r J. Cancer*, 111(8):1572-1580, 2014.

10. Hayashi, K., Tamari, K., Ishii, H., Konno, M., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Kano, Y., Nishikawa, S., Miyo, M., Noguchi, K., Ogawa, H., Hamabe, A., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2468-2474, 2014.

11. Tamari, K., Hayashi, K., Ishii, H., Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyo, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2349-2354, 2014.

12. Kawamoto, K., Yabe, S., Konno, M., Ishii, H., Nishida, N., Koseki, J., Fukuda, S., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Lee, EY., Mukai, E., Miki, T., Doki, Y., Mori, M., Hamazaki, TS., Nagano, H., Okochi, H. NeuroD1 with conditioned medium efficiently induce ASC to insulin-producing cells both in vitro and in vivo. *J. Stem Cell Res. Ther.*, 2014. (in press)

13. Ogawa, H., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Colvin, S. H., Tomokuni,

A., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Marubashi, S., Kobayashi, S., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 2014. (in press)

14. Miyazaki, S., Yamamoto, H., Miyoshi, N., Wu, Xin., Ogawa, H., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Konno, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2014. (in press)

2. 学会発表

1. 森正樹：肝胆膵領域癌におけるマイクロRNA研究の意義、第26回日本肝胆膵外科学会学術集会、2014年6月11日～6月13日、和歌山

2. 森正樹：骨転移の病態と最新治療、第23回日本がん転移学会学術集会・総会、2014年7月10日～7月11日、石川

3. 森正樹：癌幹細胞研究の現状と展望、第52回日本癌治療学会学術集会、2014年8月28日～8月30日、神奈川

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

【発明の名称】多能性幹細胞の品質診断方法及び診断キット、抗がん剤並びに疾患モデル動物

【発明者】石井秀始、森正樹、土岐祐一

郎、今野雅允、川本弘一、西田尚弘、
小関準、新井貴博、佐藤暢彦、近藤礎、
中村眞

【出願人】ユニテック株式会社、株式
会社エバンス、国立大学法人大阪大学

【出願番号】特願 2014-266696

【出願日】平成 26 年(2014 年)12 月 26
日

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

