

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830130

研究課題名(和文) オリゴDNAを用いた新技術による転写活性化機構の解析と再生医療への応用

研究課題名(英文) Mechanistic analysis and application of novel activation technique for regenerative medicine

研究代表者

仲島 由佳 (NAKAJIMA, Yuka)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40399499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アンチセンスやアンチジーンのようなオリゴDNA技術は内在の遺伝子発現を抑制するために有用な技術であるが、活性化する技術はこれまでに開発されていなかった。これまでに申請者らは、オリゴDNAにより内在の遺伝子発現を活性化する方法を見出したが、その機構解析や医療応用への可能性の検討は行われていなかった。本研究において、オリゴDNAを標的遺伝子のクロマチン状態が開いている箇所結合し、活性化していることを見出した。さらに、オリゴDNAは配列選択的に遺伝子発現を活性化し、間葉系幹細胞から筋細胞や骨細胞への分化や、繊維芽細胞から人工多能性幹細胞への脱分化の誘導が可能なことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Oligonucleotide technologies such as antisense and antigene are useful in down-regulating endogenous gene expression. However, oligonucleotides mediated upregulation of endogenous gene expression has not been developed. Recently we developed a technique using DNA oligonucleotides to activate the expression of endogenous target genes, but the mechanisms and the application to regenerative medicine have not largely unclear. In this study, we found that designing oligo DNA for open chromatin regions is required to activate target gene expression. We also demonstrate that oligo DNAs are able to induce mesenchymal cell differentiation and enhance the efficiency of induced pluripotent stem cell (iPSC) colony formation. Our process allows the design of oligonucleotides as a tool for the transient activation of endogenous gene expression that may be useful for biological research and in clinical applications.

研究分野：転写制御

キーワード：転写 DNAオリゴヌクレオチド

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの身体は、様々な機能を持つ分化した細胞で構成されており、それぞれの細胞の機能や分化は、特定の遺伝子の転写によって制御されている。したがって、ゲノム上の任意の遺伝子の転写を、人為的に制御できる技術が開発できれば、医療を含む広範な分野への応用が期待できる。しかしながら、現在、RNAiのように内在性の転写を抑制する技術は存在するが、転写を活性化する技術は存在しない。

このような技術の応用が可能な分野の一つは再生医療である。山中因子と呼ばれる4つの転写因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*) の発現導入により、分化した細胞を未分化状態の細胞 (iPS 細胞) へと脱分化することができる (Takahashi and Yamanaka, *Cell*, 2006)。また、最終分化した細胞に数種の転写因子を発現させることで肝細胞、神経細胞や心筋細胞などの他の種類の体細胞に分化誘導 (ダイレクトリプログラミング) 出来ることも報告されている (Ladewig et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013)。これらの最新技術の、医療への応用を阻む大きな壁は、ウイルスベクターの使用により引き起こされる、導入遺伝子の宿主ゲノム DNA へのインテグレーションである。導入遺伝子のインテグレーションは、ゲノム変異や恒常的発現による発癌に繋がる恐れがある (Okita et al., *Nature*, 2007)。また、宿主ゲノムにインテグレートされないアデノウイルスベクター投与でもウイルス感染による発病や死亡事例が報告されている (Marshall, *Science*, 2002)。さらに、エピソードによるリプログラミングも、誘導効率の低さや、低い確率ながらもゲノム DNA へのインテグレーションの問題が指摘されている。ウイルスベクターを使わず、かつ、細胞に遺伝子を導入することなくゲノム上の特定の遺伝子転写を活性化する技術が開発できれば、このような問題点の解決にも繋がるものと期待できる。

特定の遺伝子の転写が活性化されるためには、転写因子のプロモーターへの結合が必要である。転写因子は、転写活性化因子群をリクルートすることにより、ゲノム上のクロマチン構造を緩め、転写を活性化する。転写因子の結合領域は、転写開始点よりかなり上流である場合も多い。このような場合には DNA がベンドし、転写開始点に転写因子が近づいて転写が開始される。これらの結果は、転写因子の結合領域と制御遺伝子が直列結合をしていなくても良いことを示している。転写因子が転写開始点近傍に存在することが転写を活性化する。このような観点から、申請者はジーンジャックオリゴ DNA を開発した。本法は、任意のゲノム上の遺伝子の転写を人為的に制御することを可能とする。本法による転写活性化は、ジーンジャックオリゴ DNA を用いているため、高効率かつ一過的であり、ゲノムへのインテグレーションの

可能性も低いと考えられる。

### 2. 研究の目的

ジーンジャックオリゴ DNA は、“転写因子結合配列”と“標的遺伝子のプロモーター結合配列”を有する DNA オリゴヌクレオチドである。ジーンジャックオリゴ DNA は、内在性の転写因子を、標的遺伝子の上流にリクルートすることで、転写が活性化すると考えられる。

申請者らは、これまでにジーンジャックオリゴ DNA により転写因子、代謝因子やホルモンなどの発現が誘導可能であることを明らかにしている。しかしながら、その分子制御機構は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、1) ジーンジャックオリゴ DNA による転写制御の分子メカニズムを解明することを目指す。

また申請者らは、間葉系幹細胞の分化に関与する転写因子である MyoD や Runx2、iPS 細胞誘導に必要な Oct3/4、Sox2、KLF4、c-Myc、さらに肝細胞における insulin の転写活性化をジーンジャックオリゴ DNA により誘導可能であることを確認している。ジーンジャックオリゴ DNA の再生医療応用を目指し、2) ジーンジャックオリゴ DNA による分化・脱分化誘導の検討、in vivo 適用の可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

平成26年度:

・ジーンジャックオリゴDNAによる標的遺伝子の転写活性化機構の解析

申請者は、DNAオリゴヌクレオチド (ジーンジャックオリゴDNA: オリゴDNA) により標的遺伝子の転写を活性化出来ることを見出した。そこで、詳しい分子機構を明らかにするために、以下の項目について実験を進めた。

オリゴDNAの標的遺伝子プロモーター上の設計位置と、転写活性化の関係を検討するために、オリゴDNAによる転写活性化と標的とするゲノミックDNAのクロマチン状態をDNase感受性実験を行った。さらに、プロモーター結合配列の長さを変えたオリゴDNAを合成し、オリゴのDNA長さで転写活性化と選択性の関係を検討した。また、転写因子結合配列に変異を導入したジーンジャックオリゴDNAを用いた転写活性化の検討により、ジーンジャックオリゴDNAを介した転写因子の標的遺伝子のプロモーター上へのリクルートと転写活性化の関係を解析した。

オリゴDNAにより標的遺伝子の転写を活性化した際に、DNAメチル化が変化している

のかどうかを、バイサルファイトシーケンス法により検討した。

#### ・ジーンジャックオリゴDNAによる細胞分化誘導の検討

申請者は、オリゴDNAにより間葉系幹細胞から筋細胞への分化誘導に必要な転写因子であるMyoD、骨細胞への分化に必要な転写因子であるRunx2の転写活性化を誘導出来ることを既に確認している。そこで、ジーンジャックオリゴDNAにより、筋細胞、骨細胞以外の脂肪細胞への分化を誘導することが可能かどうかを複数の脂肪分化誘導遺伝子を標的にしたオリゴDNAを用いた検討を間葉系幹細胞であるC3H10T1/2に導入することにより行った。

平成27年度：

#### ・ジーンジャックオリゴDNAによる細胞脱分化誘導の検討

これまでにマウス線維芽細胞を脱分化させ、iPS細胞を樹立するのに必要な転写因子であるOct3/4、Sox2、KLF4、c-Mycの転写活性化がジーンジャックオリゴDNAにより誘導可能なことを確認している。また、4種類のジーンジャックオリゴDNAを混合することにより、4つの転写因子を同時に活性化することにも成功している。このジーンジャックオリゴDNAによる転写活性化は約3日で消失することから、導入遺伝子の宿主ゲノムDNAへのインテグレーションは起きていないと考えられる。発癌の可能性の少ない、安全なiPS細胞樹立のために、以下の項目について実験を進めた。

Oct3/4、Sox2、KLF4、c-Mycを標的としたオリゴDNAを数日毎に様々な遺伝子導入法でマウス線維芽細胞に導入し、初期化に必要な7日間、転写活性化し続けられる条件を検討した。得られたコロニーをAP染色やNanogなど未分化マーカーの発現を検討し、未分化能を保持しているかどうか検討し、iPS細胞株の樹立を試みた。得られたiPS細胞をマウスの皮下に移植し、テラトーマ形成試験を行うことで、多分化能があるかどうかの検討を行った。

さらに、オリゴDNA導入により樹立したiPS細胞の染色体異常や導入オリゴDNAの宿主ゲノムDNAへのインテグレーションの有無をTAIL-PCRを応用した手法により確認した。

#### ・オリゴDNAのin vivo投与によるインスリン産生の検討

これまでにマウス肝細胞にオリゴDNAを導入することで、インスリンの転写を非常に強く誘導出来ることを明らかにしている。肝臓は非常に大きな臓器であり、その一部の細胞が他の働きを行ったとしても、その影響は少ない。オリゴDNAを固体に直接投与し作用させられるかどうかを肝臓におけるインスリンの発現を解析することにより検討する。

はじめに、in vivoトランスフェクション試薬を用いた尾静脈投与により、DNAの肝臓への導入を検討した。投与24又は48時間後に、それぞれの肝臓組織中の遺伝子発現量を検討した。

転写誘導が見られない場合、DNAオリゴヌクレオチドより安定性の高いBNAなどのペプチド核酸でジーンジャックオリゴを合成し、標的遺伝子の活性化効率を検討した。

#### 4. 研究成果

申請者は、DNAオリゴヌクレオチド(ジーンジャックオリゴDNA:オリゴDNA)により標的遺伝子の転写を活性化出来ることを見出した。はじめに、詳しい分子機構の検討を行った。

オリゴDNAによる転写活性化と標的とするゲノミックDNAのクロマチン状態の関係をDNAase感受性実験を行い検討した。その結果、DNAaseに対する感受性の高い箇所とオリゴDNAにより転写活性化されるプロモーター上の位置が相関することから、MyoDプロモーターの場合、クロマチン状態が開いていると考えられる領域とオリゴDNAにより転写活性化が可能なゲノミックDNA上の標的領域となりうる可能性が示唆された。

次に、オリゴDNAと細胞内のゲノミックDNA(MyoD-goD)との相互作用の検討を行った結果、オリゴDNAがゲノミックDNAに結合していることが明らかになった(図1)。さらに、オリゴDNAの長さで転写活性化能の関係を検討した結果、プロモーター結合配列の長さを短くするに従い、オリゴDNAによる転写活性化能は減弱した。また、転写因子結合配列に変異を入れることにより、その転写活性化はほとんど見られなくなった。さらに、バイサルファイトシーケンスを行った結果、オリゴDNAによる転写活性化の際にはMyoD遺伝子のエンハンサー領域のメチル化が減少することが明らかになった。これらの結果から、オリゴDNAはゲノミックDNAに結合し、転写因子を標的遺伝子のプロモーター上にリクルートすることにより転写を活性化することが示唆された。

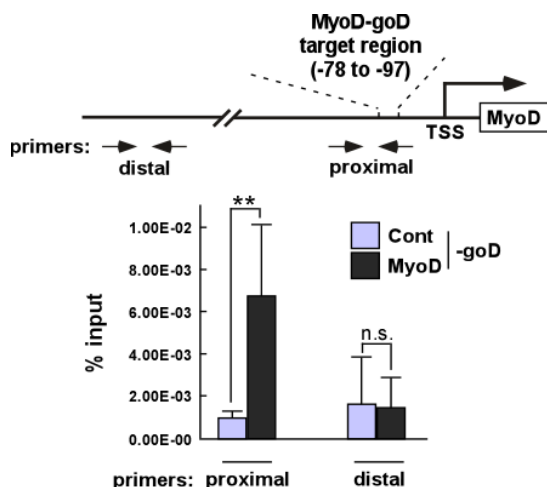


図1 MyoD を標的としたビオチン化オリゴ DNA を用いた標的遺伝子との結合

これまでに、オリゴ DNA により間葉系幹細胞から筋肉や骨への分化誘導可能なことを見出している。間葉系幹細胞は PPAR $\gamma$  の活性化により脂肪細胞へ分化誘導可能なことから、PPAR $\gamma$  を標的としたオリゴ DNA の設計を試みた。しかしながら、プロモーターのどの位置に設計しても、ほとんど活性化しなかった。この結果から、転写誘導可能な遺伝子と不可能な遺伝子が存在することが示唆された。

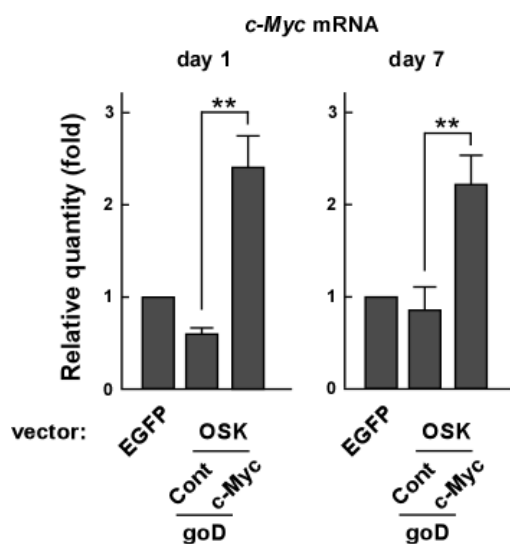


図2 c-Myc を標的としたオリゴ DNA による転写活性化

次に、DNA オリゴヌクレオチドの医療応用への可能性の検討を行った。

はじめに、オリゴ DNA による細胞脱分化誘導の検討を行うために、マウス繊維芽細胞 (MEF) に脱分化誘導因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) のオリゴ DNA を導入し、その発現量を検討した。その結果、それぞれ単独又は4因子同時にそれぞれの mRNA レベルが増加することを確認した。次に、人工多能性幹細胞の誘導が可能かどうかを検討するために、まず、3因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4)

発現プラスミド (OSK) を導入した MEF に c-Myc のオリゴ DNA (c-Myc-goD) の導入方法の検討を行った。その結果、長期間発現を維持するためには、はじめに、Lipofectamine LTX にてオリゴ DNA を細胞に導入し、その後、2日毎に3回 FuGENE6 にてオリゴ DNA を導入することにより、7日間、c-Myc の発現が続くようになった (図2)。さらに2週間培養を続けると、コントロールよりも c-Myc オリゴ DNA を加えた方が未分化マーカーである AP 陽性のコロニー数が増加し (図3) Nanog などの未分化マーカー遺伝子の mRNA 量が増加することを確認した。また、TAIL-PCR 法により、c-Myc オリゴ DNA の宿主ゲノム DNA へのインテグレーションは検出されなかった。これらの細胞を用いてテラトーム形成実験を行い、得られたテラトームを HE 染色した結果、多分化能を保持していることが明らかになった。以上の結果から、オリゴ DNA により、細胞脱分化の誘導が可能なが証明された。

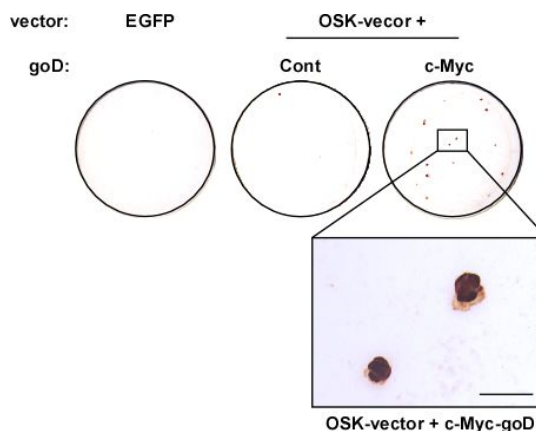


図3 c-Myc を標的としたオリゴ DNA による iPS コロニー誘導

次に、オリゴ DNA の in vivo 投与によるインスリン生産の検討を行うために、インスリンを標的としたオリゴ DNA をハイドロダイナミック法によりマウスの肝臓に投与し、インスリン遺伝子の転写活性化を試みた。はじめに、ポジティブコントロールとして EGFP プラスミドの投与を行ったが、投与から24時間、48時間後に観察した結果、肝臓における EGFP のシグナルを検出出来なかった。オリゴ DNA の安定性が低い可能性があるため、より安定性の高い BNA (Bridged Nucleic Acid) を用いて、従来のオリゴ DNA との転写活性化比較を行った。その結果、従来のオリゴ DNA と BNA とでは、それらの活性化に必要な濃度や活性化レベルはほぼ同じであった。そのため、オリゴ DNA による転写活性化を in vivo において誘導するためには、オリゴ DNA の投与量や投与方法の再検討が必要である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1 仲島 由佳、オリゴ DNA を用いた内在遺伝子の転写活性化、文部科学省 新学術領域「生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御 転写システム」領域班会議、2015年6月14日～2015年6月16日、ユウベルホテル 熊本県熊本市

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

仲島 由佳 (NAKAJIMA, Yuka)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40399499