

令和元年6月18日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14582

研究課題名(和文) microRNAゲノム編集による骨髄幹細胞由来神経細胞の生存促進技術の開発

研究課題名(英文) Development of the highly viable neural cells derived from bone marrow stem cells by genome editing of microRNA

研究代表者

松村 暢子 (Matsumura, Nobuko)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：30317698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の自己幹細胞移植治療の実現を視野に入れ、幹細胞の劣化を改善するmiR-96ゲノム編集骨髄幹細胞の作成を目指した。マウス骨髄より神経細胞に分化する幹細胞を採取培養し、miR-96の遺伝子発現を欠失させるCRISPR/Cas9プラスミドを作成した。ゲノム編集や神経分化に必要な遺伝子導入効率の改善が得られ、細胞生存能力と細胞内GSHレベルを網羅的に解析するフローサイトメトリー解析法を構築した。現在、ゲノム編集した骨髄幹細胞の性状と分化誘導した神経細胞の生存能力の評価を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患への自己骨髄幹細胞移植治療を実現するには、患者の幹細胞の劣化を改善する必要がある。細胞内のGSHの上昇は細胞に酸化ストレス抵抗性をもたらし、生存を促進する。本研究は神経細胞のGSHを増やす働きをするアミノ酸トランスポーターの発現を抑制するmiR96-5pをゲノム編集により欠損させ、GSH高発現の神経細胞を産生する骨髄幹細胞の作成を目指すものであり、得られた技術は再生医療の適応を神経変性疾患治療に広げることにつながる。

研究成果の概要(英文)：Improvement of stem cell function is necessary to succeed in autologous stem cell transplantation in the neurodegenerative diseases, because the stem cells are weakened in the patient of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Glutathione (GSH) protects the cells from oxidative stress. The intracellular GSH level is regulated by cysteine transporter EAAC1 in neuron and negatively regulated by miR-96-5p. Therefore we tried to make the bone marrow stem cells which lack miR-96 by genome editing. Bone marrow stem cells which have ability to generate neurons were prepared. CRISPR/Cas9 plasmids targeting miR-96 gene were constructed. The method for estimating the GSH level and the cell viability was established by using the flow cytometry. The efficiency of gene transfection was improved by using the electroporation technique. At present, we are estimating the viability of the miR-96 deficient neurons derived from the bone marrow stem cells which lack miR-96 by genome editing.

研究分野：神経薬理学

キーワード：骨髄間葉系幹細胞 ゲノム編集 microRNA グルタチオン 神経保護

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患への自己骨髄幹細胞移植治療の実現には患者の幹細胞の劣化の改善が必要であると考えられた。この問題を解決するために生存能力の高い神経細胞を再生する移植用の骨髄幹細胞の作成を試みた。

### 2. 研究の目的

- (1) miR-96 および GTRAP3-18 による GSH レベル調節機構の骨髄幹細胞における役割の解明
- (2) miR-96-5p をゲノム編集により GSH を高発現した生存能力の高い神経細胞を産生する骨髄幹細胞を作製する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨髄の採取と骨髄幹細胞の培養

C57BL/6j マウス 8 週齢オスあるいはメスの両側の大腿骨と脛骨を摘出し、70%エタノールで滅菌後、無菌操作で PBS 洗浄し、フラッシング法にて骨髄細胞を採取する。21G 針を付けたシリンジで 5 回吸引排出を繰り返し、70 $\mu$ m メッシュを通して骨髄細胞浮遊液を得る。細胞を遠心回収し、STEMCELL TECHNOLOGIES 社の骨髄幹細胞精製用サプリメントを添加した培地で 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養する。1 週間後、継代を行い高密度にならないよう培養維持する。

#### (2) 骨髄幹細胞の神経分化誘導

培養骨髄幹細胞に Notch 細胞内ドメイン (NICD) 遺伝子発現ベクターを導入する。エレクトロポレーション法により、52%の効率で伝子導入細胞を得る。2 日後に 3 種類の神経分化因子フォルスコリン、Ciliary Neurotrophic Factor、酸性 FGF を添加し、神経細胞へ分化させる。

#### (3) ゲノム編集 CRISPR/Cas9 プラスミドの作成

ガイド RNA による認識に必要な PAM 配列 (NGG) をマウス Precursor miR-96 遺伝子の周辺に見つけ、Addgene より入手した pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 のマルチクローニングサイトに PAM 配列の上流 20 塩基の配列を組み込む。

#### (4) SSA assay

Addgene より入手した pCAG-EGxxFP プラスミドのマルチクローニングサイトに miR-96 配列を中央に配置した 655bp のゲノム配列を挿入して pCAG-EGxxFP-miR-96 プラスミドを構築する。このプラスミドは挿入した miR-96 配列に切断が生じるとホモロジーに依存した修復機構 Single strand annealing (SSA) により蛍光タンパク質の EGFP が発現するように設計してある。エンドヌクレアーゼ活性のポジティブコントロールとして Addgene より入手したプラスミド pCAG-EGxxFP-Cetn1 と pX330-Cetn1/1 を HEK293 細胞に共発現させると、エンドヌクレアーゼ活性を示す EGFP 発現が蛍光顕微鏡により確認される。

#### (5) リアルタイム PCR による miR-96-5p の定量

ゲノム編集後の骨髄幹細胞における miR-96-5p の発現量の変化は Exiqon 社の miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT microRNA PCR System および PCRLightCycler 480 を用いた定量 PCR により測定する。この時、骨髄幹細胞における発現変動の無い miRNA-423-5p をコントロール microRNA として使用する。

#### (6) ゲノムシーケンスによるゲノム編集変異の検出

ゲノム編集を施した骨髄幹細胞からゲノム DNA を抽出し、miR-96 遺伝子を含む 655bp を PCR 法により増幅する。増幅された PCR 産物を 1%アガロース電気泳動により分離回収し、遺伝子シーケンス解析を行う。配列の読みが中断される位置を変異を受けた場所と判断する。

#### (7) CMFDA を用いた細胞内 GSH レベルの評価 (2 種)

培養中の骨髄幹細胞を CMFDA 添加無血清培地中、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で 30 分インキュベートし、CMFDA を生きた細胞内に取り込ませる。CMFDA は細胞内の GSH と結合して蛍光を発する化合物である。骨髄幹細胞であることを示す CD29 陽性/CD90 陽性/CD11b 陰性細胞の GSH レベルについて①または②の方法で評価する。

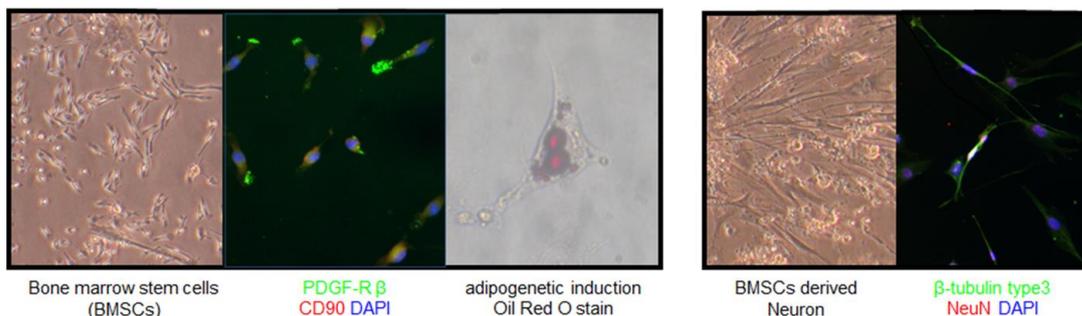
① CMFDA を取り込ませた細胞を PBS で洗浄し 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、CD29、CD90 および CD11b の免疫染色を行い、CMFDA 蛍光染色細胞像を共焦点レーザー顕微鏡 (ニコン A1) で観察する。

② CMFDA を取り込ませた細胞を Accutase で培養容器から剥離し、CD29 陽性/CD11b 陰性細胞集団の CMFDA 蛍光レベルをフローサイトメトリー (BD FACS Canto II) を用いて測定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス骨髄幹細胞および骨髄幹細胞由来神経細胞の性状解析

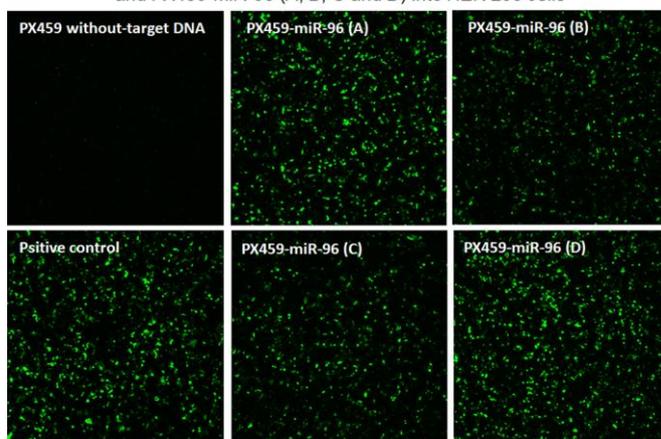
マウスの骨髄から得られた骨髄幹細胞に脂肪細胞分化能があることをマウス間葉系幹細胞機能同定キットとオイルレッドO染色を用いて確認した。骨髄幹細胞から得られた神経細胞に神経細胞特異的のマーカ-3種 ( $\beta$ -Tubulin type3、MAP-2ab、NeuN) が発現することを細胞免疫染色法により確認した。



##### (2) PX459-miR-96 プラスミドのエンドヌクレアーゼ活性の評価

miR-96-5p の発現は、ゲノム DNA から同時に転写される miR-183-96-182 クラスターが作られた後、DNA 切断酵素の Drosha により前駆体の pre-miR-96 が切り出され、Dicer により miR-96-5p が生成される。miR-96 の発現を阻止するゲノム編集の標的配列はマウス miR-96 配列中だけでなく Drosha や Dicer の認識配列にも設定が可能である。ガイド RNA の結合に必要な PAM 配列 (NGG) は相補配列も合わせてマウス miR-96 遺伝子周辺の Dicer 認識部位と miR-96 配列にかけて 4 か所見つけた。4 種類のターゲット配列をそれぞれ組み込み PX459-miR-96 (A), (B), (C), (D) と名付けた。SSA assay により 4 種類のプラスミドすべてに miR-96 ゲノム配列へのエンドヌクレアーゼ活性があり、特に PX459-miR96 (A) と (D) に強い活性を見出した。

EGFP observation after co-transfection of pCAG-EGFP-miR-96 and PX459-miR-96 (A, B, C and D) into HEK 293 cells



##### (3) ゲノム編集骨髄幹細胞の性状解析

トランスフェクション試薬 TransIT2020 を用いてゲノム編集を行った。ゲノム編集細胞の miR-96 発現レベルをリアルタイム PCR により定量したが、コントロールと比べて有意な低下は見られなかった。また、ゲノム編集細胞のゲノム DNA の挿入欠損変異を検出するシーケンス解析を行ったが PX459-miR96 (D) を用いた 1 試験にのみ変異を示唆するシーケンスの読み停止がみられたが、その後確かな再現が得られなかった。これらの原因としてトランスフェクション試薬による遺伝子導入効率が低いことが考えられた (後述)。少なくとも 50%以上の導入効率を得ることが変異の検出や miR-96 の変動解析に必要であると結論した。

##### (4) 培養骨髄幹細胞への遺伝子導入効率の改善

トランスフェクション試薬 4 種 (TransIT2020, Lipofectamine3000, FuGENE, DREAMFECT HD) の中から最高効率を得られた TransIT2020 でも遺伝子導入効率は 27% であり細胞生存率も 18% と低かった。この遺伝子導入効率の低さと生存率の低さは、ゲノム編集におけるプラスミド導入を十分なレベルで実現できない原因となっただけでなく、NICD 遺伝子導入による神経分化効率の低さの原因にもなった。そこで初代培養で遺伝子導入効率を高め細胞毒性も低いとされるエレクトロポレーション法 (ネッパジーン、NEPA21) への変更を行い、最適

条件の検討を行った結果 200V, 5ms の条件で最高導入率 52% (生存率 11%) を実現した。150V, 5ms の条件および 200V, 2.5ms の条件においてもそれぞれ高い導入効率 (40%、37%) を得、生存率は両条件ともに 21% と高まった。

#### (5) 細胞内 GSH レベルの測定

細胞内 GSH レベルの検出方法として細胞抽出液中の GSH を ABD-F で蛍光ラベル化し、Inertsil ODS-2 カラムを用いて HPLC 分離定量を行う測定系を持っていたが、骨髄幹細胞とは別の細胞種の混在を考慮し、生きた細胞の GSH を CMFDA で蛍光ラベルし、同時に特異的表面抗原で幹細胞を識別できる共焦点レーザー顕微鏡観察法を採用した。実際蛍光染色像を見てみると、骨髄幹細胞は、スピンドル型から星状型まで様々な細胞形態をとり染色強度も一様ではなかったため、顕微鏡の視野の中で定量的に蛍光レベルを評価するのが困難であることが分かった。そこで網羅的に細胞集団の蛍光強度を測定でき、骨髄幹細胞の識別が可能であるフローサイトメトリーを用いた解析方法を確立した。

現在、CRISPR/Cas9 プラスミドの導入と神経分化に用いる NICD 遺伝子導入にはエレクトロポレーション法を用い、細胞内 GSH レベルの評価にはフローサイトメトリーを用いることにより、miR-96 を欠失した骨髄幹細胞とそれから分化誘導した神経細胞の生存能力について評価を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① Nobuko Matsumura, Koji Aoyama and Toshio Nakaki. Paraxanthine elevates cysteine uptake in hippocampus slice. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, Japan, 2018
- ② 松村 暢子、木下 千智、内海 計、中木 敏夫、青山 晃治、海馬神経細胞のシステイン取り込み機構におけるカフェイン代謝物の作用、第 92 回日本薬理学会年会、2019 年 3 月大阪