

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 26 年度の研究成果として、人工制限酵素として開発された TALE(transcription activator-like effectors)に転写因子として機能する VP64(4 つの VP16 からなる転写因子)を融合させた人工転写因子を NTP と組み合わせることで、簡便、かつ、効率的に標的遺伝子の発現を誘導できることが分かった。次年度では、実験のスケールをアップし、マウ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

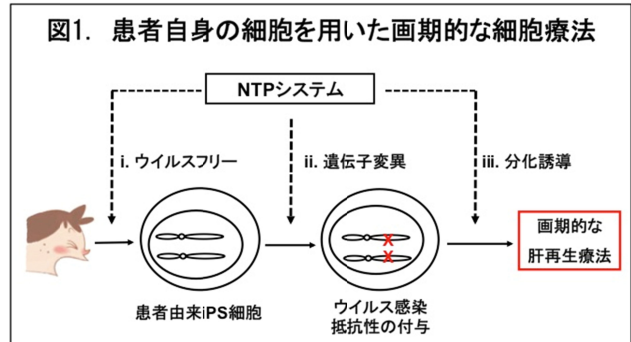
国立国際医療研究センター
膵島移植プロジェクト長

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。しかし、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、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 システムを用いて新しい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リスクが大幅に軽減され、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 Hepatocyte nuclear factor (以下 HNF) 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、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ルを 2009 年に報告した。

以上を背景に、NTP 付加型蛋白質を用いることで、細胞形質転換法の改良を図る。

B. 研究方法

a. 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を 96 well 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 した。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 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した。この 1 次分化培地での培養期間の 1 日目に 1 回のみ NTP 付加型蛋白質を 10 nM, 30 nM, 50 nM の濃度で添加した。添加後 3 日目の培養後細胞から 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。

ダイレ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ルを確立した。

NTP-TEV は細胞内導入後 24 時間、機能が持続する。そこで、添加プロトコルとして NTP 付加型蛋白質を培地に添加後 3 時間で培地を洗浄し、NTP-TEV を 3 倍モル比添加し、さらに 3 時間後にリンスし、NTP 付加型蛋白質を添加した。この操作を 1 次分化培地で培養している間、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 日間まで培養を継続した。二次分化培地で 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. マウス線維芽細胞からのウイルスフリー iPS の樹立

マウス胎児線維芽細胞を 6 well collagen coating plate に 2×10^4 cells/cm² となるように播種し、翌日から NTP 付加型蛋白質一定量添加した。

iPS 細胞の樹立には Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc(以下 NTP-OSKM)に加えて、iPS 化阻止因子として機能する Mbd3 (Methyl-CpG-binding domain 3) のドミナントネガティブ体(以下 dMbd3)を用いた。Mbd3 のアミノ酸 1-70 を欠損した分子が、野生型 Mbd3 機能を阻害することが報告されている。dMbd3 は、培養開始後 12 時間毎に 2 回、投与した。

NTP 付加型蛋白質を培地に添加し 3 時間後、NTP-TEV を 3 倍モル比で添加し、更に 3 時間後に再び NTP 付加型蛋白質を添加した。この操作を培養開始後、最初の 3 日間だけ行った。その後、ヒト副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を含む幹細胞培地で 2 日間培養し、その後は ACTH を含まない幹細胞培地で培養を継続した。

これまでの経験では、14~21 日程で iPS 様コロニーが出現する。十分な大きさに成長させた後にピックアップし、剥離液で分散した後、96 well plate もしくは 384 プレートへ播種した。

増殖した iPS 細胞は、胚盤胞補完法により仮親の子宮へと移植する。得られた iPS 細胞が多能性を有していれば、キメラマウスを得る事が出来る。さらに、ジャームラインへの寄与を確認するため、産まれた仔は ICR マウスと掛け合わせる。

d. TALE-VP64 を用いた内在性遺伝子の発現誘導法: ゲノム上の任意の位置に結合する TALE と転写アクチベーターである VP64(単純ヘルペスウイルス由来転写因子である VP16 を 4 つ連結させた分子)からなる人工転写因子の機能性も評価した。内在性遺伝子を発現誘導することは、外来性転写因子を作用させるよりも、様々な利点が考えられる(詳細は、「考察」)。NTP の下流に TALE と VP64 を融合し蛋白質として発現させた分子を用いて iPS

を樹立する事を試みた(以下 NTV)。添加因子として、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、dMbd3の他に Glis-1、L-Myc を用いた。

d. NTP を用いたゲノム編集技術の確立：

hPI4KA 遺伝子は alternative splicing によって long form と short form の 2 種類の mRNA を転写する。ウイルス感染に關与する long form を破壊するため、エクソン 37(Ex. 37) を標的とした人工制限酵素 (platinum TALEN : ptTALEN) を構築した。ptTALEN は、山本 卓博士 (広島大学大学院理学研究科・ゲノム生物学) との共同研究として使用した。ヌクレアーゼドメイン (Fok-1) 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 ptTALEN)。大腸菌の発現システムを用いて NTP 付加型 ptTALEN 蛋白質を精製した。この NTP 付加型 ptTALEN 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、Fok-1 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* Ex37 region)。Cleavage 効率を確認する為、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 DNA 500ng に対して精製タンパク質を各 50 ng 添加し 37 度にて 90 min 反応後、アガロース電気泳動にて確認した。また、上記 NTP 付加型 ptTALEN タンパク質を *PI4KA* の発現が確認されている HeLa 細胞に添加し、ゲノム編集効率を確認する手法として汎用される T7E1 Assay 及びシーケンス解析にて検討した。

e. マーモセットを用いた安全な肝臓への細胞移植法の基礎技術の確立

分化細胞の評価を行う中動物モデルを確立する。本研究では、小型霊長類であるマーモセットに注目した。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。

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 (石坂、大河内)

先行研究において、HNF3 β と HNF4 α は肝臓細胞の分化形質を維持している可能性が示唆

されている。そこで、この 2 つの転写因子に着目して、NTP 付加型蛋白質としてコムギ胚芽無細胞系蛋白質発現システムでこれらの蛋白質を発現・精製し、実験に供した。NTP 付 HNF3 β と HNF4 α タンパク質を 3 nM/3 回添加 /day/3day または、10 nM/2 回添加 /day/3days で同時に、作用させた。その結果、培養 15 日後に肝臓分化の指標である種々の mRNA 発現量の増加を認めた。

次に、より強力に分化転換を促すため、NTP の N 末側の Tag をグルタチオン S トラंसフェラーゼ (GST) ではなく、6xHis Tag に変更した分子を調整した。大腸菌発現誘導系にて大量に精製した NTP 付加型 HNF3 β と HNF4 α 蛋白質を 10 nM, 30 nM および、50 nM の 1 回添加後、肝臓細胞への分化誘導の有無を評価した。その結果、添加 3 日目において内在性 HNF3 β 、HNF4 α 及び肝臓分化指標である α -フェトプロテイン (AFP) とサイトケラチン 18 (CK18) の発現増加を認めた。

b. TALE-VP64 を用いた内在性遺伝子の発現誘導

NTV システムで内在性遺伝子発現を誘導できるか否かについて、qRT-PCR で検証した。その結果、NTP に直接転写因子を付加した蛋白質を使用した場合よりも、より低い濃度で、内在性遺伝子の発現を誘導することが分かった。また、添加後 10 日目に、プレート一枚から全ての細胞を回収し、ウイルス感染群と Oct3/4 や Sox2 の内在性遺伝子発現レベルを比較した。

その結果、NTV 投与群は、ウイルス感染群と匹敵する遺伝子発現を示す一方、これまで行ってきた NTP 付き転写因子を作用させた群では、内在性遺伝子の発現上昇を認めなかった。

c. マーモセットに対する安全な肝臓への細胞移植法の基礎技術の確立

正常なマーモセットに対して肝障害性薬剤を投与して急性肝障害を誘導した。薬剤投与量に応じて肝酵素および胆道系酵素の上昇を認め、肝不全により 1 ~ 3 週間で死亡した。生理的、血液学的データの収集を行い、肝臓の組織学的検証を行った。

d. NTP を用いたゲノム編集技術の確立：同条件にて NTP 付 pt-TALEN タンパク質の Cleavage 活性を検討したところ NTP 付加型 pt-TALEN も NTP を付加していないものと同

様の頻度で Cleavage 活性を示すことが確認された。

今回精製した NTP-hPI4Ka Ex. 31 pt-TALEN は類似した同遺伝子の異なるゲノム部位であるエクソン 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. hMSCs からの肝臓細胞への分化誘導：蛋白質ベースによる分化転換法として、NTP 付加型 HNF3 β 、HNF4 α を間葉系幹細胞に添加した。間葉系幹細胞から肝前駆細胞への既存の分化誘導プロトコールに沿って培養を継続したところ、NTP 付加型タンパク質添加群は未添加群と比較して、肝前駆細胞への早期の分化誘導を認めた。今回、さらに肝前駆細胞へのコミットをより早期に実現する為、NTP の核移行能を最大限に利用できるように NTP の N 末側の GST タグを 6xHis Tag に変更した。これまでの GST 融合型 NTP 付加蛋白質を用いた分化転換法と比較して、6xHis 融合型 NTP 蛋白質は添加後 3 日時点において濃度依存的に内在性 HNF3 β 、HNF4 α 、及び、肝臓分化の指標である種々の mRNA 発現量の増加を認めた。

また、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 または HNF-4 を添加して細胞の変化を観察したところ、3-dioxygenase (TD0) の発現は影響されなかったが、HNF-3 と HNF-4 同時投与では TD0 発現の若干の増加が認められた。

b. TALE-VP64 を用いた内在性遺伝子の発現誘導法：

また、今回、iPS 化に必要な遺伝子や HNF3 β や HNF4 α を標的にした NTP 付加型 TALE-VP64 蛋白質も、人工転写因子として機能することを認めた。TALE-VP64 による遺伝子発現誘導は、転写因子そのものを用いるシステムと比較して、様々な利点が考えられる。例えば、i. 内在性遺伝子プロモーター自身からの遺伝子発現のため、自然な転写後修飾が期待できる。

ii. NTP-TALE-VP64 が基本的な構造であり、発現ベクターの調製や、組み換え蛋白質の精製をプロトコール化できる。

iii. 重要な遺伝子の発現に関わるプロモーター配列は、種間で良く保存されているため、

同じ分子を、他の種に由来する細胞に使用できる。

iv. また、実際に添加実験を行った結果、NTV 付き人工転写因子は低濃度で機能することも分かった。即ち、標的遺伝子の発現誘導は、0.25 nM から 3 nM の濃度で可能であった。一方、転写因子そのものを NTP 付きで作用する場合には、数十 nM の濃度を要した。このように、NTV システムは利便性に優れており、コムギ胚芽無細胞蛋白質発現系で充分に対応できるため、迅速に実験を進めることが可能である。

v. 臨床展開を視野に入れた際、患者細胞の培養期間をできるだけ短縮することが重要である。NTV システムでは、作用後、数時間以内に目的の遺伝子を誘導できる。以上から、このシステムには高い、臨床応用性が期待できる。

次年度では、NTP 付加型蛋白質を作用した MSC を肝障害モデルマウス(ジフテリア毒素に対するヒト受容体をアルブミン遺伝子の下流で発現するマウス：TRECk マウス)に移植し、生着率、肝障害の軽減の有無及びヒトアルブミンの検出を解析し、本課題の目標を達成する。

c. NTP を用いた蛋白質によるゲノム編集

今回、大腸菌にて精製した NTP 付加型 pt-TALEN 蛋白質が、標的配列を特異的に切断することを認めた。また NTP 付き蛋白質が細胞内に導入されることも確認された。培養細胞への添加実験においていくつかの変異株は得ることができたが、ゲノム編集の効率はまだ十分ではない可能性が危惧される。今回作成した pt-TALEN コンストラクトは NTP の N 末側に分子量約 25kDa の GST-Tag が付いている為、NTP の核移行能を阻害している可能性も考えられる。こちら NTP の N 末側の Tag をより分子量の小さなものに変更することで、より核移行能が高まり、TALEN の機能を活かせることができると推測される。

次年度では、TALE システムに加えて、第三世代の人工制限酵素システムである Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) システムの有用性も検討する予定である。ひとたび、NTP 付 Cas9 が機能すれば、ガイド RNA を変えることで、様々な遺伝子のゲノム編集に応用可能になる。研究期間中に、基盤技術としての

有用性を証明したい。

E. 結論

1. NTP 付加型転写因子の投与によって、hMSC からの肝臓細胞への分化誘導が促進される傾向を認めた。
2. NTP 付き TALEN 蛋白質でゲノム編集を行える可能性が明らかになった。

F. 健康危険情報 特記事項無し.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsubo T, Okamura T, Hagi T, Ishizaka Y, Kawamura T, Dohi T. Retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 is associated with colitis but not tumors in a murine colitic cancer model. *PLOS ONE*, 10(2):e0116072, 2015.
- 2) Kokuryo D, Nakashima S, Ozaki F, Yuba E, Chuang KH, Aoshima S, Ishizaka Y, Saga T, Kono K, Aoki I. Evaluation of Thermo-triggered Drug Release in Intramuscular-transplanted Tumors using Thermosensitive Polymer-modified Liposomes and MRI. *Nanomedicine*, 11(1):229-38, 2015.
- 3) Haga S, Tsuchiya H, Hirai T, Hamano T, Mimori A, Ishizaka Y. A novel ACE2 activator reduced monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF- β cascades with restored caveolin-1 expression. *Experiment. Lung Res.*, 41(1):21-31, 2015.
- 4) Okudaira N, Ishizaka Y, Nishio H. Retrotransposition of long interspersed element 1 induced by methamphetamine or cocaine. *J. Biol. Chem.*, 289(37):25476-85, 2014.
- 5) 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.* 184:93-102, 2014.
- 6) Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Mimori A. Identification of novel autoantibodies to GABA_B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 53:1219-28, 2014.
- 7) Doi A, Iijima K, Kano S, Ishizaka Y. Viral protein R of human immunodeficiency virus type-1 induces retrotransposition and upregulates glutamate synthesis by the signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathway. *Microbiology and Immunology*, in press.
- 8) Sugimoto K, Itoh T, Takita M, Shimoda M, Chujo D, SoRelle JA, Naziruddin B, Levy MF, Shimada M, Matsumoto S. Improving allogeneic islet transplantation by suppressing Th17 and enhancing Treg with histone deacetylase inhibitors. *Transpl Int.* 2014 Apr;27(4):408-15.
- 9) Shimoda M, Chen S, Noguchi H, Takita M, Sugimoto K, Itoh T, Chujo D, Iwahashi S, Naziruddin B, Levy MF, Matsumoto S, Grayburn PA. A New Method for Generating Insulin-Secreting Cells from Human Pancreatic Epithelial Cells After Islet Isolation Transformed by NeuroD1. *Hum Gene Ther Methods.* 2014 Jun;25(3):206-19.
- 10) Takita M, Itoh T, Shimoda M, Kanak MA, Shahbazov R, Kunnathodi F, Lawrence MC, Naziruddin B, Levy MF. Pancreatic Ductal Perfusion at Organ Procurement Enhances Islet Yield in Human Islet Isolation. *Pancreas.* 2014 Nov;43(8):1249-55.
- 11) Questionnaire Survey of Patients with Type-1 Diabetes Mellitus and Their Family Members on the Acceptance of Newly Emerging Therapies. *Journal of Diabetes & Metabolism* in press.

2. 学会発表

1)高品智記、石坂幸人、NCGM 発ペプチドベクター、-現状の説明と今後の展開-シンポジウム、「再生医療とウイルス研究」、第 28 回日本エイズ学会、2014 年 12 月、大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 特許出願