

200806013A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業
安全に移植できる細胞を誘導するためのタンパク質導入法の開発

平成20年度 統括研究報告書

主任研究者 升井 伸治

平成21(2009)年 3月

目次

I. 統括研究報告

安全に移植できる細胞を誘導するためのタンパク質導入法の開発 ----- 1

升井 伸治

(資料) なし。

II. 分担研究報告

分担者なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行物なし。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

なし。

安全に移植できる細胞を誘導するためのタンパク質導入法の開発

主任研究者 升井 伸治 国立国際医療センター研究所 室長

転写因子セットを導入し有用細胞を誘導する知見（例；iPS細胞）は今後急速に蓄積される。その応用過程として、遺伝子導入を介さない方法での作出証明が必要だが、従来のタンパク質導入法はトラブルが多い。そこで本研究では独自のタグとアッセイ系をもとに、簡便で確実なタンパク質導入法を開発する。本システムが広く用いられ、一旦タンパク質導入法で移植細胞が「出来る」とわかれば、臨床応用は促進されるだろう。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞作出の成功要因は、「転写因子セット」の導入である。一般に細胞の性質は、核内の転写因子ネットワークが決定していると考えられるが、iPS 細胞作出法は ES 細胞転写因子ネットワークの人為的再現だった。同様の手法を用いた有用細胞作出の試みは報告が増えつつあり、今後数年内に「〇〇を作出できる転写因子セット」が次々と報告されるだろう。一方で、ウイルスなどによる多数の遺伝子導入は腫瘍化をはじめとした様々な副作用を細胞にもたすため、臨床応用への次の段階としては、遺伝子導入を経ない転写因子セット導入法でその細胞が作出可能なことを証明する必要があるだろう。その最有力な手法はタンパク質導入法だが、従来法ではタンパク質の種類に依存して導入効率や活性が大きく異なることが障害となり、最初にクリアすべきステップである「タンパク質導

入法でも分化誘導出来る」ことの証明に非常に時間がかかるのが問題である。

現在、主に2つのタンパク質導入法がある。そのうち一つである細胞膜透過性の低分子化合物との共導入法（市販キット）では、目的タンパク質を精製しておく必要があるのだが、転写因子は組み換えタンパク質としては良く発現しない場合が多く（DNA 結合能による宿主への毒性）、また精製後も活性を保つような条件検討が困難であった。もう一方の細胞膜透過ドメインとの融合法では、原理的に細胞膜透過ドメインと目的タンパク質との間でフォールディング干渉が起きやすく、様々なタンパク質と融合させたときに一定した導入効率と活性が得られていない（Pharmac Res 19:1302-9, 2002）。そこで本研究ではタンパク質精製を経ず、フォールディング干渉を起ささない簡便で確実なタンパク質導入システムを開発する。これを用いて目的細胞が誘導可能であることがわかれば、内毒素除去など

さらなる安全性を担保し臨床研究に進めるだろう。

B. 研究方法

ES 細胞の培養：フィーダーフリー株 2TS22C (Nature cell biology (2007) 9: 625-635)、EB3 (Genes Cells (2004) 9: 471-477) およびその派生株 BZnTR1 を用いて、ゼラチンコート培養皿上にて以下の培地で培養した。Glasgow minimal essential medium (GMEM), 10% fetal calf serum, 1 mM sodium pyruvate, 10⁻⁴ M 2-mercaptoethanol, 1x nonessential amino acids (Invitrogen), 1000 U/ml LIF。

COS 細胞 (BMT10) およびパッケージング細胞 (Plat-E; Experimental Hematology 31 (2003) 1007-1014) の培養：ゼラチンコート皿上、DMEM + 10%血清にて培養した。

プラスミド構築：レトロウイルスは pMXs (Experimental Hematology 31 (2003) 1007-1014) を用いた。pGRNH は、EGFP, DeRed, Neo (ネオマイシン耐性遺伝子), Hph (ハイグロマイシン耐性遺伝子) のそれぞれを PCR で転写単位として構築し、これら 4 つを連結し pBR322 系プラスミドに挿入した。pGR は GFP と DsRed の 2 つを同様に構築した。Neomycin は Nacalai 社、Hygromycin は Invivogen 社 HygroGold を使用した。

トランスフェクション：BZnTR1 を 5x10⁴/well (24 well plate) の密度で播

種し、一晚培養した。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法にてメーカー指定の方法に従ってトランスフェクションを行った。

蛍光顕微鏡観察：IX71 (オリンパス社) を用い、蛍光ミラーユニットは GFP は U-MGFPHQ, DsRed は U-MRFPHQ を使用した。遺伝子発現解析：SYBR Premix ExTaq (Takara) を用いた定量的 RT-PCR を行い、リアルタイム PCR 装置は MyiQ リアルタイム PCR 解析システム (BioRad) を用いた。
(倫理面への配慮)

本研究では実験動物を用いる予定は無いため、倫理上の問題は無い。遺伝子組み換え実験を行うが、P2 レベルで申請は受理されている。

C. 研究結果

i) タンパク質導入系の開発

細胞膜透過ドメインを含むタグ融合タンパク質を培地中に高濃度で分泌発現させ (COS 細胞を用いる)、この培養上清をヒトおよびマウス繊維芽細胞に添加する。繊維芽細胞にはタグを除去するシステムを機能させておくため、導入されたタンパク質はタグのフォールディング干渉を受けずに機能できる仕組みである。

このタグは分泌シグナル配列の I_gk リーダー配列 (分泌後は切断されている)、細胞膜透過性ドメイン、およびリンカー配列を付加し、個々の遺伝子に固有の立体構造の影響を緩和する。

タグ融合タンパク質発現ベクターを、COS

細胞においてリポフェクション法を用いて導入する。血清の影響を排除するため血清置換剤 KSR ベースの培地で過剰発現させ、その培養上清を用いてタンパク質導入効率を検定する。

タンパク質導入の効率を上げるため、培養上清は容量を極力低く設定し、且つ長時間発現させて濃度を高くする。培地中に分泌されたタンパク質は比較的安定であり、VP22 では培養上清調製後 48 時間でも導入効果があることを確認できた。分泌シグナル配列 (Ig κ リーダー配列)、細胞膜透過性ドメイン (VP22, 11R) を連結させた試作タグに EGFP 遺伝子を繋いだ発現ベクターを、COS 細胞においてリポフェクション法を用いて導入したところ、導入効率は 1 割前後であった (図 1)。



図 1. 培養上清にて調製された膜透過型 GFP タンパク質

導入効率の上昇を促すため、培養上清を限外濾過膜で濃縮しタンパク質濃度を高めることを試みたが、導入効率に変化は見られなかった。現在、試作タグ GFP を高タイトーのレトロウイルスベクター (pMXs-PlatE システムを用いて高タイト

ーにて調製する) MEF へ導入し、タンパク質分泌量を上昇させることを試みている。

ii) 多因子発現システムの開発

一方で、ウイルスを使わず (腫瘍化の危険が少なく) 分化転換ができる別のシステムの開発を行った。目的細胞内で多因子を同時に発現し分化転換させるシステムである。導入因子数が多いと、ばらばらに導入すると全因子が入った細胞数は少なくなり、解析が困難になる。しかし、通常用いられているプロモーターでは、直列に連結すると転写が阻害される (転写干渉とよばれる)。2 つまでなら逆向きに配置することで転写可能だが、3 つ以上の場合には必ずどれかが直列の向きに位置することになり、転写干渉により発現しなくなる。異なるプロモーターを用いると直列でも転写できる場合もあるが、百個以上の遺伝子のそれぞれに異なるプロモーターを用いるのは非現実的であり、少なくともどれかは転写干渉を免れない。そこで、同一のプロモーターを用いて、直列に連結したときにも発現する新しい転写システムを開発し、多数の遺伝子を同時発現させることを試みた。原理的に新しいシステムであるため、タンパク質翻訳量が十分か懸念されたが、至適化した結果、十分な量が得られた (図 2 の蛍光と薬剤耐性)。このシステムでは、染色体に入ると転写されないため (おそらくクロマチン因子が結合すると阻害的

に働くため)、レトロウイルスより腫瘍化の危険が小さい。暫定的非ウイルス型分化転換システムとして提示できる。

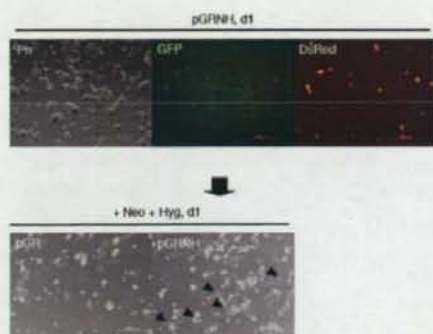


図9. 4種遺伝子の同時発現

iii) 分化転換のモデル系開発

分化転換法を用いた目的細胞の樹立十分条件の解析には、その細胞の排他的培養条件が判明している必要がある。iPS細胞のケースでは、それまでのES細胞での解析知見から極めて排他的な培養条件と形態学的特徴がすでに明らかになっており、これを利用することで樹立したクローンを単離することに成功している。そこで、タンパク質導入法および新規プロモーターシステムを用いた分化転換が可能であることを示す解析モデル系（多能性幹細胞以外の、という意味で）の構築を試みた。体細胞同士の分化転換を可能ならしめるシステムであることが分かれば、後に任意の目的細胞を用いることができるだろう。ここでは扱いやすい（均一に未分化のまま培養できる）モデル幹細胞として、平面培養 NSC（神経幹細胞

様細胞)を用いてマイクロアレイ解析を行い、まず特異的転写因子の絞り込みを行った。独立に樹立した3株を用い、コントロールにはES細胞とマウス全身のRNAを用いた。その結果、特異的発現のみられる150遺伝子を同定した。後にこれらの遺伝子を新規プロモーターシステムに搭載し同時発現を試みる。次に、発生系譜の大きく異なる細胞がNSCに分化転換したイベントを鋭敏に検出できるシステムの開発を行った。胚体外内胚葉細胞 ExEnC を対象細胞として用いて、選択的培地 (ExEnC が死滅して NSC のみが生育する培養条件) の検討を行うことにした。まず片方の Sox2 アレルに Hygromycin 耐性-Thymidine kinase 融合遺伝子 HygTK が導入された ESC (E1ht5) に (Nat Cell Biol 9, 625-35 (2007))、ExEnC への分化誘導に十分となる転写因子 Gata6 を導入した (BMC Dev Biol 7, 80 (2007))。ExEnC に分化させ7日間培養し、その後さらに7日間を Gancyclovier 存在化で培養し、Thymidine kinase の作用によって残存 ES 細胞 (Sox2 を発現する; すなわち HygTK を発現する) を完全除去した。XhtG5 と名付けたこの細胞は、NSC へと分化転換すれば内在性 Sox2 を発現するため Hygromycin 耐性となる。XhtG5 と NSEB5-2C を様々な培養条件下で選択的条件を探索した結果、XhtG5 は血清 10% が必須であること、一方 NSEB5-2C には N2 supplement と FGF2 および EGF が必須であることがわかった。したがって NSC

分化転換アッセイ時においては、血清存在化で XhtG5 を培養し多因子発現を行い、数日後に無血清培地 (N2+FGF2+EGF) に交換すればよいだろう。Hygromycin 選択と組み合わせて、鋭敏且つ信頼度高く NSC 分化転換イベントを検出できるだろう。

D. 考察

膜透過ドメインを付加した転写因子による転写活性化の報告は、これまで国内外において多くあるのだが、どのシステムも任意の転写因子タンパク質をその活性化状態を保持したまま導入することはできていないようだ。膜透過ドメイン自体の電荷の偏りやフォールディングへの影響が懸念されるため、積極的に除去されるシステムの開発を進める必要がある。その点において本研究は独自の視点から進めており、良い成果につながることを期待できる。

多因子発現システムを新たに構築し、これを分化転換研究に用いることを試みた。細胞の性質を徐々に変えるには数個の機能重要転写因子の持続的発現で十分だが、迅速に変化させるには多数 (百以上) の因子を同時発現する必要があるだろう。本研究で開発されたシステムは原理上無限個の因子を発現させることが出来る。ネックとなるのはコンストラクション上の問題で、プラスミドサイズであると考えられる。数百キロベースまで構築可能な BAC を用いた構築を予定しており、これが可能であれば数百の因子を同時発現

できるだろう。

他方、分化転換が可能になっても、その効率があまりにも低ければ実用化につながらないと予想される。本研究では一般分化転換法 (モデル系) として NSC と ExEnC を用いたシステムの構築を試みた。iPS 細胞の樹立時においても培地変換のタイミングが異なると樹立効率が大きく影響をうけることが知られており、ExEnC は血清が必須だが NSC は血清存在下では分化することも同時にわかったため、培地変換のタイミングについてはさらに検討する必要がある。一方、転写因子を発現させれば確実に下流遺伝子群が発現されるわけではなく、DNA やクロマチン修飾によるエピジェネティックな要因がロック機構として働いており、分化転換の効率は低いことが予想される。エピジェネティック因子の阻害剤による iPS 細胞樹立効率の向上も報告されており、今後は転写因子とエピジェネティクス制御因子の共発現、あるいは RG109 や VPA などのエピジェネティクス阻害剤などの併用を検討する必要がある。

E. 結論

20年度までに、分泌させたタグ融合タンパク質が別の細胞に取り込まれることを確認できた。しかしその効率は1割程度と低かったため、今後はタグ機能と培養上清調製法の至適化などを行う。他方、一過性発現で多因子を同時に発現できるシステムを開発した。本システムは染色

体に挿入されると発現しないため、腫瘍化の危険が小さい。暫定的非ウイルス型分化転換システムとして提示できる。

研究終了時には、その技術的波及効果として、本システムを初めから用いて「転写因子セット」をスクリーニングする系とすることが期待でき、有用細胞作出法の知見は急速に蓄積するだろう。

再生医療の材料としてヒト iPS 細胞や間葉系幹細胞など多くの選択肢が整備されつつある。今後は効率の良い分化誘導法の開発が急務だが、転写因子を用いた分化転換法は核内の分化プログラムに直接作用するため、成長因子や細胞外マトリクスの刺激などで分化誘導する手法と比較して分化時間が短くて済む可能性が高い。したがってドナー細胞調製コストを下げる可能性を示すことができ、医療費の抑制につながる。

さらに、安全な移植材料の調製可能証明は臨床への必須ステップであり、ひとたび「このタンパク質セットで分化転換できる」ことがわかれば、他の研究者や製薬企業の流入も手伝って、より安全なタンパク質製造手法（内毒素除去や抗原性を低める工夫など）を用いた臨床研究へとつなぐことができるだろう。すなわち本研究の長期的成果とは、この「証明ステップ」を円滑に通過させ再生医療実現化に貢献することである。

一般に再生医療が急がれている疾患（中枢神経系障害や糖尿病など）はほとんど治療方法が無く、家族や社会に対して精

神的・経済的に重い負荷を与えている。本研究の成果は多くの患者への再生医療の実施可能性を提示し、社会保障費の抑制と労働人口の増大につながる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

升井伸治・大河内仁志・浜崎辰夫 「複数の遺伝子発現を行うための発現ベクター」、出願番号 2008-260553、2008年10月7日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし