

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670259

研究課題名(和文) 幹細胞を用いた炎症部位特異的な新規遺伝子発現システムの開発とDDSへの応用

研究課題名(英文) Development of novel gene-switch system inducing inflammatory tissue-selective gene expression and realizing DDS for stem cell

研究代表者

橋田 充 (Hashida, Mitsuru)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20135594

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)：ES細胞、間葉系幹細胞、iPS細胞などの多分化能を有する細胞を利用した再生医療においても、従来の薬物治療と同様に、適切なタイミングで適切な量の細胞製剤を治療標的部位へ届けるドラッグデリバリーシステム(DDS)が重要である。本研究では、ユビキチンプロテアソーム経路によるタンパク質発現制御を利用して、炎症部位選択的に遺伝子発現が開始されるシステムを構築した。本システムは、炎症部位選択的な細胞製剤の接着増強や、治療分子の発現を通して、細胞製剤の新規DDSとなり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Drug delivery system (DDS) is the approach for ideally delivering adequate amounts of drug to the site for therapy at the best timing for curing. This concept would be important for cell-based regenerative therapy using multipotent stem cells such as ES cells, mesenchymal stem cells, iPS cells. In this study, we have developed the gene-switch system in which the genes of interests could selectively expressed in inflammatory tissue through the ubiquitin-proteasome system. A site specific cell adhesion and expression of therapeutic molecule at inflammatory tissue by this system will be a promising tool for establishing DDS for cell-based therapy.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：遺伝子発現制御 炎症

1. 研究開始当初の背景

ES細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞などの多分化能を有する細胞を利用した細胞治療は、次世代の治療法として期待されている。なかでも、間葉系幹細胞は、骨髄や脂肪組織から採取できるために倫理的な問題が少ないことや、免疫拒絶を受けにくいために他家移植が可能であることなどが有効であり、既にカナダや日本でも細胞製剤として販売承認されている。間葉系幹細胞は、治療のメカニズムには不明な点が残されているが、臨床研究において抗炎症作用や免疫抑制作用を有することが明らかにされている。

薬物を適切な場所へ、適切なタイミングに、適切な量を送達することにより、治療効果を最大限に引き出す概念は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) と呼ばれる。間葉系幹細胞は、白血球と同様に、炎症部位の血管内皮細胞に高発現する接着分子との結合を介してローリング、接着、浸潤すると考えられている。このことから、炎症部位の血管内皮細胞へ接着しやすいことが期待されるが、それでも、実験動物での検討で、炎症部位へ接着する細胞は投与された細胞の10%に満たないことが報告されている。したがって、細胞治療においても、従来の薬物治療と同様に、細胞製剤のためのDDSの概念が重要であると考えられる。間葉系幹細胞による治療のメカニズムには、組織細胞への分化と細胞からの治療タンパク質の分泌の両方の可能性があると考えられているが、いずれの場合も細胞を治療標的部位へ選択的に集積させること、および、治療標的部位で選択的に治療分子を発現させることの両面からのアプローチが重要であると考えられる。そこで、本研究では、疾患部位の組織において選択的に遺伝子発現が制御できるシステムの構築を目指し、疾患の発症や増悪とも関連するユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質発現制御を利用した遺伝子発現制御システムの構築を行った。

2. 研究の目的

炎症部位で選択的に遺伝子発現を開始するシステムを構築することを目的とする。接着分子や治療分子を炎症部位の局所で発現させることで、治療選択部位選択的に、細胞製剤の細胞接着を増強させたり、細胞製剤からの治療分子の発現を誘導させたりする、細胞製剤の新規 DDS の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞: Hela 細胞 (RCB2821, Riken Cell Bank) は、10%FBS および penicillin-streptomycin-L-glutamine を添加した DMEM を用いて培養した。

(2) ベクター構築: ①mKO2 (MBL) の

配列を切り出して pcDNA3.1 に挿入し、さらにヒト由来 IκBα (RDB 6668, Riken BRC) の配列を挿入することで、mKO2 と IκBα の融合タンパク質 (mKO2-IκBα) を発現するベクターを構築した。②テトラサイクリン耐性オペロンで働く tet リプレッサー (Rep) 発現ベクターおよび Rep に遺伝子発現制御に必要な配列を挿入した U-Rep 発現ベクターを構築した。③Rep の結合配列 tetO の下流にレポータータンパク LacZ 発現配列を挿入したベクターを構築した。

(3) mKO2-IκBα の蛍光イメージング: Hela 細胞に Fugene 6 (Roche) を用いてプラスミドベクターをトランスフェクションした後、共焦点レーザー顕微鏡 Nikon A1 (Nikon) で観察した。長時間観察する場合は、Stage Top Incubator (東海ヒット) を利用し、温度、湿度、CO₂ 濃度の制御を行った。得られた画像の蛍光シグナルは ImageJ で解析した。

(4) U-Rep による遺伝子発現制御の評価: Fugene 6 を用いて pLacZ と Rep または U-Rep を Hela 細胞にトランスフェクションし、レポータータンパク質として発現させたベータガラクトシダーゼの活性を X-gal 染色または LacZ の活性測定 (Beta-Glo Assay System, Promega, Tokyo Japan) により評価を行った。

4. 研究成果

IκBα は、TNFα などのサイトカインの刺激によりリン酸化、ポリユビキチン化を経てプロテアソームにより分解されることが知られている。まず、TNFα 刺激による IκBα の分解の程度と時間を評価することを目的に、Hela 細胞を TNFα 処理した後、一定時間後に細胞を回収し、得られた細胞内タンパク質中の内在性の IκBα を抗 IκBα 抗体を用いてウエスタンブロット法により評価した。その結果、TNFα 処理後、60 分間は細胞内の IκBα が減少し続けた (Fig.1)。

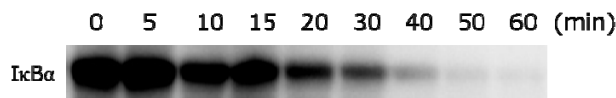


Fig. 1 Western blotting analysis of IκBα. Cytoplasmic extracts were collected at indicated time points after 5 min TNFα treatment.

次に、IκBα と蛍光タンパク質 mKO2 の融合タンパク質を発現するベクターを構築し、融合タンパク質を発現させた Hela 細胞の蛍光シグナルを顕微鏡で観察し経時的に蛍光強度を評価することで、融合タンパク質の分解を評価した。mKO2-IκBα を発現させた Hela 細胞の蛍光シグナルは、TNFα 処理後、徐々に低くなった。内在性の IκBα の減少と比較すると、減少する速度がやや遅か

った。以上の結果より、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ と蛍光タンパク質の融合タンパク質は、内在性 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の減少の程度よりやや遅いものの、 $\text{TNF}\alpha$ 処理により分解する可能性が示唆された。

次に、ユビキチン-プロテアソーム経路応答性リプレッサーU-Repを設計・作成した。コントロールには、元のリプレッサー(Rep)を使用した。レポータータンパクとしてベータガラクトシダーゼの発現配列をそのリプレッサーの結合配列tetOの下流に配したベクター(pLacZ)を構築した。Rep発現ベクターまたはU-Rep発現ベクターをトランスフェクションしたHela細胞の抽出液を電気泳動し、抗Rep抗体を用いたウエスタンブロットアッセイにより、RepまたはU-Repの発現を確認した。また、pLacZをトランスフェクションしたHela細胞をXgal染色することによりLacZの発現を確認した。

新規リプレッサーU-Repのリプレッサーとしての機能を確認するために、pLuczとU-Rep発現ベクターをトランスフェクションした細胞に対して、テトラサイクリンの添加群と非添加群でLacZの活性を評価した。テトラサイクリン添加群ではLacZの活性は認められなかったが、テトラサイクリン添加群ではLacZの活性が認められた。この結果より、Repを基盤として作成した新規リプレッサーU-Repのリプレッサーとしての機能を確認できた(Fig 2)。

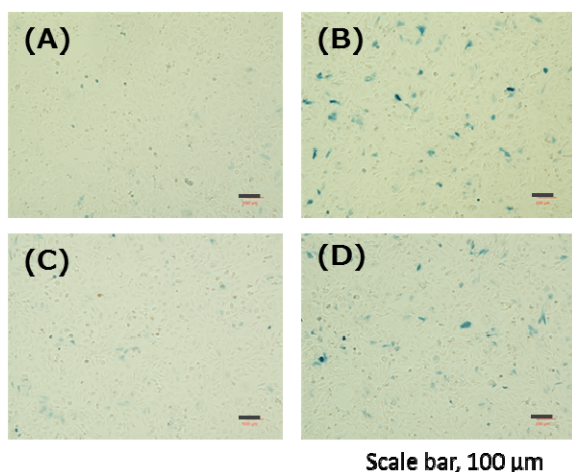


Fig. 2 Microscopic images of cells expressing β -galactosidase. Cells were transiently transfected with pLacZ and Rep expressing vector (A,B) or pLacZ and U-Rep expressing vector (C,D) following tetracycline treatments (B, D) or not (A,C). Then, cells were stained with X-gal.

そこで、pLacZとRep発現ベクターをトランスフェクションしたHela細胞に対して、 $\text{TNF}\alpha$ 処理を行った群と、 $\text{TNF}\alpha$ 処理を行わなかった群のそれぞれにXgal染色を行い比較したところ、いずれの場合もベ-

ータガラクトシダーゼの発現は認められなかった(Fig. 3A, Fig. 3B)。すなわち、Repが発現した細胞においては、 $\text{TNF}\alpha$ を添加しても遺伝子発現が開始しないことを確認した。一方、pLacZとU-Rep発現ベクターをトランスフェクションした細胞に、 $\text{TNF}\alpha$ 処理を行うとベータガラクトシダーゼの発現が認められたが(Fig. 3D)、 $\text{TNF}\alpha$ 処理を行わなかった場合はベータガラクトシダーゼの発現はほとんど認められなかった(Fig. 3C)。したがって、U-Repが発現した細胞において、 $\text{TNF}\alpha$ 処理しない場合は、ベータガラクトシダーゼの発現が抑制されているが、 $\text{TNF}\alpha$ 処理によりベータガラクトシダーゼの発現が開始されることが確認された。

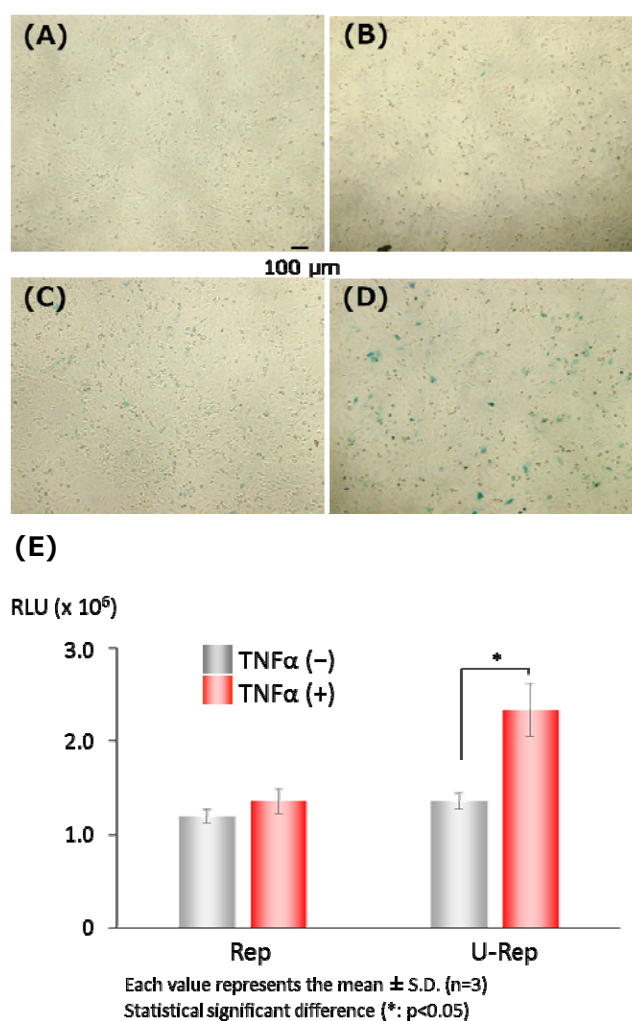


Fig. 3 Microscopic images of cells expressing β -galactosidase. Cells were transiently transfected with pLacZ and Rep expressing vector (A,B) or pLacZ and U-Rep expressing vector (C,D) following $\text{TNF}\alpha$ treatments (B, D) or not (A,C). Then, cells were stained with X-gal. Their β -galactosidase activities were examined (E). Each value represents the means \pm S.D. (n=3) ***p<0.001

次に、pLacZ と U-Rep 発現ベクターをトランスフェクションした細胞に、1 ~ 100 ng/ml の異なる濃度の TNF α 処理を行った後、Xgal 染色を行ったところ、TNF α の濃度が高い方がベータガラクトシダーゼの発現がやや高い傾向が認められた。

また、pLacZ と U-Rep 発現ベクターをトランスフェクションした細胞に TNF α 処理を行い、さらにユビキチンプロテアソーム系に特異的な阻害剤である Lactacystin を添加すると、ベータガラクトシダーゼの発現が阻害された (Fig. 4B, 4C)。以上の結果より、U-Rep による遺伝子発現制御には、ユビキチンプロテアソーム系によるタンパク質分解が関与していることが示唆された。

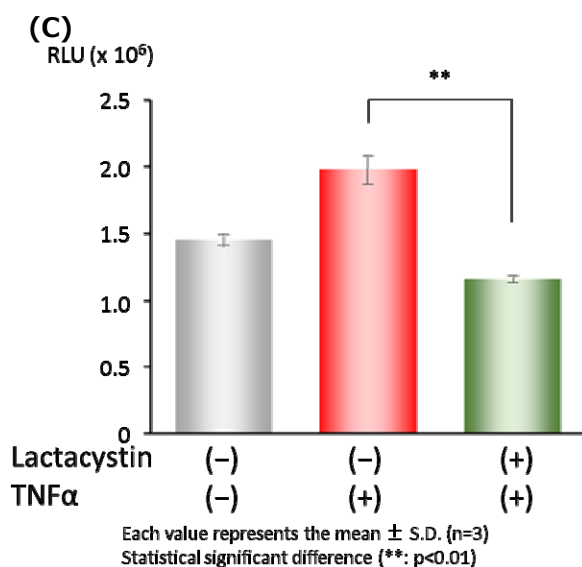
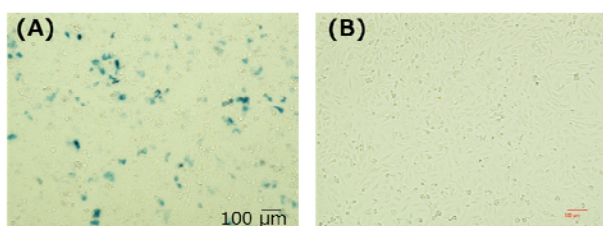


Fig. 4 Microscopic images of cells expressing β -galactosidase. Cells transiently transfected with pLacZ and U-Rep expressing vector were incubated without (A) or with (B) lactacystin following TNF α treatments. Then, cells were stained with X-gal. Their β -galactosidase activities were examined (E). Each value represents the means \pm S.D. (n=3) ***P<0.001

以上の結果より、本研究で作成した U-Rep が発現している細胞においては、レポータータンパク質であるベータガラクトシダーゼの発現が抑制されているが、その細胞に TNF α を添加すると、ユビキチンプロテアソーム経路のシグナル伝達を介した反応によりベータガラクトシダーゼの発現が開始されることを確認した。

炎症部位においては、主にマクロファージなどから TNF α が産生され、正常組織と

比較すると TNF α 濃度が高いことが知られている。したがって、本研究で作成した U-Rep 発現細胞は、炎症部位などの TNF α の濃度が高い組織において選択的に遺伝子発現を開始することが期待できる。しかしながら、本研究では、比較的高濃度の TNF α で刺激しているため、今後は、炎症組織における TNF α 濃度でも発現が開始されるような最適化が必要であると考えられる。また、現システムでは、U-Rep とレポータータンパクを発現するベクターの 2 種類のベクターを共発現させる必要があるため、U-Rep 発現ベクターと pLacZ をモル比 6:1 でトランスフェクションした。より簡便にするためには、ベクターを一体化させるなどの工夫が必要かもしれない。

以上、本研究において、ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質の分解を利用し、TNF α の添加により遺伝子発現を開始させることが可能なシステムを開発できた。

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 1 件)

- Hideyuki Nakanishi, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Targeted gene integration using the combination of a sequence-specific DNA-binding protein and phiC31 integrase. Journal of Biotechnology, 査読有, 186, 2014, 139-147
DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.07.012

[学会発表] (計 3 件)

- 橋田 充、ターゲティング型 DDS の設計と評価、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月 30 日、慶應義塾大学薬学部 (東京都)
- Mitsuru Hashida, Pharmaceutical Sciences 2020: Cutting Edge Technologies in Drug Delivery, 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2014 年 4 月 16 日、Melbourne(Australia)
- Nilufar Rahimova, Yuriko Higuchi, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Visualization of I κ B α degradation in HeLa cells with I κ B α fragments fused to mK02, 第 28 回日本薬物動態学会年会, 2013 年 10 月 9 日~11 日、タワーホール船堀 (東京都)

[その他]

ホームページ等

http://dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/Dds_Home/index.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋田 充 (HASHIDA MITSURU)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：20135594

(2)研究分担者

山下富義 (YAMASHITA FUMIYOSHI)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：30243041

樋口 ゆり子 (HIGUCHI YURIKO)
京都大学・健康長寿社会の総合医療開発
ユニット・特定講師
研究者番号：40402797