

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700490

研究課題名(和文) 持続発現型RNAベクターによる再生医療のための細胞改変技術の開発

研究課題名(英文) Development of methods for cell reprogramming with a persistent RNA vector for regenerative medicine

研究代表者

佐野 将之 (SANO, Masayuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：80415687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：センダイウイルス変異株Cl.151を骨格とした持続発現型RNAベクターによる細胞リプログラミングにおいて、外来遺伝子フリーの細胞を作製するためには、リプログラミング後にベクターゲノムを細胞から除去することが重要である。本研究では、ベクター搭載遺伝子の発現を低分子化合物の添加や組織特異的に制御できる人工リボスイッチやマイクロRNAを利用し、幅広い細胞リプログラミングに利用できる除去方法の構築を試みた。

研究成果の概要(英文)：To generate transgene-free cells by cell reprogramming using a persistent RNA vector based on a Sendai virus mutant Cl.151, it is important to eliminate the genome of Sendai virus vector from infected cells. For a wide range of application of cell reprogramming, we examined methods to eliminate the vector genome using an artificial riboswitch or microRNAs, which could inhibit the gene expression by addition of small molecules or in a tissue-specific manner.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：遺伝子デリバリー 細胞リプログラミング 機能性RNA

1. 研究開始当初の背景

2006年、京都大学の山中伸弥教授らにより、Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc の4種類の転写因子をマウス体細胞に導入することで体細胞が初期化され、ES細胞に極めてよく似た細胞ができることが報告された (Takahashi and Yamanaka, Cell, 126, 663-676, 2006)。この細胞は人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem (iPS) cell) と名付けられ、翌年の2007年にはヒト体細胞からも iPS細胞ができることが確かめられた (Takahashi et al., Cell, 131, 861-872, 2007)。iPS細胞の発見は、複数の転写因子等により細胞の形質を自由に变化させることができるという新たなパラダイムを生み出し、iPS細胞のような多能性を持つ細胞だけでなく、組織特異的な転写因子等により神経細胞など分化の進んだ細胞を作る direct reprogramming という手法も新たに開発された (Vierbuchen et al., Nature, 463, 1035-1041, 2010)。遺伝子導入による細胞リプログラミング技術は、目的の細胞を *in vitro* で比較的容易に調製できることから、将来の再生医療を支える極めて重要な技術と考えられるようになった。

iPS細胞が報告された当初、外来遺伝子を体細胞に導入する方法としてレトロウイルスベクターが使用された。レトロウイルスやレンチウイルスを骨格としたベクターは外来遺伝子を宿主のゲノムに組み込むため、安定な遺伝子発現が可能であり、一定期間の遺伝子発現を必要とする細胞リプログラミングにおいては非常に有用なベクターである。しかしながら、レトロウイルスベクターによる遺伝子の組み込みは、細胞をがん化させる恐れがあり、iPS細胞を再生医療に利用するためには、遺伝子を宿主ゲノムに組み込まない、より安全な遺伝子導入方法の開発が緊急の課題となった。

宿主ゲノムに遺伝子を組み込まない発現系として、プラスミドや合成 mRNA などを使った非ウイルス発現系またはアデノウイルスやセンダイウイルスなどのウイルスベクターを使った系が試され、これらによりゲノムに組み込まない iPS細胞を作製できることが報告された。我々の研究室では、以前から CI.151 というセンダイウイルス変異株を骨格とした遺伝子発現ベクターを開発しており、このベクターを利用し体細胞から iPS細胞を樹立することに成功した (Nishimura et al., J. Biol. Chem., 286, 4760-4771, 2011)。

2. 研究の目的

センダイウイルスは1本鎖のRNAをゲノムに持つRNAウイルスであり、ヒトに対し病原性をもたない。我々が開発しているセンダイウイルスベクターは、M, F, HN というウイルスの伝播に必要な構造タンパク質を完全に欠損させているため、二次感染粒子を産生しないが、NP, P, L というウイルスゲノムの複

製に必要な遺伝子はベクター上に残っており、ベクターゲノムが細胞に導入されると、これらの因子によりゲノム複製が開始される。ウイルスゲノムに搭載される遺伝子は、ウイルスRNAポリメラーゼが認識する転写開始点および転写終結点の間に挿入されており、各遺伝子は mRNA としてモノシストロニックに転写される。

センダイウイルス変異株 CI.151 は細胞障害性が低く、感染した宿主細胞を死滅させることなく長期間、ウイルスゲノムの複製を行うことができる。我々の研究室では、この変異株を骨格としたベクターを開発し、SeVdp (defective and persistent Sendai virus) ベクターと名付けた。このベクターは、複数の外来遺伝子を同一ベクター上に直列に搭載することができ、導入した細胞内でそれらの遺伝子を長期間、安定して発現させることができる。これらの特徴は SeVdp ベクターを細胞リプログラミングに使うための大きな利点であるが、さらに重要な特徴として、宿主ゲノムへの遺伝子挿入がない点が挙げられる。センダイウイルスはその生活環において、DNAに変換する時期がなく、また宿主の細胞質に局在し、核内に入ることがないため、外来遺伝子を宿主ゲノムに組み込む危険性がない。このため、細胞リプログラミングにより体細胞を初期化し、その後ウイルスゲノムを細胞から除去することで完全な外来遺伝子フリーの iPS細胞を作製することができる。我々は、ウイルスゲノムの複製に必須のポリメラーゼ遺伝子を抑制することで、ウイルスゲノムを導入細胞から除去できるのではないかと考え、ポリメラーゼの構成因子である L 遺伝子の発現を siRNA で抑制した。その結果、Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 遺伝子を搭載した SeVdp ベクターで体細胞を初期化し、適切な時期に siRNA 処理を行うことで、ウイルスゲノムが除去された、外来遺伝子フリーの iPS細胞が樹立できることを明らかにした。

このコンセプトは iPS細胞以外にも SeVdp ベクターを用いた幅広い細胞リプログラミングにおいて利用できるものと考えられるが、神経細胞のようなトランスフェクション効率が極めて低い細胞を作製する場合は、siRNA の利用は難しいと考えられる。そこで、本研究では、siRNA を使わずに、ウイルスポリメラーゼ遺伝子の発現を抑制し、ウイルスゲノムを細胞から除去できる新しい方法の構築を試みた。

3. 研究の方法

細胞リプログラミングにおいて、適切な時期に SeVdp ベクターゲノムを細胞から除去するためには、ポリメラーゼ遺伝子の発現を任意に制御できる ON/OFF スイッチのような系を利用することが望ましい。本研究では、ON/OFF のシステムとして、人工リボスイッチおよびマイクロRNA の利用を検討した。

(1) 人工リボスイッチの利用

人工リボスイッチは、哺乳動物細胞で機能することが報告されているテオフィリン応答性リボザイムを利用した。この人工リボスイッチはHartigらにより開発されたもので、ハンマーヘッド型リボザイムのステム領域を低分子化合物であるテオフィリンに結合するRNA配列、いわゆるアプタマーに置き換えている(Ausländer et al., Mol. Biosyst., 6, 807-814, 2010)。野生型のハンマーヘッド型リボザイムはmRNAに挿入すると、自己切断を起こしてしまうが、この人工リボスイッチはテオフィリンと結合した場合のみ、リボザイムが切断活性を示すように設計されている。このため、この人工リボスイッチを目的遺伝子の非翻訳領域(UTR)に組込んでおくことで、テオフィリンを添加した時のみ、遺伝子発現をOFFにすることができる。

この人工リボスイッチの効果を調べるために、赤色蛍光タンパク(Keima-Red)遺伝子の5'UTRに人工リボスイッチを組み込んだSeVdpベクターを作製した。ベクターを導入した細胞をテオフィリンにより処理し、Keima-Redの発現を指標に人工リボスイッチの効果を調べた。

(2) マイクロRNAの利用

マイクロRNAは内在性の低分子RNAであり、mRNAの3'UTRに結合して遺伝子発現を抑制することが知られている。マイクロRNAには組織特異的な発現パターンを示すものがあり、いくつかのマイクロRNAは発生・分化において、非常に重要な役割を担うことが知られている。本研究では、細胞リプログラミングで作製する細胞で特異的に発現するマイクロRNAを利用し、遺伝子発現制御を行う。例えば、線維芽細胞から神経細胞を作製する場合、神経細胞で特異的に発現するマイクロRNAの標的配列をベクター搭載遺伝子の3'UTRに組込むことで、リプログラミングが起こった細胞でのみ、その遺伝子の発現が抑制されることになる。

本研究では、マイクロRNAによるベクター搭載遺伝子の発現抑制効果を調べるために、多くの細胞で発現が高いマイクロRNAの標的配列をEGFP遺伝子の3'UTRに組込んだSeVdpベクターを作製した。このベクターを細胞に導入し、EGFPの発現強度を指標に、マイクロRNAの効果を調べた。また、神経細胞特異的マイクロRNAの標的配列をL遺伝子の3'UTRに組込んだベクターを作製し、direct reprogrammingによる神経細胞作製において、ベクター除去効果を検証した。

(3) 神経細胞の誘導

SeVdpベクターの除去効果を調べる系として、direct reprogrammingによる神経細胞作製について検討を行った。Wernigらの報告(Pang et al., Nature, 476, 220-223, 2011)を参考にし、神経細胞を誘導する因子を

SeVdpベクターに組み込み、マウス胎児線維芽細胞から神経細胞の誘導を行った。

4. 研究成果

(1) 人工リボスイッチによる遺伝子発現制御

EGFPをレポーターとしたプラスミドを使った実験から、5'UTRに1個よりも複数の人工リボスイッチを組込むことで遺伝子抑制効果が上昇することが分かったため、ベクターに搭載したKeima-Red遺伝子の5'UTRに複数の人工リボスイッチを組込んだSeVdpベクターを構築した。また、コントロールとしてリボザイムの活性部位に変異を入れた切断活性を持たない人工リボスイッチを組込んだベクターも用意した。これらのベクターをHeLa細胞に導入し、濃度3mMのテオフィリンで処理した後、Keima-Redの発現をフローサイトメトリーで解析した。その結果、テオフィリン添加時のみコントロールに比べ、約70%の遺伝子抑制効果が認められた。このことから、RNAをゲノムとしてもつSeVdpベクターにおいて、人工リボスイッチによるON/OFFの系が利用できることが確かめられた。次に、この人工リボスイッチをL遺伝子の5'UTRに組込むことを試みたが、ベクターの作製が非常に困難であった。おそらく、L遺伝子上流の繰り返し配列が大腸菌を不安定化するためだと考えられ、現在、クローニング方法を検討するとともに、人工リボスイッチの組込み位置を変えるなどして、ベクターの構築を進めている。

(2) マイクロRNAによる遺伝子発現制御

マイクロRNAを利用した遺伝子抑制効果を調べるために、多くの細胞で発現が高いmiR-21の標的配列をEGFPの3'UTRに組込んだSeVdpベクターを作製した。このベクターをHeLa細胞およびiPS細胞に導入したところ、顕著なEGFP抑制効果が見られた。HeLa細胞を使い、フローサイトメトリーで解析したところ、miR-21の標的配列がある場合、EGFPの発現が90%以上抑制されていることが確かめられた。このことから、発現量の多いマイクロRNAを利用することで、高い遺伝子抑制効果が得られることが分かった。次に、direct reprogrammingによる神経細胞作製においてベクター除去効果を検証した。L遺伝子の3'UTRに神経特異的マイクロRNAであるmiR-124の配列を組込んだベクターを作製し、マウス胎児線維芽細胞から神経細胞の誘導を行った。その結果、神経細胞様の細胞が誘導されたが、免疫染色を行ったところ、センダイウイルスのNP抗原が陽性であった。このことから、誘導された細胞において、miR-124による遺伝子抑制効果がまだ十分ではない可能性が考えられるため、現在、さらなる解析を行うとともに、miR-124以外の神経特異的マイクロRNAの利用についても検証を進めている。

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)

[学会発表](計7件)

佐野 将之、大高 真奈美、西村 健、中西 真人、外来遺伝子フリーの iPS 細胞作製のための RNA ベクターの開発、第 13 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、平成 26 年 2 月 18 日、茨城県つくば市

佐野 将之、大高 真奈美、西村 健、高安 聡子、中西 真人、機能性 RNA を利用した持続発現型 RNA ベクターの遺伝子発現調節系の検討、第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 5 日、兵庫県神戸市

佐野 将之、大高 真奈美、西村 健、高安 聡子、中西 真人、機能性 RNA による持続発現型センダイウイルスベクター遺伝子発現調節効果の検討、第 23 回アンチセンスシンポジウム、平成 25 年 11 月 29 日、徳島県徳島市

佐野 将之、大高 真奈美、西村 健、高安 聡子、中西 真人、Development of methods to generate transgene-free iPS cells with SeVdp vectors、日本組織培養学会 第 86 回大会、平成 25 年 5 月 30 日、茨城県つくば市

佐野 将之、大高 真奈美、西村 健、高安 聡子、中西 真人、ヒト iPS 細胞樹立のための持続発現型 RNA ベクターの開発、第 12 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、平成 25 年 2 月 5 日、茨城県つくば市

佐野 将之、大高 真奈美、西村 健、高安 聡子、中西 真人、細胞リプログラミングのための持続発現型 RNA ベクター制御技術の開発、第 35 回日本分子生物学会年会、平成 24 年 12 月 14 日、福岡県福岡市

佐野 将之、大高 真奈美、西村 健、高安 聡子、中西 真人、機能性 RNA を用いた RNA ベクターの制御と細胞改変技術への応用、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012、平成 24 年 9 月 24 日、宮城県仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 将之 (SANO, Masayuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・主任研究員

研究者番号：80415687