

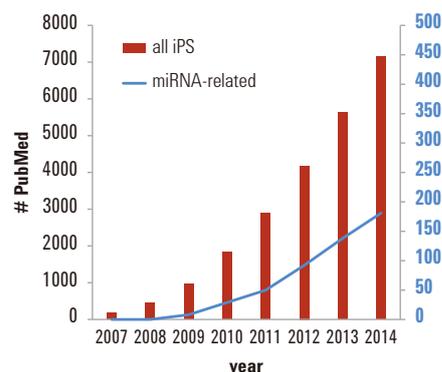
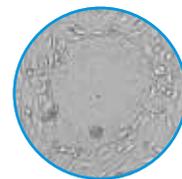


## iPS 細胞と microRNA との関わり

MicroRNA (miRNA) は 20 ~ 25 塩基程度のノンコーディング RNA であり、最も良く知られる機能の一つとして主に mRNA の 3' 側非翻訳領域と相互作用することによって他の遺伝子の翻訳や発現の調節をすることが挙げられます。近年では、特定の miRNA の発現調節による fine-tuning としての役割<sup>1)</sup> が改めて知られるようになった一方、疾患や加齢の効果的な分析マーカーや薬剤の標的としても注目されています<sup>2)</sup>。

幹細胞の分野では、マウス iPS 細胞の樹立の数年前から、幹細胞のみならず<sup>3)</sup>、様々な体細胞・組織あるいは分化系列において特異的に発現する miRNA の存在が知られていましたが、iPS 細胞作製の効率を改善する miRNA の存在が明らかになるまでの間に、マウスで 3 年<sup>4)</sup>、ヒトで 4 年<sup>5)</sup> の歳月が経過しました。その後、iPS 細胞を始めとする幹細胞や分化における miRNA の関わりを明らかにする研究が進展し、ヒト疾患モデルの応用への道筋<sup>6)</sup>、リプログラミング過程における small RNA の新たな役割<sup>7)</sup>、iPS 細胞の分化系列やダイレクトリプログラミングとの関わり<sup>8)</sup> など、今なお新たな報告が次々となされ、増加の一途を辿っています (右図)。

現在、次世代シーケンサの活用によってヒトで約 2500 種もの miRNA が知られるようになり、ヒト、マウス、ラットの最新のデータベースから定量性の高いマイクロアレイでのプロファイリングを行うことも出来るようになってきています。今回は、iPS 細胞と miRNA との様々な関わりの中から、アジレント社の変異導入キット、miRNA マイクロアレイやアレイ CGH を使用した例を中心に、これらの解析結果を報告した論文を御紹介します。



1) *Cell*. 2013 Apr 25; **153**(3) : 516-9. Yates LA, et al.,

2) *Front Genet*. 2015 Mar 9; **6**(87) : 1-16. Szafranski, et al.,

3) *Dev. Cell*. 2003 Aug; **5**(2) : 351-8. Houbaviy HB, et al.,

4) *Nat Biotechnol*. 2009 May; **27**(5) : 459-61. Judson RL, et al.,

5) *EMBO J*. 2011 Mar 2; **30**(5) : 823-34. Li Z, et al.,

6) *J Biomed Biotechnol*. 2012; **2012**: 758169. Underbayev C, et al.,

7) *Nat Commun*. 2014 Dec 10; **5**: 5522. Clancy JL, et al.,

8) *Adv Drug Deliv Rev*. 2015 Apr **14**; Ong SG, et al.,

## リプログラミング過程における miRNA の役割の解明 (QuikChange を用いた例)



近年になって miR-302 / miR-294 ファミリーに加えて miR-181 ファミリーがリプログラミングの初期過程を促進するエンハンサーとして知られるようになりました (細胞周期の制御に関わる CDKN1A 遺伝子は miR-294 の確立された標的遺伝子の一つ)。内在性の miR-181 は OCT4 / SOX 2 / KLF4 の導入により一過性に発現が増加しますが、その抑制に伴い iPS 細胞のコロニー形成は減少します。Judson RL et al. は二つの miRNA ファミリーの 114 個の標的遺伝子の機能を一つ一つ調べ、初期化を抑制する 25 の遺伝子を明らかにしました。初期化因子導入後 1 日目での miRNA ファミリーの導入は、それより後の導入と比較するとコロニー形成が大きく促進され、その結果を RNA 干渉により検証しました。候補となる標的遺伝子群について、さらに miRNA 結合部位である 3' UTR 領域のクローニングを行い、QuikChange を用いた変異導入を施した上でレポーターアッセイを行いました。その結果、ほぼ全ての miRNA が予想された野生型の標的部位に対してのみ翻訳を阻害しました。これらの結果は miRNA の機能に伴う堅牢性 (robustness) モデルと一致しており、外来性の miRNA の導入により初期過程での確率的な遺伝子発現による多能性の獲得の障壁が取り除かれることで、リプログラミング状態により近づくようになるのではないかと考察されました。以上の事から、著者らは miRNA がその他の細胞間の状態転移においても同様に機能する可能性を示唆しています。

"MicroRNA-based discovery of barriers to dedifferentiation of fibroblasts to pluripotent stem cells."  
*Nat Struct Mol Biol*. 2013 Oct; **20**(10) : 1227-35. Judson RL et al., PMID: 24037508





## 分化に伴う miRNA の発現変化を miRNA マイクロアレイで追跡



網膜色素上皮 (RPE) は正常な視野を維持するために必須の組織です。RPE が損傷すると、加齢黄斑変性 (AMD) や網膜色素変性症 (RP) などを引き起こします。その治療には iPS 細胞を網膜色素上皮に分化させた iPS-RPE の移植が期待されますが、iPS 細胞から分化させた組織は機能面、分化能や腫瘍形成因子が働いていないこと等、安全面も徹底的に確認することが必要です。一方で miRNA は分化の過程で重要な役割を果たすことが報告されています。Wang HC. *et al.* は iPS 細胞と分化させた iPS-RPE の miRNA 発現プロファイルを **アジレント Human miRNA マイクロアレイ** を用いて解析しました。その結果、網膜と脳内で組織特異に発現することが知られている miR-181c や多能性誘導因子であることが確認されている miR-367、miR-302 を含め、113 の miRNA の発現変動が確認されました。

さらに著者は Enrichment Analysis を行い、iPS 細胞と iPS-RPE で発現変化がある miRNA は細胞の発生、成長と増殖、細胞周期、細胞死など細胞運命決定に関連していることを確認しました。また発現差がみられる miRNA のターゲット候補遺伝子を TarBase や miRecords で予測したところ、予測遺伝子の多くはがん遺伝子、腫瘍抑制因子もしくは転写制御因子でした。iPS-RPE で発現上昇した miRNA は腫瘍抑制因子を含む一方、発現が低下した miRNA の多くは onco miR でした。さらに踏み込んだ miRNA-mRNA ターゲット解析により、がんや奇形、生殖器系の疾患に関連するネットワーク、がんの他、胃腸障害や肝機能疾患に関連するネットワークが明らかになりました。今後 iPS-RPE の miRNA と付随する mRNA の時間的・空間的発現挙動を解析することで、さらに新しい知見が得られることが期待されます。

“Profiling the microRNA Expression in Human iPS and iPS-derived Retinal Pigment Epithelium”  
*Cancer Inform.* 2014 Oct 15; **13**(Suppl 5) : 25-35. Wang HC. *et al.*, PMID:25392691

## 初期化遺伝子除去後、CGH マイクロアレイでゲノム全体のコピー数変化がないことを確認

iPS 細胞のリプログラミングでは、体細胞へ DNA、mRNA あるいはタンパクを導入することが多く行われています。初期の iPS 細胞の研究で用いられたレトロウィルスベクターは、発がん性などが懸念されており、複数の持続性のレトロウィルス挿入を避けることが臨床応用では求められます。DNA トランスポゾンベクターは、GOI (gene of interest) と TIRs (terminal inverted repeats) をもちトランスポゼースを発現させることで、目的遺伝子を挿入します。*Sleeping Beauty* (SB) トランスポゾンシステムは遺伝子の挿入効率が高く、安全性に優れており、哺乳類のゲノムには SB 関連の配列はないため内因的・外因的トランスポゾンの交配を避けることができるなどの利点があります。Grabundzija I. *et al.* は OSKM (*Oct4, Sox2, Klf4* および *c-Myc*) あるいは OSKML (OSKM に加え *Lin28*) を含む SB トランスポゾンベクターを構築し、iPS 細胞を作製しました。さらに著者は RMCE (recombination-mediated Cassette exchange) を用いて iPS 細胞からのリプログラミング遺伝子の除去を行い、**アジレントマウス CGH マイクロアレイ** によりその前後でゲノム全体のコピー数変化がないことを確認しました。一方で miRNA は体細胞のリプログラミングを促進することが報告されており、著者は OSKM に加え miRNA302 / 367 も含むベクターを構築しました。このベクターをヒト繊維芽細胞に導入したところ、OSKM ベクターよりも 1 週間早く、リプログラミング効率も 15 倍に向上しました。また SB トランスポゾンを用いて得られたヒト iPS 細胞は神経前駆細胞 (外胚葉)、筋繊維 (中胚葉) そして腸上皮 (内胚葉) 様に分化することも確認されました。安全な方法で作製された iPS 細胞は様々な疾患の研究や治療に役立つことが期待されます。

“Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells.”  
*Nucleic Acids Res.* 2013 Feb 1; **41**(3) : 1829-47. Grabundzija I. *et al.*, PMID:23275558

アジレントゲノミクス関連製品サイト : <http://AgilentGenomics.jp>

販売店

[ お問い合わせ窓口 ]

アジレント・テクノロジーズ株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1  
●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111  
email\_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。  
※本資料掲載の製品は全て研究用です。  
その他の用途にご利用頂くことはできません。

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
Printed in Japan, Nov. 30, 2015

