

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461004

研究課題名(和文) 肝細胞における腫瘍免疫標的分子発現制御機構のiPS細胞を用いた解明と創薬への展開

研究課題名(英文) Study on regulation of immune target in hepatocytes using iPS cells

研究代表者

青井 貴之 (Aoi, Takashi)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：00546997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌の発生および進展のプロセスにおいて、腫瘍免疫監視からの逸脱は重要な意義があると考えられるが、その分子機構の多くは不明である。本研究は、ヒトiPS細胞からの肝細胞への分化誘導技術等を駆使することにより、ヒト非癌肝細胞へのウイルス感染によって惹起される免疫標的分子の発現制御機構を包括的に明らかにし、それをターゲットとする創薬へと展開するための系を確立することを目的として行った。ヒトiPS細胞由来肝細胞に、薬剤誘導性発現プラスミドを用いてC型肝炎ウイルスがコードするタンパク質の其々を強制発現する系を確立した。この系を用い、免疫標的分子の発現制御機構を解析することができた。

研究成果の概要(英文)：In the process of cancer initiation and development, escape from tumor immunosurveillance has been thought to be important. However its molecular mechanisms are still unclear. This study aimed to clarify regulatory mechanisms of the expression of immune target molecules induced by viral infection of human non-cancer hepatocytes by utilizing iPS cell technologies and establish a system for drug discovery targeting it. In this study, we established a drug-inducible system for forced expression of each proteins encoded by hepatitis C virus in human iPS cell - derived hepatocytes. Using this system, we analyzed the regulatory mechanism of the expression of immune target molecules.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 肝細胞 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の発生と免疫監視機構

癌の発生および進展のプロセスにおいて、NK 細胞や T 細胞による非特異的腫瘍免疫の監視機構からの逸脱は重要な意義があるものと考えられている。しかし、発癌に関連する因子による腫瘍免疫標的分子の発現制御機構については多くが不明である。従って、癌もしくは癌の発生母地となる病変に腫瘍免疫標的分子を十分に発現させることで腫瘍免疫監視機構からの逸脱を防ぐことを目的とする治療薬を開発することも困難であった。

近年、C 型肝炎に関連する肝細胞癌症例についての GWAS(genome wide association study)から、natural killer(NK)細胞や T 細胞の標的分子のひとつである MICA のプロモーター領域の一塩基多型 (SNP) が、C 型肝炎関連肝細胞癌の発生と有意に相関することが報告された (Kumar et al., Nat. Genetics, 43:455, 2011)。さらに、この報告の中では、肝細胞における MICA の発現と相関することが知られていた末梢血中の可溶性 MICA の濃度とこの SNP が相関することが示され、リスクアリルを有する患者では肝細胞における MICA の発現が低い事が示唆された。この事は、世界の癌関連死亡の原因として 3 番目に多い肝細胞癌においても、免疫標的分子の発現制御機構が重要であることを示すものである。

(2) ウイルス関連肝細胞発癌は腫瘍免疫標的分子発現機構の解明のために最適のモデルとなる

ほぼ全ての癌種と同様、C 型肝炎関連肝細胞癌の発癌メカニズムについては、その全貌が解明されているとはいえない。しかし少なくとも、発癌プロセスが始まる最初のトリガーが C 型肝炎ウイルスの感染であることは明らかである。従って、発癌に関与する多様な因子の中で免疫標的分子の発現の変動という要素のみを帰結とし、C 型肝炎ウイルスの感染を出発点として、その間を繋ぐ分子機構を解明することは、十分な実現可能性がある課題だと考えられる。この点において、発癌に至るプロセスの出発点を単一の明確な因子に特定することが出来ない他の多くの癌に比べて C 型肝炎関連肝細胞癌は、免疫標的分子の発現制御機構を解明するのに適した病態であるといえる。これは、その機構に介入するための治療薬を探索するためにも有用であることを意味する。

実際、上述の GWAS の結果を受けて、C 型肝炎ウイルスにより誘導される転写因子 SP1 が当該 SNP を含む領域にプロテクティブ・アリルでは結合するのに対しリスク・アリルでは結合しないことが MICA の発現量に影響を与えていること (Lo et al, PLOS ONE,9:e61279,2013) や、ある種のマイクロ RNA を抑制することで MICA の発現を促進できること (Kishikawa et al, Scientific

Report, 3:2739, 2013) などの興味深い報告が、肝癌細胞株を用いた実験に基づいてなされている。但し、これらの研究で用いられた肝癌細胞株はいずれも既に完成した肝癌から樹立されたものであることや、GWAS で有意なものとして見出されていた SNP 以外にもゲノムの相違が多数あると考えられることなどから、実際の正常肝細胞への C 型肝炎ウイルス感染から発癌にいたるプロセスの中では、これらの報告の中で見出されたこと以外の機構が存在している可能性も否定はできない。

(3) iPS 細胞は免疫標的分子発現機構解明のために最適かつ強力なツールである

そこで、人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞を用いることは、上述の諸問題を解決するのに有用であると考えられる。iPS 細胞は、体細胞に少数の因子を導入することで得られる多能性幹細胞で、無限の自己複製能と分化多能性を有するのに加え、あらかじめ個性 (疾患の有無や遺伝子型など) が判明している個人の細胞から樹立出来るという特徴を持つ。ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導を行うことで、癌細胞株とは異なり正常のゲノムを有したヒト肝細胞を量的限定なしに得ることが出来るのに加え、目的とする免疫標的分子のレポーターシステムを導入したり、特定の部位の SNP 型を相同組換え技術を用いて他の型に変換したりするなどの遺伝子改変を行ってクローン化することが可能である。このようにして得られたヒト iPS 細胞由来肝細胞に肝炎ウイルスの感染もしくは肝炎ウイルスがコードする遺伝子の強制発現を行うことで、それによって作動する機構についての詳細な動的観察が可能となる。ここに種々の遺伝子の強制発現や発現抑制等を行うことによって、免疫標的分子の発現制御機構の解明が可能となるのに加え、それをターゲットとした創薬のための系をつくることも可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞からの肝細胞への分化誘導技術や iPS 細胞の遺伝子改変技術等を駆使することによって、ヒト非癌肝細胞へのウイルス感染に惹起される免疫標的分子の発現制御機構を包括的に明らかにし、それをターゲットとする創薬へと展開するための系を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

上記目的を達成するため、以下の通りに研究を進めた。

(1) ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導の最適化

(2) ヒト iPS 細胞由来肝細胞への肝炎ウイ

ルスの感染/ウイルス遺伝子の強制発現系確立

(3) 既知の免疫標的分子のヒト iPS 細胞由来肝細胞における肝炎ウイルス遺伝子の強制発現による変動についての評価

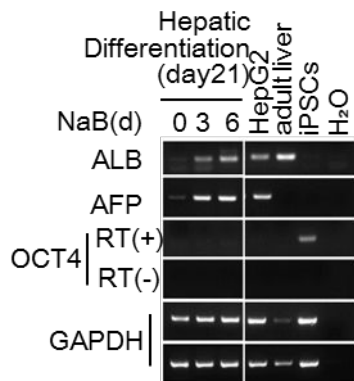
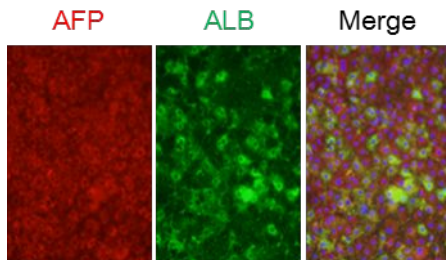
(4) 上記で変動した分子の評価系確立

(5) 同分子の発現制御機構の分子生物学・生化学的探索

4. 研究成果

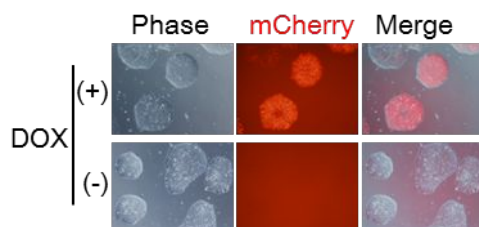
(1) ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導の最適化:

研究代表者が過去に報告した方法を中心として、最近様々な研究室から報告された分化誘導法のうち有望であると考えられるものも導入して検討を行い、本研究におけるヒト iPS 細胞からの肝分化誘導プロトコルの最適化を行った。安定した分化プロトコルが確立した。下図はヒト iPS 細胞由来肝細胞の AFP およびアルブミンに対する免疫染色と RT-PCR

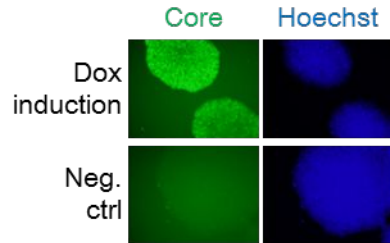


(2) ヒト iPS 細胞由来肝細胞への肝炎ウイルスの感染/ウイルス遺伝子の強制発現系確立:

ドキシサイクリン存在下に、目的遺伝子を mCherry とともに発現する PiggyBAC ベクターをヒト iPS 細胞に導入し薬剤選択を行った。培地中へのドキシサイクリン添加に mCherry を発現する株を取得することができた。

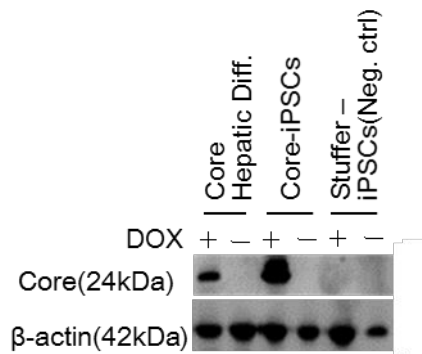
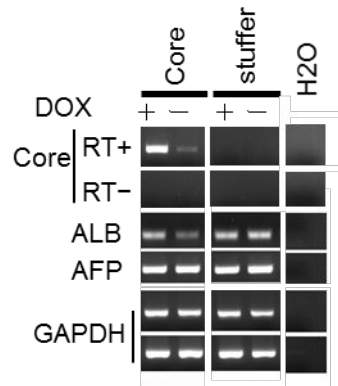


続いて、C 型肝炎ウイルスがコードするタンパク質を前述のベクターで導入した iPS 細胞を樹立した。下図に示す通り、コアタンパク質を導入した iPS 細胞にドキシサイクリンを添加すると、HCV-コアタンパク質が発現したことが免疫染色で確認された。



(3) 既知の免疫標的分子のヒト iPS 細胞由来肝細胞における肝炎ウイルス遺伝子の強制発現による変動についての評価:

薬剤誘導性強制発現システムを導入した iPS 細胞からの肝細胞分化を行い、得られた肝細胞にドキシサイクリンを添加し結果、iPS 細胞由来肝細胞においても目的とす遺伝子の発現系が機能することが明らかになった。下図は RT-PCR とウエスタンブロット。



この細胞において、免疫標的分子として知られる分子群の発現を定量 RT-PCR で調べた。その結果、ある C 型肝炎ウイルスタンパク質の強制発現によって、ある既知の免疫標的分子の発現量が上昇することが明らかになった。

(4) 上記で変動した分子の評価系確立：
この分子について、免疫染色を行いフローサイトメトリーによって、蛋白質レベルでも初連を評価する系を確立した。

(5) 同分子の発現制御機構の分子生物学・生化学的探索：

上記分子の発現制御機構を解明するために、ヒト iPS 細胞由来肝細胞で当該ウイルスタンパク質の強制発現を行ったものとしていないものについて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。発現変動が見られた遺伝子群に関して、ontology 解析を行い、発現制御機構として考えられる仮説を複数立てた。これに基づいて、肝炎ウイルスタンパク質発現ヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いて、関連する遺伝子導入による強制発現やノックダウン、あるいは阻害剤等の薬剤添加などによる検証を進めている。

これまでに、iPS 細胞由来肝細胞を用いて、肝炎ウイルスに惹起される免疫標的分子の発現変動を調べるという手法で行われた研究はなく、我々の研究により、新たな機構が解明される可能性が考えられる。これによる成果は、免疫標的分子の発現制御機構をターゲットとした新たな薬剤の探索へと展開する可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takashi Aoi “10th anniversary of iPS cells: the challenges that lie ahead” J Biochem 査読あり vol 160 No.3、2016、pp121-129

〔学会発表〕(計3件)

青井貴之 iPS 細胞の医学応用 第 117 回日本結核病学会近畿地方会・第 87 回日本呼吸器学会近畿地方会、2016.7.9、大阪国際交流センター(大阪府)

青井貴之 10th Anniversary of iPS cells、JAACT2016、2016.11.10 神戸国際会議場(兵庫県)

青井貴之 Applications of iPS cell technology for Gastroenterology APDW2016、2016.11.4、神戸国際会議場(兵庫県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lab.kobe-u.ac.jp/gmed-ipsc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青井 貴之 (A01 Takashi)

神戸大学・大学院科学技術イノベーション

研究科・教授

研究者番号：00546997

(2) 研究分担者

青井 三千代 (A01 Michiyo)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90432327

(3) 連携研究者

堀田 博 (HOTTA Haku)

神戸大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：40116249