

研究報告書

「非ウイルス的手段によるiPS誘導法の確立」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：松田 修

1, 研究のねらい

エプスタイン・バール・ウイルス(EBV)エピゾーマル・ベクターは、EBVのoriP配列とEBNA1(EBV nuclear antigen 1)遺伝子を含むプラスミドベクターである。EBVエピゾーマル・ベクターを用いると、ヒト細胞に対する非ウイルス的遺伝子導入の効率が飛躍的に向上し、また強力な発現が達成できる。さらに導入されたDNAは染色体に組み込まれず、エピゾームとして核内に安定的に維持される。これはヒト細胞内において、EBNA1遺伝子産物がoriP内のコンセンサス配列に特異的に結合し、プラスミドの核内移行と核内保持、染色体の複製に同期したプラスミドの複製等の機能を発揮することに起因する。そこでEBVエピゾーマル・ベクターを用いれば、ホストのゲノムに異常をもたらさずに外来遺伝子を強発現させ、さらに薬剤選択圧をコントロールすることによって、導入した遺伝子を必要な期間だけ維持し、不要になってから除去することができる。そこで本研究では、この利点を生かして非ウイルス的な体細胞リプログラミング誘導法を開発し、ゲノムのintegrityが保持されたiPS細胞を樹立することを当初のねらいとした。

さらにこれらの系を応用し、ゲノム領域特異的なエピジェネティック修飾の新しい解析システムの樹立を目指した(京都大学iPS細胞研究所 升井伸治博士(JSTさきがけ研究者)との共同研究)。すなわち、解析目的とするゲノム領域を有するEBVエピゾーマル・ベクター(エピゲノソーム)を構築し、細胞内に導入後長期に渡って維持することで、分化に伴うエピジェネティクス構築活性を染色体上の位置効果を受けずに解析できると考えられる。さらに、解析対象とするゲノム配列に自在に欠失や変異を導入し、エピジェネティック修飾に及ぼす影響を解析できると考えられる。そこでこのようなエピゲノソームを実際に構築し、解析システムの妥当性を検証するとともに、モデルとしてエピゲノソーム上に挿入したnanog遺伝子領域のエピジェネティック修飾を解析した。

またエピジェネティック修飾の解析のモデル系に適した細胞系譜に着目し、樹立したiPS細胞からの機能細胞への分化誘導法を開発することとした。

2, 研究成果

2-1 EBVエピゾーマル・ベクターを用いた体細胞リプログラミングとその応用

ヒトケラチノサイトに電気穿孔法にてEBVエピゾーマル・ベクターを導入する方法を最適化した。これを用いてOct-4、Klf-4、SOX2を有するEBVエピゾーマル・ベクターを単独で、あるいはc-MycとLIN28を有するEBVエピゾーマル・ベクターと共導入することによって、iPS細胞を誘導した。また、マウスiPSについても、同様のベクターを異なる手法で体細胞に導入することで、iPS細胞の樹立に成功した。得られたiPS細胞の幹細胞マーカーの発現プロファイル、in vitroにおける種々細胞への分化能、テラトマ形成能等の解析を行うとともに、導入した初期化遺伝子の染色体へのインテグレーションがないことを確認した(Fig. 1)。

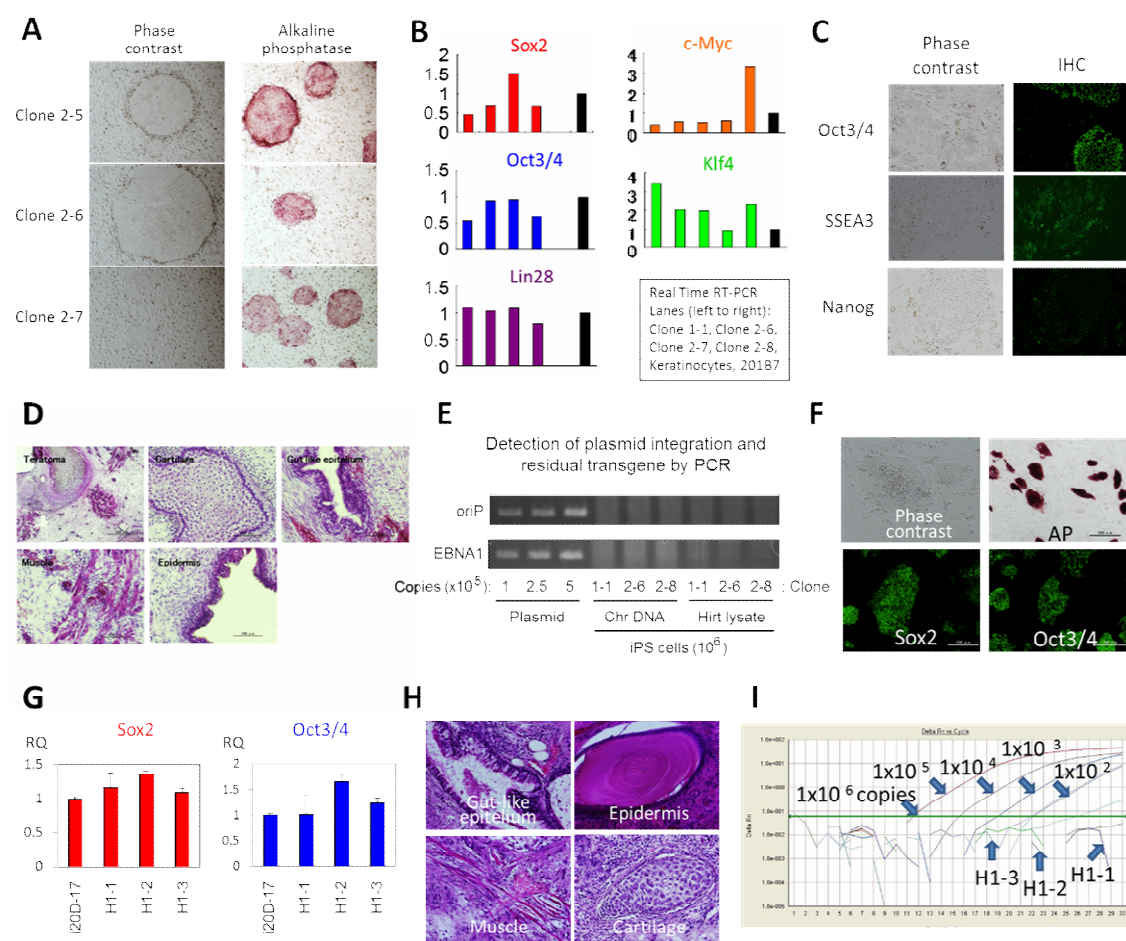


Fig. 1 EBV エピゾーマル・ベクターを用いて樹立した iPS 細胞。A-E、ケラチノサイト由来ヒト iPS 細胞クローン。これらは典型的な iPS 細胞のコロニー形状を示し(A 左)、アルカリフォスファターゼ陽性である(A 右)。幹細胞マーカーの発現を mRNA レベル(B)と蛋白レベル(C)で認め、そのレベルは、レトロウイルスベクターで樹立された iPS 細胞株 201B7 と同程度である。SCID マウス精巢に移植すると 3 胚葉由来組織を含むテラトーマを形成する(D)。染色体 DNA(Chr DNA)と Hirt lysate(エピゾームが含まれる抽出液)を調整し、ベクター配列特異的なプライマーで PCR を行うと、いずれも検出されず、これらの iPS 細胞クローンには導入したベクターは存在していない(E) (Plasmid はコピー数を算定するためのコントロールであり、検出感度は 1 細胞あたり 0.1 コピー以下である)。F-I、マウス iPS 細胞クローン。上記のヒト細胞と同様、典型的なコロニー像(F 左上)を呈し、アルカリフォスファターゼ陽性である(F 右上)。Sox2 と Oct3/4 を、レトロウイルスベクターで樹立された iPS 細胞株 i20D-17 と同レベル発現する(F 下、G)。3 胚葉由来組織を含むテラトーマ形成能を有し(H)、また染色体 DNA からベクター配列は検出されない(I) ($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ はコピー数を算定するための plasmid DNA のコントロールであり、検出感度は 1 細胞あたり 0.1 コピー以下である)。

2-2 EBV エピゾーマル・ベクターを用いたゲノム領域特異的エピジェネティック修飾の新しい解析システム

解析目的とするゲノム配列を有する BAC クローンに、insulator を隔てて EBNA1 発現ユニットと oriP を挿入する、エピゲノソームを開発した (Fig. 2A)。このエピゲノソームの有用性を検証する目的で、Tet-on 制御ユニットを含むベクターを HeLa 細胞等の細胞株、およびヒト iPS 細胞に導入後、doxycycline を添加することで、挿入配列とベクターバックボーンの発現制御の独立性を確認した (Fig. 2B、C)。また、oriP の上流と下流に loxP を組み込むことで、導入後早期に脱落させることが可能なエピゲノソームを作成し、CreERT2 導入後に Tamoxifen を添加することでその有効性を確認した。そこで EGFP-IRES-Puro を Nanog 遺伝子の転写開始点直下にノックインしたマウスのゲノム配列約 210 kb を有する BAC クローンにこのベクターを挿入し、エピゲノソームを構築した。これらを種々のヒト由来培養細胞に導入後、薬剤選択下で培養することで、エピゲノソームを安定的に維持させることができた。HeLa 細胞では、エピゲノソームは細胞あたり約 20 コピー維持することができ、その 100% がヒト細胞内で複製したものであることが、dam メチル化のパターン (DpnI 耐性、MboI 感受性) から示された (Fig. 2D)。Nanog 遺伝子の proximal promoter の CpG メチル化をバイサルファイト法で解析したところ、ヒト細胞内で de novo のメチル化が加わったことが分かった。エピゲノソームはヒト細胞のみならず、本来 EBV が non-permissive であるマウス細胞においても複製された。以上から、エピゲノソームは染色体の位置効果に依存せず、細胞環境に応じたエピジェネティック修飾を解析できる実験系として有用であると考えられる。

2-3 iPS 細胞から機能細胞の分化誘導系の開発

2-1 で樹立した iPS 細胞を用い、2-2 のシステムを検証するのに適した細胞系譜の分化誘導を試みた。モデルとなる細胞としては、環境 (栄養、温度等) に応じたエピジェネティックな影響を受け得る、個体差がある、これまで分化誘導がなされておらず、基礎研究上の重要性が高い、ヒト疾患の治療上の意義があり、再生医療上の重要性が高い、細胞が望ましい。また解析対象とする遺伝子としては、その細胞への分化に伴って発現し、その細胞の機能に重要な遺伝子、その細胞の活性化に伴い発現量が変化する遺伝子、疾患素因との関連がある、発現レベルに影響する SNP が知られており、その SNP に臨床的な意義がある、ものが適していると考えられる。

そこでこのようなキャラクターを有するある細胞に着目し、マウスとヒトの iPS 細胞からその分化誘導に成功した。さらにそのキャラクターゼーションと機能解析を in vitro および in vivo の移植実験で行った。また、マウス線維芽細胞からのダイレクト・リプログラミングにも成功した。

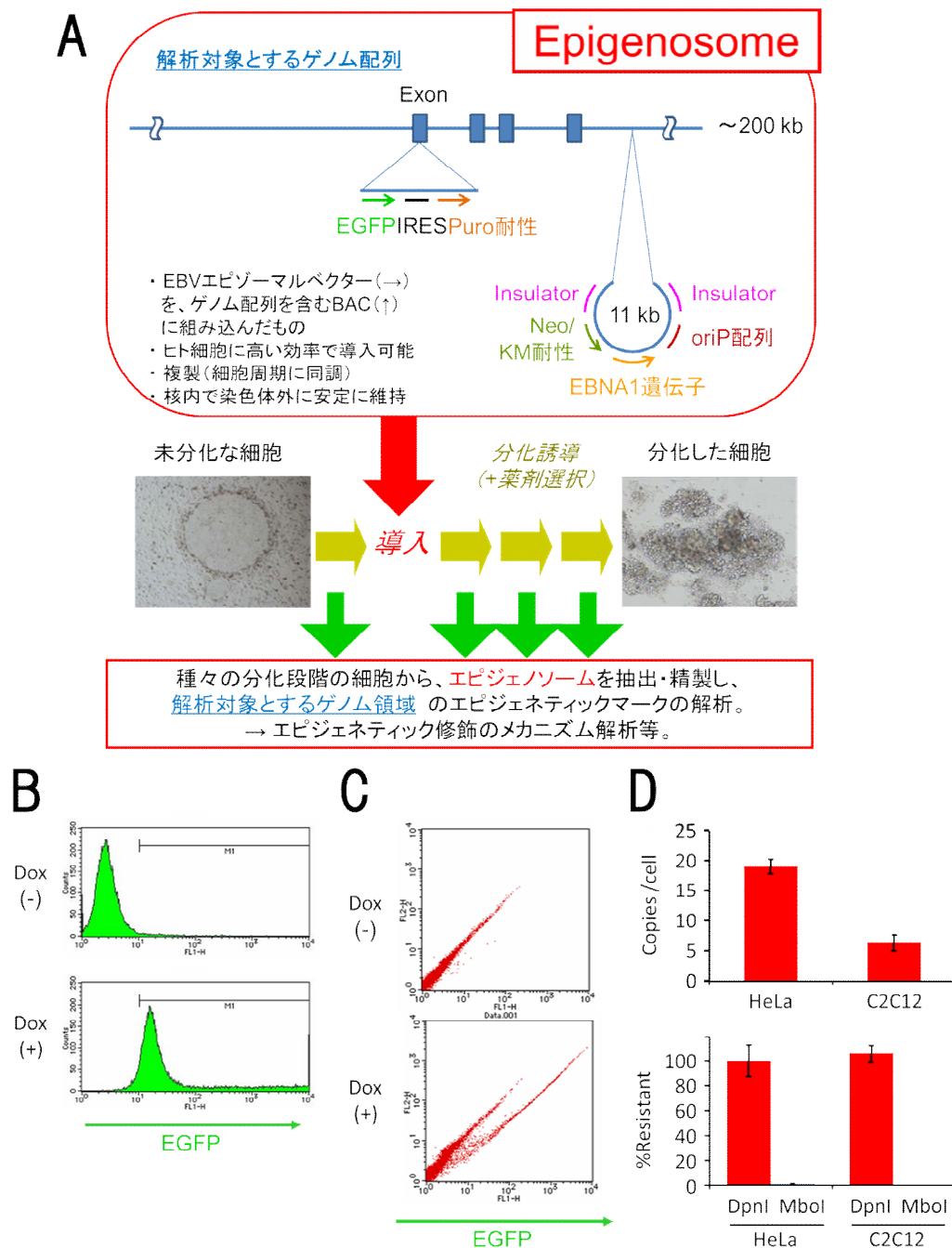


Fig. 2 エピゲノソームとそれを用いたエピジェネティック修飾の解析システム。A、解析系の模式図。B-D、解析系の検証。TetOn プロモーターの下流に EGFP を挿入した EBV エピゾーマル・ベクターを HeLa(B)またはヒト iPS 細胞(C)に導入後、Doxycycline を 0 $\mu\text{g/mL}$ (-)または 1 $\mu\text{g/mL}$ (+)添加して培養し、EGFP の発現を FACS で解析した。また、Nanog 領域 210 kb を含むエピゲノソームを HeLa または C2C12 に導入後、カナマイシン選択して耐性クローンを得、細胞あたりのエピゲノソームのコピー数(D 上)、DpnI または Mbol 耐性コピー数の率(D 下)を Real time PCR で測定した。

3, 今後の展開

EBV エピゾーマル・ベクターを用いて、ゲノムの完全性を保持したヒトおよびマウスの iPS 細胞を樹立することができた。Yu らは同様の EBV エピゾーマル・ベクターを用いているのが、Oct3/4、Klf-4、Sox2 の 3 因子に加えて c-Myc、Nanog、LIN28 と SV40 large T が必須であると述べているので (Science 324:797, 2009)、3 因子のみを用いる我々の方法は、細胞の異常や負荷が少ない可能性がある。また感染性を有するウイルスベクターを用いないので、使用上の制約が少なく、また導入遺伝子の脱落も速やかであるので、iPS 細胞バンクの樹立など、応用の範囲が広い技術であると考えられる。

エピゲノソムのシステムは、幹細胞特異的な遺伝子のみならず種々の細胞種に特異的に発現する遺伝子のゲノム領域に、細胞分化あるいはリプログラミングに伴ってエピジェネティック修飾が誘導される過程とその機構を解明するための強力な実験手段を提供する可能性が期待できる。さらに、挿入するゲノム断片をトランケートし、あるいはミューテーションを加えることで、特定の配列がゲノム領域特異的なエピジェネティック修飾に及ぼす影響を解析し、その分子基盤の解明につなげることが可能であろう。

このような基礎的技術と知見を、応用的に展開することで、再生医療において最も求められているテクノロジー、すなわち幹細胞から特定の細胞種に、特異的かつ完全な制御下に分化誘導する技術、あるいは高効率なリプログラミング技術の樹立に資するものと期待できる。たとえば上記のようなゲノム領域特異的なエピジェネティック修飾をもたらす因子を解明すれば、細胞の分化の方向性と速度を制御する薬剤の開発等に繋がる可能性がある。一方で、種々の疾患、たとえばメタボリック症候群や悪性腫瘍等に対する新しい分子治療技術の開発、発症素因の診断法、モニタリング法等の創出をもたらす可能性があり、医療の進歩と新産業の創出に寄与できると期待される。

4, 自己評価

EBV エピゾーマル・ベクターによる非ウイルス的 iPS 細胞の誘導という目標に関しては、残念ながら他のグループに遅れをとったが、上記のような利点を有する技術が樹立できたと考えている。細胞分化に伴うエピジェネティック修飾の新しい解析システムの樹立、また iPS 細胞から機能細胞への分化誘導では、当初の目標以上の成果を得ることができ、今後のさらなる基礎的、応用的展開につながるものと考えている。

5, 研究総括の見解

当初心配した通り、EB ウイルスベクターを用いて iPS を樹立するという研究については、完全に遅れをとった。ただ、アドバイザー等の意見を聞いて、エピジェネティックな遺伝子修飾を検討するためのベクターシステム開発へと方向転換を試み、成果が出るところまで到達できたことは評価する。このベクターシステムはオリジナルであり、また iPS 研究にとっても有用なツールとなる可能性を秘めており、是非とも汎用されるシステムへと発展させる事を期待する。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Yoshimoto T, Hisa Y, & Mazda O. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* 69(6): 2523-30, 2009.
2. Mazda O, & Kishida T. Molecular therapeutics of cancer by means of electroporation-based transfer of siRNAs and EBV-based expression vectors. *Frontiers in bioscience*, 1:316-31, 2009.
3. Inoue A, Takahashi KA*, Mazda O, Arai Y, Saito M, Kishida T, Shin-Ya M, Morihara T, Tonomura H, Sakao K, Imanishi J, & Kubo T. Comparison of anti-rheumatic effects of local RNAi-based therapy in collagen induced arthritis rats using various cytokine genes as molecular targets. *Mod Rheumatol.* 19(2): 125-33, 2009.
4. Yoshimoto K, Kishida T, Nakano Hi, Matsui M, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Takeuchi M, Hisa Y, & Mazda O. Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. *J Immunother.* 34(2):139-48, 2011.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果

1. Pleiotrophic Functions of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 (EBNA-1) and oriP Differentially Contribute to the Efficacy of Transfection/expression of Exogenous Gene in Mammalian Cells.
Kishida T, Asada H, Kubo K, Sato Y, Shin-Ya M, Imanishi J, Yoshikawa K, & Mazda O*.
J Biotechnol. 133(2): 201-207, 2008.
2. Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and HSP70 expression in the rabbit knee joint.
Tonomura H, Takahashi KA*, Mazda O, Arai Y, Shin-Ya M, Inoue A, Honjo K, Hojo T, Imanishi J, & Kubo T.
J Orthop Res. 26(1): 34-41, 2008.
3. Nanogel DDS Enables Sustained Release of IL-12 for Tumor Immunotherapy
Shimizu T, Kishida T, Hasegawa U, Ueda Y, Imanishi J, Yamagishi H, Akiyoshi K, Otsuji E, & Mazda O*.
Biochem Biophys Res Commun. 367(2): 330-335, 2008.

4. Enhanced expression of interleukin-6, matrix metalloproteinase-13, and receptor activator of NF-kappaB ligand in cells derived from osteoarthritic subchondral bone.
Sakao K, Takahashi KA*, Mazda O, Arai Y, Tonomura H, Inoue A, Saito M, Fujioka M, Takamiya H, Imanishi J, & Kubo T.
J Orthop Sci. 13(3): 202-10, 2008.
5. Induction of chondrogenic phenotype in synovium-derived progenitor cells by intermittent hydrostatic pressure.
Sakao K, Takahashi KA*, Arai Y, Inoue A, Tonomura H, Saito M, Yamamoto T, Kanamura N, Imanishi J, Mazda O, & Kubo T.
Osteoarthritis Cartilage 16 (7): 805-814, 2008.
6. Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8 and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis
Sakao, K., K.A. Takahashi*, Y. Arai, M. Saito, K. Honjo, N. Hiraoka, H. Asada, M. Shin-Ya, J. Imanishi, O. Mazda, & T. Kubo.
J Bone Miner Metab. 27(4): 412-23, 2009.
7. Raspberry-like assembly of cross-linked nanogels for protein delivery.
Hasegawa U, Sawada SI, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O, & Akiyoshi K*.
J Control Release. 140(3): 312-7, 2009.
8. Asporin and transforming growth factor- β gene expression in osteoblasts from subchondral bone and osteophytes in osteoarthritis
Sakao K, Takahashi KA*, Arai Y, Saito M, Honjo K, Hiraoka N, Kishida T, Mazda O, Imanishi J, & Kubo T.
J Orthop Sci. 14(6): 738-47, 2009.
9. N-acetylcysteine prevents nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in an experimental model of osteoarthritis.
Nakagawa S, Arai Y*, Mazda O, Kishida T, Takahashi KA, Sakao K, Saito M, Honjo K, Imanishi J, & Kubo T.
J Orthop Res. 28(2):156-63, 2010.
10. Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice
Shinoda M, Shin-Ya M*, Naito Y, Kishida T, Ito R, Suzuki N, Yasuda H, Sakagami J, Imanishi J, Kataoka K, Mazda O*, & Yoshikawa T
J Gastroenterol. 45(6):608-17, 2010.
11. Effects of mechanical stress on cytokine production in mandible-derived osteoblasts.
Yamamoto K, Yamamoto T, Ichioka H, Akamatsu Y, Oseko F, Mazda O, Imanishi J, Kanamura N, & Kita M.
Oral Dis. 17(7): 712-9, 2011.

12. Intra-articular injection of hyaluronan restores the aberrant expression of matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritic subchondral bone.
Hiraoka N*, Takahashi KA, Arai Y, Sakao K, Mazda O, Kishida T, Honjo K, Tanaka S, & Kubo T.
J Orthop Res 29(3):354-60, 2011.