

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830134

研究課題名(和文) EMTを制御する新規DNA認識化合物によるヒトiPS細胞誘導の高効率化

研究課題名(英文) High efficiency of human iPS cell induction by the novel DNA recognition compound to regulate the EMT

研究代表者

齋藤 孝輔 (SAITO, Kosuke)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：80624163

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)：ヒトTGF- β シグナル関連遺伝子のプロモーター領域を標的とするPIポリアミドがEMT/METを制御し、ヒトiPS細胞誘導効率の促進効果があるか検討した。センダイウイルスベクターにより外来性リプログラミング因子を導入したヒト繊維芽細胞に対してPIポリアミドを投与し、ヒトiPS誘導培養液で培養したところ、非投与群に比べPIポリアミド投与群のアルカリフォスファターゼ陽性コロニー数の有意な増加が認められ、またそれらのコロニーは未分化マーカーの発現が認められた。TGF- β のプロモーター特異的PIポリアミドによりEMT/METを制御でき、ヒトiPS細胞誘導効率を高める事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether PI polyamides designed targeting of the TGF- β 1 have the effect regulation of EMT/MET, and increase the human iPS cell induction efficiency. We designed and synthesized three different types of PI polyamides designed targeting of the TGF- β 1. We were administered PI polyamide to human fibroblasts transfected with exogenous reprogramming factor by Sendai virus vector and grown in human iPS induction cultures were seeded on feeder cells, was observed a significant increase in alkaline phosphatase-positive colony number of PI polyamide treated group compared with the non-treated group, we also found that the expression of undifferentiated markers was observed in these colonies. It was found to regulate of EMT/MET, and increase the human iPS cell induction efficiency in human fibroblasts by PI polyamides targeting human TGF- β gene promoter region.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：EMT iPS PIポリアミド

1. 研究開始当初の背景

(1)ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは、抗生剤であるデュオカルマイシン A とディスタマイシン A が DNA を塩基特異的に認識することを基に見出された有機化合物であり、ピロール(Py)とイミダゾール(Im)残基で構成される(Dervan PB: Bioorg Med Chem 9: 2215-2235, 2001)。PI ポリアミドはいかなる DNA 塩基配列に対しても設計、合成が可能であり、これまでの遺伝子発現制御薬であるアンチセンス DNA、リボザイム、siRNA とは異なり、核酸分解酵素に分解されずに生体内で安定に、ベクターやデリバリー試薬無しに細胞内に取り込まれる。細胞核内に取り込まれた PI ポリアミドは Py/Im ペアが GC、Py/Py ペアが AT または TA、Im/Py ペアが GC を認識し、2 本鎖 DNA に塩基配列特異的に強力に水素結合する。標的とする転写因子のプロモーター領域を認識するように設計した場合は、目的遺伝子の転写活性を抑制することが可能となる。申請者らの研究グループはこれまで新たな遺伝子治療薬の開発を目的として PI ポリアミドについて研究を行ってきた。

(2)近年、再生医療実現化に向けて世界中で研究が行われているヒト iPS 細胞は、分化した体細胞に ES 細胞で発現している 4 つの初期化(リプログラミング)因子、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc を導入することで樹立された、高い増殖能をもつ多能性細胞である。しかしながら現時点での従来のヒト iPS 細胞作製法では、その誘導効率が非常に悪く、またリプログラミング因子をレトロウイルスで導入しているためゲノムにランダムな遺伝子挿入が起こり、遺伝子変異を惹起する恐れがある。そのような問題を克服するため、遺伝子導入ベクターをアデノウイルスやセンダイウイルス、タンパク質、そしてエピソーマルプラスミドといった外来遺伝子の挿入が起こらない導入方法が用いられたが、ウイルスも用いた場合よりも誘導効率が同等か、それ以下の低効率で作製までの培養期間が 4 週間程と長いものであった。

(3)TGF- β は上皮細胞が間葉系様細胞に形質変化する現象である、上皮間葉移行(EMT)を強力に誘導する因子である。EMT を起こした上皮細胞では、同一細胞との細胞接着性の亢進、厳格な細胞極性が失われ、高い移動能・浸潤能を得て間葉細胞様の形質を獲得する。近年、間葉系細胞にリプログラミング因子を導入する際に、TGF- β 1 受容体の阻害剤を同時に投与すると、ヒト iPS 細胞の誘導効率が改善されることが報告された(Lin T et al., Nat Methods. 6 :805-808, 2009.)。TGF- β 1 シグナルの抑制がなぜヒト iPS 細胞の誘導効率に影響するのか、その詳細な作用機序は不明であったが、EMT とは逆の過程である間葉

上皮移行(MET)の誘導がヒト iPS 誘導過程におけるリプログラミングを促進することが示唆され(Li R et al., Cell Stem Cell. 7 :51-63, 2010.)。現在では様々な研究成果により、間葉系細胞のリプログラミングには EMT-MET が関与していると考えられている。

(4)PI ポリアミドについては、その合成が技術的に困難であり、その研究自体限られた研究グループでのみ行われていたため、特に医学分野への応用においては開発が遅れているのが現状である。本研究により PI ポリアミドが有効な遺伝子探索、制御薬であることが証明された場合、新たな遺伝子制御薬として世界中で認知されると期待される。また今回の研究結果でヒト TGF- β プロモーター領域に特異的な PI ポリアミドの EMT 抑制効果が認められた場合、EMT は癌細胞の悪性化、浸潤、転移に関わることが知られていることから、癌に対する治療薬としての研究の発展が見込められる。

2. 研究の目的

PI ポリアミドは核酸分解酵素に分解されず、生体内で安定に、ベクター無しに組織に取り込まれ、標的遺伝子への結合能も強いことから、申請者らはヒト iPS 細胞誘導の際に、EMT を誘導するヒト TGF- β 1、2、またそれらのレセプターのプロモーター領域に特異的な PI ポリアミドを用いることで、EMT の誘導を特異的に抑制し、結果リプログラミング過程を促進することで、従来の誘導法より短期間でかつ高い誘導効率を示すヒト iPS 細胞誘導法の開発につながると考えた。

3. 研究の方法

(1)ヒト TGF- β 2、ヒト TGF- β 1 レセプター、ヒト TGF- β 2 レセプター遺伝子プロモーター領域に特異的な PI ポリアミドを設計、合成した。それら作製した PI ポリアミドの標的 DNA に対する特異的結合能をゲルシフトアッセイにより評価した。またそれぞれの PI ポリアミドを FITC 標識し、培養細胞に投与して、細胞内導入効率および細胞内挙動を蛍光顕微鏡下で確認、評価した。作製した PI ポリアミドの EMT に対する抑制効果を検討するため、EMT 誘導型上皮細胞株に作製した PI ポリアミドを投与し、TGF- β 1、TGF- β 2、EMT マーカーである SNAI1、上皮マーカーである E-cadherin の mRNA、タンパク質の発現量の変化量をリアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法により評価した。上皮細胞の EMT 誘導系については、申請者はすでに TGF- β シグナルを活性化することが明らかになっている Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)を 100nM 投与した乳腺上皮細胞株 MCF10A 細胞を用いた。

(2)センダイウイルスベクターは細胞質内で RNA の状態で存在するためにゲノムへの挿入がなく、遺伝子の組換えを起こす可能性のないベクターである。このセンダイウイルスベクターによりリプログラミング因子である、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc をヒト繊維芽細胞に導入した後、作製した PI ポリアミドを 1 μ M 投与し、またその三日置きに PI ポリアミドを同濃度投与していった。ヒト iPS コロニーを得た時点で、それらヒト iPS 細胞の誘導効率を評価した。ヒト iPS 細胞の誘導効率は幹細胞特異的であるアルカリフォスファターゼ染色法を用いてアルカリフォスファターゼ陽性コロニーを検出後、それら陽性コロニーの割合を算出することで評価した。

(3)作製した PI ポリアミドを投与して樹立したヒト iPS 細胞の多能性幹細胞としての機能を評価するため、胚性幹細胞の幹細胞性に関与する遺伝子群のマイクロアレイによる網羅的解析を行った。また、それら PI ポリアミドを投与したヒト iPS 細胞を数継代した後、未分化マーカーである Nanog、SSEA4、SOX2、Oct3/4 の細胞内タンパク質の発現を免疫細胞化学法により評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト TGF- β 2、ヒト TGF- β 1 レセプター、ヒト TGF- β 2 レセプター遺伝子のプロモーター領域に対する特異的 PI ポリアミドの作製
ヒト TGF- β 2、ヒト TGF- β 1 レセプター、ヒト TGF- β 2 レセプター遺伝子のプロモーター領域に特異的な PI ポリアミドを、それぞれで複数候補の転写因子結合領域を標的にして、複数個設計、合成し、それら作製した PI ポリアミドを FITC 標識し、それぞれの標的 DNA に対する DNA 結合能をゲルシフトアッセイにより評価したところ、全ての PI ポリアミドにおいて、それぞれを標的 dsDNA に付加しても DNA バンドの明確なゲルシフトは確認できなかった。また EMT を誘導した MCF10A 細胞株にそれぞれの PI ポリアミドを投与し、EMT マーカー遺伝子である SNAI1、上皮マーカー遺伝子である E-cadherin の細胞内発現量を検出したところ、発現量に有意な差は確認できず、これら合成した PI ポリアミドは EMT 抑制能を有していないと判断した。よって既に EMT 抑制能が確認されているヒト TGF- β 1 プロモーター領域に対する PI ポリアミドを使用し、ヒト iPS 細胞の誘導効率を検討した。

(2) ヒト TGF- β 1 プロモーター領域に特異的な PI ポリアミドによるヒト iPS 細胞の誘導効率
センダイウイルスベクターにより外来性リプログラミング因子を導入したヒト繊維芽細胞に対して、ヒト TGF- β 1 プロモーター領

域に特異的な PI ポリアミドを投与し、フィーダー細胞に播種してヒト iPS 誘導のための培養液で培養したところ、PI ポリアミド非投与群に比べ、PI ポリアミド投与群のアルカリフォスファターゼ陽性のコロニー数が 1.8 倍増加したことが有意に認められた。これに対し、ヒト TGF- β 1 プロモーター領域にミスマッチな PI ポリアミドを投与した群においては、アルカリフォスファターゼ陽性コロニー数の有意な差は確認されなかった(図 1)。またそれら PI ポリアミドを投与して得られたヒト iPS コロニーは免疫細胞化学法によって幹細胞未分化マーカー Nanog を発現していることが確認された。

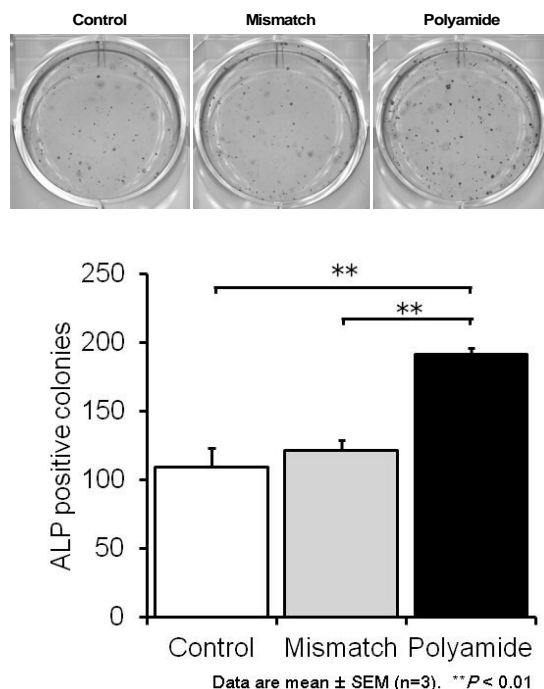


図 1: ヒト iPS 誘導過程における PI ポリアミド投与群、非投与群、ミスマッチ PI ポリアミド投与群のアルカリフォスファターゼ陽性コロニー数の割合。

(3) ヒト TGF- β 1 プロモーター領域に特異的な PI ポリアミドを投与して樹立したヒト iPS 細胞のタンパク質レベルでの機能解析、マイクロアレイを用いた網羅的解析
ヒト TGF- β 1 プロモーター領域に特異的な PI ポリアミドを投与して樹立したヒト iPS 細胞からトータル RNA を抽出し、ヒト胚葉性幹細胞の多分化能と自己増幅能に関連する遺伝子一群のマイクロアレイ解析を行った結果、ヒト iPS 細胞誘導においてその PI ポリアミドを投与すると、遺伝子プロファイルにおいては、非投与群のヒト iPS 細胞と同様の遺伝子発現の挙動を示した($R^2 = 0.99325$) (図 2)。興味深いことに、PI ポリアミド投与群において、非投与群に比べ、有意に発現の増加が見られた遺伝子は C-C motif chemokine 2 (CCL2) と C-C chemokine receptor type 7 (CCR7) (Fold changes=2.66, 2.07) であり、投

与した PI ポリアミドのヒト iPS 誘導効率増加作用に関わる遺伝子であることが示唆された。また、非投与群と比較し、三胚葉性分化マーカーの遺伝子発現の増加は認められなかった。

PI ポリアミドを投与して樹立したヒト iPS 細胞を 2 継代培養し、それらコロニーを免疫細胞化学法により解析したところ、ヒト幹細胞の未分化マーカーである Nanog, SSEA4, SOX2、Oct3/4 のタンパク質発現が確認された。

以上の結果から、本研究のヒト TGF-1 プロモーター領域に特異的な PI ポリアミドは EMT の抑制能を有し、ヒト iPS 細胞誘導効率を促進させることが確認された。よって、既存のヒト iPS 細胞誘導法にヒト TGF-1 プロモーター領域を標的とした PI ポリアミドを使用すれば、遺伝学的に安定に、高い誘導効率を望めるヒト iPS 細胞作製法の開発に有用であることが示唆された。

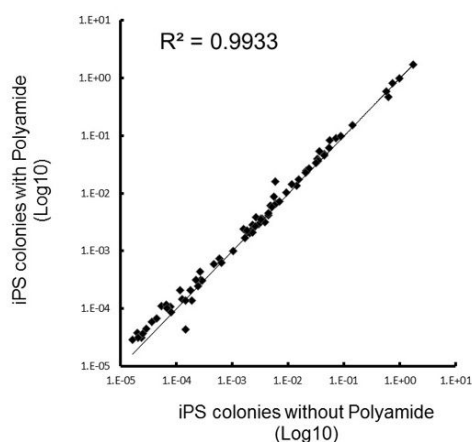


図 2 : ヒト TGF-1 プロモーター領域に特異的な PI ポリアミドを投与したヒト iPS 様細胞の胚性幹細胞の幹細胞性に関するマーカー遺伝子群のアレイ解析。

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 1 件)

Saito K, Fukuda N, Shinohara K, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M. Modulation of the EMT/MET process by pyrrole-imidazole polyamide targeting human transforming growth factor-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 査読有, 66, 2015, 112-120
DOI: 10.1016/j.biocel.2015.07.011.

[学会発表](計 1 件)

齋藤孝輔、福田昇、上野高浩、相馬正義：ヒト TGF-1 PI ポリアミドによるヒト iPS 細胞誘導効率増加作用。第 14 回 日本再生医療学会総会 2015.3.19 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 孝輔 (SAITO, Kosuke)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：80624163

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし