

「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。

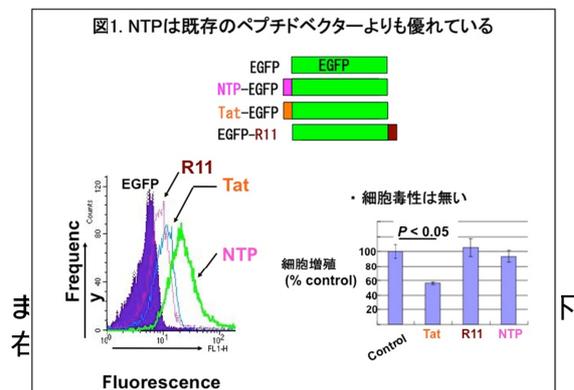
A. 研究目的

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)。

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 factor 3β (HNF3 β) や HNF1α 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□(PI4K□)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 組み替え蛋白質を用いて、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、PI4K□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 を用いた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 ScaI 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 /1day/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 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、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、肝臓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, 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.

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, 萩原將太郎, 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.

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