

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：83904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310146

研究課題名(和文) タンパク質導入系 LENA による安全な分化・脱分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Re-direction of the differentiation status by a novel protein transduction system LENA

研究代表者

駒野 淳 (KOMANO, Atsushi)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：60356251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は再生医療を実現するために欠かせないが、臨床応用には安全性で改善が求められる。本研究は安全なiPS細胞を作成するための技術構築を目的とする。安全性が懸念される過程の一つに、体細胞からiPS細胞を誘導する際のゲノム損傷がある。申請者らは独自に開発したタンパク質導入系LENAを応用してこの解決を試みる。我々はiPS細胞誘導の基本4因子の一つOct3/4が安定にLENAに取り込まれ、ヒト標的細胞に送達できる事を示した。しかし、体細胞から脱分化した細胞を導出するには改良を要することが判明した。安定した結果を得るため、実験系を鋭意改良しながらゴールに向かって研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：For the establishment of safe re-direction protocol, we evaluated the protein delivery system LENA. We have shown that a transcription factor, Oct3/4 is successfully delivered to human cells via LENA. However, we found that the system have a room to improve because the biological function of Oct3/4 is detected weakly. We designed the second generation LENA to achieve the goal of this study.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：移植&#8226;再生医療 バイオテクノロジー レンチウイルス様ナノ粒子 脱分化法 ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

現在再生医療で注目を浴びている iPS 細胞は日本が世界に貢献した重要な研究成果である。iPS 細胞のもつ再生医療へのインパクトは計り知れない。しかし、臨床応用に際しては非常に大きなハードルがある。それは安全性である。安全性への懸念に関しては大きく分けて2つの問題点がある。細胞の悪性化と iPS 細胞への分化誘導に使用されるベクターの生物学的安全性に関する懸念である。前者においてはウイルスベクターや導入された核酸による染色体損傷や sporadic に遺伝子染色体異常・点変異による細胞の遺伝的变化が、後者においては導出された細胞に残存するウイルスベクター等がこれにあたる。iPS 細胞に由来する組織等は長期間生体内に存在する事を念頭に再生医療への応用を考えねばならない。従って、低い頻度でも細胞の悪性化リスクがあればヒト体内で副作用として顕在化する可能性は高い。リプログラミング因子を細胞に導入できるタンパク質デリバリー法があれば安全性に関する懸念は解消できる。LENA 系（後述）はこの用途に非常に適している。

申請者らはエイズウイルスの粒子を形作るウイルス構造遺伝子 gag-pol の研究を通じて、レンチウイルスベクターの産生能を 10 倍に高める技術開発に成功した(Urano E, et al. J Gen Virol 2008; Aoki T, et al. Gene Ther 2010 ; 特願 2009-263587)。この研究を基にして、我々は細胞内へのタンパク質デリバリーツールの開発に成功した。外来タンパク質をレンチウイルス様ナノ粒子 (Lentivirus-like nanoparticle, LENA) に封じ込め、VSV-G で被覆した LENA で細胞にタンパク質を導入する

システムである(Aoki T, et al. Gene Ther, 2011)。LENA 一粒子により、一度に数千分子の外來タンパク質を細胞質に導入できる。さらに、LENA 技術を応用した活性型 Caspase3 導入によるがん治療の可能性も実証した(Miyauchi K, et al. Leukemia, revision submitted for publication)。発表以来、LENA 技術は世界各国から分与依頼が来ている。我々は LENA 技術が再生医療領域で最も潜在力を発揮できると考え本申請を着想した。

2. 研究の目的

LENA 技術をコアとして、既法で得られるものより格段に安全性の高い iPS 細胞を樹立する方法を確立し、再生医療を実用化するために極めて有用な基盤技術を提供する。

3. 研究の方法

(1) Oct3/4 導入用 LENA の調整とタンパク質導入能の検証

ヒト繊維芽細胞を CD45⁺細胞へとリプログラミングすることができる Oct3/4 について検討する。Oct3/4 遺伝子を PCR で増幅し、LENA 発現ベクターにクローニングする。このプラスミドベクターと VSV-G 発現ベクターを 293T 細胞に co-transfection して培養上清から Oct3/4-LENA を調整する。Transfection した 293T 細胞および LENA よりタンパク質を回収し Oct3/4 に対する抗体にて Western blot を行い、LENA 粒子中で Oct3/4 が HIV-1 のプロテアーゼで分解されていないかを確認する。分解される場合には感受性部位に転写因子としての機能を損なわずプロテアーゼにより分解されないアミノ酸点変異を導入する。Oct3/4 の機

能が維持されていることを Oct3/4 結合部位をプロモーターに持つシフェラーゼ発現プラスミドを導入した 293T 細胞に完成した Oct3/4-LENA を曝露しレポーターアッセイを行い確認する。I/II 型 LENA でより機能が良好なベクターを選択する。

(2) Oct3/4-LENA によるヒト繊維芽細胞のダイレクトリプログラミングの検証

ヒト繊維芽細胞に Oct3/4-LENA を曝露させ、IGFII、bFGF、SCF、Flt3LG を含む培地で継代培養を行う。一定期間の培養の後、FACS および免疫染色により CD45⁺細胞が誘導できるかを確認する。Oct3/4-LENA をヒト繊維芽細胞に曝露させる回数、曝露させる量を変えて最適な CD45⁺細胞誘導条件を決定する。誘導した CD45⁺細胞が機能的であるかどうかについて、さらに SCF、G-CSF、Flt3LG、IL-3、IL-6、BMP-4、erythropoietin を含んだ培地で培養を続け、それぞれ myelocyte (CD13⁺/CD33⁺細胞)、erythrocyte (CD71⁺細胞)、megakaryocyte (CD41⁺細胞)、granulocyte (CD15⁺細胞)、monocyte (CD14⁺細胞) に分化するか確認する。コントロールとして、Oct3/4 導入レンチウイルスベクターを用い同様に CD45⁺細胞の誘導を行う。

(3) ヒト繊維芽細胞ダイレクトリプログラミングで得られた CD45⁺細胞悪性化リスクの評価

レンチウイルスベクターを用いたダイレクトリプログラミングでは、細胞の染色体に導入遺伝子が挿入されてしまうため悪性化の問題を避けて通ることができない。それに対し、LENA 法は核酸を用いずタンパク質を直接細胞に導入するため、染色体を傷つけることがないことが予想される。安全性の確認のため、in

vivo および in vitro の両面から評価を行う。

in vivo 試験: レンチウイルスベクター法および LENA 法により誘導した CD45⁺細胞を通常の細胞培養により継代し、polyclonality のバランス崩壊の有無を遺伝的マーカー陽性細胞に対するドミナンスを指標に解析する。また、SCID マウスの皮下に移植して継代し、同様の評価を行う。マウスにおいては細胞が腫瘍化するかも併せて評価する。

in vitro 試験: 元となった体細胞、レンチウイルスベクター法および LENA 法で誘導した CD45⁺細胞の全ゲノム配列を次世代核酸配列決定装置で決定することにより、ゲノムの安全性を相互に比較して、LENA によりがん化に関わるような変異が誘導されないか確認する。本法は in vivo 試験において選択された細胞に対しても施行する。

(4) 残り 3 つの山中因子への適応拡大

Oct3/4-LENA によるダイレクトリプログラミングが確認された後、他の因子導入用 LENA の作製を行う。Oct3/4 導入用 LENA を作製した時と同様の方法で Sox2-LENA、Klf4-LENA、c-Myc-LENA を作製する。Transfection した 293T 細胞および LENA よりタンパク質を回収し、それぞれのタンパク質の物理的安定性を検証する。Oct3/4-LENA に準じて必要に応じて安定性の向上を行う。また、完成した LENA を細胞へ曝露することにより、導入されるタンパク質の転写因子としての機能を確認する。

4 種類の LENA をヒト体細胞へ曝露させ、ヒト iPS 細胞が誘導できるか検討を行う。作製した 4 種類の LENA をヒト繊維芽細胞に曝露し、ヒト ES 細胞培養用培地にて培養を行う。一定期間培養を行い、ヒト ES 様細胞が誘導される

か検証する。曝露する回数や LENA の量を変えるなど、様々な条件で検討を行う。ヒト ES 様細胞が樹立できた場合、コロニーを単離し以下の性状試験を行う。アルカリフォスファターゼ (AP) 発現の有無を確認し、陽性のクローンについて未分化マーカー oct3/4, sox2, nanog, gdf3, rex1, fgf4, esg1, dppa2, dppa4, hTERT, dnmt3B, gabrb3, tdgf1, gal, leftb, ifitm1, nodal, utf1, ebf, grb7, podxl, cd9, brix, klf4, c-myc, nat1 を RT-PCR にて、SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog, Oct3/4, E-cadherin を免疫染色にてそれぞれ確認する。多分化能の確認についてはテラトーマ形成能のチェックを行う。具体的には SCID マウスの皮下に $10^6 \sim 10^7$ の iPS 細胞を移植し、約 2 ヶ月後形成された腫瘍を採取しパラホルムアルデヒドにて固定し、組織切片に HE 染色を施し、検鏡して三胚葉に分化しているかを組織学的な判定を行う。誘導された iPS 細胞を適当な条件で培養し、*in vitro* でも三胚葉に分化するか確認を行う。誘導したヒト ES 様細胞について、ヒト ES 細胞あるいはすでに樹立されているヒト iPS 細胞と global な遺伝子発現パターンを比較することにより脱分化の質的相違の有無について評価する。脱分化の指標となる上記遺伝子の promoter 領域の脱メチル化状態、誘導した ES 様細胞の核型、脱分化能の維持期間も併せて評価する。コントロールとして従来のレトロウイルスベクターを用いた方法を並行して行う。

(5) ヒト繊維芽細胞の脱分化で得られた細胞の悪性化リスクの評価

マウス iPS 細胞の場合は iPS 細胞を導入し作製したキメラマウスにおける発がんリスクを

評価することにより悪性化リスクを判定できるが、ヒト iPS 細胞は同様の手法による評価は困難である。そこで悪性化の評価は(3)に準じて *in vivo* 及び *in vitro* 評価を行う。

(6) 他の分化・脱分化誘導因子への適応拡大

iPS 細胞の樹立には 4 遺伝子、あるいは c-Myc を除いた 3 遺伝子を用いるのが基本となっているが、それらの遺伝子に他の遺伝子を加えることにより良質の iPS 細胞が樹立できると報告されている。代表的な例として、初期化の不完全な細胞の増殖を抑制する働きのある Glis1 (Maekawa M, et al. Nature 2011) や、今現在広く用いられているヒト iPS 細胞よりも初期状態の誘導が可能な Rarg、Lrh-1 (Wang W, et al. PNAS 2011) である。これらのタンパク質導入用 LENA を作製し、基本 3/4 因子と同時に体細胞に導入することで、安全で良質の iPS 細胞が効率よく誘導できるかを検証する。一方、樹立された iPS 細胞から脱分化を誘導するためにも転写因子は利用できる。これも LENA を利用することで安全に分化が達成できると期待される。この可能性も併せて検討する。

4. 研究成果

Oct3/4-LENA 発現ベクター I 型の構築に成功した。このプラスミドベクターと VSV-G 発現ベクターを 293T 細胞に co-transfection して培養上清から Oct3/4-LENA を調整し、LENA 粒子中で Oct3/4 が HIV-1 のプロテアーゼで分解されていないことを確認した。従って、プロテアーゼ耐性変異等への改変は実施しなかった。Oct3/4 の機能が維持されていることを Oct3/4 結合部位をプロモーターに持つルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した 293T 細胞

や HeLa 細胞に対して完成した Oct3/4-LENA を曝露し、レポーターアッセイを行い確認した。Oct3/4-LENA の生物活性を再現性よく定量化するためのレポーター細胞系を構築するため、HeLa 細胞にレポーター遺伝子をトランスフェクションして安定に遺伝子を維持する細胞を選択し利用した。また、レンチウイルスベクターによりレポーターカセットを持つ細胞を選択し利用した。これを用いて活性を指標とした Oct3/4-LENA 産生プロトコルの指摘化および生物活性を最大限に引き出す暴露条件を繰り返し検討した。しかし、転写因子活性は転写因子を発現するベクターと比較して極めて低いため、再現性を検討するという点で十分に高い信頼性を得る結果は得られなかった。これを解決するために LENA を改良し、より高い転写因子機能を得るための工夫を実施中である。一方、ヒト繊維芽細胞に Oct3/4-LENA を曝露させ CD45⁺細胞が誘導できるかを評価したが、陽性細胞の検出にはいたらなかった。これは前出のレポーター活性評価結果と相関する結果と考えられる。従って、ゲノムの完全性や分化に関する試験は実施しなかった。

Oct3/4-LENA による機能的転写因子導入が一定の成果を得た事を受けて、他の因子導入用 LENA の作製を行った。Oct3/4 導入用 LENA を作製した時と同様の方法で Sox2-LENA、Klf4-LENA、c-Myc-LENA を作製した。Transfection した 293T 細胞および LENA よりタンパク質を回収し、それぞれのタンパク質の物理的安定性を証明した。タンパク質はプロテアーゼに対して感受性は低く、更なる遺伝子工学的改変は必要なかった。Oct3/4-LENA と共同して機能することが知られている

Sox2-LENA を Oct3/4-LENA と同時に使用する事で、転写活性の相乗作用が検出できるかについてレポーター細胞にて繰り返し試みたが、微弱な活性が検出されるにとどまった。これも、前出と同様に細胞系におけるレポーター遺伝子による転写因子活性検出感度が十分に高くないことに原因があると考えられる。そこで、Sox2-LENA も Oct3/4 と併せて遺伝子工学的機能増強改変を実施する事とし、鋭意実験を進めている。2 因子の実験結果を受けて、4 種類の LENA によるヒト iPS 細胞誘導実験および誘導された細胞の悪性化に関するリスク評価は実施しなかった。

5. 主な論文発表等

特許取得の関係で研究結果は公表せず。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒野 淳 (KOMANO, Jun)

名古屋医療センター・統括診療部 臨床検査科・科長

研究者番号：60356251

(2) 研究分担者

武田 哲 (TAKEDA, Satoshi)

国立感染症研究所エイズ研究センター・研究員

研究者番号：50396959