

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）
総括研究報告書

「自己幹細胞からの革新的肝再生療法の開発と応用」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ペクター(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、マーム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

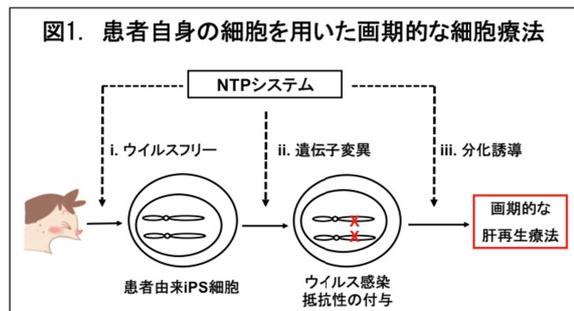
国立国際医療研究センター研究所
膵島移植プロジェクト研究

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ペクター(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



ルスの増殖に關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 (*PI4KIII*、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 Hepetocyte 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。ウイルス感染に關与する 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、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 へクローニングした (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 Sca1 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 2 μ l 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、HNF-3 および

HNF-4 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 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 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 の発現を調べた。その結果、HNF-3

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 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と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臓障害モデルマウスに移植し、生着率、肝臓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、肝臓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. 健康危険情報 特記事項無し。

G. 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.
- 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.
- 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. メチル化アレキ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, 吉田罌, 望月眞, 田沼順子, 岡慎一, 石坂幸人, 志村まり, 萩原将太郎, エビジェネテイ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

2. 学会発表

- 1) 飯島健太、石坂幸. The functional analysis of DNA damage induced LINE-1 retrotransposition. 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

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