

平成23年 5月 24日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21790528
 研究課題名(和文) 遺伝子工学的手法を用いた再生医療における移植細胞の腫瘍形成制御システムの開発研究
 研究課題名(英文) Control of tumor formation after transplantation in regenerative therapy with genetic engineering methods
 研究代表者
 田原 強 (TAHARA TSUYOSHI)
 独立行政法人理化学研究所・分子プローブ機能評価研究チーム・研究員
 研究者番号： 20419708

研究成果の概要(和文)：

移植細胞が癌化をしてしまった場合、その細胞を特異的に殺すことができるシステムの構築が求められている。本研究では、腫瘍細胞あるいはES細胞のような未分化細胞で特異的に発現するOct3/4およびc-Myc遺伝子のプロモーター制御下に蛍光蛋白質GFPが発現できるシステムを構築した。この発現制御システムは、ES細胞においてGFPの発現が認められるが、一方正常細胞では見られなかった。すなわち、腫瘍および未分化細胞特異的発現制御システムの構築に成功したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：

Gene therapy and cell transplantation therapy is expected to be a breakthrough for treating neurodegenerative disorders, such as Parkinson's and Alzheimer's disease. In this study, I could isolate the tumor- or non-differentiated cell-specific promoter region from Oct3/4 gene promoter and make the GFP expression vector, which works only in non-differentiated cell, such as mouse embryonic EB5 cell but not mouse fibroblast Balb/3T3b cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：再生医療、がん、HSV-TK,

1. 研究開始当初の背景

再生医療の分野では共通の問題として、移植した細胞が免疫拒絶されず生着し、それが幹細胞の際は癌化せず正常な分化を遂げて増殖し、失われた機能回復に役立つのかということが中心課題と考えられている。再生医療（細胞移植）を成功させるためには、1) ES細胞の生着・分化および機能を確認する方法、2) ES細胞の癌化をモニターおよびコントロールする方法、3) 免疫拒絶の状況解析による免疫抑制剤の投与スケジュールを立てる方法などを確立する必要がある。移植実験においては、細胞の状態を観察するために動物を解剖しなければならず、同一個体での変化を追うことは容易ではなかった。とくにES細胞由来の分化細胞を移植した場合、生存や機能だけでなく、癌化することに気をつけなければならない。そのため、解剖することなく移植細胞の変化（生存、機能、癌化）を観察、癌化をコントロールすることが再生医療の精度を高めるために必要不可欠であると考えられている。しかしながら、再生医療技術向上に向けた上述の問題点を解決する発展型の研究成果は、ほとんど報告されていないのが現状である。

2. 研究の目的

癌細胞および移植細胞の腫瘍形成をコントロールするために、癌細胞および未分化細胞において特異的に機能するプロモーター制御化でHSV-TKタンパク質を発現する癌特異的発現制御システムの開発を目的とする。

2. 研究の方法

1)細胞培養

マウス胚性幹細胞 EB5 は、10% KSR、1% FCS、non-essential amino acid (1/100), pyruvate(1/100), 0.1 mM β -mercaptoethanol、LIF (2000U/ml)およびブラストサイジン (20 μ g/ml)を添加した GMEM 培地を用いて培養した。また EB5 細胞の培養には、ゼラチンコートした培養ディッシュを使用した。一方マウス繊維芽細胞 Balb/3T3 細胞は、10%FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO₂ 条件において培養した。ルシフェラーゼアッセイ用ベクターならびに腫瘍特異的 GFP 発現ベクターの細胞への遺伝子導入は、Lipofectamin2000 (Invitrogen 社)を用いて行い、導入後 6 時間で新しい培地に変えた。また安定型遺伝子導入細胞を得るために、遺伝子導入後 24 時間で培地に G418 (200 μ g/ml)を添加し培養を継続し

た。

2)マウス Genomic DNA の調製

プロモーター領域を PCR 法によって増幅するためのテンプレートとして、マウスの genomic DNA を用いる。1 x 10⁶ 細胞のマウス EB5 細胞を回収し、Gen とるくん (タカラバイオ社)を使用し、調製した。

3) プラスミドの構築

マウス Oct3/4 および c-Myc プロモーター領域を PCR 法によって増幅し、pGEM T-easy vector に組み込み、DNA シークエンサーを用いて、配列の確認を行った。目的の配列がクローニングできたことを確認した後、EcoR I - Xho I 部位を用いて、レポーターベクターである pGL4 ベクターに挿入しサブクローニングを行い、レポーターアッセイ用ベクターの作製を行った(pGL-Octp & pGL-Mycp)。また、腫瘍(未分化細胞)特異的 GFP 発現ベクターは、GFP 遺伝子を持つプラスミドを骨格に用いた。すなわちプラスミド内の GFP 遺伝子の 5'上流に、pGL-Octp から切り出した Oct3/4 プロモーター領域を繋ぐことによって作製した (pOctp-GFP)。

4) レポーター解析

pGL-p(negative control), pGL-Octp, pGL-Mycp および pRL ベクターを EB5 もしくは Balb/3T3 細胞にトランスフェクションし、16 時間培養した細胞を PBS を用いて洗浄後、Passive Lysis Buffer を加え細胞を溶解した。続いて遠心分離し、上清を酵素液とした。Photinus Luciferase および Renilla Luciferase の活性測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay System のプロトコールに従って行った。まず、酵素液と LAR II を混和し、Photinus Luciferase による発光をルミノメーターを用いて測定した。続いて Stop&Glo Reagent を添加して、Renilla Luciferase による発光を計測した。トランスフェクションの効率、内部コントロールとして Renilla Luciferase の活性により補正した。全ての実験は、それぞれ独立した実験を 3 回以上行った平均を求め、標準偏差を用いてグラフ化した。

5) 顕微鏡観察

pOctp-GFP ベクターを遺伝子導入した EB5 および Balb/3T3 細胞における GFP の発現を観察するために、細胞は観察 24 時間前に、8 ウェルチャンバースライドに播種し、24 時間後 PBS を用いて 2 度洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド(室温 15 分間)で固定した。核を染色するために、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含んだ封入剤を用いて封入し共焦点顕微鏡によって、蛍光画像の観察を行った。

4. 研究成果

1) 腫瘍特異的プロモーター活性- Oct3/4

マウス胚性幹細胞 EB5 細胞から得た Oct3/4 遺伝子プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果、ルシフェラーゼ活性は、未分化細胞である EB5 細胞において、高い値が認められた(図 1)。一方、分化細胞でかつ非腫瘍細胞であるマウス繊維芽細胞 Balb/3T3 細胞を用いて同様にルシフェラーゼアッセイを行ったところ、ルシフェラーゼ活性は示したが、EB5 細胞に比べ顕著に低い値であった。つまり、今回クローニングを行った Oct3/4 プロモーター領域が未分化および腫瘍特異的遺伝子発現調節領域である可能性が示唆された。

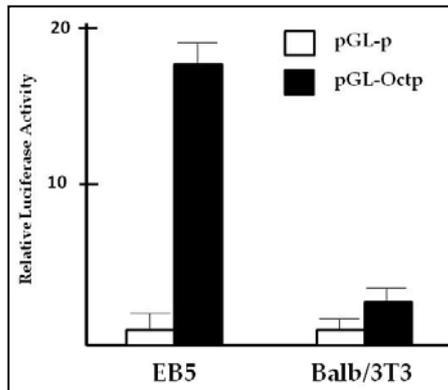


図 1
未分化細胞および Balb/3T3 細胞における Oct3/4 プロモーター活性

2) 腫瘍特異的プロモーター活性- c-Myc

Oct3/4 遺伝子プロモーター同様に、EB5 細胞から調製した。この c-Myc プロモーターを用いて EB5 および Balb/3T3 細胞におけるルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、Oct3/4 プロモーターにおいて見られたように、c-Myc プロモーターでも EB5 細胞で高い活性が見られた。しかし、その値は、Oct3/4 に比べおよそ半分であった。さらに、Balb/3T3 細胞においても、Oct3/4 プロモーターより高い活性を示した(図 2)。

すなわち、c-Myc プロモーターは、未分化細胞において高い活性を示すものの、成熟細胞においても活性を示すことから、Oct3/4 プロモーターに比べて非特異的であることが推測された。今回、クローニングを行った領域には、腫瘍(未分化)細胞特異的な領域とともに、成熟細胞においても機能する上流領域が含まれていたと考えられる。

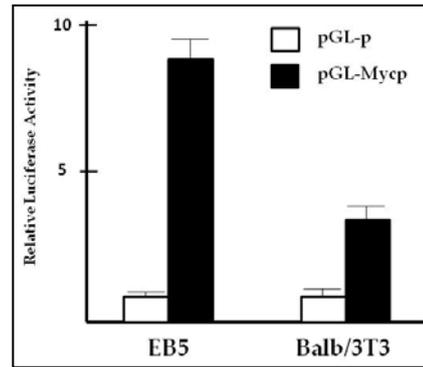


図 2
未分化細胞および Balb/3T3 細胞における c-Myc プロモーター活性

3) 未分化細胞特異的 GFP 発現ベクター

Oct3/4 および c-Myc プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果より、2 つのプロモーターのうち、未分化細胞特異的であるのは、Oct3/4 プロモーターであることが示唆されたので、Oct3/4 プロモーター制御下で蛍光蛋白質 GFP が発現するベクターを作製した。この発現ベクターを未分化細胞 EB5 および繊維芽細胞 Balb/3T3 に遺伝子導入し、それぞれの細胞における GFP の発現について検討した。

その結果、図 3 に示すように、Balb/3T3 細胞では、ほとんど GFP のシグナルは見られなかった。一方、EB5 細胞に pOctp-GFP を導入したところ、GFP のシグナルが顕著に認められた。

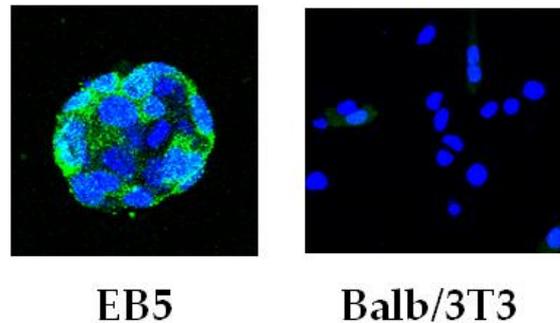


図 3
pOctp-GFP ベクター導入未分化細胞および Balb/3T3 細胞における GFP 発現
(青)DAPI 染色 ; 細胞核を示す
(緑)GFP ; GFP の発現を示す

以上の結果から、今回クローニングした Oct3/4 プロモーター領域は、未分化細胞あるいは腫瘍細胞特異的に機能すると考えられた。

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)
なし

〔学会発表〕(計0件)
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田原 強 (TAHARA TSUYOSHI)
独立行政法人理化学研究所・分子プローブ機能評価研究チーム・研究員
20419708