

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618003

研究課題名(和文) iPS細胞の腫瘍形成の原因である「不均一性の排除」に関する研究

研究課題名(英文) Research on elimination of heterogeneity of iPS cells that is believed to be causative in the tumor formation.

研究代表者

佐藤 岳哉 (SATO, Takeya)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10312696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は、自己複製能と無限増殖能を持ち、さらにさまざまな細胞へと分化する能力も保持するため、培養条件を厳密に制御することで様々な細胞系列に分化させることが可能である。しかし、一方で移植幹細胞がその無限増殖能に起因するガン化、あるいは免疫担当細胞へと分化した結果、移植細胞が誘発した免疫反応による宿主への過剰反応などが観察されており、iPS細胞の再生医学への応用において、細胞移植の安全性を確保する必要性が指摘されている。申請者はiPS細胞の安全性を確保するために「自殺遺伝子」を組み込んだ細胞を作製し、分化させた細胞集団に残存する未分化状態細胞のみを除去する装置の有効性を検討した。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells are known to possess ability to differentiate into various types of cells and to proliferate infinitely in vitro. Whereas, these characters of iPS cells often induce tumor formation and irritable immune reactions against the host cells following differentiation into immunocompetent cells. Thus, involvement of "suicide genes" is prerequisite to reserve safety of iPS cells in the application of regenerative medicine. Our novel suicide gene approach utilizes a gene for human thymidylate kinase (tmpk) in combination with a non-toxic prodrug, azido-thymidine (AZT) which is converted into toxic metabolites, AZT-triphosphate that leads to induce cell death. We chose the CR4 promoter for tmpk gene that expresses only undifferentiated iPS cells to ensure the safety of usage of differentiated iPS cells by removing residual undifferentiated cells in the differentiated cell cluster after AZT-administration. We have validated effectiveness of our approach in vitro.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：細胞 トランスレーショナルリサーチ 再生医学 薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (Embryonic stem cells: ESCs) や 2006 年に京都大学の山中博士らにより開発された iPSCs は、試験管内で自己複製能および無限増殖能を持ち、さらに三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) を構成する細胞へと分化する能力も保持するため、培養条件を厳密に制御することで様々な細胞系列に分化させることが可能である。実験動物モデルにおける幹細胞移植実験では、脾臓や脳、心臓などの組織に移植した幹細胞が移植先組織内に定着し、正常に分化することが観察されており、これらの幹細胞が細胞移植治療における組織の供給源としての有用性が大きく期待され、その早期の実用化が待たれている。近年、ヒト胎児神経細胞を、パーキンソン病患者の線条体に移植した臨床研究によると、多くの患者において病気の症状が改善されたことが報告され、幹細胞移植の有効性が確認された。その一方でいくつかの症例においては、移植した胎児神経細胞が異常増殖し神経伝達物質を過剰に産生するために引き起こされた副作用も報告されている。上記で述べた幹細胞移植動物モデル実験においても、移植幹細胞がその無限増殖能に起因するガン化、あるいは免疫担当細胞へと分化した結果、移植細胞が誘発した免疫反応による宿主への過剰反応などが観察されており、ESCs や iPSCs の再生医学への応用において、細胞移植の安全性を確保する必要性 (安全性を高めるための装置の使用) が指摘されている。

2. 研究の目的

移植幹細胞にあらかじめ『自殺遺伝子』を導入しておき、細胞が望ましくない挙動 (ガン化、異常増殖によるホルモン、サイトカインなどの異常産生など) を起こした際にこの自殺遺伝子の作用により、移植幹細胞を体内から速やかに除去する方法である。今回の申請研究では、申請者が開発に携わってきたヒト由来の酵素 tmpk とプロドラッグに適用することで、ES/iPSCs が移植後にガン化あるいは異常増殖状態になった際には、選択的に異常増殖細胞を体内から除去する方法を確立することを目指すものである。

3. 研究の方法

本研究は、iPSCs を分化誘導し、移植に用いる際に危惧されている、未分化な細胞の残存に起因するガン化の問題を解決することを目的とする。そのために、申請者が開発してきた「細胞運命調節装置」を未分化な細胞のみに発現するに遺伝子発現ユニットを改変して、iPSCs に組み込む。この細胞を用いてプロドラッグに対する感受性が未分化状態と分化状態で異なることを確認する。

(1) 細胞システムの構築と導入遺伝子発現の確認

未分化な細胞において、活性をもつプロモーター制御下 (例: Oct4 や Nanog プロモ-

ーター、今回使用したのは CR4 プロモーター) で遺伝子発現するように細胞運命制御装置を構成する遺伝子 (活性亢進型 tmpk 遺伝子) をレンチウイルスベクターに組み込み、組換えレンチウイルスを作製する。このベクターには遺伝子導入細胞を選別するための Puromycin 耐性遺伝子が組み込まれている。対照として、恒常的に転写活性をもつプロモーター制御下 (EF1- α) で同様の遺伝子発現ユニットを持つ組換えレンチウイルスベクターを用いる。これらのウイルスをマウス iPSCs に感染させる。遺伝子導入の確認は、導入した tmpk 遺伝子の発現で判断する。すなわち、tmpk に対する特異抗体を使用して、遺伝子導入細胞抽出液の Western blot 解析を行い、tmpk 遺伝子の発現を確認する。

(2) 未分化条件培養における細胞運命制御装置導入 iPSCs の細胞死誘導の確認

マウス iPSCs の場合、ゼラチンコート培養皿上、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) 存在下で iPSCs を培養すると、未分化状態が維持される。この培養条件で細胞運命制御装置導入 iPSCs の培養を行い、種々の濃度のプロドラッグ (AZT) 存在下で一定期間培養を行う。その後、薬剤による細胞死誘導を MTT 法により定量し、細胞運命調節装置 (tmpk) の効果を比較する。

(3) 分化培養条件における「細胞運命制御装置」導入 iPSCs の選択的細胞死誘導の確認 (未分化な細胞のみが除去されることを確認)

マウス iPSCs の場合、(2) の培養条件から LIF を除去し、通常の培養皿上で培養することで iPSCs は分化する。本試験研究に用いる iPSCs は未分化状態では、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子が発現し、緑色蛍光が観察されるが、分化するとそれは消失する。これをマーカーとして、細胞の分化状態を判別する。ここに (2) で決定した適切な濃度のプロドラッグを添加し、一定期間培養を行う。その後、EGFP の発現量を目印として、未分化、分化状態の細胞をフローサイトメータを用い区別する。さらに、それぞれの区分におけるプロドラッグ (AZT) 処置による細胞死誘導を蛍光標識 Annexin V を用いて細胞染色を行い、フローサイトメータで測定し、未分化細胞画分において細胞死誘導が起きていることを確認する。

4. 研究成果

(1) 細胞システムの構築と導入遺伝子発現の確認

新規活性亢進型 tmpk 遺伝子を部位特異的変異法により作製した。新規活性亢進型遺伝子の細胞死誘導活性を従来の tmpk 遺伝子のそれと比較検討するために、この

遺伝子を保持するレンチウイルスベクターを構築し、組換えレンチウイルスを作製した。従来の tmpk と新規活性亢進型 tmpk ウィルスそれぞれ iPSCs に感染させた。これらの遺伝子導入細胞抽出液を作製し、細胞内における tmpk の発現の確認を行うために、tmpk に対する特異抗体を使用して、遺伝子導入細胞抽出液の Western blot 解析を行った。今回の検討に持ち用いた細胞の培養条件では、細胞は未分化状態を維持しているため、CR4 プロモーターおよび EF1- α プロモーター制御下で発現する tmpk 遺伝子のタンパクレベルでの発現については、プロモーターの差異による違いは認められず、両プロモーター制御下で tmpk 遺伝子の発現が確認できた。

(2) 未分化条件培養における細胞運命制御装置導入 iPSCs の細胞死誘導の確認

種々の AZT 濃度で細胞を LIF 存在下で未分化状態を維持し、4 日間培養を行った。その後細胞の生存率を MTT 法を用いて、定量を行い、導入遺伝子の違いによる AZT の細胞死誘導活性の感受性の違いについて検討を行った。その結果、遺伝子を導入しないものでは、AZT による細胞死は、検討した AZT の濃度範囲内(最大 10 mM)において認められなかった。従来の tmpk 遺伝子導入細胞においては、IC50 濃度が 20 μ M であった。新規活性亢進型 tmpk 発現細胞は、IC50 濃度が 2 μ M であった。これらことから、今回の研究で作製した新規活性亢進型 tmpk は、従来のものよりも約 10 倍の細胞死誘導活性を持つ。すなわち、従来の 1 / 10 の薬剤量で従来と同様の細胞死を誘導することが可能であるということを示した。

(3) 分化培養条件における「細胞運命制御装置」導入 iPSCs の選択的細胞死誘導の確認(未分化な細胞のみが除去されることを確認)

iPSCs の胚葉体を形成後、LIF を抜いた培地で細胞を維持すると、未分化マーカーである EGFP の蛍光が消失した細胞、すなわち分化した細胞が観察された。これらの細胞の抽出液を作製して、分化および未分化の条件で培養した細胞における tmpk の発現を、tmpk に対する特異抗体を使用して、Western blot 解析を行った。その結果、分化培養条件で培養を行った場合に、CR4 プロモーターで発現制御される tmpk 遺伝子の場合、未分化培養条件で培養を行った場合に比して、tmpk 遺伝子の発現がほぼ消失していることを確認した。一方、恒常的に遺伝子発現を可能にする EF1- α プロモーターで発現制御される tmpk 遺伝子は、分化の有無にかかわらず、その発現が認められた。これらの細胞における AZT による

未分化細胞の選択的除去については、現在確認をすすめているところである。

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 6 件)

1. Sato T., Neschadim A., Lavie A., Yanagisawa T., Medin JA. The Engineered Thymidylate Kinase (TMPK)/AZT Enzyme-Prodrug Axis Offers Efficient Bystander Cell Killing for Suicide Gene Therapy of Cancer. PLOS ONE 8, e78711 (2013).

査読有り

DOI: 10.1371/journal.pone.0078711

2. Katsushima Y.,[†] Sato T.,[†] Yamada C., Ito M., Suzuki Y., Ogawa E., Sukegawa I., Sukegawa J., Fukunaga K., Yanagisawa T. Interaction of PICK1 with C-Terminus of Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor (GHRHR) Modulates Trafficking and Signal Transduction of Human GHRHR. J. Pharmacol. Sci., 122, 193-204 (2013).

査読有り

DOI: 10.1254/jphs.12287FP

3. Goto T, Chiba A, Sukegawa J., Yanagisawa T., *Saito M, Nakahata N. Suppression of adenylyl cyclase-mediated cAMP production by plasma membrane associated cytoskeletal protein 4.1G. Cell Signal. 25,690-697 (2013).

査読有り

DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.11.020.

4. Neschadim A., Wang JCM., Sato T., Fowler DH., Lavie A., Medin JA. Cell Fate Control Gene Therapy Based on Engineered Variants of Human Deoxycytidine Kinase. Mol Ther. 20(5), 1002-1013 (2012).

査読有り

DOI: 10.1038/mt.2011.298.

5. 佐藤岳哉 ミトコンドリア品質管理機構の分子薬理学的研究 PCEM

(Tohoku University) 31, 25-29
(2012)

査読有り
URL, DOI:無し

6. Kuramasu A., Sukegawa J., Sato T., Sakurai E., Watanabe T., Yanagisawa T., Yanai K. The hydrophobic amino acids in putative helix 8 in carboxy-terminus of histamine H3 receptor are involved in receptor-G-protein coupling. Cell Signal. 23, 1843-1849 (2011).

査読有り

DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.06.021.

[学会発表] (計 10 件)

1. 佐藤岳哉 高活性化 TMPK と AZT による遺伝子治療法は、Bystander 効果によりガンに対する治療効果を発揮する 第 87 回日本薬理学会 年会 2014/3/19-21 仙台市
2. 柳澤輝行 カリウムチャネル開口薬の発見、開発、進歩 第 87 回日本薬理学会 年会 2014/3/19-21 仙台市
3. 柳澤輝行 基礎医学研究・教育と薬理学会とを活性化する方略 第 87 回日本薬理学会 年会 2014/3/19-21 仙台市
4. 佐藤岳哉, 野村亮介, 久志本成樹, 柳澤輝行 AZT 活性化体細胞内蓄積はミトコンドリア呼吸能低下をもたらす 第 64 回 日本薬理学会北部会 2013/9/13 旭川市
5. 野村亮介, 久志本成樹, 柳澤輝行, 佐藤岳哉 AZT active metabolite impairs mitochondrial quality control system 第 86 回日本薬理学会 年会 2013/3/21-23 福岡市
6. 佐藤岳哉, 伊東萌, 助川淳, 柳澤輝行 PICK1 と GHRHR の相互作用による受容体作動活性の調節 第 63 回 日本薬理学会北部会 2012/9/14 新潟市
7. 野村亮介, 久志本成樹, 柳澤輝行, 佐藤岳哉 AZT 誘発酸化ストレス応答遺伝子の発現解析 第 63 回 日本薬理学会北部会 2012/9/14 新潟市
8. 佐藤岳哉 ミトコンドリア品質管理機構の分子薬理学的研究 第 63 回東北臨床超微細形態懇話会 2012/6/28 仙台市
9. 佐藤岳哉, 伊東萌, 鈴木夕起, 助川淳, 柳澤輝行 PICK1 と GHRHR の相互作用は GHRHR の細胞表面発現を制御する 第 85 回日本薬理学会 年会 2012/3/14-16 京都市
10. 野村亮介, 久志本成樹, 柳澤輝行, 佐藤岳哉 AZT 誘発ミトコンドリア機能不全の機能解析 第 85 回日本薬理学会 年会 2012/3/14-16 京都市
11. 柳澤輝行, 野村亮介, 助川淳, 佐藤岳哉 AZT 誘発致死性ミオパチーは酸化ストレスにより誘発される 第 41 回 日本脈管作動

- 物質学会 年会 2012/2/10-11 秋田市
12. 佐藤岳哉, 野村亮介, 助川淳, 柳澤輝行 AZT 誘発心筋ミトコンドリア機能障害は酸化ストレスによるものである。第 62 回日本薬理学会北部会 2011/9/29-30 仙台市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/medical/11/index.html>
http://www.molpharm.med.tohoku.ac.jp/fe_n_zi_yao_lihomupeji/HOME.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 岳哉 (TAKEYA SATO)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 10312696

(2) 研究分担者

柳澤 輝行 (TERUYUKI YANAGISAWA)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90133941

(3) 連携研究者

助川 淳 (JUN SUKEGAWA)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 30187687