様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ９ 日現在

機関番号：８２６２６
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：２６７５０１６３

研究課題名（和文）マイクロＲＮＡの機能を制御できる細胞質ＲＮＡベクターの開発と細胞改変技術への応用

研究課題名（英文）Development of a cytoplasmic RNA vector to modulate microRNA function for cellular reprogramming

研究代表者
佐野　将之（SANO, Masayuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：８０４１５６８７

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）：マイクロRNAは短鎖のノンコーディングRNAであり、mRNAの3’非翻訳領域に配列特異的に結合することで、様々な遺伝子発現を制御している。組織特異的に発現するマイクロRNAのいくつかは、細胞リプログラミングを制御できることから、本研究では、センダイウイルスを骨格とした細胞質RNAベクターを用い、マイクロRNAの発現および機能の阻害ができる新しいベクターを開発し、細胞リプログラミングに応用することを目指した。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression by binding to the 3’ unltanslated region of target mRNAs. It has been demonstrated that several tissue-specific miRNAs can modulate cellular reprogramming. In this study, we tried to construct a cytoplasmic RNA vector, based on Sendai virus, which not only produces miRNAs but also inhibits the miRNA activity, so as to apply in cellular reprogramming.

研究分野：複合領域

キーワード：マイクロRNA　RNAベクター　細胞改変技術　遺伝子導入　機能制御

1．研究開始当初の背景

線維芽細胞に胚性幹細胞（embryonic stem (ES) cell）で強く発現する遺伝子群を導入することで得られる人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem (iPS) cell）の発見は、一度運命が決まった細胞でも細胞内の環境変化に応じて、柔軟にその性質や状態を変えることが可能であることを示した（Takahashi and Yamanaka, Cell, 2006; Takahashi et al., Cell, 2007)。iPS 細胞の発見を契機に、導入する遺伝子の種類を変えることで、線維芽細胞から ES 細胞様の状態を経ることなく神経細胞や心筋細胞などが作製できることも示された（Vierbuchen et al., Nature, 2010; Ieda et al., Cell, 2010)。現在、これらの細胞リプログラミングとよばれる手法を用いることで、通常、採取が難しい組織細胞を試験管内（in vitro）で調製できるようになり、再生医療で用いる移植のための細胞や疾患モデル細胞としての利用、薬の薬理試験や安全性試験のための利用など、様々な応用が展開されている。

iPS 細胞の発見当初、外来遺伝子の導入にはレトロウイルスベクターが用いられた。レトロウイルスやレンチウイルスを骨格としたベクターは、導入した遺伝子を長期間、発現させるのに適しており、細胞リプログラミングに有用なベクターである。しかしながら、これらのベクターは宿主の染色体に外来遺伝子を組込むことから、がん遺伝子を活性化する危険性が指摘されている。リプログラミングで作製した細胞を臨床応用するためには、染色体に外来遺伝子を組込まないことが望ましく、このため外来遺伝子フリーの iPS 細胞等を作製する技術の開発が進められた。

我々の研究室では、以前からセンダイウイルスを骨格とした遺伝子発現ベクターを開発していた（Nishimura et al., J. Biol. Chem., 2007)。センダイウイルスは一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスであり、ヒトに対し病原性をもたないことが知られている。我々は、Cl.151 というセンダイウイルス変異株を骨格に利用し、ウイルス由来の構造遺伝子を欠損させることで、安全性の高いベクターを開発し、このベクターを欠損持続発現型センダイウイルスベクターまたは SeVdp（defective and persistent Sendai virus）ベクターと名付けた（Nishimura et al., J. Biol. Chem., 2011)。SeVdp ベクターは、複数の外来遺伝子を同一ベクター上に搭載することができ、導入した細胞内でそれらの遺伝子を長期間、安定して発現させることができる。また、このベクターは宿主の細胞質に局在し、核内に入ることがないため、外来遺伝子を染色体に組込む危険性がなく、さらに SeVdp ゲノムの複製を阻害することで、導入細胞からベクターを除くこともできる。我々は、iPS 細胞誘導に必要な Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 遺伝子を搭載した SeVdp ベクターを作製し、体細胞に導入することで、高い効率で iPS 細胞を樹立することに成功した（Nishimura et al., J. Biol. Chem., 2011)。

2．研究の目的

iPS 細胞誘導には山中伸弥教授らが報告した 4 種類の転写因子が広く利用されている。しかし、報告当初は誘導効率が十分に高くはなかったため、これらの因子以外で、効率を高める遺伝子の探索が行われた。その結果、様々な転写因子やクロマチン修飾因子などのタンパク質、またマイクロ RNA（miRNA）などのノンコーディング RNA が iPS 細胞誘導を促進することが明らかとなった。

miRNA は、約 22 塩基の短鎖 RNA であり、標的遺伝子を抑制することで、様々な遺伝子の発現を制御している。miRNA は真核生物のゲノムにコードされており、転写後、核内でプロセッシングを受け細胞質に輸送される。その後、さらなるプロセッシングを経て成熟 miRNA となる。成熟 miRNA は RISC とよばれるタンパク複合体に取り込まれ、標的 mRNA の 3’非翻訳領域（3’UTR）に配列特異的に結合することで翻訳阻害や mRNA の不安定化を引き起こし、結果として遺伝子の発現を負に制御する。

多くの miRNA は細胞特異的または組織特異的に発現することが知られており、ES 細胞では miR-302 などの miRNA が高発現していることが報告されている。興味深いことに、レンチウイルスベクターを用い、線維芽細胞に miR-302 を導入することで、iPS 細胞を誘導できることが報告された（Anokye-Danso et al., Cell Stem Cell, 2011)。さらに、多くの正常細胞で発現している Let-7 miRNA の機能を阻害することで、iPS 細胞誘導が促進されることも報告されている（Melton et al., Nature, 2010; Worringer et al., Cell Stem Cell, 2014)。これらの結果は、細胞内での miRNA の発現や活性を調節することで、細胞リプログラミングの効率を上昇させることができることを示している。

我々が開発している SeVdp ベクターはウイルスゲノムの複製に必要な RNA ポリメラーゼをコードしており、ベクターに搭載した外来遺伝子は mRNA としてモノシストロニックに転写される。また、安定した高い遺伝子発現レベルが得られるため、タンパク質を発現させる系としては非常に優れている。一方、miRNA などのノンコーディング RNA の発現系としては、レンチウイルスベクターなどの核に局在するベクターが利用されており、細胞質局在型の SeVdp ベクターから miRNA が発現できるかについては検討が遅れていた。

本研究では、SeVdp ベクターを幅広い遺伝子発現のプラットフォームとして利用できるようにするために、SeVdp ベクターからの miRNA 発現について検討を行った。また、このベクターを用い、細胞内の miRNA 活性を阻害する系を構築することで、発現および阻害の両面から細胞内の miRNA を制御できる、iPS

細胞誘導などの細胞リプログラミングに有用なベクターの開発を目指した。

３．研究の方法

(1) miRNA 発現 SeVdp ベクターの構築

SeVdp ベクターに組込むための miRNA 配列は、mouse embryonic fibroblast (MEF) からゲノム DNA を単離し、polymerase chain reaction (PCR)により目的の miRNA 配列を増幅することで取得した。SeVdp ベクターには、目的の miRNA 遺伝子と Blasticidin 等の薬剤耐性遺伝子を搭載させておき、HeLa S3 細胞に導入後、薬剤処理により、SeVdp ゲノムを安定的に保持する細胞株を選択した。またネガティブコントロールとして、miRNA 遺伝子をもたない SeVdp ベクターについても細胞株を調製した。さらに、ポジティブコントロールとして、miRNA 配列を組込んだレトロウイルスベクターを作製し、HeLa S3 細胞に導入後、安定発現株を取得した。これらの細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR により miRNA の発現量を調べるとともに、psiCHECK vector を用いた、ルシフェラーゼ活性を指標にした解析を行うことで、ベクターから発現する miRNA の遺伝子発現抑制活性を調べた。

(2) miRNA 抑制 SeVdp ベクターの構築

細胞内の miRNA 活性を抑制する方法として、miRNA スポンジという技術が知られている（Ebert et al., Nat. Methods, 2007）。この技術は、ベクターにコードされる任意のタンパク質の 3’UTR に阻害したい miRNA の標的配列を組込み、この配列に細胞内の目的 miRNA を結合させることで、フリーに存在する miRNA 濃度を減少させ、結果として、目的 miRNA の機能を減弱させるというものである。

SeVdp ベクターで miRNA スポンジ技術を利用するために、蛍光タンパク質である Keima-Red をコードする遺伝子の 3’UTR に miRNA 標的配列をタンデムに組込んだ SeVdp ベクターを作製した。また、ネガティブコントロールとして、miRNA 標的配列に変異を入れ、miRNA を結合できなくさせたものも用意した。ベクターには薬剤耐性遺伝子をコードさせておき、BHK/T7/151M(SE) 細胞（Nishimura et al., J. Biol. Chem., 2011）または HeLa S3 細胞を薬剤で処理することにより SeVdp ゲノムを安定に保持した細胞株を選択した。miRNA 阻害効果については、psiCHECK vector を用いた、ルシフェラーゼ活性を指標にした解析により検証した。

(3) iPS 細胞誘導への利用

構築した miRNA 遺伝子をコードする SeVdp ベクターまたはコントロール SeVdp ベクターを MEF に導入し、iPS 細胞誘導を行った。iPS 細胞のコロニー形成能については、iPS 細胞特異的なマーカーである SSEA-1 を検出して、評価を行った。

４．研究成果

(1) miRNA 発現 SeVdp ベクターの評価

神経特異的に発現することが知られている miR-124 遺伝子を組込んだ SeVdp ベクター（SeVdp-miR-124）および miRNA 遺伝子を組込んでいない SeVdp ベクター（SeVdp-Control）を導入した HeLa S3 細胞の miR-124 の発現量を比較した。SeVdp-Control と比べ、SeVdp-miR-124 導入細胞では、成熟 miR-124 の有意な発現上昇が確認できた。また、psiCHECK vector に miR-124 の標的配列を組込み、SeVdp ベクターを導入した細胞にトランスフェクションしたところ、SeVdp-miR-124 導入細胞でルシフェラーゼ活性の減少がみられた。さらに、miRNA をレトロウイルスベクターで導入した細胞と比較したところ、発現量および活性ともに、大きな差は認められなかった。これらの結果から、SeVdp ベクターに搭載した miR-124 遺伝子は成熟 miRNA として発現することが確かめられた。

(2) miRNA 抑制 SeVdp ベクターの評価

Keima-Red 遺伝子の 3’UTR に Let-7a の標的配列をタンデムに組込んだ SeVdp ベクター（SeVdp-spo-Let7）および標的配列に変異を入れたネガティブコントロールベクター（SeVdp-spo-Control）を構築した。それぞれのベクターを安定に保持している BHK/T7/151M(SE)細胞に、Let-7a の標的配列を組込んだ psiCHECK vector(psiCHECK-Let7)をトランスフェクションした。BHK/T7/151M(SE)細胞では内在性の Let-7 が発現しているので、psiCHECK-Let7 から発現するルシフェラーゼ活性は抑制される。しかし、SeVdp-spo-Let7 を導入した細胞では、miRNA スポンジの効果により、Let-7 が阻害され、ルシフェラーゼ活性の抑制効果が緩和されると期待された。しかしながら、SeVdp-spo-Control を導入した細胞と比較した結果、SeVdp-spo-Let7 はわずかにルシフェラーゼ活性を上昇させたにすぎず、顕著な効果は得られなかった。miR-21 についても標的配列を付加した SeVdp ベクターを作製し、HeLa S3 細胞において阻害を試みたが、miRNA 活性阻害効果は得られなかった。これらの結果から、Let-7 や miR-21 は BHK/T7/151M(SE) 細胞や HeLa S3 細胞において発現量が高いため、miRNA スポンジによる抑制では十分な効果が得られなかった可能性が考えられた。今後は、発現量が低い miRNA に対し阻害効果が得られるか、また miRNA 標的配列の数を増やすことにより、miRNA 阻害効果を上昇させることができるか調べることで、検証を行っていく予定である。

(3) iPS 細胞誘導の評価

ES 細胞特異的 miRNA である miR-302 遺伝子を組込んだ SeVdp ベクターを作製し、このベクターを MEF に導入することで、iPS 細胞誘

導を試みた。miR-302 を組込んでいないコントロール SeVdp ベクターと比較した結果、miR-302 だけでは、iPS 細胞コロニーの形成を促進することはできなかった。しかしながら、miR-302 に加え、いくつかの初期化因子および ES 細胞で発現している miRNA を追加発現させることで、コントロールベクターと比べ、SSEA-1 陽性のコロニー数の増加が認められた。このことから、miRNA 発現 SeVdp ベクターについては iPS 細胞誘導に利用できることが分かり、今後、SeVdp ベクターが miRNA 発現ベクターとして細胞リプログラミングに適用できる可能性が確かめられた。

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）

〔学会発表〕（計４件）

① 佐野 将之、大高 真奈美、飯島 実、加藤 義雄、中西 真人、長期間 miRNA をモニタリングできるベクターの開発、第 15 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、平成 28 年 2 月 2 日、産業技術総合研究所（茨城県つくば市）

② 佐野 将之、大高 真奈美、飯島 実、加藤 義雄、中西 真人、欠損持続発現型センダイウイルスベクターを利用した細胞リプログラミングにおけるマイクロ RNA モニタリング、BMB2015、平成 27 年 12 月 2 日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

③ 佐野 将之、大高 真奈美、飯島 実、加藤 義雄、中西 真人、細胞質 RNA ウイルスベクターによるマイクロ RNA 検出系の構築、第 7 回日本 RNAi 研究会、平成 27 年 8 月 26 日～27 日、グランドプリンスホテル広島（広島県広島市）

④ 佐野 将之、大高 真奈美、飯島 実、中西 真人、SeVdp ベクターを利用した細胞リプログラミングにおけるマイクロ RNA 検出系の評価、第 14 回日本再生医療学会総会、平成 27 年 3 月 19 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

６．研究組織

(1)研究代表者

佐野 将之（SANO, Masayuki）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号：８０４１５６８７