

201320038A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策 研究事業

「自己幹細胞からの革新的肝再生療法の開発と応用」
に関する研究

平成25年度 総括研究 報告書

研究代表者 石坂幸人

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総括研究年度終了報告

「自己幹細胞からの革新的肝再生療法の開発と応用」

石坂幸人

----- 1

II. 分担研究年度終了報告

1. 「NTPを用いた骨髄由来間葉系幹細胞からの迅速肝細胞分化誘導とゲノム編集」
に関する研究

石坂幸人（国立国際医療研究センター、難治性疾患研究部） ----- 7

添付資料-1: 日本国内特許出願承認書 ----- 11

添付資料-2 米国内特許出願承認書 ----- 13

2. 「脂肪組織由来間葉系幹細胞からの迅速肝細胞分化誘導」に関する研究

大河内仁志（国立国際医療研究センター、細胞組織再生医学研究部） ----- 14

3. 「大動物移植モデルを用いた分化細胞の効果と安全性評価」に関する研究

霜田雅之（国立国際医療研究センター研究所） ----- 17

（プロジェクト研究長）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 21

「自己幹細胞からの革新的肝再生療法の開発と応用」に関する研究

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療研究センター 難治性疾患研究部 部長

研究要旨:本課題では、研究代表者が発明したペプチドベクター(NTP:nuclear trafficking peptide)を用いて、蛋白質を用いた細胞形質転換法を確立し、体性幹細胞からの迅速かつ効率的な肝臓細胞の分化誘導法を確立する。また、NTP とゲノム編集技術と融合させ、肝炎ウイルスに感染抵抗性を示す細胞の作成技術を開発する。平成 25 年度の研究成果として、NTP を付加した蛋白質によって肝臓細胞への分化誘導が可能になることが分かった。また、人工制限酵素に NTP を付与した蛋白質が NTP 無しの分子と同程度の DNA 切断効率を示すことが分かった。次年度では、実験のスケールをアップさせ、マーモセットを含む動物モデルを用いて、NTP システムの有効性を検証する。

<分担研究者>

大河内仁志

国立国際医療研究センター研究所
細胞組織再生医学研究部・部長

霜田雅之

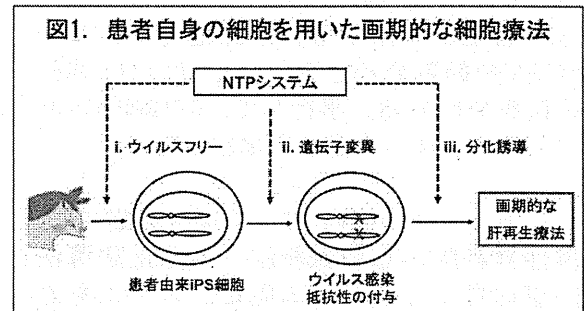
国立国際医療研究センター研究所
膝島移植プロジェクト研究

A. 研究目的

近年、ヒト間葉系幹細胞(以下 hMSC:human mesenchymal stem cell)から肝臓細胞が誘導できることが分かり、国内でも肝硬変症例に対する自己骨髄移植の臨床トライアルが行われている。国立国際医療研究センター(NCGM)においても、自己骨髄移植が 5 例の肝硬変症例に施行され、重篤な副作用無く行えることを経験したが、十分な臨床効果が得られないのに加えて自己骨髄移植は患者にとって大きな負担であるため、革新的なシステムへの改良が必須となっている。研究代表者は HIV-1 研究の過程で新規ペプチドベクター(NTP:nuclear trafficking peptide)を同定し、国際特許を取得した。

本プロジェクトでは NTP システムを用いて画期的な肝再生療法を実現する。その要素は 3 つからなる。まず、i. 患者自身の iPS 細胞をウイルスフリーで作成し、ii. これにゲノム操作を加えることでウイルス感染に必

須な遺伝子に変異を挿入する。次に、iii. 本課題で実現するシステムを用いて迅速かつ効率的に肝細胞へ分化誘導させる(図 1)。近年、iPS 細胞の臨床応用に向けた取り組みが行われているが、ウイルスで作成された iPS 細胞の安全性が問題となっている。もし、iPS 細胞を蛋白質だけで作成できるようになれば、ウイルスベクターの持つ危険性が大幅軽減され、iPS 細胞の臨床応用が大きく進展することが期待される。また、C 型肝炎ウイ



ルスの増殖に関与する分子が同定され、例えばその一つであるフォスファチジルイノシトール 4 キナーゼ III α (PI4KIII α 、以下 hPI4Ka) 遺伝子に変異を導入すると、ウイルス感染抵抗性を獲得することが報告された。さらに、骨髄や脂肪組織に存在する間葉系幹細胞や線維芽細胞へ Hepatocyte nuclear factor 3 β 等の遺伝子を導入することによって、肝臓細胞へ速やかに分化誘導できることも報告されている。特に、分担研究者である大河内は 2009 年に間葉系細胞から肝臓細胞へ分化誘導できるシステムとして、三段階誘

導法を開発し、培養開始後、12 日で肝臓細胞の分化マーカーが発現誘導可能なプロトコールを報告した。そこで本課題では、NTP 付加型蛋白質を用いることで、肝臓細胞への分化誘導に必要な時間の短縮や分化マーカー陽性細胞の頻度を上昇できる可能性を検証し、最適化する。本研究では、上述した3つのプロセスをすべて NT 付加型蛋白質で行うための技術を確立することを目標としている。

特に近年、人工制限酵素技術が革新的に進歩し、効率良くゲノム変異を導入できるようになっている。第一世代の人工制限酵素は zinc-finger nuclease (ZFN) で、転写因子がゲノム DNA を認識するモジュールと、2 量体を形成して初めてエンドヌクレアーゼ作用を示す FokI を組み合わせた分子が開発された。ゲノム二重鎖 DNA のそれぞれの配列を認識する ZFN を作成し、二者の複合体を形成させることで、FokI の作用を誘導するため、ゲノム部位選択的に DNA を切断できる。その後、第二世代として Zinc finger の代わりに TALEN (transcription activator-like effectors) が導入され、DNA 認識部位のデザインおよび構築が格段に行い易くなった。さらに第三世代の人工制限酵素として、ごく最近、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) が開発された。CRISPR-Cas9 はゲノム DNA を認識するガイド RNA を介してエンドヌクレアーゼ活性が作用する。本課題では、NTP と TALEN を組み合わせることで、*hPI4Ka* 遺伝子の破壊を試みる。平行して、CRISPR-Cas9 と NTP との融合の可能性を検証する。

以上の3つの技術の内、本研究課題では iii. 体性幹細胞から肝臓細胞への分化誘導法と ii. 蛋白質によるゲノム編集システムを確立する。これらが可能になれば、肝炎ウイルス感染抵抗性を付与された細胞による肝再生療法の可能性が広がり、肝臓移植しか治療法のない患者に細胞移植という新しい治療法を提供できる可能性が広がる。

B. 研究方法

a. 三段階分化法による肝細胞の分化誘導法：2009年に *J Gastro Hepatol* に報告したヒト脂肪由来間葉系幹細胞から肝臓細胞への誘導法は三段階からなる。即ち、
ステップ-1: アクチニン A+FGF4----3 日間
ステップ-2: HGH/FGF1/FGF4/ITS/DMSO/ニコ

チナミド-----10 日間

ステップ-3: ニコチナミド/DEX-----数日間。

このプロトコールによってアルブミン陽性細胞が出現し、低比重リポタンパク低分子 (LDH) の取り込みやグリコーゲンの産生が陽性となる。また、四塩化炭素で惹起された肝障害モデルマウスに投与すると、血中のアンモニアや尿酸値の低下を誘導した。

今回、改めて同方法の有効性を検証するため、市販のヒト脂肪組織由来幹細胞含む5株の細胞を用いて三段階誘導法を行い、それぞれ処理の第一段階の3日目、第二段階の10日目、そして第三段階の4日目で細胞を回収し、RT-PCR法を用いて HNF-1、HNF-3、HNF-4、HEX、および Albumin、TPO の発現を調べた。

b. ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) から肝臓細胞への分化誘導：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 96well collagen coating plate に 2×10^4 cells/cm² となるように播種し、1 日間葉系幹細胞専用培地にて Preculture する。翌日 EGF, b-FGF を含んだ Starvation 培地に交換し更に1日間培養を行う。翌日より7日間、1 次分化培地として HGF, b-FGF, nicotinamide を含んだ培地に交換し培養を継続する。この1次分化培地での培養期間の1日目、3日目、5日目において NTP 付加型蛋白質を規定量添加する。

ダイレクトリプログラミングに用いる因子は転写因子であり、NTP 等の余分な配列をタグとして付与すると転写因子としての機能が損なわれる可能性が考えられる。実際、iPS 化の実験において、Oct3/4 や Sox2 は N 末側にタグが付くことで、iPS 化因子としての作用を失う (Konno et al., *J Biotechnol.* 154:298-303, 2011)。そこで、NTP 配列と ORF 配列の間に TEV protease 認識配列を組み込み、細胞内に導入した後、さらに NTP-TEV を作用させることで、タグを切断するプロトコールを確立した。

NTP-TEV は細胞内導入後 24 時間にわたり機能が持続する為、添加プロトコールとして NTP 付加型蛋白質を培地に添加後 3 時間で培地を Washout し NTP-TEV を 3 倍モル比添加する。NTP-TEV を添加 3 時間後にリンスし、更に複数回 NTP 付加型蛋白質を添加する。この操作を 1 次分化培地で刺激している間、隔日 3 回の投与を行った。1 次分化培地で 7 日間培養後、DEX, ITS (Insulin/transferrin/selenium), Oncostatin M を含んだ 2 次分化

培地に交換しさらに7日間培養を継続する。2次分化培地で7日間培養後の細胞からRNAを取り、cDNAに逆転写したのち、qPCRにて種々の肝臓分化マーカーのmRNA発現量を肝分化の指標として解析した。

c. NTPを用いたゲノム編集技術の確立：
hPI4Ka 遺伝子には alternative splicing によって long form と short form の2種類の mRNA が転写される。ウイルス感染に関与する long form を破壊するため、エクソン31(Ex. 31)を標的とした人工制限酵素を構築した。近年、シングルモジュールによる新規 TALEN (compact TALEN) が、開発された。このシステムでは、エンドヌクレアーゼとして I-Tev1 が使用されており、このヌクレアーゼドメインと DNA 認識ドメインを含む分子を NTP 付加型タンパク質として発現させた (NTP 付加型 C-TALEN)。大腸菌の発現システムを用いて NTP 付加型 C-TALEN タンパク質を精製した。この NTP 付加型 C-TALEN タンパク質の機能を確認する為、TALE の DNA 認識配列、I-Tev1 ヌクレアーゼ Cleavage Site を含んだ領域を PCR で増幅し、TA クローニングベクターである PGEM-T Easy Vector ヘクローニングした (PGEM-T Easy hPI4Ka Ex31 region)。Cleavage 活性の有無を確認する為、この確認用 Plasmid を Scal によって Linear にしたものを使用した。Linear plasmid 500ng に対して精製タンパク質を 2ul 添加し 37°C にて 90min 反応後、サンプルを電気泳動にて確認した。N 末端側の NTP 配列による Cleavage 活性への影響も危惧される為、Cleavage コントロール蛋白質として N 末端側に NTP 配列を付加しない C-TALEN 蛋白質も作成した。

C. 研究結果

a. 間葉系幹細胞からより高機能な肝細胞の分化誘導法の確立：報告されている三段階のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞から肝細胞へ分化誘導する培養方法の再現および確認を行った。実験には市販されているヒト脂肪組織由来幹細胞である ASC-F (DS Pharma) および HADSC (Lonza) と同意を得て採取した皮下脂肪から培養した間葉系幹細胞3株など合計5株を用いた。三段階誘導法の効果を確認するために、それぞれの処理の最終日で細胞を回収し、RT-PCR を用いて遺伝子発現を調べた。その結果、大半の細胞株では第一段階において HNF-1 α 、HNF-3 β

および HNF-4 α の発現を確認できず、第二および第三段階において一部の細胞株でのみアルブミンの微弱な発現を確認できた。また、第二段階の処理によって細胞死および剥離をおこす細胞株があり、ほかの細胞株においても外形上に典型的な肝臓前駆細胞に近い細胞集団と典型的な肝臓前駆細胞とは異なる細胞集団が認められるなど、三段階誘導法による分化誘導効率は細胞毎に異なり、安定しないことが判明した。

論文報告では三段階誘導法の第一段階の処理が終わる三日目に HNF-3 β の発現を確認できるとされていたので、第一段階において HNF-3 β が発現する条件を検討した。また、肝臓発生過程では前腸内胚葉が FGF と BMP の刺激を受けて肝芽が形成するという発生学の知見から、第一段階誘導法に用いられる Fgf4 と Activin A の濃度を論文より2倍、3倍に引き上げた条件を用い、これまでもっとも良い分化誘導効率を示したヒト細胞株に対して3日間処理したのち、PCRを用いて HNF-3 β の発現を調べた。その結果、HNF-3 β の発現が確認され、その発現様式は Activin A の濃度に応答して濃度依存性を示した。また、FGF4 と Activin A の濃度を同時に引き上げるとより強い HNF-3 β の発現を引き起こすことが確認された。

b. ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) から肝臓細胞への分化誘導：NTP 付加型 HNF3 β 、HNF4 α の同時添加プロトコールにおいて2つの条件下 (3nM/3 回添加/day/3days) (10nM/2 回添加/day/3days) で肝臓分化の指標である種々の mRNA 発現量の増加を認めた。

c. NTP を用いたゲノム編集技術の確立：同条件にて C-TALEN タンパク質の Cleavage 活性を検討したところ NTP 付加型 C-TALEN も NTP を付加していないものと遜色なく Cleavage 活性を示すことが確認された。また qPCR においても Cleavage 活性を検討し、こちらも同様に NTP 付加型タンパク質で Cleavage 活性を認めることができた。

今回精製した NTP-hPI4Ka Ex. 31 cTALEN は類似した同遺伝子の異なるゲノム部位である Ex. 12 領域に対しては、ゲノム DNA の切断を誘導しなかった。

D. 考察

a. 間葉系幹細胞からより高機能な肝細胞の分化誘導法の確立：ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、5

種類の細胞を使用した、それぞれ細胞成長因子やサイトカインに対する反応性が異なることが判明した。特に同じ細胞でも継代による違いも認められたことから、至適条件は変わりうることを認識する必要がある。特に三段階分化法の第一段階は内胚葉に分化させるための重要なステップであり、本研究の主眼とする転写因子の蛋白導入法を併用することで、この第一段階の内胚葉分化を効率的に行えると考えている。NTP 付加型蛋白導入による細胞への影響は問題ないと考えられるので、今後導入する転写因子の種類と至適濃度を詳細に検討する予定である。

b. ヒト間葉系幹細胞 (hMSCs) から肝臓細胞への分化誘導：今回の実験系は 96-well plate での Small Scale の実験であり今後の動物実験、臨床展開を進めるうえでより大きな Scale での分化誘導が求められる。また今回は mRNA 発現量での検討である為、実際免疫染色などで蛋白質レベルでの発現を今後確認する。分化検討の Scale を拡充することで NTP 付加型タンパク質を大量に確保する必要があり、現在大腸菌を用いて大量に精製できる Protocol を確立している。NTP 付加型タンパク質が潤沢に準備できるようになれば、さらに添加 Dose を広く検討でき、より効果の高い分化条件を見出せることが期待される。今後は実際に NTP 付加型タンパク質を用いて分化誘導を促進させた細胞を肝障害モデルマウスに移植し、生着率、肝障害の軽減の有無等を検討する

b. NTP を用いたゲノム編集技術の確立：今回大腸菌にて精製した NTP 付加型 *hPI4Ka* Ex. 31 C-TALEN は Plasmid を用いた Cleavage assay で特異的に切断できることが認められた。また N 末端側において NTP やタグなどの付加配列を含んでいても Cleavage 効率に大きく差は見られなかった。今後、この精製蛋白を細胞に添加し、*hPI4Ka* Ex. 31 cleavage site において InDel (DNA の挿入や欠損) が確認されるかどうかを検討する。細胞に添加する際、N 末端側の余剰配列がどのように TALEN 機能を阻害するかは十分にわかっていない。万が一、細胞内で NTP 付き蛋白質機能が発揮されない場合を考え、N 末端側のタグ配列と TALE 配列の間に TEV 認識サイトを組み込んだ。その場合には、NTP-TEV を作用させ、ゲノム DNA の切断効率を比較する予定である。

E. 結論

1. ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、最初の内胚葉分化へのステップが重要であり、NTP 付加型蛋白導入法の効果が鍵を握っている。
2. NTP 付加型 HNF3 β , HNF4 α の同時添加により、hMSC からの肝臓細胞への分化誘導が促進された。
3. 次年度では、肝障害モデルマウスでの NTP システムの有効性を検証し、マーマセットを用いた有効性の検証実験を開始する。
4. C-TALEN は、NTP 付きの状態でも DNA 切断活性を示した。
5. 次年度では、ヒト肝臓癌由来細胞株である Huh7.5 細胞を用いて、NTP 付き c-TALEN による *hPI4Ka* ノックアウトを試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Deng A, Chen C, Ishizaka Y, Chen X, Sun B, Yang R. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Virus Res.* [Epub ahead of print]
- 2) Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Akio Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA_B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, in press.
- 3) Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An D-S, Koyanagi Y. HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploiting proliferating CD4⁺ T cells *in vivo*. *PLoS Pathogen*, in press.
- 4) Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamazaki M, Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, **Ishizaka Y**, Shimura M and Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS*, in press.
- 5) Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T and **Ishizaka Y**. Retrotransposition of long interspersed element-1 in the kidney by human immunodeficiency virus type-1 Vpr. *Retrovirology*, 10:83, 2013.

- immunodeficiency virus type-1 Vpr. *Retrovirology*, 10:83, 2013.
- 6) Richard J, Pham TN, **Ishizaka Y**, Cohen EA. Viral protein R upregulates expression of ULBP2 on uninfected bystander cells during HIV-1 infection of primary CD4+ T lymphocytes. *Virology* 443:248-56, 2013.
- 7) Matsuyama S, Matsunaga A, Sakamoto S, Iida Y, Suzuki Y, **Ishizaka Y**, Yamauchi K, Ishikawa T, Shimura M. Metallomics. Scanning protein analysis of electrofocusing gels using X-ray fluorescence. *Metallomics* 5: 492-500, 2013 (DOI: 10.1039/C3MT20266F).
- 8) Koyama T, Sun B, Tokunaga K, Tatsumi M and **Ishizaka Y**. DNA damage aids human immunodeficiency virus type 1 infection by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
- 9) Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(16):6412-7, 2013
- 10) Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, **Okochi H**, Sato S. CXCR3 Deficiency Prolongs Th1-Type Contact Hypersensitivity. *J Immunol*. 190(12): 6059-70, 2013
- 11) Kimura T, Sugaya M, Blauvelt A, **Okochi H**, Sato S. Delayed wound healing due to increased interleukin-10 expression in mice with lymphatic dysfunction. *J Leukoc Biol* 94(1): 137-45, 2013.
2. 学会発表
- 1) 飯島健太、石坂幸. The functional analysis of DNA damage induced LINE-1 retrotransposon. 第29回放生研・放医研国際シンポジウム. 2013年11月、京都.
- 2) 高品智記、石坂幸人. 新規ペプチドベクターによるウイルスフリーiPS細胞作成技術開発. BIOtech2013 -第12回国際バイオテクノロジー展/技術会議. 2013年5月、東京.
- 3) 高品 智記、石坂幸人. Vpr由来ペプチドベクターによるウイルスフリーiPS細胞作成法の確立と応用. 白馬シンポジウム in 名古屋. 2013年7月、名古屋.
- 4) 高品 智記、石坂幸人. 新規核指向性ペプチド NTP を用いた細胞形質転換方法の開発. 第36回日本分子生物学会年, 2013年12月、神戸.
- 5) 豊岡理人, 松永章弘, 山崎茉莉亜, 志村まり, 田中紀子. メチル化アレイ測定データの分布に基づくサンプル品質管理及び人種差を考慮したプローブフィルタリングの妥当性の検討. 日本人類遺伝学会第58回大会. 2013年11月、宮城.
- 6) 松永章弘, 比島恒和, 田中紀子, 山崎茉莉亜, 吉田壘, 望月眞, 田沼順子, 岡慎一, 石坂幸人, 志村まり, 萩原将太郎, エピジェネティクス解析によるエイズ関連悪性リンパ腫の病態理解, 第36回日本分子生物学会, 2013年12月、神戸.
- 7) Tamai M, **Shimoda M**, Matsumoto S. Questionnaire Survey on the Perception of Type 1 Diabetic Patients and Family Members about Allogeneic and Bio-artificial Islet Transplantation, DNA Vaccine, and iPS Cellular Therapy. 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th AASD Scientific Meeting Seoul, Korea November 6-9th, 2013
- 8) **Shimoda M**, Tamai M, Matsumoto S. MOTIVATION FOR RECEIVING ALLOGENEIC AND XENOGENIC ISLET TRANSPLANTATION AMONG JAPANESE TYPE 1 DIABETIC PATIENTS. 12th CONGRESS INTERNATIONAL XENOTRANSPLANTATION ASSOCIATION OSAKA JAPAN November 13th
- 9) Chujo D, Foucat E, Nguyen TS, Chaussabel D, **Shimoda M**, Matsumoto S, Yagi K, Banchereau J, Ueno H. An Integrated Approach to Determine ZnT8-specific T Cell Repertoire in Type 1 Diabetes Patients and Healthy Adults. The 13th International Congress of the Immunology of Diabetes Society Mantra Lorne, Victoria, Australia 7-11th December 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明人、石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡
発明の名称、「新規核移行ペプチド」
出願人、国立国際医療センター総長、
米国特許番号 8455616、

登録日 2013 年 6 月 4 日

日本特許番号 5403681、

登録日平成 25 年 11 月 8 日

2. 実用新案登録 無

3. その他 特許出願

「NTPを用いた骨髄由来間葉系幹細胞からの迅速肝細胞分化誘導とゲノム編集」に関する研究

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療研究センター 難治性疾患研究部 部長

研究要旨:本課題では、研究代表者が発明したペプチドベクター (NTP:nuclear trafficking peptide) を用いて、蛋白質による細胞形質転換法を確立し、体性幹細胞からの迅速かつ効率的な肝臓細胞の分化誘導法を確立する。また、NTP とゲノム編集技術と融合させ、肝炎ウイルスに感染抵抗性を示す細胞の作成技術を開発する。平成 25 年度の研究成果として、NTP を付加した蛋白質によって肝臓細胞への分化誘導が可能になることが分かった。また、人工制限酵素に NTP を付与した蛋白質が NTP 無しの分子と同程度の DNA 切断効率を示すことが分かった。次年度では、実験のスケールをアップさせ、マーマセツトを含む動物モデルを用いて、NTP システムの有効性を検証する。

A. 研究目的

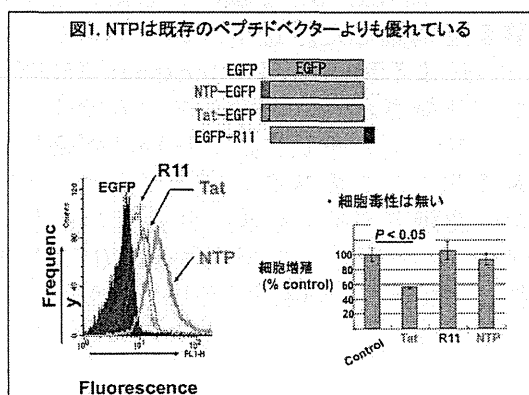
分担研究者である石坂は、HIV-1 研究の過程で新規ペプチドベクター (NTP: nuclear trafficking peptide) を同定し、国際特許を取得した。NTP は、HIV-1 ウイルス蛋白質である Vpr (viral protein R) に由来する 10 個のアミノ酸からなるペプチドで、RI・・・・FIHFRIGC (アミノ酸を一文字で標記) の配列を有している。この中で、連続する 5 つの「・」は LQQLL に相当し、ロイシンジッパー機能を示しながら、Vpr の細胞毒性作用において、重要な役割を担っている。NTP はこの配列を欠損しており、DNA 二重鎖切断などの細胞毒性作用は示さない。NTP を EGFP の N 末側に付加した状態で組み替え蛋白質を調整し、これを細胞の培養液中に添加すると、細胞内に EGFP が取り込まれる。その作用は、既知のペプチドベクターである Tat 由来ペプチドや、11 個のアルギニンからなるペプチド (R11) よりも強いことが分かった (図 1 下左)。

また、細胞毒性も認められなかった (同下右)。

本プロジェクトでは NTP システムを用いて画期的な肝再生療法を実現する。確立システムは 3 つあり、i. 患者自身の iPS 細胞のウイルスフリーでの樹立、ii. ゲノム操作による肝炎ウイルス感染抵抗性の付与。次に、iii. 幹細胞からの迅速な肝臓細胞への分化誘導

である。この中で、本課題では、ii と iii を実現する。

近年、ヒト間葉系幹細胞 (以下 hMSC: human mesenchymal stem cell) から肝臓細胞が誘導できることが分かり、国内でも肝硬変症例に対する自己骨髄移植の臨床トライアルが行われている。国立国際医療研究センター (NCGM) においても、自己骨髄移植が 5 例の肝硬変症例に施行され、重篤な副作用無く行えることを経験したが、十分な臨床効果が得られないのに加えて自己骨髄移植は患者にとって大きな負担であるため、革新的なシステムへの改良が必須となっている。一方、分担研究者である大河内らは、培養条件を三段階で行うことで、脂肪組織由来 MSC から分化誘導開始後、12 日で成熟した肝臓細胞に誘導できることを報告した。また、骨髄由来 MSC や線維芽細胞に Hepatocyte nuclear factor3 β (HNF3 β) や HNF1 α 等の肝臓細胞分化誘導因子を強制発現させることで、肝臓細胞への分化を誘導できることが報告された。これまでの試みは、ほぼ全てがレトロウイルス



ベクター等を用いた外来遺伝子発現系であり、臨床応用は難しい。

さらに、C型肝炎ウイルスの増殖に関与する分子が同定され、例えばその一つであるフォスファチジルイノシトール 4 キナーゼ IIIa (*PI4Ka*) 遺伝子に変異を導入すると、ウイルス感染抵抗性を獲得することが報告され、これを組み換え蛋白質で行うことが可能になれば、肝炎ウイルス感染抵抗性を付与された細胞による肝再生療法の可能性が広がり、肝臓移植しか治療法のない患者に細胞移植という新しい治療法を提供できる可能性が広がる。近年、人工制限酵素技術が革新的に進歩し、効率良くゲノム変異を導入できるようになった。第一世代の人工制限酵素は zinc-finger nuclease (ZFN) で、転写因子がゲノム DNA を認識するモジュールと、2 量体を形成して初めてエンドヌクレアーゼ作用を示す FokI を組み合わせた分子として開発された。ゲノム二重鎖 DNA のそれぞれの配列を認識する ZFN を作成し、二者の複合体を形成させることで、FokI 作用を誘導するため、ゲノム部位選択的に DNA を切断できる。その後、第二世代として Zinc finger の代わりに TALEN (transcription activator-like effectors) が使用されるようになり、DNA 認識部位のデザインおよび構築が格段に行い易くなった。さらに第三世代の人工制限酵素として、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) が開発された。CRISPR-Cas9 はゲノム DNA を認識するガイド RNA を介してエンドヌクレアーゼ活性が作用する。

以上を背景に、本課題では、NTP を付加した HNF 組み換え蛋白質を用いて、肝臓細胞への分化誘導法を確立するとともに、NTP と TALEN を融合させることで、*PI4Ka* 遺伝子の破壊を試みる。平行して、CRISPR-Cas9 と NTP との融合の可能性も検証する。

B. 研究方法

a. ヒト間葉系幹細胞からの肝臓細胞への分化誘導：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞

96well collagen coating plate に 2×10^4 cells/cm² となるように播種し、1 日間葉系幹細胞専用培地にて Preculture する。翌日 EGF, b-FGF を含んだ Starvation 培地に交換し更に 1 日間培養を行う。翌日より 7 日間、1 次分化培地として HGF, b-FGF, nicotinamide を含んだ培地に交換し培養を継続する。この 1 次分化培地での培養期間の 1 日目、3 日目、5 日目において NTP 付加型蛋白質を規定量添加する。

NTP 付加型蛋白質は N 末側にタグが付属されている。タグ配列と ORF 配列の間に TEV protease 認識配列を組み込んでいるため細胞内に導入後、NTP-TEV を用いタグ配列を切断することで蛋白質の作用を最大にしている。

NTP-TEV は細胞内導入後 24 時間にわたり機能が持続する為、添加プロトコールとして NTP 付加型蛋白質を培地に添加後 3 時間で細胞をリンスし、NTP-TEV を 3 倍モル比添加する。NTP-TEV を添加 3 時間後にリンスし、更に複数回 NTP 付加型蛋白質を添加する。この操作を 1 次分化培地で刺激している間、隔日 3 回の投与を行った。1 次分化培地で 7 日間培養後、DEX, ITS (Insulin/transferrin/selenium), Oncostatin M を含んだ 2 次分化培地に交換しさらに 7 日間培養を継続する。2 次分化培地で 7 日間培養後細胞から RNA を取り、cDNA に逆転写したのち、qPCR にて種々の肝臓分化マーカーの mRNA 発現量を肝分化の指標として解析した。

b. NTP を用いたゲノム編集技術の確立：

hPI4Ka 遺伝子には alternative splicing によって long form と short form の 2 種類の mRNA が転写される。ウイルス感染に関与する long form を破壊するため、エクソン 31 (Ex. 31) を標的とした人工制限酵素を構築した。近年、シングルモジュールによる新規 TALEN (compact TALEN) が、開発された。このシステムでは、エンドヌクレアーゼとして I-TevI が使用されており、このヌクレアーゼドメインと DNA 認識ドメインを含む分子を NTP 付加型タンパク質として発現させた (NTP 付加型 C-TALEN)。大腸菌の発現システムを用

いて NTP 付加型 C-TALEN タンパク質を精製した。この NTP 付加型 C-TALEN タンパク質の機能を確認する為 PGEM-T Easy Vector に TALE の DNA 認識配列、I-Tev1 ヌクレアーゼ Cleavage Site を含んだ領域をクローニングした (PGEM-T Easy hPI4KA Ex31 region)。Cleavage 効率を確認する為、この確認用 Plasmid を Scal によって Linear にしたものを使用した。Linear plasmid 500ng に対して精製タンパク質を 2ul 添加し 37C にて 90min 反応後電気泳動にて確認した。コントロールとして NTP を付加しない C-TALEN タンパク質も作成した。

C. 研究結果

a. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSCs) から肝臓細胞への分化誘導：NTP 付加型 HNF3B, HNF4A の同時添加プロトコールにおいて 2 つの条件下 (3 nM/3 回添加/day/3days) (10 nM/2 回添加/day/3days) で肝臓分化の指標である種々の mRNA 発現量の増加を認めた。

b. NTP を用いたゲノム編集技術の確立：同条件にて Cleavage 活性を検討したところ NTP 付加型 C-TALEN も NTP を付加していないものと遜色なく Cleavage 活性を示すことが確認された。また qPCR においても Cleavage 活性を検討し、こちらも同様に NTP 付加型タンパク質で Cleavage 活性を認めることができた。

今回精製した NTP-PI4KA Ex. 31 cTALEN は類似した同遺伝子の異なるゲノム部位である Ex. 12 領域に対しては、ゲノム DNA の切断を誘導しなかった。

D. 考察

a. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSCs) から肝臓細胞への分化誘導：今回の実験系は 96Well Plate での Small Scale の実験であり今後の動物実験、臨床展開を進めるうえでより大きな Scale での分化誘導が求められる。また今回は mRNA 発現量での検討である為、実際免疫染色などで蛋白質レベルでの発現を今後確認する。分化検討の Scale を拡充することで NTP 付加型タンパク質を大量に確保する必要があり、現在大腸菌を用いて大量に精製

できる Protocol を確立している。NTP 付加型タンパク質が潤沢に準備できるようになれば、さらに添加 Dose を広く検討できより効果の高い分化条件を見出せることが期待される。今後は実際に NTP 付加型タンパク質を用いて分化誘導を促進させた細胞を肝障害モデルマウスに移植し、生着率、肝障害の軽減の有無等を検討する

b. NTP を用いたゲノム編集技術の確立：

今回大腸菌にて精製した NTP 付加型 PI4KA Ex. 31 C-TALEN は Plasmid を用いた Cleavage assay で特異的に切断できることが認められた。また N 末端側において NTP やタグなどの付加配列を含んでも Cleavage 効率に大きく差は見られなかった。今後、この精製蛋白を細胞に添加し、PI4KA Ex. 31 cleavage site において InDel (DNA の挿入や欠損) が確認されるかどうかを検討する。細胞に添加する際、N 末端側の余剰配列がどのように TALEN 機能を阻害するかは十分にわかっていない。万が一、細胞内で NTP 付き蛋白質機能が発揮されない場合を考え、N 末端側に TEV 認識サイトを組み込んだ。その場合には、NTP-TEV を作用させ、ゲノム DNA の切断効率を比較する予定である。

E. 結論

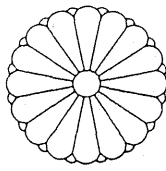
1. NTP 付加型 HNF3B, HNF4A の同時添加により、hMSC からの肝臓細胞への分化誘導が促進された。
2. 次年度では、肝障害モデルマウスでの NTP システムの有効性を検証する。
3. TALEN は、NTP 付きの状態でも DNA 切断活性を示した。
4. 次年度では、Huh7.5 細胞を用いて、NTPy 付き c-TALEN による PI4KA ノックアウトを試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Deng A, Chen C, Ishizaka Y, Chen X, Sun B, Yang R. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *Virus Res.* [Epub ahead of print]

- 2) Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Akio Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA_B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, in press.
- 3) Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsui M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An D-S, Koyanagi Y. HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploiting proliferating CD4⁺ T cells *in vivo*. *PLoS Pathogen*, in press.
- 4) Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamazaki M, Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, **Ishizaka Y**, Shimura M and Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. *AIDS*, in press.
- 5) Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T and **Ishizaka Y**. Retrotransposition of long interspersed element-1 in the kidney by human immunodeficiency virus type-1 Vpr. *Retrovirology*, 10:83, 2013.
- 6) Richard J, Pham TN, **Ishizaka Y**, Cohen EA. Viral protein R upregulates expression of ULBP2 on uninfected bystander cells during HIV-1 infection of primary CD4⁺ T lymphocytes. *Virology* 443:248-56, 2013.
- 7) Matsuyama S, Matsunaga A, Sakamoto S, Iida Y, Suzuki Y, **Ishizaka Y**, Yamauchi K, Ishikawa T, Shimura M. Metallomics. Scanning protein analysis of electrofocusing gels using X-ray fluorescence. *Metallomics* 5: 492-500, 2013 (DOI: 10.1039/C3MT20266F).
- 8) Koyama T, Sun B, Tokunaga K, Tatsumi M and **Ishizaka Y**. DNA damage aids human immunodeficiency virus type 1 infection by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
2. 学会発表
- 1) 飯島健太、石坂幸. The functional analysis of DNA damage induced LINE-1 retrotransposon. 第 29 回放生研・放医研国際シンポジウム. 2013 年 11 月、京都.
- 2) 高品智記、石坂幸人. 新規ペプチドベクターによるウイルスフリー iPS 細胞作成技術開発. BIOtech2013 -第 12 回 国際バイオテクノロジー展/技術会議. 2013 年 5 月、東京.
- 3) 高品 智記、石坂幸人. Vpr 由来ペプチドベクターによるウイルスフリー iPS 細胞作成法の確立と応用. 白馬シンポジウム in 名古屋. 2013 年 7 月、名古屋.
- 4) 高品 智記、石坂幸人. 新規核指向性ペプチド NTP を用いた細胞形質転換方法の開発. 第 36 回日本分子生物学会年, 2013 年 12 月、神戸.
- 5) 豊岡理人, 松永章弘, 山崎茉莉亜, 志村まり, 田中紀子. メチル化アレイ測定データの分布に基づくサンプル品質管理及び人種差を考慮したプローブフィルタリングの妥当性の検討. 日本人類遺伝学会第 58 回大会. 2013 年 11 月、宮城.
- 6) 松永章弘, 比島恒和, 田中紀子, 山崎茉莉亜, 吉田壘, 望月眞, 田沼順子, 岡慎一, 石坂幸人, 志村まり, 萩原将太郎, エピジェネティクス解析によるエイズ関連悪性リンパ腫の病態理解, 第 36 回日本分子生物学会, 2013 年 12 月、神戸.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
発明人、石坂幸人、長谷川正勝、野原聡
発明の名称、「新規核移行ペプチド」
出願人、国立国際医療センター総長、
米国特許番号 8455616、
登録日 2013 年 6 月 4 日
日本特許番号 5403681、
登録日平成 25 年 11 月 8 日
参考資料として
日本国、米国での特許承認を示す書面を添付する
2. 実用新案登録 無
3. その他 特許出願



特許証
(CERTIFICATE OF PATENT)

特許第5403681号
(PATENT NUMBER)

発明の名称
(TITLE OF THE INVENTION)

新規核内移行ペプチド

特許権者
(PATENTEE)

東京都新宿区戸山1丁目21番地1号

独立行政法人国立国際医療研究センター

発明者
(INVENTOR)

石坂 幸人
長谷川 正勝

その他別紙記載

出願番号
(APPLICATION NUMBER)

特願2009-502646

出願日
(FILING DATE)

平成20年 3月 6日(March 6, 2008)

登録日
(REGISTRATION DATE)

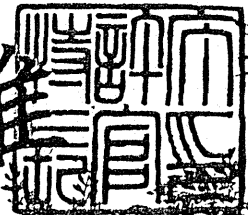
平成25年11月 8日(November 8, 2013)

この発明は、特許するものと確定し、特許原簿に登録されたことを証する。
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE JAPAN PATENT OFFICE.)

平成25年11月 8日(November 8, 2013)

特許庁長官
(COMMISSIONER, JAPAN PATENT OFFICE)

羽藤 秀雄



特許証

(CERTIFICATE OF PATENT)

(続葉 1)

特許第5403681号 (PATENT NUMBER)

特願2009-502646 (APPLICATION NUMBER)

發明者
(INVENTOR)

野原 聡

[以下余白]



US008455616B2

(12) **United States Patent**
Ishizaka et al.(10) Patent No.: **US 8,455,616 B2**(45) Date of Patent: **Jun. 4, 2013**(54) **NUCLEAR TRANSLOCATION PEPTIDE**(75) Inventors: Yukihito Ishizaka, Tokyo (JP);
Masakatsu Hasegawa, Nagoya (JP);
Satoshi Nohara, Gifu (JP)(73) Assignee: National Center for Global Health and
Medicine, Tokyo (JP)(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this
patent is extended or adjusted under 35
U.S.C. 154(b) by 698 days.

(21) Appl. No.: 12/450,010

(22) PCT Filed: Mar. 6, 2008

(86) PCT No.: PCT/JP2008/054563

§ 371 (c)(1),

(2), (4) Date: Mar. 1, 2010

(87) PCT Pub. No.: WO2008/108505

PCT Pub. Date: Sep. 12, 2008

(65) **Prior Publication Data**

US 2010/0203611 A1 Aug. 12, 2010

(30) **Foreign Application Priority Data**

Mar. 7, 2007 (JP) 2007-057387

(51) **Int. Cl.**

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**

USPC 530/328; 514/21.6; 514/21.8

(58) **Field of Classification Search**

USPC 530/328; 514/21.6, 21.7

See application file for complete search history.

(56) **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**5,652,122 A 7/1997 Frankel et al.
2003/0077826 A1* 4/2003 Edelman et al. 435/440**FOREIGN PATENT DOCUMENTS**WO 99/09412 2/1999
WO WO 2005103654 A2* 11/2005
WO WO2005103654 A2* 11/2005**OTHER PUBLICATIONS**Taguchi et. al. Nuclear trafficking of macromolecules by an
oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus
type-1, vol. 320, Issue 1, p. 18-26, Jul. 16, 2004.*
International Search Report issued Jun. 3, 2008 in International
(PCT) Application No. PCT/JP2008/054563.
Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G,
Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia
homeodomain is receptor-independent. J Biol Chem. Jul. 26,
1996;271(30):18188-93. PubMed PMID: 8663410.Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a
herpesvirus structural protein. Cell. Jan. 24, 1997;88(2):223-33.
PubMed PMID: 9008163.Hasegawa, M. Research on Peptide Addition to Magnetic Nano Particles
and Optimization—Shared Research Report (2006). Groundbreaking
Cutting-edge Medical Technology Development and Implementation
Research Project (accompanied by English language translation).Hasegawa, M. Research on Peptide Addition to Magnetic Nano Particles
and Optimization—Shared Research Report (2007). Groundbreaking
Cutting-edge Medical Technology Development and Implementation
Research Project (accompanied by English language translation).Mizoguchi I, Ooe Y, Hoshino S, Shimura M, Kasahara T, Kano S,
Ohta T, Takaku F, Nakayama Y, Ishizaka Y. Improved gene expression
in resting macrophages using an oligopeptide derived from Vpr of
human immunodeficiency virus type-1. Biochem Biophys Res Commun.
Dec. 23, 2005;338(3):1499-506. Epub Oct. 27, 2005. PubMed
PMID: 16274667.Mukai Y, Sugita T, Yamato T, Yamanada N, Shibata H, Imai S, Abe Y,
Nagano K, Nomura T, Tsutsumi Y, Kamada H, Nakagawa S, Tsunoda
S. Creation of novel Protein Transduction Domain (PTD) mutants by a
phage display-based high-throughput screening system. Biol
Pharm Bull. Aug. 2006;29(8):1570-4. PubMed PMID: 16880606.Taguchi T, Shimura M, Osawa Y, Suzuki Y, Mizoguchi I, Niino K,
Takaku F, Ishizaka Y. Nuclear trafficking of macromolecules by an
oligopeptide derived from Vpr of human immunodeficiency virus
type-1. Biochem Biophys Res Commun. Jul. 16, 2004;320(1):18-26.
PubMed PMID: 15207696.Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic
domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates
in the cell nucleus. J Biol Chem. Jun. 20,
1997;272(25):16010-7. PubMed PMID: 9188504.Zhao M, Kircher MF, Josephson L, Weissleder R. Differential conjugation
of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on
cellular uptake. Bioconj Chem. Jul.-Aug.
2002;13(4):840-4. PubMed PMID: 12121140.Extended European Search Report issued Jul. 5, 2010 in corresponding
European Application No. 08 73 8644.Wang et al.; "Characterization of Leucine-Zipper-Like Domain in
Vpr Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1"; Gene;
1996; vol. 178, No. 1-2; pp. 7-13.Coeytaux et al.; "The Cationic Amphipathic α -Helix of HIV-1 Viral
Protein R (Vpr) Binds to Nucleic Acids, Permeabilizes Membranes,
and Efficiently Transfects Cells"; The Journal of Biological Chemistry;
2003; vol. 278, No. 20; pp. 18110-18116; USA.Koita et al.; "Confirmation of Immunogenic Consensus Sequence
HIV-1 T-Cell Epitopes in Bamako, Mali and Providence, Rhode
Island"; Human Vaccines; 2006; vol. 2, No. 3; pp. 119-128.

* cited by examiner

Primary Examiner — Christina Bradley

Assistant Examiner — Jeanette Lieb

(74) Attorney, Agent, or Firm — Wenderoth, Lind & Ponack,
L.L.P.(57) **ABSTRACT**The present invention provides a peptide comprising amino
acid sequences R I, F I and R I G C and containing 25 or fewer
amino acid residues, and capable of transporting a functional
molecule into a cell, and also into a nucleus, more efficiently
than a previous PTD.

7 Claims, 5 Drawing Sheets

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

「脂肪組織由来間葉系幹細胞からの迅速肝細胞分化誘導」に関する研究

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療研究センター研究所
細胞組織再生医学研究部・部長

研究要旨：

目的：脂肪組織由来間葉系幹細胞からの迅速かつ高機能な肝細胞の分化誘導

方法：ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に対して、Banas らが 2009 年に J Gastro Hepatol に報告した三段階誘導法を検証するとともに、第一段階において NTP 付加型タンパク質の添加による細胞への影響を検証した。

結果：5 種類のヒト脂肪由来間葉系幹細胞を使用したが、細胞成長因子やサイトカインに対する反応性がそれぞれ異なることが判明した。NTP 付加型タンパク質の導入そのものによる細胞への影響については問題なかった。

考案：ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、最初の内胚葉への分化ステップが重要であり、導入する転写因子の種類と至適濃度をさらに詳しく検討する必要がある。

A. 研究目的

本研究計画では 3 段階の肝細胞分化誘導法と新しい蛋白導入法を組み合わせ、肝細胞への分化の鍵となる転写因子等を導入することで、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞からより高機能な肝前駆細胞や肝細胞へ分化誘導する方法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

a. 三段階分化法による肝細胞の分化誘導法：

ヒト脂肪由来間葉系幹細胞に対して、Banas らが 2009 年に J Gastro Hepatol に報告した三段階誘導法の分化誘導効率を検証、確認するために、市販のヒト脂肪組織由来幹細胞含む 5 株の細胞を用いて三段階誘導法を行い、それぞれ処理の第一段階の 3 日目、第二段階の 10 日目、そして第三段階の 4 日目で細胞を回収し、RT-PCR 法を用いて HNF-1、HNF-3、HNF-4、HEX、および Albumin、TPO の発現

を調べた。

b. 分化誘導 NTP 付加型タンパク質による影響を検証：三段階誘導法の第一段階において NTP 付加型タンパク質の添加による影響を検証するために、96well のマルチプレートに 1well あたり 5000 個のヒト脂肪細胞由来の間葉系幹細胞を播種した。1well 当たり最大 210ng までの NTP-TEV タンパク質と最大 70ng までの NTP 付加型の HNF-3 β または HNF-4 α を加えて培養して細胞の変化を調べた。また、対照群として無処理のヒト脂肪由来幹細胞に対して同様に NTP-TEV タンパク質と NTP 付加型の HNF-3 β または HNF-4 α を添加して細胞の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

ヒトの脂肪組織から細胞を分離したが、倫理委員会の承認を受けた上で、術前に

書面による同意の得られた患者からの検体を用いた。

C. 研究結果

a. 間葉系幹細胞からより高機能な肝細胞の分化誘導法の確立：報告されている3段階のヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞から肝細胞へ分化誘導する培養方法の再現および確認を行った。誘導には市販されているヒト脂肪組織由来幹細胞である ASC-F (DS Pharma) および HADSC (Lonza) と同意を得て採取した皮下脂肪から培養した間葉系幹細胞3株など合計5株を用いた。3段階誘導法の効果を確認するために、それぞれの処理の最終日で細胞を回収し、RT-PCR を用いて遺伝子発現を調べた。その結果、大半の細胞株では第一段階において HNF-1 α 、HNF-3 β および HNF-4 α の発現を確認できず、第二および第三段階において一部の細胞株でのみアルブミンの微弱な発現を確認できた。また、第二段階の処理によって細胞死および剥離をおこす細胞株があり、ほかの細胞株においても外形上に典型的な肝臓前駆細胞に近い細胞集団と典型的な肝臓前駆細胞とは異なる細胞集団が認められるなど、三段階誘導法による分化誘導効率は細胞毎に異なり、安定しないことが判明した。

論文報告では三段階誘導法の第一段階の処理が終わる三日目に HNF-3 β の発現を確認できるとされていたので、第一段階において HNF-3 β が発現する条件を検討した。また、肝臓発生過程では前腸内胚葉が FGF と BMP の刺激を受けて肝芽が形成するという発生学の知見から、第一

段階誘導法に用いられる Fgf4 と Activin A の濃度を論文より2倍、3倍に引き上げた条件を用い、これまでもっとも良い分化誘導効率を示したヒト細胞株に対して3日間処理したのち、PCR を用いて HNF-3 β の発現を調べた。その結果、FGF4 または Activin A の濃度を倍以上引き上げると HNF-3 β の発現が確認され、その発現様式は Activin A の濃度に応答して濃度依存性を示した。また、FGF4 と Activin A の濃度を同時に引き上げるとより強い HNF-3 β の発現を引き起こすことが確認された。

b. 分化誘導 NTP 付加型タンパク質による影響を検証

本研究では NTP 付加型タンパク質による遺伝子導入によって高機能な肝細胞の分化誘導法の確立を目指している。NTP 付加型タンパク質による実験を実施する際に、まず NTP 付加型タンパク質の導入そのものによる影響について検証した。96well のマルチプレートにヒト脂肪細胞由来の幹細胞を播種し、Fgf4 と Activin A を加えると同時に切断タンパクと共に NTP 付加型の HNF-3 β および HNF-4 α を加えて培養して細胞の変化を調べた。タンパク質を加えていない細胞と比べて、一部の NTP 付加型タンパク質を添加された細胞では、細胞死の減少がみられた。また、NTP 付加型タンパク質が添加された細胞では顕著な変化が認められず、HNF-3 β および HNF-4 α 単独の添加では ASC に対して顕著な誘導効果が認められなかった。

D. 考 察

ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、5種類の細胞を使用したが、それぞれ細胞成長因子やサイトカインに対する反応性が異なることが判明した。特に同じ細胞でも継代による違いも認められたことから、至適条件は変わりうると認識する必要がある。特に3段階分化法の第一段階は内胚葉に分化させるための重要なステップであり、本研究の主眼とする転写因子の蛋白導入法を併用することで、この第一段階の内胚葉分化を効率的に行えると考えている。NTP 付加型蛋白導入による細胞への影響は問題ないと考えられるので、今後導入する転写因子の種類と至適濃度を詳細に検討していきたい。

E. 結 論

ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導するに当たり、最初の内胚葉分化へのステップが重要であり、NTP 付加型蛋白導入法の効果が鍵を握っている。

研究発表

なし。

なし。

1. 論文発表

- 12) Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T, Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(16):6412-7, 2013
- 13) Suga H, Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, **Okochi H**, Sato S. CXCR3 Deficiency Prolongs Th1-Type Contact Hypersensitivity. *J Immunol*. 190(12): 6059-70, 2013
- 14) Kimura T, Sugaya M, Blauvelt A, **Okochi H**, Sato S. Delayed wound healing due to increased interleukin-10 expression in mice with lymphatic dysfunction. *J Leukoc Biol* 94(1): 137-45, 2013.

2. 学会発表

無し。

H. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

自己幹細胞からの革新的肝再生療法の開発と応用

研究分担者 霜田 雅之 国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト研究長

研究要旨 本課題では、新規ペプチドベクター（NTP）付加型蛋白質を用いて「ヒト間葉系幹細胞→肝臓細胞への分化誘導」や「ヒトiPS細胞の作成→肝臓細胞への分化誘導」するためのシステムを確立することが目的である。

分担研究者の分担は、本技術を最終的に肝硬変患者に臨床応用するために、小型動物での技術確立の次段階として中、大動物を用いた移植実験によってその有効性と安全性を検証することである。

研究方法： 中動物として、ミニブタもしくはさらに低体重のマイクロブタ、もしくはマーモセットがあるが、なかでも小型霊長類であるマーモセットに注目した。H25年度は、基礎データ収集および実際に移植部位となる腹腔内の検証を行う。

成果、結果： H25年度はマーモセットを用いて血液・尿検査・肝機能を含む生化学検査のデータを収集した。全身麻酔下に開腹手術を行い、肝臓および周囲血管、腹腔内臓器の検証を行った。

考察・結論： H25年度はマーモセットを用いた基礎データの収集を行った。H26年度からの肝障害モデル作製と移植実験を予定している。

A. 研究目的

本課題では、新規ペプチドベクター（NTP）付加型蛋白質を用いて「ヒト間葉系幹細胞→肝臓細胞への分化誘導」や「ヒトiPS細胞の作成→肝臓細胞への分化誘導」するためのシステムを確立することが目的である。しかし、幹細胞由来肝細胞の評価を肝障害中動物モデルで行う方法は確立されていない。分担研究者の分担は、分化細胞の臨床応用のために小型動物での技術確立の次段階として中、大動物を用いた移植実験によってその有効

性と安全性を検証することである。

B. 研究方法

分化細胞の評価を行うモデルを確立する。本研究では、小型霊長類であるマーモセットに注目した。初めに、正常な個体を用いて細胞の移植実験を行い、移植方法や移植細胞の生着性、グラフト機能の評価および腫瘍化の有無や全身への遊走性などレシピエントの安全性を検証する。次段階として、肝障害モデル動物に対する移植実験を行う。まず、治療を

施さなければ致死に至る程度の肝障害モデルを作成するが、細胞移植は同所性の肝臓をターゲットに血管を通して行われるため、肝実質および血管系は保たれている必要がある。また、肝は再生能力の強い臓器であるため、軽度の障害では自己回復してしまう。移植細胞効果の評価のためには、ある程度の期間肝障害が持続することが望ましいが、まずは急性期の障害に対する効果の検証を目的として、これらの特性を踏まえて再現性の高い急性肝障害モデルを確立する。さらに、移植後の免疫抑制剤使用が必要であるので、薬剤投与方法の最適化を行う。モデル確立後、細胞移植を行い、最適な移植方法、細胞量を検討し、肝機能を評価する。

年次計画は以下である。

平成25年度：正常な個体を用いて細胞の移植を行い、移植方法や移植細胞の生着性、グラフト機能の評価および腫瘍化の有無や全身への遊走性などレシピエントの安全性を検証のための実験を開始する。

平成26年度

前年度の実験を引き続き行う。
肝障害モデルを作製する。
肝障害モデルに細胞移植実験を開始する。

平成27年度

引き続き細胞移植実験継続
評価項目のデータ収集

C. 研究結果

H25 年度は正常なマーマセットを用いて生理的、血液学的基礎データの収集を行った。霊長類であるマーマセットはヒトに近い生理・代謝機構をもつと考えられるが、実際にデータを評価し、文献値と比較した。特に肝機能、糖代謝、タンパク量・脂質等を評価した。これらの項目は、ヒトとほぼ同等であった。また、開腹手術を行って細胞を移植する部位となる肝臓や門脈等血管の解剖およびサイズ等の検証を行った。

また、臨床試験の際に細胞調製を行うに当たって細胞の品質管理に必要な GMP 基準を満たす細胞調製施設(CPC)を NCGM 内に稼働させた。

D. 考察

H25 年度の計画は順調に経過したが、全体の研究進捗を鑑みて時期尚早であるため、マーマセットへの移植実験は行っていない。

E. 結論

H26 年度からはマーマセットの肝障害モデル作製や移植実験を開始する予定である。

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

1. Tamai M, Shimoda M, Matsumoto S.

Questionnaire Survey on the Perception of Type 1 Diabetic Patients and Family Members about Allogeneic and Bio-artificial Islet Transplantation, DNA Vaccine, and iPS Cellular Therapy. 2013 International Conference on Diabetes and Metabolism & 5th AASD Scientific Meeting Seoul, Korea November 6-9th, 2013

2. Shimoda M, Tamai M, Matsumoto S.

MOTIVATION FOR RECEIVING ALLOGENEIC AND XENOGENIC ISLET TRANSPLANTATION AMONG JAPANESE TYPE 1 DIABETIC PATIENTS. 12th CONGRESS INTERNATIONAL XENOTRANSPLANTATION ASSOCIATION