

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22945

研究課題名(和文)多段階分化促進遺伝子発現と自動除去型ベクターの融合による高効率高純度分化誘導法

研究課題名(英文) Safe and efficient selection of differentiated cells by stage-specific gene expression from auto-erasable vector

研究代表者

西村 健 (Nishimura, Ken)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80500610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞等を分化誘導して得られた分化組織の再生医療や創薬への実用化を進めるために、残存未分化細胞等によるガン化等のリスクを減らして、安全性の高い分化細胞を取得する系の構築を試みた。我々独自の自動除去型SeVdpベクターに、神経幹細胞特異的miRNAの標的配列を追加することによって、分化誘導されてきた神経幹細胞のみを選択することに成功した。また、分化段階特異的に発現するmiRNAを利用して、神経幹細胞分化を促進する遺伝子を分化段階に応じてベクターから発現させることにも成功した。今後は、分化細胞選択と分化促進の機能を一つのベクターに融合することによって、高効率高純度分化細胞選択系を確立したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によって、再生医療や創薬に実用化可能な分化細胞を取得するために必要な技術の開発が進展した。この技術を完成させるためには、ベクターコピー数の微調整や、ベクター除去に用いるために最適なmiRNAの探索、試行などが必要ではあるが、そのような研究を継続して高効率高純度分化細胞選択系を確立することによって、幹細胞等から誘導して作製した分化細胞を用いた、安全な再生医療や新しい医薬の探索が可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To enhance an application of differentiated tissue to regenerative medicine and drug discovery, we need to reduce risks of tumor formation by remained undifferentiated cells and obtain highly pure differentiated cells efficiently. Adding target sequences of neural stem cell (NSC)-specific miRNA to our original auto-erasable SeVdp vector enabled us to select pure population of the induced NSCs. Moreover, we succeeded to control an expression timing of a NSC differentiation inducer from SeVdp vector by miRNA whose expression is changed at a particular period in the NSC differentiation. We plan to combine the cell selection system and the differentiation induction into single SeVdp vector to establish a system for efficient selection of highly pure differentiated cells.

研究分野：幹細胞工学、幹細胞生物学

キーワード：分化誘導 再生医療 創薬 自動除去型SeVdpベクター miRNA

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞等から誘導した分化細胞を移植に用いる再生医療は、現在、様々な組織について実用化に向けた研究が進められている。しかし、分化細胞に混入した未分化細胞や目的外分化細胞が、移植後に腫瘍形成等の想定外の機能を発現してしまうリスクがある。また、創薬においても、候補薬物の薬効・毒性の試験のために肝細胞、心筋細胞、神経細胞などが大量に必要とされているが、一定の品質の細胞を安定供給する為に、生体から分離した細胞を用いるのではなく、多能性幹細胞等からこれらの細胞を分化誘導して得ることが望ましいと考えられている。しかし、分化細胞に他の細胞が混入すると、薬物試験結果等に影響を及ぼす恐れがある。そのため、分化誘導した細胞を用いた再生医療の実用化や創薬研究の促進のために、高純度分化細胞取得方法の確立が強く望まれている。

高純度分化細胞の取得には、誘導効率の向上と細胞選択の最適化の両方が必要である。

分化誘導効率は、従来の培地添加物による誘導に加え、分化誘導の鍵となる遺伝子を導入することによって大きく向上することが期待される。しかし、多段階を経る分化誘導では、誘導遺伝子を必要な時期にのみ一過的に発現させる必要があるが、それに対し、分化段階特異的な発現コントロールに適した遺伝子導入系は存在しない。また、分化細胞選択についても、未分化細胞や目的外分化細胞を取り除き、分化細胞のみを大量に得ることができる実用的な技術は開発されていない。

それに対し我々は、センダイウイルスの持続感染株を元に、持続的に複数の遺伝子を同時に発現させることができる SeVdp ベクターの開発に成功している (Nishimura K *et al.* 2011 *J. Biol. Chem.*)。また、多能性幹細胞特異的マイクロ RNA (miRNA) の標的配列をベクターに搭載させることによって、SeVdp ベクターを用いて誘導されてきた iPS 細胞からベクターを自動的に取り除くことに成功したことから、細胞特異的 miRNA の機能を利用して細胞から除去可能な「自動除去型 SeVdp ベクター」の開発に成功している (Nishimura K *et al.* 2017 *Stem Cell Res.*)。

2. 研究の目的

本研究では、高純度分化細胞取得のために、分化誘導を促進しつつ、目的分化細胞の選択も行うことができるベクターシステムの開発を試みる。そのためにまず、自動除去型 SeVdp ベクターに細胞選択遺伝子と、目的分化細胞特異的に発現する miRNA の標的配列を挿入し、目的分化細胞を選択するシステムを構築する。さらに、分化段階特異的に分化促進遺伝子を発現させることによって分化効率の向上を可能にし、一つのベクターを一度感染させるのみで高効率で高純度な分化細胞を取得できる方法を構築する。そして、そのような独自のバイオ技術を基盤として、再生医療や創薬研究の促進に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 分化細胞選択系の構築

分化細胞の選択は、図1のように分化細胞特異的 miRNA の標的配列を L 遺伝子に融合させた自動除去型 SeVdp ベクターを用いて行う。このベクターを誘導元の幹細胞等に感染させた後に分化誘導を行うと、目的分化細胞では、細胞特異的 miRNA がウイルスポリメラーゼをコードする L 遺伝子の発現を抑制するため、ベクターが自動的に除去される。それに対し、miRNA が発現していないそれ以外の細胞には持続感染するため、分化誘導終了後に、自殺遺伝子の機能を利用する (例: P450 遺伝子発現細胞に対する CPA 処理) ことによってベクター残存細胞を死滅させ、分化細胞に混入した未分化細胞や目的外分化細胞を取り除くことが可能になる。

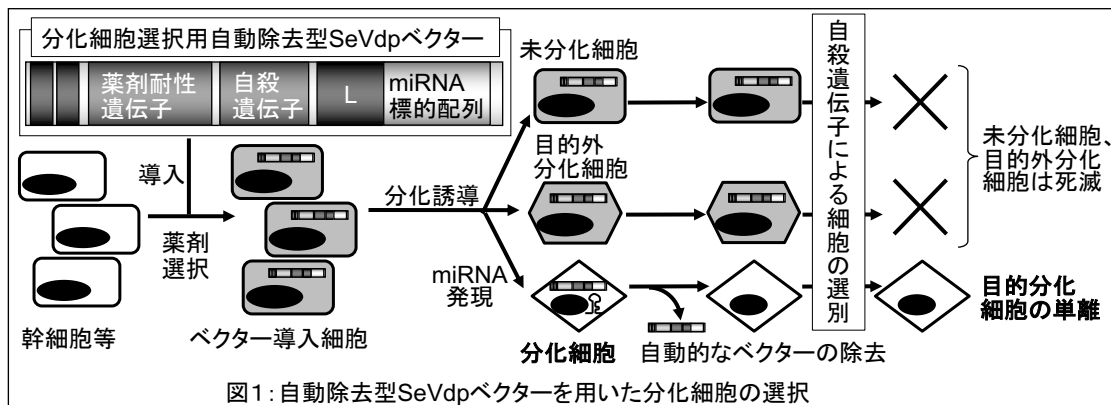
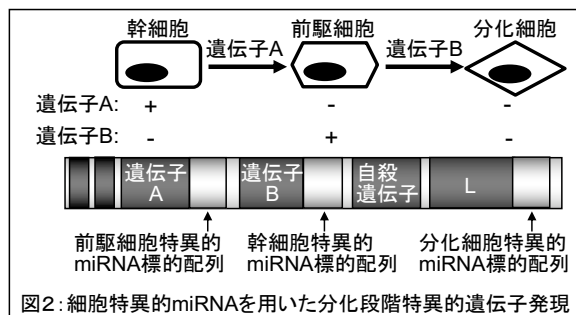


図1: 自動除去型SeVdpベクターを用いた分化細胞の選択

(2) 分化段階特異的遺伝子発現系の構築

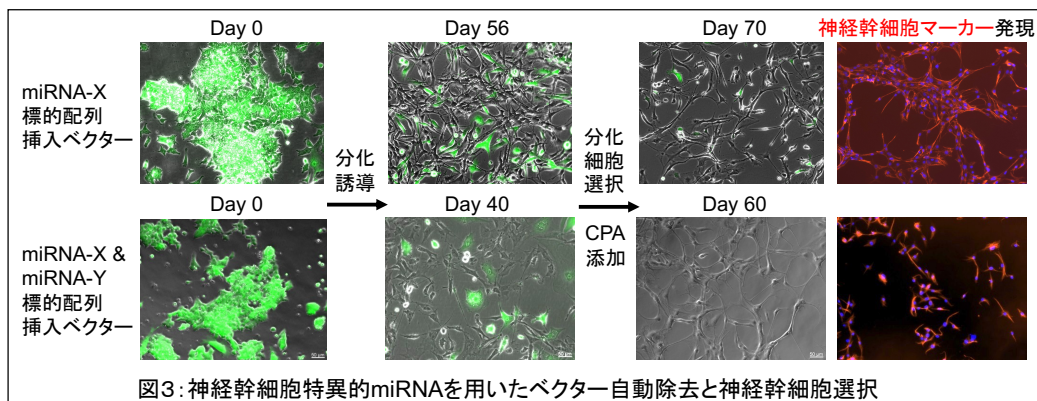
分化段階特異的遺伝子発現系を構築するために、各段階特異的に発現する miRNA の機能を利用する。図2の場合、幹細胞では、遺伝子 B の発現が幹細胞特異的 miRNA によって抑制されるために遺伝子 A のみが発現する。そして、それによって前駆細胞への分化が促進されると、遺伝子 A の発現が前駆細胞特異的 miRNA によって抑制され、代わって遺伝子 B の発現抑制が解除される。遺伝子 B によって分化細胞へと分化すると、後述のように、分化細胞特異的 miRNA によってベクターが自動除去されるため、遺伝子 A、B 両方の発現がなくなり、最終的にベクターを含まない分化細胞が得られる。



4. 研究成果

(1) 分化細胞選択系の構築

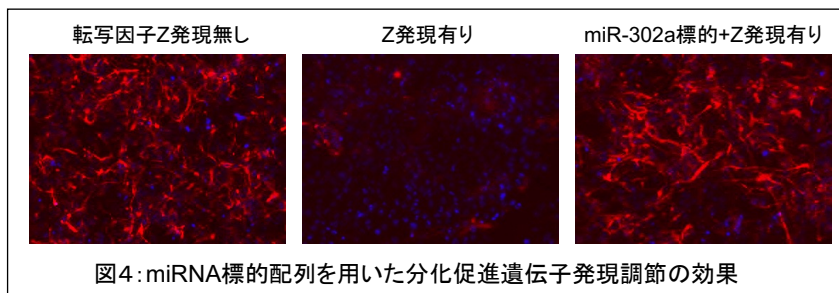
マウス ES 細胞から神経幹細胞を誘導する系をモデルとして、分化細胞選択系の構築を試みた。miRNA データベース (miRBase) を参照し、神経幹細胞特異的に発現する miRNA-X の標的配列をベクターの L 遺伝子の 3'-UTR に挿入した。このベクターを用いて、分化誘導後の神経幹細胞選択を試みた結果、図3に示すように、分化誘導に伴ってベクター感染細胞 (GFP 陽性) が減少したことから、分化誘導に伴って発現してきた miRNA-X によってベクターが自動除去されることが示唆された。そして CPA 添加により P450 発現ベクター感染細胞を死滅させることによって、すべての細胞に神経幹細胞マーカーが発現している細胞群を得ることに成功した。



miRNA-X 標的配列を用いた神経幹細胞選択に 70 日ほどかかったことから、より短時間で細胞選択を行うために、他の神経幹細胞特異的 miRNA である miRNA-Y の標的配列を L 遺伝子の 5'-UTR に追加した。このベクターを用いて同様に神経幹細胞選択を行ったところ、60 日で神経幹細胞の選択を完了することに成功した (図3) ことから、miRNA の標的配列を追加することによって、複数の miRNA の機能を相乗的に利用して、ベクターの自動除去が可能であることを明らかにした。

(2) 分化段階特異的遺伝子発現系の構築

マウス ES 細胞から神経幹細胞を誘導する系において、神経幹細胞で強く発現している転写因子 Z をベクターから発現させて分化誘導を行なった。すると図4に示すように、転写因子 Z が分化誘導の始めから発現すると正しく分化が進行しないことを示唆する結果が得られた (「Z 発現有り」)。そこで、転写因子 Z の 5'-UTR に、ES 細胞特異的 miRNA である miR-302a の標的配列を追加することによって、誘導開始時には Z の発現を抑制し、分化が進行してから発現するように調節した。その結果、正しく分化が進行することが確認された (「miR-302a+Z 発現有り」) ことから、分化促進遺伝子を発現させる場合、分化段階の正しい時期に発現させることが重要であり、miRNA の発現時期を利用して分化促進遺伝子発現調節が可能であることを明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西村健
2. 発表標題 安全な再生医療を実現させる高純度分化細胞選択法
3. 学会等名 日中大学フェア&フォーラム in CHINA 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村健
2. 発表標題 再生医療や創薬研究を支援する高純度分化細胞選択法
3. 学会等名 BioJapan2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村健、石渡裕、久武幸司
2. 発表標題 PD imaging systemを用いて生きたまま幹細胞の多能性を定量的に解析する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------