

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592675

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した角膜上皮幹細胞の ex vivo expansion法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for ex vivo expansion of corneal epithelial cells

## 研究代表者

川崎 諭 (KAWASAKI, Satoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授(常勤)

研究者番号：60347458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療やEx vivo遺伝子治療では効率良い細胞増殖が必須の条件となる。本研究では低分子による細胞増殖促進を目指して、スクリーニングに供する細胞の構築を行った。骨肉腫患者由来の細胞株にテトラサイクリン(Tet)誘導下に癌抑制遺伝子であるレチノブラストーマ(pRb)タンパクが発現するように構築した。TetによりpRbタンパクを誘導すると予想通り細胞老化が誘導され細胞面積が増加した。この細胞において、Tetとともに低分子化合物を添加して細胞増殖の抑制が起こらない場合、pRbを阻害していると推察される。48個のクローンのうち、特に良いクローンではZ'値0.8という良好な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In regenerative medicine, efficient cell proliferation is a very important factor. In the present study, we focused on constructing cells for the screening of small-molecule drugs that enhance cell proliferation. Cells were constructed to express the well-known tumor-suppressor retinoblastoma (pRb) protein by introducing the RB1 gene that is regulated under the control of tetracycline to an osteosarcoma cell line. As expected, when pRb protein was expressed in the constructed cell by adding tetracycline, cell proliferation arrest and cell senescence was induced in the cells. If cell proliferation can be observed when simultaneously adding tetracycline and certain small-molecule drugs to the cells, the small-molecule drug may have an inhibitory effect on the pRb protein in terms of the arrest of cell proliferation. Among the 48 clones that we obtained, the best clone achieved 0.8 in Z' value. The cells may be useful for the screening of small-molecule drugs to inhibit pRb protein.

研究分野：再生医療、創薬、分子生物学

キーワード：再生医療 膠様滴状角膜ジストロフィ レチノブラストーマ 細胞老化 創薬

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療において細胞増殖の促進は極めて重要かつ本質的な課題である。我々がこれまで研究対象として分子病態解明などを行ってきた膠様滴状角膜ジストロフィ (GDLD) は常染色体劣性遺伝疾患であり、責任遺伝子である TACSTD2 遺伝子の両アレルの機能喪失性変異によって生じる。そのため、GDLD はかねてから遺伝子治療の良い適応であると考えられてきた。

細胞増殖は主に 2 つのバリアが存在し、それぞれ M1 (Senescence) と M2 (Crisis) と呼ばれている (図 1; Ramirez et al, Oncogene. 2003)。M1 バリアには主に TP53 (タンパクでは p53) と RB1 (タンパクでは レチノブラストーマタンパク; pRb) の 2 つの癌抑制遺伝子が関与しており、M2 バリアには主にテロメアの短縮が関与している。

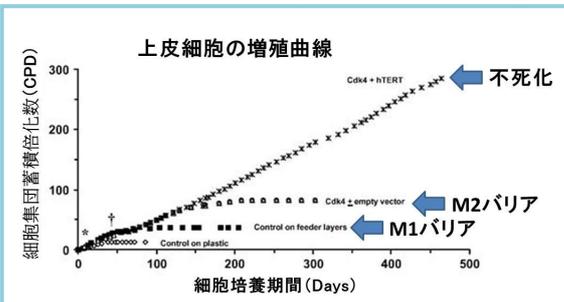


図1 細胞増殖にはM1およびM2の二つのバリアが存在する。(Ramirez et al, 2003を改変)

iPS 細胞は内在的に不死化した状態にあり無限に増殖するが、一方で現行の再生医療で用いられる体性幹細胞は不死化しておらず有限増殖であるため、上記 2 つのバリアにより細胞増殖は大きく制限される。特に M1 バリアは細胞増殖亢進状態のような癌細胞類似の挙動に対して極めて鋭敏に反応して細胞増殖不能状態へと導く (Courtois-Cox et al, Oncogene. 2008) ため、体性幹細胞を体外で増殖させる際には大きな障壁となる。また生体内で生じる創傷治癒反応においても細胞増殖が不十分な場合には良好な治癒が得られにくい、これにも M1 バリアが関与している可能性がある。M1 バリアを阻害する薬剤はこれらの状況に対し有益となる可能性がある (図 2)。GDLD に対する遺伝子治療を考える場合、ex vivo での細胞老化の抑制が重要な課題となる。

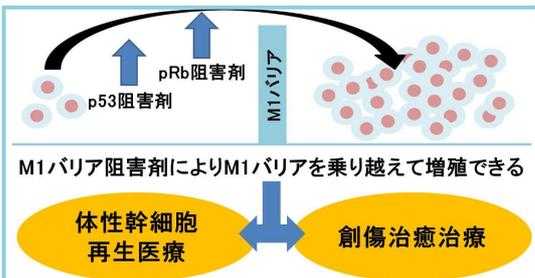


図2 M1 バリア阻害剤による臨床応用の可能性

### 2. 研究の目的

遺伝子治療などを併用する体性幹細胞による再生医療においては、ex vivo で細胞培養や薬剤による細胞選択を行う過程において高頻度に細胞老化が生じる。そのため、細胞増殖を促進する技術の確立を行う。研究計画当初は RNA を遺伝子導入することを計画していたが、細胞内での RNA の安定性や RNA トランスフェクションの効率などの観点、汎用性、および今後の臨床現場での利用を想定した中長期的な視点などから低分子阻害剤による細胞増殖亢進を目的とすることとした。

細胞増殖を促進させるためには、単純には増殖因子や血清などの栄養因子により増殖シグナルを亢進させればよいが、増殖シグナルの異常亢進は特に in vitro において細胞にとって癌化の兆候として感知されるため、それを阻害しようとしてサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害物質 (CKDI, p15, p16, p18, p19, p21, p27 など) が発現し、最終的に細胞老化やアポトーシスへと誘導される。(図 3) この時、細胞老化への制御分子とし

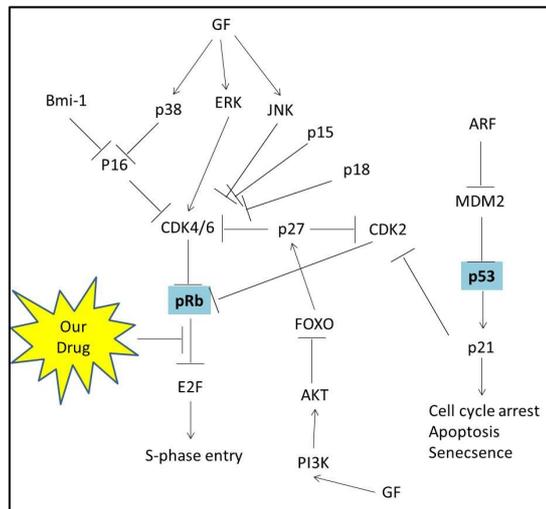


図3 細胞周期、細胞老化、アポトーシスに関わるシグナル経路と開発目標薬剤

て最も重要なのは M1 バリア因子である p53 と pRb であり、癌抑制遺伝子でもあるこれら 2 つを抑制すると細胞分裂寿命は著明に延長する。いくつかの癌ウイルスではこれらの 2 つの癌抑制遺伝子を阻害することで癌化を引き起こすことが知られている。

M1 バリア因子のうち p53 については既にピフィスリン (Komarov et al, Science. 1999) とピフィスリン μ (Strom et al, Nat Chem Biol. 2006) の 2 つの阻害剤が低分子ライブラリのスクリーニングによって得られており、放射線治療や化学療法時の正常組織の保護や神経変性疾患、脳梗塞などへの有効性 (Gudkov and Komarova, BBRC. 2005) が示されている。p53 は M1 バリアメカニズムのうち、主に細胞老化やアポトーシスの誘導を担当しており、一方で pRb は転写因子 E2F の転写活性を抑制することで細胞周期

を直接停止させており、主に細胞増殖阻害を担当している。そのため p53 阻害剤単独では再生医療や創傷治癒治療で要求される細胞増殖促進を満たすには不十分であると考えられ、もう一つの M1 バリア因子である pRb の阻害剤の存在が極めて重要となる。そこで本研究では pRb に対する低分子阻害剤の開発を行うこととした。予測される阻害剤の阻害メカニズムであるが、pRb と E2F が結合する領域に入り込んで阻害する、いわゆる PPI (Protein-Protein Interaction) の阻害を予想している。(図 4、図 5)

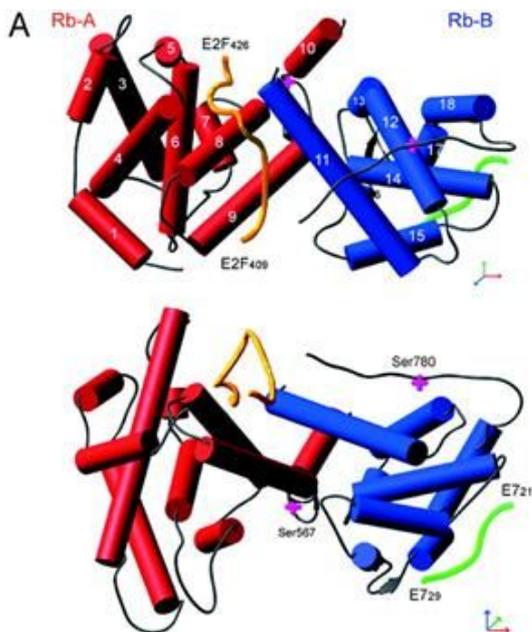


図 4 pRb (赤・青) と E2F (オレンジ) との相互作用。(Xiao et al, PNAS, 2003 より引用)

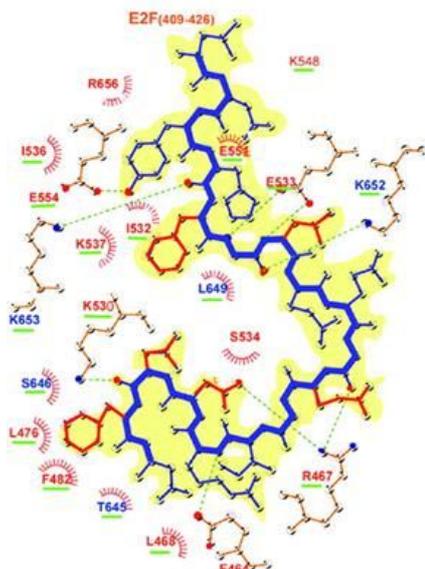


図 5 pRb と E2F との相互作用。緑点線は水素結合を、赤のスポークは疎水結合を示す。pRb 阻害剤はこれらの結合を阻害するものと推察される。(Xiao et al, PNAS, 2003 より引用)

pRb は細胞増殖を抑制するため、その阻害剤は細胞増殖を高める作用をもつ。そのためセルベースアッセイを用いる限り、低分子化合物の添加前には増殖せず、添加後に低分子化合物が pRb を阻害する場合に細胞増殖が生じる系を構築することとなる。そのため、アッセイに用いる細胞は低分子化合物の添加前には増殖しないことが要求される。一方でアッセイ系を構築する過程においては、通常クローニング等により細胞を単離した後にアッセイに必要な細胞数にまで細胞を増やすこととなるため、アッセイに用いる細胞は増殖する能力(できれば不死化の状態であることが望ましい)をもつ必要がある。この相反する性質をいかに達成するかがアッセイ系構築の上での最大の鍵であると言える。今回、我々が考案したアッセイシステム(図 6)では、ベースとなる SaOs-2 細胞は骨肉腫患者由来の無限増殖細胞株で内因性の p63 および pRb 機能を欠如しており、この細胞にテトラサイクリンの誘導下に野生型 pRb を発現させることで細胞増殖を阻害する仕組みとした。クローニングからアッセイまでの間はテトラサイクリンを加えずに増殖させ、低分子化合物を添加すると同時にテトラサイクリンを加えて pRb を発現させることで細胞増殖を阻害するようにしている。もし低分子化合物の添加により細胞増殖が促進すればその低分子化合物は pRb の阻害作用を持つ可能性が高いと言える。

### 3. 研究の方法

以下のすべての遺伝子組み換え実験は、大阪大学医学系研究科の病原体等安全管理委員会の承認を得た上で適切に行った。

内在性の p53 と pRb の発現を欠失している細胞株である SaOs-2 細胞を用いて、テトラサイクリン誘導下に RB1 遺伝子を発現する細胞株、SaOs-2\_Teton\_RB1 細胞を作成した。まず、HeLa 細胞から抽出した mRNA から cDNA を合成した。これをアガロースゲルで電気泳動して切り出し、精製後にエンターベクターである pENTR/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific 社製) に組み込んだ。これを大腸菌に形質転換して、コロニー PCR にてスクリーニングして、サンガーシーケンスにより変異のないプラスミド、pENTR\_RB1 を得た。これをテトラサイクリン誘導性レンチウイルスである pLenti6.3/T0/V5-DEST (Thermo Fisher Scientific 社製) に LR 交換反応によって組み替え、大腸菌に形質転換して、サンガーシーケンスによる確認の後、最終的にプラスミド pLenti6.3/T0\_RB1 を得た。

293T 細胞にパッケージングプラスミドミックス (pLP1, pLP2, pLP/VSVG; Thermo Fisher Scientific 社製) と pLenti6.3/T0\_RB1 プラスミドまたは pLenti3.3\_TR プラスミドをトランスフェクションして、48 時間後におのおののウイルス液を得た。ウイルス液をポリブレン存在下に

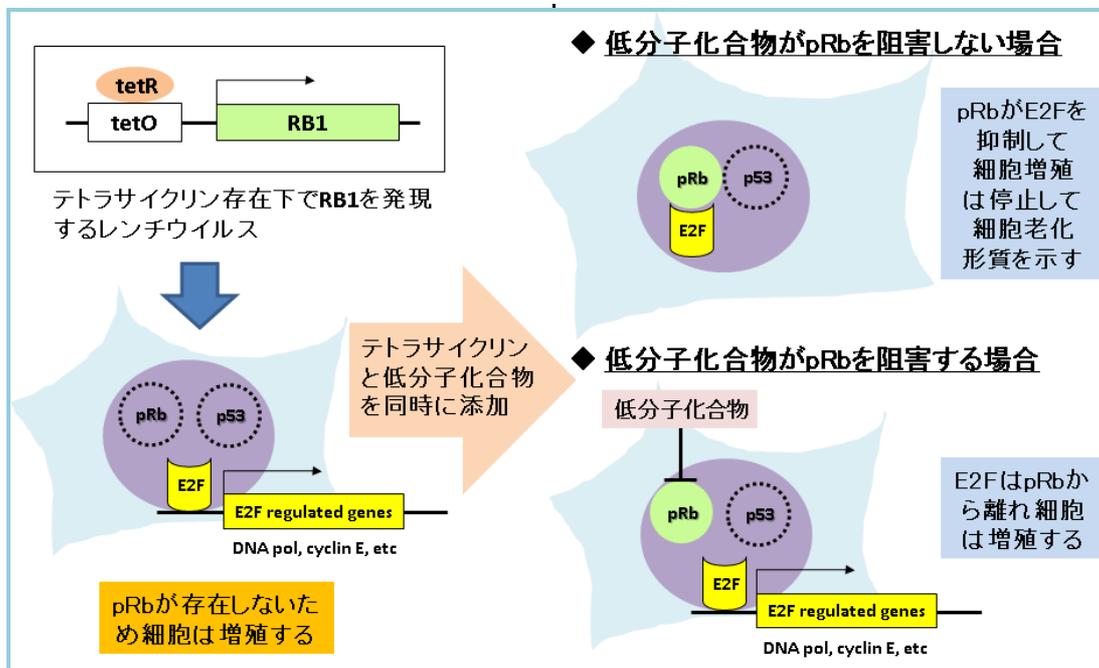


図6 我々が考案したアッセイシステム

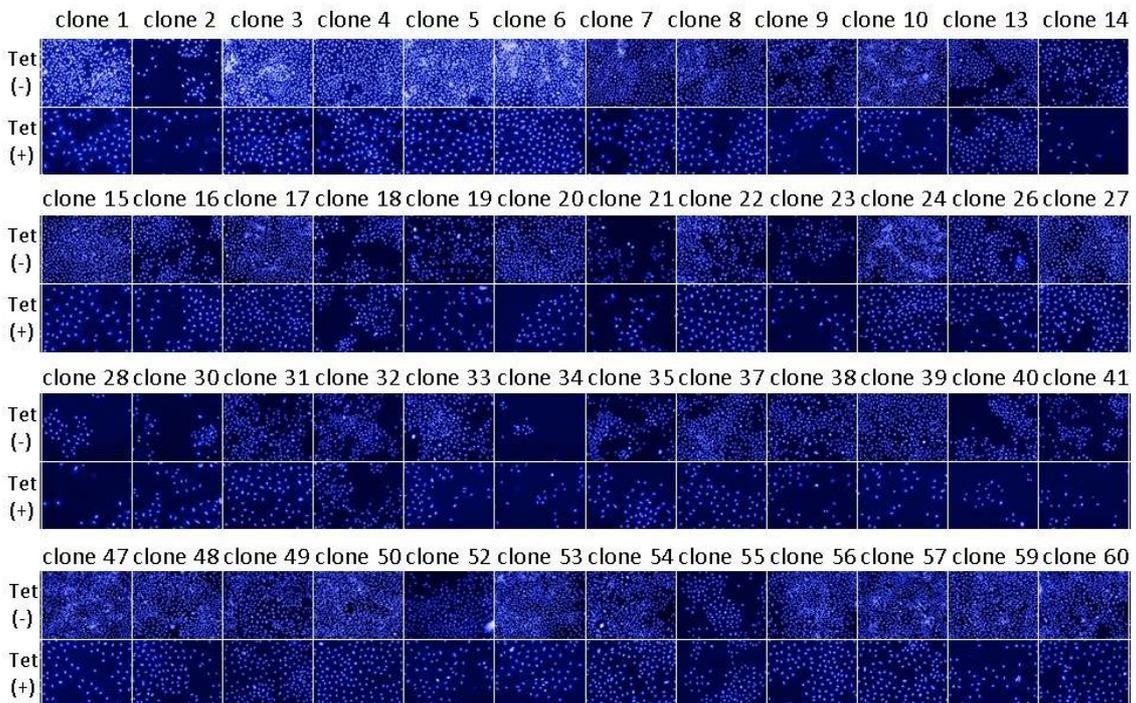


図7 SaOs-2\_Teton\_RB1 を2週間薬剤選択し、クローニングによって増殖活性の高い48クローンを得た。(未発表データ)

SaOs-2 細胞に24時間感染させ、培地交換して3日間の養生培養の後に薬剤選択(Blasticidine-SとG418)を2週間行った。薬剤選択後の細胞を10cmシャーレに5000個播種し、2週間培養してシングルクローンを53個得た。(図7)

得られた53個のクローンのうち、増殖活性の高い48クローンを96ウェルプレートに播種し、テトラサイクリン誘導を6日間行い、洗浄の後、パラホルムアルデヒド固定を行い、Hoechst33342蛍光染色を行った。テトラサイ

クリン誘導前後の細胞面積を指標としてZ', S/B値、CV値を計算し、薬剤スクリーニングに適切なクローンを選択した。(図8)

#### 4. 研究成果

薬剤選択後のSaOs-2\_Teton\_RB1細胞にテトラサイクリンを添加してRB1遺伝子の発現を誘導すると、経時的に細胞は大型化して、細胞老化に特徴的な形態を示した。(図9) またSA-beta Gal染色を用いて細胞老化が起きているかどうかを調べたところ、テトラサイ

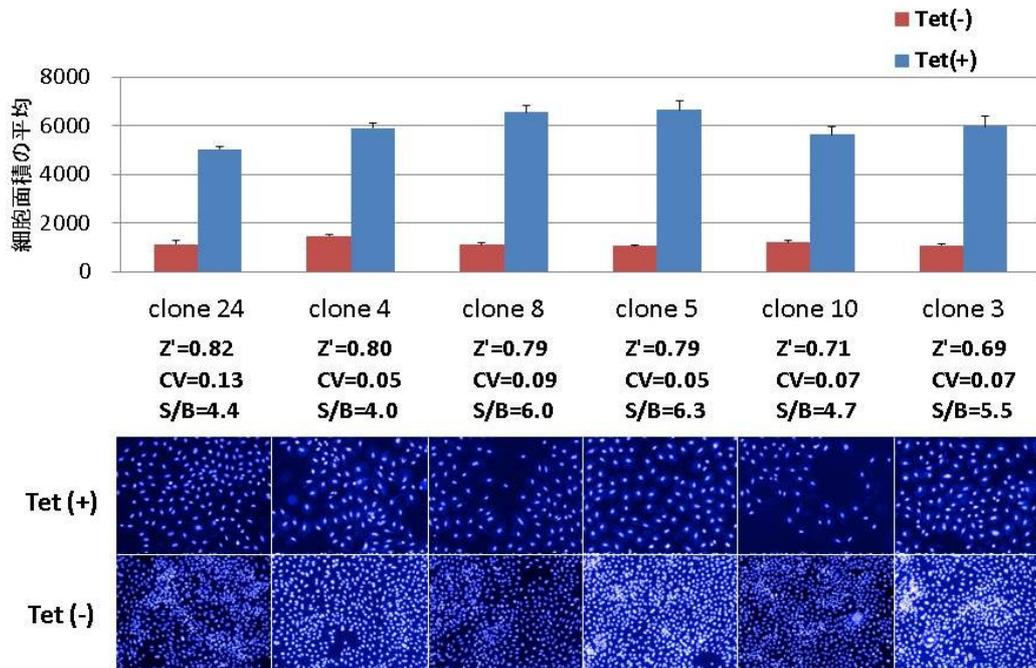


図8 Z'値(細胞面積)上位6クローンのZ'値、S/B値、CV値とテトラサイクリン誘導前後の細胞形態。総じて良好な値を示している。

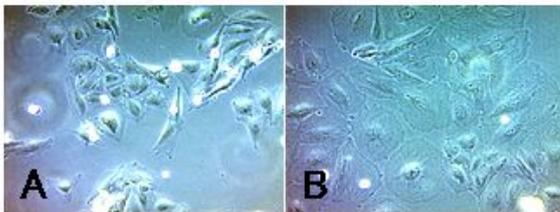


図9 SaOs-2細胞にRB1を強制導入するとBのように老化形質を示した。AはGFPを強制導入したSaOs-2細胞で老化形質は示さない。

イクリン誘導5日後には多くの細胞が青色に染色された。(図10)さらにKi67抗体により、細胞増殖活性を調べたところ、テトラサイクリン誘導前には90%の細胞がKi67陽性であったのに対し、テトラサイクリン誘導後には30%の細胞しかKi67陽性とならず(図11)テトラサイクリンによりpRBを発現誘導すると細胞増殖を阻害して細胞老化へと至ることが明らかとなった。よって、我々が構築し

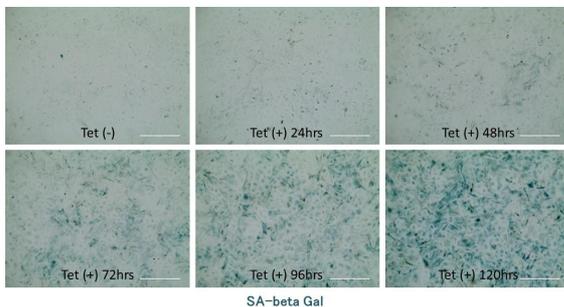


図10 SaOs-2\_Tet RB1細胞をテトラサイクリンにてRB1遺伝子発現を誘導したところ、5日後には多くの細胞がSA-beta Gal陽性となった。(青色)

たSaOs-2\_Tet RB1細胞ではRB1遺伝子の発現により細胞増殖の停止に加えて細胞老化が誘導されることが明らかとなった。

図8、図9に示すように、細胞老化によって細胞が著明に大型化するため、細胞面積を指標としていくつかのクローンで良好な創薬パラメータ( $Z' > 0.5$ ,  $S/B > 3.0$ ,  $CV < 0.1$ )が得られた。(図12)一方で細胞老化をエンドポイントとして評価系を構築することには、細胞老化を導くための時間が長いとい

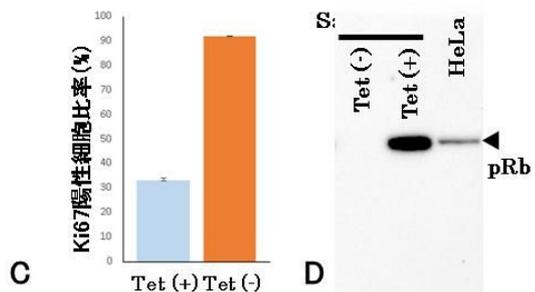
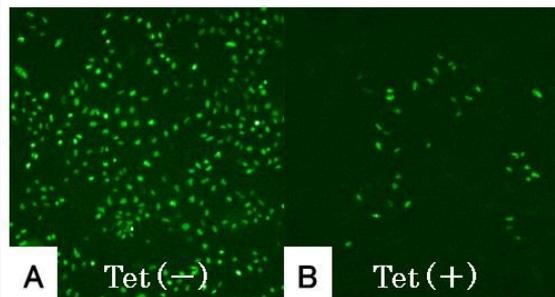


図11 A, B, C: SaOs-2\_Tet RB1細胞をテトラサイクリンにてRB1遺伝子発現を誘導したところ、細胞増殖マーカーであるKi67陽性の細胞が減少した。D: テトラサイクリンによりpRBが誘導されている。

う大きな不安がある。実際のスクリーニングにおいては、低分子化合物を入れたまま培地交換を数日間行わないというのは、細胞培養培地の劣化や、化合物の安定性、細胞毒性などの観点から様々な問題が顕在化しやすい状況であり、望ましくないからである。しかし2日程度の短期間のpRb発現でも細胞老化を誘導することができるのであれば、その時点で培地交換を行うことができるため、スクリーニングに供することが可能となる。そこで、リアルタイムに撮影を行うことができる培養装置（IncuCyte™ZOOM、エッセンバイオサイエンス社製）を用いて、テトラサイクリン誘導によるpRbの発現はどの程度の日数で細胞老化を誘導できるかを検討した。結果として、2日間程度の短期間のテトラサイクリン誘導では細胞老化へとコミットさせることは困難であり、5から6日間程度の誘導が細胞老化の誘導に必要であることが明らかとなった。そのため、実際のスクリーニングにおいても、テトラサイクリンと低分子化合物を5から6日間程度添加した状態を維持する必要がある。まずは千個程度の化合物にて



**図 12 細胞面積を指標として、48 個の SaOs-2\_Teton\_RB1 細胞について薬剤スクリーニング指標 (Z', S/B, CV) を調べた。基準値 (Z' >0.5, S/B>3.0, CV<0.1; 青線で表示) を満たすクローンがいくつか得られた。**

スクリーニングを行い、この問題が致命的と判断されれば、別のエンドポイントを考慮するべきであると考えられる。

別のエンドポイントとしては、上記のように細胞老化という late marker をエンドポイントとして用いるのではなく、E2F の転写活性という early marker をエンドポイントとして用いることを考えている。E2F は転写因子であり、pRb が CDK によりリン酸化されると、遊離して転写活性をもつようになる。E2F の DNA 結合配列は既に解明されており、結合配列を複数個タンデムに結合させた配列にレポーター遺伝子をつなげたレポーターカセットも数社から市販されている。

具体的には、プロモーターを含まないレンチウイルスベクターに上記レポーターカセットを組み込み、これを SaOs-2\_Teton\_RB1 細胞に感染させた後にクローニングしてス

クリーニングに供することを考えている。pRb-E2F の結合を阻害する化合物を加えた時には、E2F が遊離して GFP が発現することになるので、そこをエンドポイントとする。

また今後行う薬剤スクリーニングについては、大阪大学は創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業 (AMED) における制御拠点・ライブラリー・スクリーニング領域を担当しており、技術支援や化合物使用の支援を得て行う予定としている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kitazawa K, Kawasaki S, Shinomiya K, et al, Establishment of a human corneal epithelial cell line lacking the functional TACSTD2 gene as an in vitro model for gelatinous drop-like dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Aug 23;54(8):5701-11. (査読有) doi: 10.1167/iovs.12-11043.

Jongkhajornpong P, Lekhanont K, Ueta M, Kitazawa K, Kawasaki S, Kinoshita S, Novel TACSTD2 mutation in gelatinous drop-like corneal dystrophy. Hum Genome Var. 2015 Nov 26;2:15047. (査読有) doi: 10.1038/hgv.2015.47.

〔学会発表〕(計 2 件)

Kawasaki S, Theoretical Assessment for the Gene Therapy of Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2014.5.5, Orange County Convention Center, Orland, FL  
川崎 諭, 膠状滴状角膜ジストロフィの遺伝子治療の可能性について、日本眼科学会総会、2015.4.16、ロイトン札幌、札幌

〔図書〕(計 2 件)

井上 幸次 (編集者), 大橋 裕一, 雑賀 司珠也, 川崎 諭 他, 中山書店, 角膜混濁のすべて, 2014, 302  
木下 茂 (編集者), 横井 則彦, 外園 千恵, 川崎 諭 他, MEDICAL VIEW, 角膜疾患 外来でこう診てこう治せ (第 2 版), 2015, 335

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 諭 (KAWASAKI, Satoshi)  
大阪大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・特任准教授 (常勤)  
研究者番号: 60347458

(2) 研究分担者

上野 盛夫 (UENO, Morio)  
京都府立医科大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教  
研究者番号: 40426531