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」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を可能にするシステムを開発し、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も立ち上げる。平成 26 年度、NTP を付加した転写因子によって肝臓細胞への分化誘導が促進されることが分かった。また、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、この NTP 付人工転写を用いた肝臓細胞分化誘導システムの in vivo での効果を検証する。

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、充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、革新的なシステムの開発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この 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。

近年、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□（*PI4KIII□*）遺伝子に変異を導入すると、ウイルス感染抵抗性を誘導できることが報告された。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。

以上を背景に、本課題では、まず、NTP 付き蛋白質を用いて、
I.転写因子を用いた細胞分化誘導を確立する ことと平行して、
II.蛋白質によるゲノム編集
を試みる。

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。上記 II では、このゲノム編集技術を応用する。第一世代の人口制限酵素は zinc-finger nuclease（ZFN）で、ゲノム DNA を認識するモジュールとエンドヌクレアーゼ作用を示す FokI とのキメラ蛋白質が開発された。Fok1 は、２量体を形成して初めて DNA 切断活性を示すため、ゲノム二重鎖 DNA のそれぞれのストランドの配列を認識する２種類の ZFN を作用することで、FokI 作用が発揮し、ゲノム部位選択的に DNA を切断できる。第二世代の人工制限酵素として、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容易になった。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。今年度は、NTP と TALEN とを融合させ、*PI4KIII□*遺伝子破壊を試みた。

B. 研究方法

I.NTP 付き転写因子を用いた細胞分化誘導

a.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 $2x10^4$ cells/cm^2 となるように播種し、翌日から NTP 付加型蛋白質を規定量添加した。

NTP 付加型蛋白質は全て N 末側にタグが付与されている。タグ配列と ORF 配列の間に TEV プロテアーゼ認識配列を組み込んでいる。そのため細胞内に導入後、NTP-TEV プロテアーゼ蛋白質を添加し細胞内でタグ配列を切断できる。Oct3/4 や Sox2 等の転写因子は、N 末側に Tag が付いていると本来の機能が発現しない可能性が指摘されている。NTP-TEV で Tag を切断することで、蛋白質本来の作用を発揮出来る様にした。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。

NTP-TEV は細胞内導入後 24 時間にわたり効果が持続する為,添加プロトコールとして NTP 付加型蛋白質を培地に添加し 3 時間後、NTP-TEV を 3 倍モル比で添加した。更に 3 時間後に再び NTP 付加型蛋白質を添加する。この操作を初期の 3 日間のみ行った。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。充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。

b.TALE-VP64 を用いた内在性遺伝子の発現誘導による iPS 樹立: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も試みた。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 (NTP 付き TALE-VP64、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。

c. hBMMSCs 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 96 well collagen coating plate に $2x10^4$ cells/cm^2 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。

II.NTP を用いた蛋白質によるゲノム編集

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。ウイルス感染に関与する 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(platina TALEN:pt-TALEN)を構築した。Pt-TALEN は、山本 卓博士 (広島大学大学院理学研究科・ゲノム生物工学)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 pt-TALEN)。大腸菌の発現システムを用いて NTP 付加型 pt-TALEN 蛋白質を精製した。この NTP 付加型 pt-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、Folk-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 500 ng 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 pt-TALEN 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 及びシークエンス解析にて検討した。

C. 研究結果

I.NTP 付き転写因子を用いた細胞分化誘導

a. マウス繊維芽細胞からのウイルスフリー iPS の樹立：NTP-OSKM と NTP-dMbd3 を用いる事で iPS 様の細胞塊を得る事が出来た。得られたクローンは胚盤胞補完法によりマウスの仮親へ移植したが、キメラ、ジャームラインへ寄与する事が出来たのは１つのクローンのみであり非常に再現性が低かった。

b. TALE-VP64 を用いた内在性遺伝子の発現誘導による iPS 樹立：

まず、NTV システムが内在性遺伝子発現を誘導できるか否かについて、qRT-qPCR 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(表 1)。

表1. NTP付TALE-VP64は低濃度で優れた転写誘導活性を示す

発現系	内在性遺伝子のmRNA発現				
	Oct3/4	Sox2	Klf4	c-myc	Nanog
コントロール(MEF)	1	1	1	1	1
ウイルスベクター	18	31	65	27	49
NTP付蛋白質	0.1	0.7	1.3	1.3	0.3
NTP付TALE-VP64	16	21	111	138	45

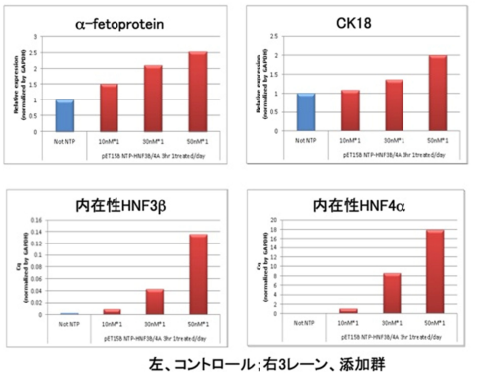
・培養開始10日後のqRT-PCR解析結果
・濃度:0.25 nM

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(表１最下段)、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(表１下から二段目)。

c. hBMMSCs からの肝臓細胞への分化誘導

先行研究において、HNF3β と HNF4α 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 付加型 HNF3β と HNF4α タンパク質を 同時に、3 nM/3 回添加/day/3day または、10 nM/2 回添加/day/3days で作用させた。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 トランスフェラーゼ(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 HNF3β と HNF4α 蛋白質を 10ｎM,30ｎM および、50nM 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 HNF3β、HNF4α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（図 2)。

図2:NTP付転写因子による肝前駆細胞への分化誘導



左、コントロール;右3レーン、添加群

iPS 化実験において、NTV が機能することが分かったので、HNF3β と HNF4α の発現誘導系にも応用した。それぞれの遺伝子の Proximal promoter 近傍に TALE を設計し、VP64－TALE と NTP との融合蛋白質による新規分化転換法を検討した。その結果、添加翌日に回収したサンプルで、いずれの遺伝子も

発現上昇を示すことを認めた。

II.NTP を用いた蛋白質によるゲノム編集

まず、NTP 付加型 pt-TALEN 蛋白質の活性を確認した後、同遺伝子産物を細胞内で発現させた際のゲノム変異機能を評価した。即ち、CMV プロモーター下で NTP 付加型 pt-TALEN を発現するプラスミド DNA を HEK293T 細胞に遺伝子導入し、ゲノム編集効率を検討した。その結果、96 検体中、3 検体で挿入変異や塩基置換変異が誘導され、NTP 非付加 TALEN を発現させた時と同等であった。このことは、pt-TALEN は NTP を融合した状態でも、細胞内においてゲノム編集能を示すことを意味する。また、ウエスタン解析と免疫組織化学的解析で、NTP 付加型 pt-TALEN タンパク質が細胞内に取り込まれることも確認した。NTP 付加型 pt-TALEN 蛋白質を 890 nM 、一回投与で作用させ、翌日のサンプルについてシークエンス解析を行った。その結果、96 検体中、3 検体で挿入変異や 1 塩基置換変異を認めた。

D. 考察

I.NTP 付き転写因子を用いた細胞形質転換法

a.マウス線維芽細胞からのウイルスフリー iPS の樹立：iPS 細胞の樹立には Oct3/4 を始めとする多能性因子の持続的な発現が必要である。これまで行って来た NTP 付加型転写因子タンパク質の添加により一過性に多能性因子を供給する事は出来たが、持続的に発現させた状態を維持する事は出来なかった(3 頁 表 1)。iPS 化の再現性が低かった事はこれが原因であると考えられる。一方、NTV を用いることで、これらの遺伝子の持続的な発現が可能になった。また、NTV を用いて得られる iPS 用細胞からなる細胞集塊の形態は、ウイルス感染システムで得られる細胞集塊の形態に類似していた。NTV システムをさらに改良することで、再現性良く iPS 細胞が得られる投与法が確立できるものと思われる。

b. hBMMSCs 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 HNF3β、HNF4α 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 HNF3β、HNF4α、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、HNF3β や HNF4α を標的にした NTP 付加型 TALE-VP64 蛋白質の添加によっても、内在性の遺伝子発現を認めた。

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 の濃度が必要であった。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も可能である。

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(Alb-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などを検討し、本課題の目標を達成する。

II.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。こちらも 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、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. 新しい人工転写因子として、NTP-TALE-VP64 が良好に機能することが分かった。
2. NTP 付き転写因子によって、肝臓細胞への分化をコミットできる可能性が得られた。
3. 次年度、分化誘導した細胞の in vivo 効果を検証する。

F. 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 immundeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell cuture. ***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 immunpdeficiency virus type-1 induces retrotransposition and upregulates glutamate synthesis by the signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathway. ***Microbiolopgy and Immunology***, in press.

2. 学会発表

1)石坂幸人．トランスポゾン制御破綻による疾病の発症．日本実験動物科学技術さっぽろ 2014．2014 年 5 月、札幌．

2) 飯島健太、石坂幸人．HIV-1 VprによるDNA二重鎖切断誘導機構．第16回白馬シンポジウム in 熊本，2014年6月，熊本．

3)石坂幸人、抗エイズ療法の導入後に残る問題とその克服に向けた挑戦．エイズ・市民公開講座．第 28 回日本エイズ学会、2014 年 12 月、大阪．

4) 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 特許出願無