

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591231

研究課題名（和文）新規のタンパク質発現量調節システムを応用した造血幹細胞の生体内運命決定の制御

研究課題名（英文）*In vivo* Regulation of the Cell Fates Utilizing a Novel Inducible System of Protein Expression

研究代表者

大津 真（OTSU MAKOTO）

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：30361330

研究成果の概要（和文）：新規タンパク質発現調節システムの Degradation-domain (DD)/Shield-1 系と、従来の転写調節ユニット Tetracycline-inducible システムとを兼ね備えたレンチウイルスベクターを構築した。Tet-ON、Tet-Off 両方との組み合わせを比較し、細胞株で検討した結果、従来のベクターより発現リークの抑制および発現調節特性の面で優れていることが示された。

研究成果の概要（英文）：As planned, I constructed the inducible retroviral system that could allow rapid and dose-related regulation of expression of the target protein. It, however, turned out that the degradation-domain (DD)/Shield-1 system did have an intrinsic defect in itself, which was compatible with significant expression leak. I thus decided to change gears to the combined use of DD/Shield-1 and tetracycline-inducible system, the latter of which was originally developed by Dr. Bujard. I utilized so-called “All-in-One LV”, the lentiviral system that was generated by my colleague to allow containing all the required elements for the system to work within a single cassette. Among the combination tested, I finally figured out that the system comprised of Tet-ON and DD/Shield-1 was the best performer so that it allowed the lowest leak and prompt expression upon dual stimulation. Although the overall progress remain behind the schedule due to the change of plans, I believe that the system is now ready to be tested in vivo, once the inducible target gene is introduced within this newly developed dual-regulation lentiviral vector.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞、レンチウイルスベクター、レンチウイルスベクター、発現調節、細胞老化

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は、血液悪性腫瘍、先天性免疫不全症等の難治性疾患に対して行われ、移植技術の進歩によりかつては致死であった疾患をも根治することが可能になっている。しかしながら、移植細胞の拒絶・生着不全、造血不全、移植片対宿主病 (GVHD) 等、克服すべき問題は多く、理想の造血幹細胞移植法の実現にむけて精力的な研究が展開されている。移植に伴う複製ストレスは、造血幹細胞の自己複製能、多分化能に損傷を与え、いわゆる老化と呼ばれる現象を引き起こすことが知られているが、その本態、分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。造血幹細胞の老化を制御する方法を確立することは、移植の現場でしばしば問題となる造血不全を克服し、質の高い造血幹細胞移植法の開発へとつながることが期待される。

特定の分子の造血幹細胞における老化現象への関与は、従来、移植造血幹細胞において遺伝子改変による発現のノックアウトや、遺伝子導入による発現のノックダウンまたは過剰発現を行うことで解析されてきた。しかしながら、移植後長期の造血再構築をもって造血幹細胞の能力を評価する実験系においては、恒常的な遺伝子発現変化は次のような問題点を含んでいる。すなわち、1) 当該遺伝子の発現変化が造血前駆細胞や成熟細胞に与える影響を排除できず、必ずしも造血幹細胞レベルでの解析とはなり得ないこと、2) 発現量の段階的な調節が技術的に困難であること、の2点である。

2. 研究の目的

本研究においては、新たに開発されたタンパク質発現調節システム (Cell 126, 995, 2006; Nat Med 14, 1123, 2008) を応用し、移植早期の造血幹細胞内で標的タンパク質発現量を段階的に調節する方法を確立する。特にウイルスベクターによる導入法を可能にし、universalに応用可能なシステムとして確立することを目標とする。

3. 研究の方法

このシステムの特徴である destabilization domain (DD) を融合した標的タンパク質 (cyclin dependent kinase inhib

itors: CDKIs, transcription factors: TFs, anti-oxidative stress factors) をレトロウイルスベクターによりマウス造血幹細胞に導入し、放射線照射したマウスに移植する。標的タンパク質は DD のため迅速に分解されるため低分子化合物 Shield-1 の投与無しでは発現されないが、in vivo に Shield-1 を投与することで急速に安定化され、dose-dependent に発現量の可逆的な増加を示す。移植早期以降は Shield-1 投与を行わない限り標的タンパク質は発現しないため、その後の再構築時期における細胞分化や成熟細胞の生存等には影響は無い。このシステムを用いることにより、特定の分子がある発現量において、移植早期の限られた期間に、造血幹細胞における複製ストレスに及ぼす影響を解析することがはじめて可能になる。

4. 研究成果

計画に従いタンパク質発現誘導を生体内で可能にするシステムの構築を進めた。研究初期において、本計画の中核を成す degradation-domain (DD)/Shield-1 システムにおける発現リークの問題に直面し、ベクター骨格に改変を加える等で克服を目指したが、結果的に当システムの系としての限界が明らかとなった。次年度から計画を変更し、Bujardらによる遺伝子発現誘導系、Tetracycline-inducible システムと DD-システムとの融合系の構築を検討した。backbone vector として当研究室の開発による、「ドキシサイクリン添加によって目的遺伝子の発現を ON にする全ての必要エレメントを含んだレンチウイルスベクター (All-in-One LV)」を使用した。このベクター中の (r) tTA エレメントを tTA と交換して All-in-One LV の Tet OFF version を構築し、それぞれ AIO-0n、AIO-0ff と命名した。この両ベクターに、DD-赤色蛍光タンパク融合遺伝子をクローニングし、産生ウイルスによって血球系がん細胞株へと導入を行った。得られた安定細胞株を用いてドキシサイクリンによる転写調節と Shield-1 による翻訳後発現調節の組み合わせを試み、FACS 解析により定量的に目的蛍光タンパクの発現量評価を行った。結果、発現リークの抑制および発現調節特性の面で、AIO-0n と DD-システム

の組み合わせが特に優れていることが明らかとなった。DD-システム系の欠陥を補完するために計画を余儀なく変更するに至り、当初の予定に遅れることとなったが、結果的には目的の達成が期待できる新たなタンパク発現誘導ベクター系の構築に成功した。今後、他の研究資金により研究を継続し、本研究において得られた成果を生かすことで、当初の計画を完遂する予定である。

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 14 件)

- ① Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 査読有, 478: 64-69, 2011
- ② Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Eto Y, Ishige N, Kitagawa T, Otsu M, Nakauchi H, Ida H, Ohashi T. Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med.*, 査読有, 13: 262-268, 2011
- ③ Maeyama Y, Otsu M, Kubo S, Yamano T, Iimura Y, Onodera M, Kondo S, Sakiyama Y, Ariga T. Intracellular estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 exerts in vivo tumor-promoting effects via its coiled-coil region. *Int J Oncol.*, 査読有, 39:41-49, 2011
- ④ Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the alphaIIb beta3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood.*, 査読有, 117:5479-5484, 2011
- ⑤ Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T. Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. *Cytokine.*, 査読有, 55:402-408, 2011
- ⑥ Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells, *J Exp Med.* 査読有, 207:2817-30,2010
- ⑦ Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H, Reprogramming adult hematopoietic cells, *Curr Opin Hematol.* 査読有, 17:271-5, 2010
- ⑧ Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One.*, 査読有, 5:e14099, 2010
- ⑨ Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M, Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms, *Clin Cancer Res*, 査読有, 16:3825-31, 2010
- ⑩ Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms, *Cell Cycle*, 査読有, 9:1051-6, 2010
- ⑪ Sogo T, Kawahara M, Ueda H, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Nagamune T. T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine.*, 査読有, 46:127-136, 2009
- ⑫ Sanada M, Suzuki T, Shih LY, Otsu M, Kato M, Yamazaki S, Tamura A, Honda H, Sakata-Yanagimoto M, Kumano K, Oda H, Yamagata T, Takita J, Gotoh N, Nakazaki K, Kawamata N, Onodera M, Nobuyoshi M, Hayashi Y, Harada H, Kurokawa M, Chiba S, Mori H, Ozawa K, Omine M, Hirai H, Nakauchi H, Koeffler HP, Ogawa S, Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms, *Nature*, 査読有, 460:904-8, 2009
- ⑬ Okabe M, Otsu M, Ahn DH, Kobayashi T, Wakiyama Y, Morita Y, Onodera M, Eto K, Ema H, Nakauchi H, Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency, *Blood*, 査読有, 114:1764-7, 2009
- ⑭ Ogaeri T, Eto K, Otsu M, Ema H, Nakauchi H, The actin polymerization regulator WAVE2 is required for early bone marrow repopulation by hematopoietic stem cells, *Stem Cells*, 査読有, 27:1120-1129, 2009

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Makoto Otsu. (invited) Myeloablation を必要としない造血幹細胞移植法の確立に向けて
Towards the establishment of hematopoietic stem cell transplantation without the need for myeloablation. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会・日本再生医療学会合同シンポジウム [造血幹細胞移植の未来] Feb 24, 2012, 大阪
- ② Makoto Otsu. (invited) より良い造血細胞移植を目指して：造血幹細胞における生着および骨髄再構築能の制御. 第 10 回神奈川小児血液・感染症フォーラム Sept 2, 2011, 横浜
- ③ Makoto Otsu (invited) Stem Cell Gene Therapy for Primary Immunodeficiency Diseases. - Where are we now and where should we go? - July 17, 2011, 第 17 回日本遺伝子治療学会シンポジウム, 福岡

〔図書〕（計 1 件）

先天性免疫不全症の遺伝子細胞治療

Gene and Cell Therapy for Primary Immunodeficiency Diseases

日本臨床免疫学会会誌 = Japanese journal of clinical immunology 33(6), 312-316, 2010-12-31

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：誘導型多能性幹細胞の製造方法
発明者：中内啓光, 大津真, 高山直也, 安東赫
権利者：東京大学
種類：PCT
番号：JP2011/063650
出願年月日：2011 年 6 月 15 日
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://stemcell-u-tokyo.org/scb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 真 (OTSU MAKOTO)
東京大学医科学研究所・特任准教授
研究者番号：30361330

(2) 研究分担者

竹内 康雄 (TAKAUCHI YASUO)
北里大学・医学部・講師