

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860797

研究課題名(和文) DNAアプタマーによる新規ヒト造血幹・前駆細胞の増幅法の開発

研究課題名(英文) Transient Tcf3 Gene Repression by TALE-Transcription Factor Targeting

研究代表者

増田 潤子 (Masuda, Junko)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：20424674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子E2A 発現を阻害した状態で、造血幹細胞をB細胞分化条件で培養すると、*in vitro*で造血幹細胞様である多能性造血幹/前駆細胞(induced hematopoietic stem/progenitor cell: iHSP細胞)を *in vitro*で誘導することができる。本研究では、従来よりも安全な方法で、且つ効率的に、造血幹細胞をiHSP細胞へ誘導する方法を確立するために、TALエフェクター(transcription activator-like effector: TALE)技術を用いた人工転写因子を発現するプラスミドベクターの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of hematopoietic stem and progenitor cells (HSCs) is now a widely performed therapy for many hematopoietic diseases. However, these cells are present in low number and are subject to replicative senescence after extraction; thus, the acquisition of sufficient numbers of cells for transplantation requires donors able to provide repetitive blood samples and/or methods of expanding cell numbers without disturbing cell multipotentiality. Previous studies have shown that HSCs maintain their multipotentiality and self-renewal activity if TCF3 transcription function is blocked under B cell differentiating conditions. Taking advantage of this finding to devise a new approach to HSC expansion *in vitro*, we constructed an episomal expression vector that specifically targets and transiently represses the TCF3 gene.

研究分野：血液内科学

キーワード：TCF3 (E2A) 人工転写因子 TALE

1. 研究開始当初の背景

今までの癌治療である「外科療法（手術）」、「化学療法（抗ガン剤）」、「放射線療法」の三大療法は、副作用による患者への肉体的・精神的負担が大きいことが難点である。一方で、近年開発された免疫細胞療法は、患者自身の血液を採取して *in vitro* にて血液細胞を増殖し、患者自身に戻す方法である。この方法は副作用の心配なく患者の免疫機能を高めることで、癌の進行を抑制することができる。すでに免疫細胞療法は治療に応用され、高い効果を得ている。しかし現状の方法では体外で増幅させた血液細胞は保存ができないので、治療中は患者から頻繁に(2週間に1度程度を最低6回、を数サイクル)血液採取を行わなければならない。これは、非常に手間が掛かり、コストも割高という点でも患者への負担が少ないとは言えず、現状方法の改善が必要とされている(図1)。

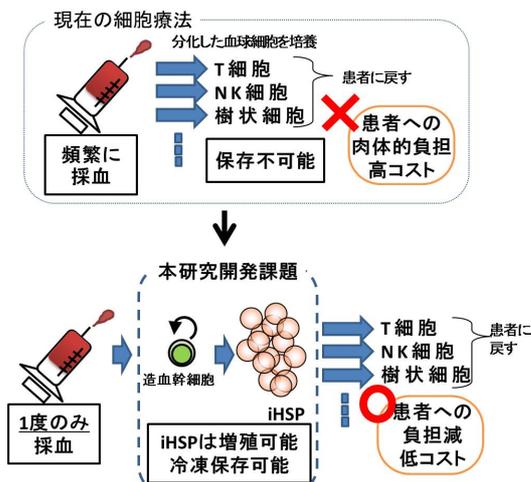


図1 細胞療法に応用できる安全性の高い多能性造血幹/前駆細胞 (iHSP細胞) 誘導方法の開発

近年開発された癌治療である免疫細胞療法は、患者自身の血液を採取して *in vitro* にて血液細胞を増殖し、患者自身に戻す方法である。この方法は副作用の心配なく患者の免疫機能を高めることで、がんの進行を抑制することができる。しかし現状の方法では体外で増幅させた血液細胞は保存ができないので、治療中は患者から頻繁に(2週間に1度程度を最低6回で数サイクル)血液採取を行わなければならない。これは、非常に手間が掛かり、コストも割高という点でも患者への負担が大きい。このため、現状方法の改善が必要とされ、*in vitro* で効率よく血球細胞を増やす方法の開発が期待されている(図1)。

体細胞に4つの転写因子の発現をさせるだけで誘導多能性幹細胞(iPS細胞)が作り出せ

ることが明らかになったが、造血幹細胞においても、転写因子 TCF3 (E2A) 発現を阻害すれば *in vitro* で造血幹細胞様 iHSP 細胞を誘導することが明らかになった(Ikawa et al., Stem Cell Reports. 2015 5:1-12.)。iHSP 細胞は、1)すべての白血球にいつでも分化できる能力をもつ状態で、2) 無限に増殖させることができ、3) 凍結保存が可能である(図1, 2)。造血幹細胞を iHSP 細胞へ誘導できれば、1度の採血で各種免疫細胞療法を何度でも受けることができるので、患者の負担を大幅に軽減し、且つ高い治療効果を得られる。また、iHSP 細胞は骨髄移植も可能であり、白血病の治療にも用いることができる。ところが、この方法は现阶段でレトロウイルスを用いた方法のみ成功しており、安全性の面から現状の方法を治療に応用することは難しい。そのため、がん治療へ応用するためには新たに安全性に配慮した iHSP 細胞を樹立する方法の確立が必要である。

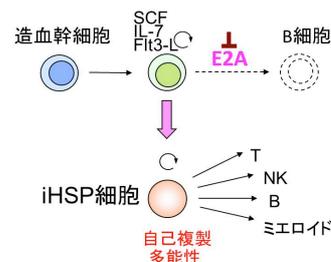


図2 TCF3(E2A)機能阻害により分化停止/自己増幅の誘導(iHSP細胞)ができる

2. 研究の目的

本研究では、人工塩基を含むアプタマーによって造血幹細胞に発現する E2A 機能制御を行うことで細胞療法に応用できる安全性の高い iHSP 細胞誘導方法の開発を行う。期間内に(1)E2A に対して結合能力の極めて高く特異性の高いアプタマーを作製し、E2A と E-box との結合をアプタマーが阻害することを確認し、(2)同時にヒト、およびマウス造血幹細胞においてアプタマーを核内に導入するための最適条件をそれぞれ検討する。次に(3)マウス造血幹細胞株にアプタマーを導入し、B細胞分化条件で培養する。この条件下での未分化細胞を、アプタマーによる E2A の機能阻害として評価する。最終的に(4)ヒト造血幹細胞においても同様の効果を得られるための条件検討を行う。

3. 研究の方法

1. E2A発現を抑制するTALE-人工転写抑制因子融合タンパク質発現ベクターの構築
TALE-転写抑制因子 (KRAB) 融合タンパク質 (TALE-KRAB) 発現プラスミド pTALE-KRABの構築、および、レポータープ

ラスミドの構築は、SBI社のEZ-TAL™ Assemblyキットを用いて行った。閉環状プラスミドの抽出は、セシウムクロライド平衡密度勾配遠心法で行った。

2. 細胞および遺伝子導入

COS-7細胞および293細胞への遺伝子導入は、キアゲン社のEffectene™ Transfection Reagentを用いて行った。Daudi細胞への遺伝子導入は、Bio-Rad社のGene Pulser IIを用いて既報に基づき行った(Murai K et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3461-6)。

3. 逆転写PCR

RNA抽出は、Thermo Fisher ScientificのTRIzol® LSを用いて行った。逆転写は、Life Technologies社のSuperscript® III First-Strand Synthesis SuperMixを用いた。逆転写PCRは、Eppendorf Scientific社のサーマルサイクラーを用い、TOYOBO社のQuickTaq™™ HS DyeMixを用いて、94度2分の後、94度30秒、53度30秒、68度30秒を35サイクルの行程で行った。RFPのプライマーは5'-AGGCTTCAAGTGGGAGAGATTC-3' (forward) および5'-TTTTGCATGACAGGGCCAT-3' (reverse)、GAPDHのプライマーは、5'-CAACGACCACTTTGTCAAGCTC-3' (forward) および5'-GGTCTACATGGCAA CTGTGAGG -3' (reverse)を用いた。

4. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイは、1検体あたり2 x 10⁵ のHEK293に対して、プロメガ社のdual-luciferase reporter assay systemキットを用いて溶解し、得られた反応は、マイクロプレートリーダー(SH-9000, Corona Electric社)にて検出を行った。

5. フローサイトメトリー

1検体あたり5 x 10⁶の細胞に対して、マウスCD8α-APC (clone 53-6.7, eBioscience社) およびアイソタイプ抗体 (Rat IgG2a κ; clone R35-95; BD Biosciences社)を用いて染色し、BD Accuri® C6 (BD Biosciences社)を用いて解析した。

4. 研究成果

1. E2A発現を抑制するTALE-人工転写抑制因子融合タンパク質発現ベクターの構築

プラスミド導入によるタンパク質発現方法は、ウイルスを用いた方法より細胞の染色体に組み込まれる可能性が極めて低いため、安全性が認められており、iPS細胞の臨床研究においても用いられている(Okita et al., Stem Cells. 2013 Mar;31(3):458-66.)。そこで本研究では、プラスミドベクターによるE2A発現抑制方法に注目した。ヒトE2A遺伝子の転写開始点の

上流に特異的に存在する塩基配列を探索し、その領域を認識するTALE-転写抑制因子(KRAB)融合タンパク質(TALE-KRAB)発現プラスミドpTALE-KRABの構築を行った(図3)。また、目的塩基配列(図3, TDBS)とTALE-KRABタンパク質の結合および転写抑制因子による転写抑制を、レポーターアッセイで評価するために、mCMVプロモーターとルシフェラーゼの発現領域の上流に上記配列を三回挿入したレポータープラスミド(図3)を構築した。さらに遺伝子導入の高効率化、および安全性向上のため、セシウムクロライド平衡密度勾配遠心法で閉環状プラスミドを純化した。

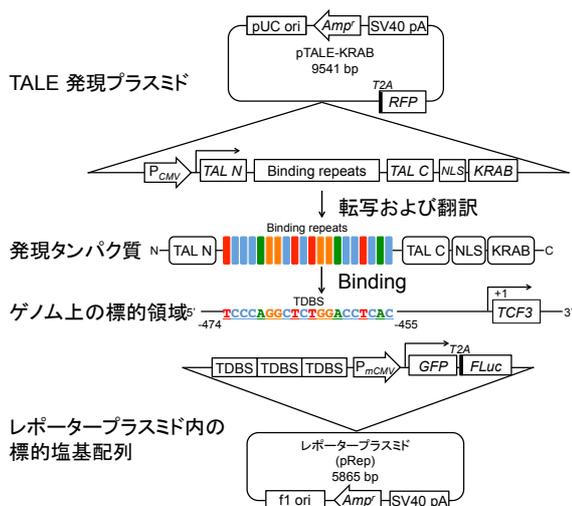


図3 TALE発現プラスミド(pTALE-KRAB)から発現したTALE-転写抑制因子(KRAB)融合タンパク質はゲノム上の標的領域(TDBS)に特異的に結合し、TCF3の発現を抑制することができる。発現タンパク質とTDBSとの結合は、レポータープラスミドを用い、簡便に確認することができる。

2. TALE発現プラスミドのRFP発現

TALE-KRABが機能するかより詳しく確認するため、pTALE-KRABの部位欠落プラスミドを3つ構築し(図4A)、これらをCOS-7細胞またはHEK293細胞に導入した。まずこれらのプラスミドを導入された細胞からトータルRNAを抽出し、導入プラスミドをDNaseIで消化してから逆転写を行った後、RFPのプライマーを用いRT-PCRを行い、全てのプラスミド目的遺伝子を転写していることを確認した(図4B)。また、TALE-KRABとΔTALEのRFP発現が細胞質と核の両方に存在するのに対し、ΔKRABは核のみに存在することから、TALE-KRABはT2AによってRFPが効率的に切断され、TALE部位は核に留まることが示された(図5Aおよび図5B)。Mockプラスミドは、RFP遺伝子一部の転写が生じるが、正しくタンパク質発現しないことが示された(図4Bおよび図5A)。

3. レポータープラスミドのGFP発現

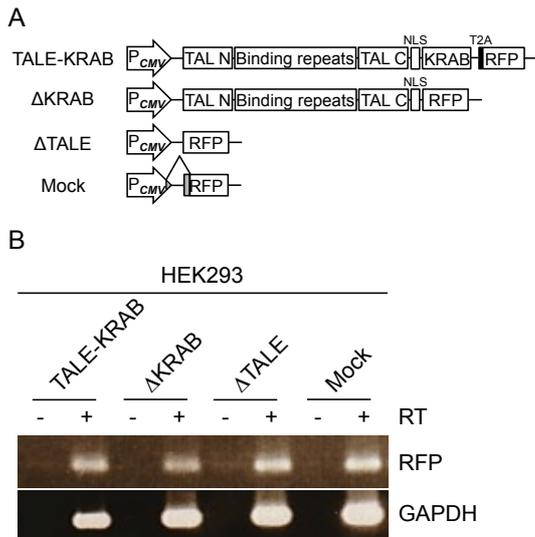


図4 (A)TALE-KRABと部位欠落タンパク質の発現を示した。TALE-KRABとRFPはT2Aによりポリシストロニックに発現する。ΔKRABはKRAB領域を欠損し、RFP融合タンパク質を発現する。ΔTALEはRFPのみを発現する。Mockはプロモーターの下流11 bとRFPの最初の6 bを欠損している。(B)各ミュータントのmRNA発現。+RTは、逆転写したもの、-RTは逆転写を行っていないものを示す。

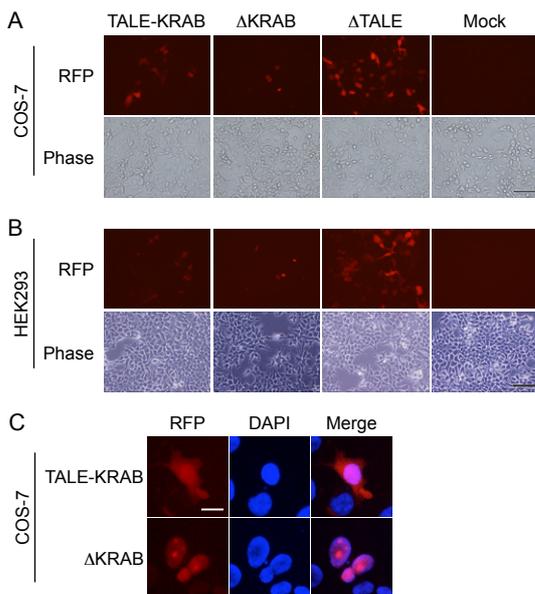


図5 (A)TALE-KRABと部位欠落タンパク質のRFP発現とフェーズコンタクトイメージ(Phase)。COS-7細胞(A, C)またはHEK293細胞に各プラスミド(0.4 μg)を導入し、48時間後に検鏡した。(A, B)スケールバーは、50 μmを示す。(C) COS-7細胞におけるRFP発現と核の局在を示すDAPI染色の蛍光検鏡 スケールバーは、10 μmを示す。

TALEドメインが標的塩基配列に結合し、下流の遺伝子発現を抑制するか簡便に確認するために、TALE発現ベクターをレポータープラスミド(pRep)と共にHEK293細胞に導入し、レポータープラスミドの標的塩基配列下流にあるGFPの発現の変化を蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターにて確認した。TALE-KRABを発現させた細胞のGFP発現は、

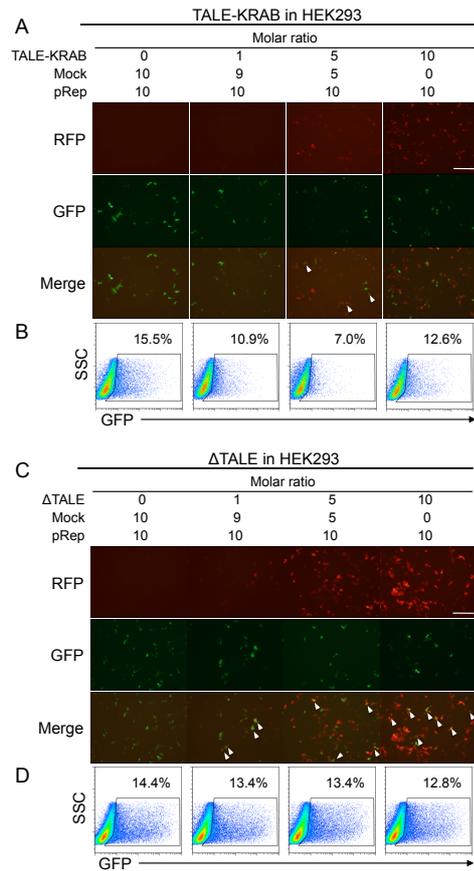


図6 TALE-KRABはレポーターのGFP発現を抑制する。HEK293細胞 (5×10^5) にTALEプラスミドとMockプラスミドを合計0.4 μmol、レポータープラスミド (0.4 μmol) と共に導入し、48時間後RFP発現とGFP発現を見た。(A, C) TALE-KRABまたはΔTALE (RFP) およびレポーター (GFP) の発現を蛍光顕微鏡で確認した。(B, D) レポーター (GFP) の発現をフローサイトメーターで確認した。

TALE-KRABの発現量依存的に低下したが、対照群であるΔTALE発現細胞ではGFPの発現に変化は見られなかった(図6)。これらの結果から、TALE-KRABのTALEドメインの標的塩基配列特異的な結合と、KRABドメインの下流遺伝子発現抑制が確認された。

4. レポータープラスミドのルシフェラーゼ発現

pRepには、GFPだけでなく、ルシフェラーゼもコードされている(図3)。そこで、3.と同様に処理を行ったHEK293細胞にルシフェラーゼアッセイを行った。TALE-KRABを発現させた細胞のルシフェラーゼ活性は、TALE-KRABの発現量依存的に低下したが、対照群であるΔTALE発現細胞では変化は見られなかった(図7)。

5. TALE-KRABタンパク発現によるE2A抑制

E2Aは、B細胞リンパ腫細胞株(Daudi)のような血球細胞で内在的な高発現が認められるものの、HEK293細胞のような線維芽細胞には発現していない。そこで、TALE-KRABタンパク質がE2A発現を抑制するかフローサイ

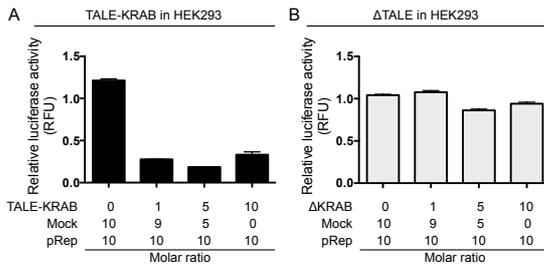


図7 TALE-KRABはレポーターのルシフェラーゼ発現を抑制する。HEK293細胞 (5×10^5) にTALEプラスミドとMockプラスミドを合計0.4 μmol 、レポータープラスミド (0.4 μmol) と共に導入し、48時間後ルシフェラーゼアッセイを行った。

トメトリーで確認するために、pTALE-KRABプラスミドにIRES-マウス(m)CD8 α を挿入した(図8A)。さらに血球細胞で発現を上げるためにプロモーターをCMVからEF1 α に置換した(図7B)。EF1 α プロモーターはDaudi細胞でのTALE-KRAB発現を向上した(図8B)。最後に、EF1 α プロモーターに置換したプラスミドをDaudi細胞に導入し、20時間後に、mCD8陽性細胞中のTCF3発現が低下していることを確認した(図8C)。これらの結果は、このベクターが、臨床に応用できるほど安全に造血幹細胞をiHSP細胞へと誘導できる可能性を示唆した。

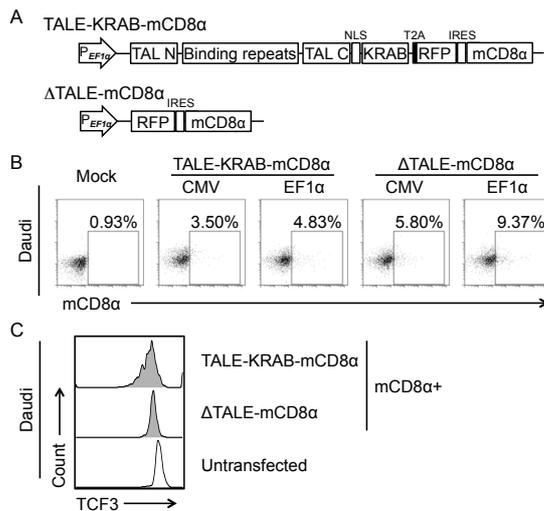


図8 (A) TALE-KRAB発現細胞をフローサイトメトリーで簡便に検出するために、IRES-マウスCD8 α を挿入した。(B) プロモーターをCMVからEF1 α に置換することで、TALE-KRABのDaudi細胞での発現が向上した。発現細胞の検出はマウスCD8 α 抗体を用いた。(C) Daudi細胞に遺伝子導入し、20時間後にマウスCD8 α 陽性細胞のTCF3発現をフローサイトメトリーにて検出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Shigehiro T, Zhai W, Vaidyanath A, Masuda J, Mizutani A, Kasai T, Murakami H, Hamada H, Salomon DS, Mikuni K, Seno Y, Mandai T, Seno M. Evaluation of glycosylated docetaxel-encapsulated liposomes prepared by remote loading under solubility gradient. 査読有 J Microencapsul. 2016 Mar;33(2):172-82. doi: 10.3109/02652048.2016.1144815.

② Yan T, Mizutani A, Chen L, Takaki M, Hiramoto Y, Matsuda S, Shigehiro T, Kasai T, Kudoh T, Murakami H, Masuda J, Hendrix MJ, Strizzi L, Salomon DS, Fu L, Seno M. Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived extracellular vesicles. 査読有 J Cancer. 2014 Jul 5;5(7):572-84. doi: 10.7150/jca.8865.

③ Ieguchi K, Tomita T, Omori T, Komatsu A, Deguchi A, Masuda J, Duffy SL, Coulthard MG, Boyd A, Maru Y. ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes to lung metastasis. 査読有 Oncogene. 2014 Apr 24;33(17):2179-90. doi: 10.1038/nc.2013.180.

④ Koreishi M, Gniadek TJ, Yu S, Masuda J, Honjo Y, Satoh A. The golgin tether giantin regulates the secretory pathway by controlling stack organization within Golgi apparatus. 査読有 PLoS One. 2013;8(3):e59821. doi: 10.1371/journal.pone.0059821.

[学会発表] (計 14 件)

① 佐々田 沙紀、星川 健太、松本 拓馬、Sanchez Calle Anna, Vaidyanath Arun, 増田 潤子、笠井 智成、妹尾 昌治 化学物質のがん幹細胞誘導性に関する in vitro における簡易評価技術の開発 日本動物実験代替法学会 第28回大会 2015年12月11日 横浜

② 笠井 智成、佐々田 沙紀、星川 健太、松本 拓馬、増田 潤子、Anna Sanchez Calle, Arun Vaidyanath、工藤 孝幸、妹尾 昌治 化学物質のがん幹細胞誘導性評価において iPS 細胞を用いる技術の開発 日本動物実験代替法学会 第 28 回大会 2015 年 12 月 10 日 横浜

③ 恩賀 咲、平本 祐樹、松田 修一、村上 宏、増田 潤子、Vaidyanath Arun、笠井 智成、水谷 昭文、妹尾 昌治 がん幹細胞ニッチでのがん幹細胞自己複製促進 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 3 日 神戸

④ 相澤 一輝、宗田 龍幸、谷口 早紀、尾上 稜馬、村上 宏、増田 潤子、Vaidyanath Arun、笠井 智成、水谷 昭文、妹尾 昌治 マウス iPS 細胞由来がん幹細胞におけるダウノルビシンによる p53 経路の活性化 第 38 回

日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 3 日 神戸

⑤ 佐々田 沙紀、星川 健太、松本 拓馬、Anna Sanchez Calle、水谷 昭文、Arun Vaidyanath、増田 潤子、笠井 智成、妹尾 昌治 シグナル伝達阻害剤によるがん幹細胞誘導メカニズムの解析 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 2 日 神戸

⑥ 公文 一輝、本山 大暉、増田 潤子、Marta Prieto Vila、相澤 一輝、尾上 稜馬、笠井 智成、村上 宏、水谷 昭文、妹尾 昌治 がん幹細胞 miPS-LLCcm が形成する微小環境による Nanog タンパク質の局在変化 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 2 日 神戸

⑦ 増田 潤子、高山 英次、佐藤 あやの、守本 祐司、本庶 仁子、石塚 俊晶、徳野 慎一、青笹 季文、光吉 俊二、重廣 司、前野 成実、村上 宏、笠井 智成、水谷 昭文、Arun Vaidyanath、妹尾 彬正、川木 晴美、神谷 真子、近藤 信夫、一瀬 雅夫、一戸 辰夫、妹尾 昌治 がんモデル動物を用いた悪性度の違いによる全身免疫能変化の解析 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日 神戸

⑧ 趙 香琳、河野 俊一郎、笠井 智成、増田 潤子、水谷 昭文、妹尾 昌治、村上 宏 G-CSF 刺激依存の好中球分化誘導における Gab2 タンパク質の役割 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日 神戸

⑨ 重廣 司、増田 潤子、水谷 昭文、笠井 智成、村上 宏、濱田 博喜、伊藤 哲也、萬代 忠勝、妹尾 昌治 糖修飾ドセタキセル封入リボソームを用いたドラッグデリバリー 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 名古屋

⑩ Masuda J, Takayama E, Seno M. Systemic Immunities on Mouse with Malignant Cancer. *Frontiers in Basic Immunology* 2015 2015 年 10 月 8 日 ベセスダ アメリカ

⑪ Masuda J, Kitani A, Fuss I, Seno M, Strober W. Dextran sodium sulfate-induced colitis in dendritic cell deletion mice. *Annual Meeting 2015, American Association for Cancer Research (AACR)* 2014 年 4 月 21 日 フィラデルフィア、アメリカ

⑫ Masuda J, Kitani A, Fuss I, Seno M, Strober W. Dextran sodium sulfate-induced colitis in dendritic cell deletion mice. *Cancer Immunology and Immunotherapy: Delivering the Promise* 2014 年 10 月 9-10 日 ベセスダ、アメリカ

⑬ Mizutani A, Matsuda S, Yan T, Prieto-Vila M, Chen L, Satoh A, Kasai T, Masuda J, Kudoh T, Murakami H, Fu L, Salomon DS, Seno M. Cancer stem cells maintain a hierarchy of differentiation by creating their niche. *Annual Meeting 2014, American Association for Cancer Research (AACR)* 2014 年 4 月 8 日 サンディエゴ、アメリカ

⑭ Ting Y, Masuda J, Mizutani A, Chen L, Shigehiro T, Matsuda S, Kasai T, Kudoh T, Murakami H, JC Hendrix MJ, Strizzi L, Salomon DS, Fu L, Seno M. Characterization of cancer stem-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells transformed by tumor-derived exosomes/microvesicles. *Annual Meeting 2014, American Association for Cancer Research (AACR)* 2014 年 4 月 8 日 サンディエゴ、アメリカ

[図書] (計 2 件)

① 笠井 智成、Arun Vaidyanath、妹尾 彬正、朝倉 真実、増田 潤子、水谷 昭文、村上 宏、妹尾 昌治 技術情報協会 次世代のがん治療薬・診断のための研究開発 2016 年 (348-353)

② Mizutani A, Yan T, Vaidyanath A, Masuda J, Seno A, Kasai T, Murakami H, Seno M *Springer Biology in Stem Cell Niche* 2015 年 (211-226)

[産業財産権]
なし

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 潤子 (MASUDA, Junko)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：20424674