

令和元年5月21日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21642

研究課題名(和文) 不死化RPE細胞マーカーIRM1の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of a IRM1 as a Novel Marker for Immortalization of Retinal Pigment Epithelial Cells

研究代表者

黒田 拓也 (Kuroda, Takuya)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・主任研究官

研究者番号：70648857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来移植細胞の安全性において最も懸念される問題は、移植細胞の腫瘍化である。これまでの研究の結果、網膜色素上皮(RPE)細胞をモデルとして、不死化RPE細胞マーカーIRM1(Immortalized RPE cell marker 1)遺伝子を同定していた。今回、IRM1と不死化との関連を調べるため、IRM1の機能解析を行った。その結果、IRM1は卵巣がん等の幾つかの腫瘍組織で高発現していることが示され、また、IRM1の過剰発現株の解析から、IRM1はアクチンフィラメントの重合を促進し、細胞遊走の亢進に寄与する事が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞を用いた再生医療製品の安全性において最も懸念される問題は移植細胞のがん化である。そのため、未分化細胞や目的外細胞の残存を評価する試験法を確立する事が非常に重要である。この試験法では、下方検出限界3%まで正常RPE細胞に混入させた不死化RPE細胞を検出可能であることを示した。また、今回、不死化RPEマーカーTNNT1は、卵巣癌等いくつかのがん組織でも優位に高発現していることを明らかとした。この試験法は、iPS細胞由来移植細胞の品質管理に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells (hPSCs) are leading candidate raw materials for cell-based therapeutic products (CTPs). In the development of hPSC-derived CTPs, it is imperative to ensure that they do not form tumors after transplantation for safety reasons. Because cellular immortalization is a landmark of malignant transformation and a common feature of cancer cells, we aimed to develop an in vitro assay for detecting immortalized cells in CTPs. We employed retinal pigment epithelial (RPE) cells as a model of hPSC-derived products and identified a gene encoding slow skeletal muscle troponin T (TNNT1) as a novel marker of immortalized RPE cells by comprehensive microarray analysis. We demonstrated that TNNT1 mRNA expression is higher in several cancer tissues than in normal tissues. Furthermore, stable expression of TNNT1 in ARPE-19 cells affected actin filament organization and enhanced their migration ability.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 網膜色素上皮細胞 不死化細胞 造腫瘍性細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞由来移植細胞の安全性において最も懸念される問題は、移植細胞の腫瘍化である。そのため、未分化 iPS 細胞の残存だけでなく、目的外の形質転換細胞の混入を評価する試験法を開発・確立する事が重要である。そこで我々は、ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞をモデルに、不死化した形質転換細胞の混入を評価する試験法の開発を行った。その結果、3種類の不死化 RPE 細胞において共通して正常 RPE 細胞に比べ 100 倍程度発現量が高く、且つ未分化 iPS 細胞でも高発現している遺伝子 IRM1 (immortalized RPE maker 1) を同定した。しかしながら、IRM1 (以下、TNNT1) がどのようなメカニズムで不死化と関連しているのかは、不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が同定した不死化 RPE 細胞マーカーIRM1 の機能を明らかにし、RPE 細胞の不死化メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) TNNT1 KO 細胞株の表現型解析

不死化 RPE 細胞株を用いて ZFN 技術により、TNNT1 KO 株を作製し、その細胞増殖能、テロメラーゼ活性、細胞周期に関わる p16INK4a 発現や pRb リン酸化などを調べる。

(2) TNNT1 過剰発現株の表現型解析

TNNT1 が機能的、直接的に不死化に関与していることを証明するため、IRM1 の過剰発現を行う。作成した IRM1 過剰発現株を解析し、細胞老化の指標である酸性 β ガラクシダーゼ活性や細胞増殖能などを調べる。

(3) TNNT1 の発現調節の解析

染色体上の TNNT1 上流には CpG アイランドが存在していることを、ゲノムデータベースを用いることにより確認している。CpG アイランドにおける DNA メチル化は、ほとんど全ての種類のがんの発達において極めて重要な役割を果たしていることが知られている (Jaenisch R, et al., Nat. Genet. 2003)。そこで、バイサルファイトシーケンスを行うことにより、正常 RPE 細胞と不死化 RPE 細胞における TNNT1 上流の CpG アイランドにおける DNA メチル化の比較を行い、エピジェネティックな発現調節の可能性を検討する。

4. 研究成果

まず初めに、不死化 RPE 細胞における TNNT1 発現制御がエピジェネティック制御によるものであるかどうかを確かめるために、不死化 RPE 細胞における TNNT1 遺伝子座でのクロマチン状態を調べた。ヒストン H3 のトリメチル化リジン 27 (H3K27me3)、およびヒストン H3 のトリメチル化リジン 4 (H3K4me3) に特異的な抗体を用いて正常 RPE 細胞および不死化 RPE 細胞 (ARPE-19 細胞) に ChIP-qPCR を行った。TNNT1 の転写開始部位 (TSS) から -3kb、-2kb、-1kb および +1kb の領域について正常 RPE 細胞と比較した場合、H3K27me3 は、ARPE-19 細胞において TSS に対して -2kb および +1kb の領域で有意に減少した。他方、正常 RPE 細胞と ARPE-19 細胞との間の TNNT1 遺伝子座での H3K4me3 における有意な差を認めなかった (図 1)。これらの知見は、TNNT1 遺伝子座での H3K27me3 マークの喪失が TNNT1 の転写活性化を促進することを示した。

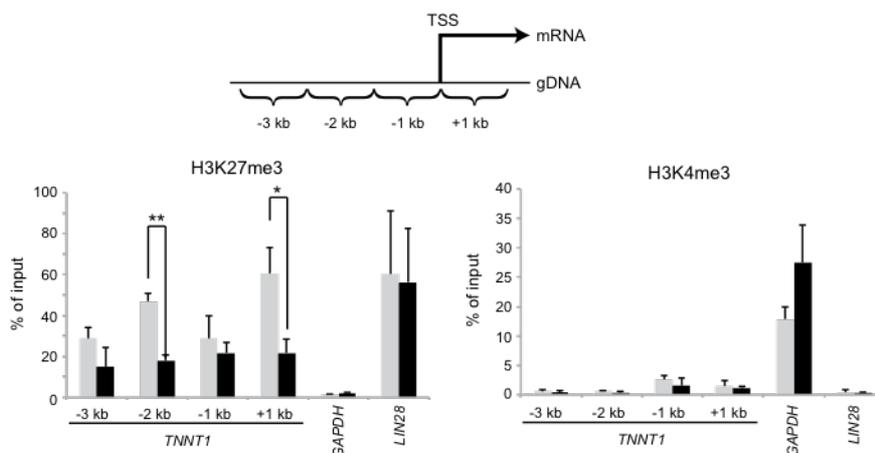


図 1 TNNT1 の発現制御

次に、TNNT1 が不死化に機能的に関与しているかを調べる目的で、TNNT1 の過剰発現株を作製し、解析を行った。レンチウイルスベクタープラスミドである pLVSIN Vector の MCS に TNNT1 遺伝子を挿入し CMV プロモーターにより発現するベクターを構築した。しかしながら、正常 RPE 細胞へレンチウイルスを感染させ、ピューロマイシン選択により、薬剤耐性株を獲得しよう

と試みたが、感染効率が悪く、安定発現株を獲得することは出来なかった。その代わりに、不死化 RPE 細胞において TNNT1 の過剰発現株を作製し、解析を行った。その結果、ZFN で切断された AAVS1 部位に TNNT1 を挿入することによって TNNT1 を過剰発現する ARPE-19 細胞を樹立した (pCMV-TNNT1 ARPE-19)。予想通り、pCMV-TNNT1 ARPE-19 細胞は、TNNT1 mRNA の約 70 倍の増加を示した。先行研究により、不死化細胞におけるテロメア維持における重要な役割を果たす TERT の発現が、HCT116 細胞において遊走に関与していることが報告されている。この情報を元に、今回、ギャップクローゼージャー遊走アッセイにより細胞遊走に対する TNNT1 の効果を調べた。その結果、pCMV-TNNT1 ARPE-19 細胞は、野生型 ARPE-19 細胞よりも有意に高い内向き遊走を示した (図 2)。また、hTERT RPE-1 細胞における TNNT1 の一過性発現もそれらの遊走を増強し、そして ARPE19 細胞の結果を支持した。逆に、ARPE-19 細胞における shRNA を利用した TNNT1 ノックダウンは、ノックダウン細胞の遊走を有意に抑制した。

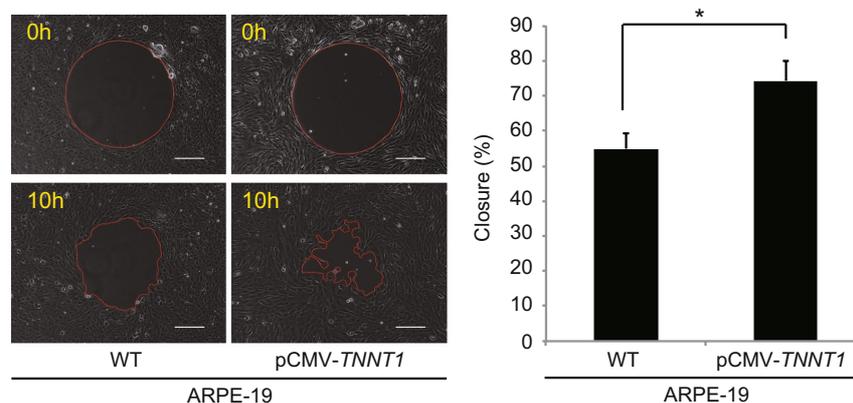


図 2 TNNT1 過剰発現株の細胞遊走能

さらに、ARPE-19 細胞において TNNT1 の過剰発現によって誘導されたアクチン重合の明らかな増強を観察した (図 3)。これらの結果は、TNNT1 発現がアクチンフィラメントの組織化に影響を及ぼし、不死化 RPE 細胞における細胞遊走能を増強することを示唆した。

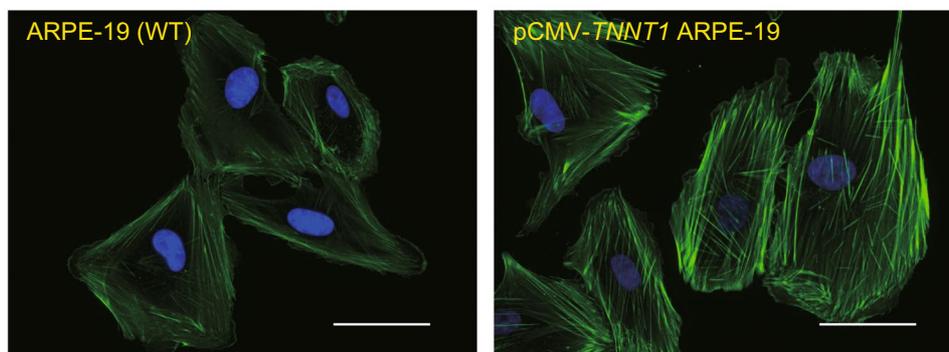


図 3 TNNT1 過剰発現株のアクチンフィラメント免疫染色 (緑色)

最後に、不死化細胞のマーカーとしての TNNT1 の多様性を調べるために、18 種類の癌または正常組織 (副腎、胸部、子宮頸部、大腸、子宮内膜、食道、腎臓、肝臓、肺、リンパ組織、卵巣、膵臓、前立腺、胃、精巣、甲状腺、膀胱、子宮) 由来の cDNA をスポットした TissueScan アレイを用いて、さまざまな種類のヒト癌組織および正常組織における TNNT1 発現レベルを調べた。その結果、子宮頸部、結腸、肺、卵巣、および精巣の癌組織において、TNNT1 が有意に高発現していることが明らかとなった (図 4)。

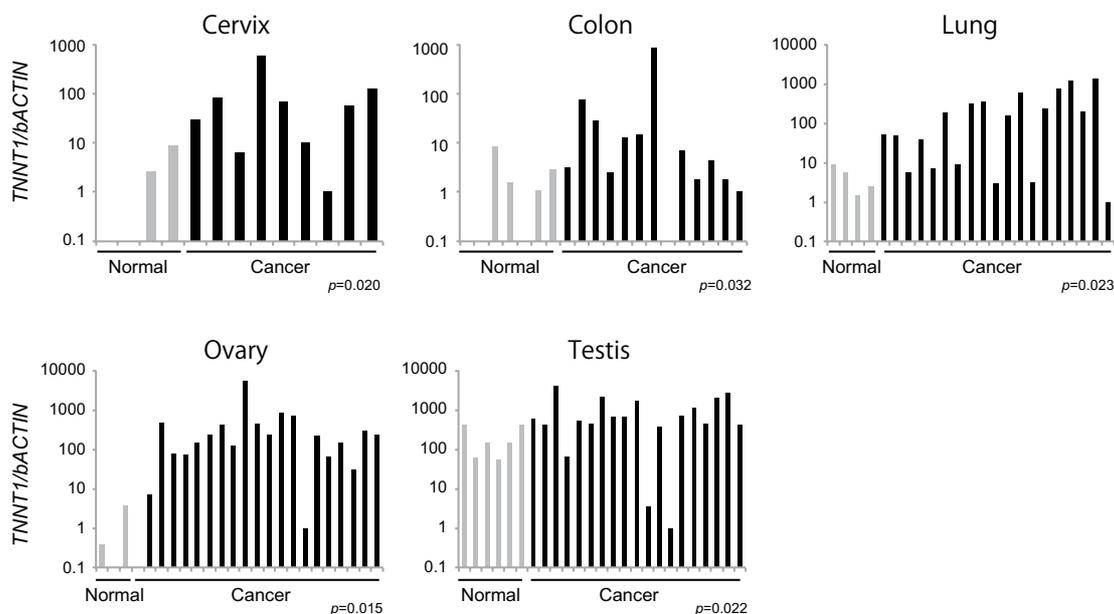


図4 様々なヒトがん組織における TNNT1 の発現量

一般的に、トロポニン複合体は細胞内カルシウム濃度の変化に応答して横紋筋収縮を調節する。そのうち、Ca²⁺感受性分子スイッチを形成するトロポニン T はトロポミオシンと結合してトロポニン複合体を細いフィラメントの特定の位置に固定する機能を持つことが知られている。脊椎動物では、3 つの筋肉型特異的トロポニン T アイソフォームをコードするように進化しており、TNNT1 は、骨格遅筋特異的トロポニン T である。今回の研究で、今までの TNNT1 とは全く異なる機能として、TNNT1 の過剰発現が ARPE-19 細胞において遊走を増加させ、アクチン重合を増強させることを見出した。また、一時的に TNNT1 を発現する hTERT RPE-1 を用いて遊走アッセイを繰り返し、TNNT1 がその過剰発現細胞の遊走を増強するという同様の結果を得た。上皮細胞へのトロポミオシンのマイクロインジェクションは急速な細胞遊走を誘導すると報告されているので、TNNT1 は細胞遊走と浸潤を調節するアクチンとトロポミオシンの相互作用に寄与する可能性が高いと考えられる。また、癌との関連で、子宮頸部、結腸、肺、卵巣、および精巣の癌組織における TNNT1 の実質的な発現を示した。既報にて、胆嚢癌の術後再発は、TNNT1 発現と正の関連があること、また、卵巣癌で有意に高発現していることが報告されていることから、TNNT1 は癌において複数の役割を果たすことが予測される。本研究により、TNNT1 は細胞の不死化において部分的にはあるが、一般的に考えられている筋収縮以外の何らかの重要な役割を果たしていること示唆された。今後の研究によりそのメカニズムが明らかにされることが望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① [Kuroda T, Yasuda S, Nakashima H, Takada N, Matsuyama S, Kusakawa S, Umezawa A, Matsuyama A, Kawamata S, Sato Y.](#) Identification of a Gene Encoding Slow Skeletal Muscle Troponin T as a Novel Marker for Immortalization of Retinal Pigment Epithelial Cells, *Scientific reports*, 査読有、7 巻、2017、8163-8174
DOI: 10.1038/s41598-017-08014-w
- ② [Ohashi F, Miyagawa S, Yasuda S, Miura T, Kuroda T, Itoh M, Kawaji H, Ito E, Yoshida S, Saito A, Sameshima T, Kawai J, Sawa Y, Sato Y.](#) CXCL4/PF4 is a predictive biomarker of cardiac differentiation potential of human induced pluripotent stem cells, *Scientific reports*, 査読有、9 巻、2019
DOI: 10.1038/s41598-019-40915-w
- ③ [Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K.](#) Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells, *Cell Metabolism*, 査読有、23 巻、2016、663-74
DOI: 10.1016/j.cmet.2016.03.001
- ④ [Kitajima N, Numaga-Tomita T, Watanabe M, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M.](#) TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling., *Scientific reports*, 査読有、6 巻、2016
DOI: 10.1038/srep37001.
- ⑤ [Numaga-Tomita T, Kitajima N, Kuroda T, Nishimura A, Miyano K, Yasuda S, Kuwahara](#)

K, Sato Y, Ide T, Birnbaumer L, Sumimoto H, Mori Y, Nishida M.、TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis.、Scientific reports、査読有、6 巻、2016

DOI: 10.1038/srep39383.

- ⑥ Yasuda S, Kusakawa S, Kuroda T, Miura T, Tano K, Takada N, Matsuyama S, Matsuyama A, Nasu M, Umezawa A, Hayakawa T, Tsutsumi H, Sato Y.、Tumorigenicity-associated characteristics of human iPS cell lines.、PLoS One、査読有、13 巻、2018
DOI: 10.1371/journal.pone.0205022.
- ⑦ Kono K, Sawada R, Kuroda T, Yasuda S, Matsuyama S, Matsuyama A, Mizuguchi H, Sato Y.、Development of selective cytotoxic viral vectors for concentration of undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells.、Scientific reports、査読有、9 巻、2019
DOI: 10.1038/s41598-018-36848-5.

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 黒田拓也, 安田智, 中島啓行, 松山さと子, 高田のぞみ, 草川森士, 梅澤明弘, 松山晃文, 川真田伸, 佐藤陽治、不死化網膜色素上皮細胞マーカーIRM1 の機能解析、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年 3 月 7 日
- ② 黒田拓也, 安田智, 城しおり, 松山さと子, 佐藤陽治、A transcriptomic approach to identify potential marker genes for prediction of differentiation propensity of human induced pluripotent stem cell lines.、国際幹細胞学会 2017、
- ③ 黒田拓也, 安田智, 松山さと子, 草川森士, 佐藤陽治、不死化網膜色素上皮細胞マーカーとしてのトロポニン T1 の同定、第 3 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2017 年
- ④ 黒田拓也, 安田智, 城しおり, 松山さと子, 草川森士, 田埜慶子, 三浦巧, 松山晃文, 佐藤陽治、ヒト iPS 細胞における分化指向性予測マーカーの同定、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年
- ⑤ 黒田拓也, 安田智, 城しおり, 松山さと子, 草川森士, 田埜慶子, 三浦巧, 松山晃文, 佐藤陽治、Identification and characterization of potential marker genes for prediction of differentiation propensity of human induced pluripotent stem cell lines.、International society for stem cell research 2019 annual meeting、2018 年
- ⑥ 黒田拓也, 安田智, 城しおり, 松山さと子, 草川森士, 田埜慶子, 三浦巧, 松山晃文, 佐藤陽治、Characterization of potential marker genes for prediction of differentiation propensity of human induced pluripotent stem cell lines.、Cell symposia、2018 年
- ⑦ 草川森士, 鎌田敦音, 安田智, 黒田拓也, 西野泰斗, 大塚敬一郎, 佐藤光利, 佐藤陽治、簡便な三次元培養法を利用した再生医療等製品の造腫瘍性関連試験の検討、第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年
- ⑧ 大橋文哉, 宮川繁, 安田智, 三浦巧, 黒田拓也, 伊藤昌可, 川路英哉, 伊東絵望子, 吉田昇平, 齋藤充弘, 鮫島正, 河合純, 澤芳樹, 佐藤陽治、CXCL4/PF4 is a Predictive Biomarker of Cardiac Differentiation Propensity of Human Induced Pluripotent Stem Cells、アメリカ心臓協会 2018、2018 年
- ⑨ 大橋文哉, 宮川繁, 安田智, 三浦巧, 黒田拓也, 伊藤昌可, 川路英哉, 伊東絵望子, 吉田昇平, 齋藤充弘, 大山賢二, 松田勇, 鮫島正, 河合純, 澤芳樹, 佐藤陽治、心筋細胞に分化指向性を有する iPS 細胞株を選択するためのバイオマーカーの探索、第 18 回日本再生医療学会総会、2018 年
- ⑩ 我妻昭彦, 黒田拓也, 寺井織枝, 戸村大助, 中野駿介, 森田麻耶, 渡辺武志, 佐藤陽治、In vitro detection of undifferentiated pluripotent stem cells - Preliminary studies of Droplet Digital PCR assay.、第 45 回日本毒性学会学術年会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。