

TGF- β 1 に対するPIポリアミドを用いた 日大式ヒトiPS細胞誘導法の開発

齋藤孝輔¹⁾, 福田昇²⁾³⁾, 篠原憲一⁴⁾, 舩廣善和⁵⁾, 松本宜明⁶⁾,
青山隆彦⁶⁾, 花沢重正⁵⁾, 松田裕之⁷⁾, 藤原恭子⁷⁾, 相馬正義⁷⁾

Establishment of the new method to induce iPS cell by using pyrrole- imidazole polyamide targeting TGF- β 1

Kosuke SAITO¹⁾, Noboru FUKUDA²⁾³⁾, Kenichi SHINOHARA⁴⁾, Yoshikazu MASUHIRO⁵⁾,
Yoshiaki MATSUMOTO⁶⁾, Takahiko AOYAMA⁶⁾, Shigemasa HANAZAWA⁵⁾,
Hiroyuki MATSUDA⁷⁾, Kyoko FUJIWARA⁷⁾, Masayoshi SOMA⁷⁾

要旨

iPS細胞技術をヒトに対し臨床応用するためには、より安全かつ安価で簡便な作成技術の確立が求められる。iPS細胞の誘導過程においては、細胞の間葉系上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition:MET) が生じており、TGF- β 1の発現を抑制してMETを促進することにより、細胞のiPS化がより進むことが報告されている。そこで、本研究においては標的特異的DNA結合能を持つPIポリアミドを用いてTGF- β 1の発現を抑制し、iPS細胞の導入効率の改善を試みた。その結果、TGF- β 1抑制PIポリアミドは乳腺上皮細胞のMETを促進し、ヒト繊維芽細胞からのiPS細胞誘導効率を有意に上昇させることが判った。この結果はPIポリアミドを併用することで、より安全で効率の良いiPS細胞の誘導が可能となることを意味し、現在さらに誘導法の改良を進めている。

1. 背景

Induced pluripotent stem cell (iPS細胞) は、人工的に誘導された多能性幹細胞であり、自己複製能と体内のほぼ全ての細胞に分化し得る分化能を有する。iPS細胞は分化した体細胞に、多能性維持に必須である山中4因子等の少数の遺伝子を導入することにより作出できるため、再生医療の分野において甚大なポテンシャルを持つ技術である。現在、iPS細胞の臨床応用に向けた研究が活発に行われており、2014年には世界初の臨床試験として、iPS細胞より誘導した網膜細胞シートを用いた加齢黄斑変性の治療が開始され、現在経過観察が進んでいる。一方、iPS細胞技術を実用化する上で最も懸念される

のが、iPS細胞より分化誘導した細胞・組織が腫瘍化する可能性である。また、より広く一般的に実用化するためには、さらに効率的で安価な作成技術の開発も求められている。

近年、iPS細胞の誘導過程において間葉細胞の上皮化 (mesenchymal-epithelial transition:MET) が必須のステップであることが判ってきた。METは間葉系の細胞が細胞間の接着性を獲得し上皮様に形態変化する過程であり、胚発生の過程において重要な役割を果たすことが知られている。外部より導入したSOX2, OCT-4, KLF4, c-MYCなどの山中4因子は、体細胞の初期化の過程で細胞の上皮化を進行させ、間葉系細胞特異的な遺伝子の発現を抑制すること

1) Centre de recherche, Centre hospitalier de l' Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC, Canada

2) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

3) 日本大学大学院総合科学研究科

4) 千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学

5) 日本大学生物資源学部応用生物科学科

6) 日本大学薬学部薬学科

7) 日本大学医学部内科学系総合内科学・総合診療医学分野

相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

で、初期化の効率を上げると考えられる。また、METと逆の過程である上皮間葉系転換 (EMT) を促進する作用がある Transforming growth factor β1 (TGF β1) を抑制すると、METが阻害されることが判っており、TGF-β1の阻害剤投与により、マウス繊維芽細胞からのiPS細胞の誘導効率が上昇することも報告されている¹⁾。そこで、本研究では我々が研究開発中のピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドを用いてTGF-β1の発現抑制を行い、ヒトiPS細胞の誘導効率への影響を調べる研究を企画した。

PIポリアミドは芳香族アミノ酸 *N*-methylpyrrole (Py) および *N*-methylimidazole (Im) で構成される低分子有機化合物であり、配列特異的にDNAに結合する性質を持つ。現在我々が開発対象としているPIポリアミドは、PyとImが鎖状につながった分子が中央部で屈曲したヘアピン型の形状をしており、この屈曲により分子内で向き合うPIポリアミドのペアごとに、認識するDNA塩基が決まっている。Py・PyのペアはATまたはTAを、Py・ImはCGをIm・PyのペアはGC塩基対を認識し、ImとPyの組み合わせ次第で多様な配列のDNAに結合させることが可能である。転写因子の結合を競合的に阻害し、下流の遺伝子発現を抑制する転写制御薬として用いることができる。特別なDrug Delivery Systemなしに細胞の核内に取り込まれ、核酸分解酵素やタンパク分解酵素による分解を受けず、生体内にて安定に存在できることから、PIポリアミドは新規の転写阻害剤として期待される分子である²⁾。

TGF-β1の発現抑制作用を持つPIポリアミドをiPS誘導時に用いることで、iPSの誘導効率が上がる

のではないかと考え、以下の研究を行った。

2. 対象・方法

1) TGF-β1抑制PIポリアミドGB1101

ヒトTGF-β1遺伝子プロモーターのFSE2 (転写開始点より-1383 ~ -1376の領域) を認識するようデザインされたPIポリアミドGB1101を用いた (図1)。この分子が標的DNAに特異的に結合し、TGF-β1の発現を抑制することを確認後³⁾、実験に用いた。

2) 細胞

乳腺上皮細胞MCF10AはDMEM/F12培地に5%馬血清、ヒドロコルチゾン (500ng/ml)、ヒトEGF (10ng/ml)、インスリン (5 μg/ml)、コレラ毒素 (100ng/ml) を添加した培養液を用いて培養した。ヒト繊維芽細胞株HDFは10%牛胎児血清を添加したDMEM培地を用いて培養した。

3) EMTの誘導とその解析

MCF10Aを6well培養プレートに播種し、コンフルエントになった時点でmitomycin Cを添加し、その2時間後にPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加し、EMTを誘導した。48時間後にピペットチップ先端で細胞の層をスクラッチして創傷を作成し、Wound healing アッセイを行った。このアッセイにおいて、創傷部が回復する速度の速さが遅いほどEMTの抑制/METの誘導が生じていると判定した。

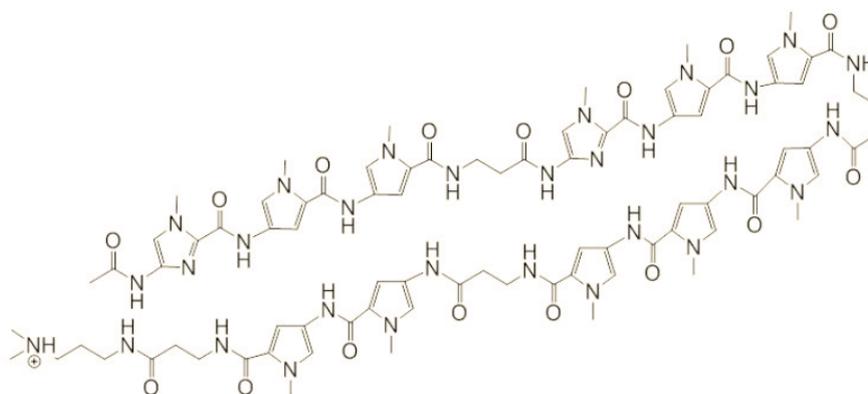


図 1 TGF-β1抑制PIポリアミドGB1101の構造式

4) iPS細胞の誘導と同定

CytoTune センダイウイルス・ベクターキット (DNAVEC, 茨城) を用いて, HDF細胞に SOX2, OCT4, KLF4, C-MYC を導入した。3日後に細胞を再播種し, mitomycin C 存在下で増殖を抑えたマウス胎児繊維芽細胞 MEF をフィーダー細胞として, 0.1%ゼラチンコートした 6well 培養プレートにて培養した。培地は DMEM/F12 に, 20% KnockOut serum replacement, 10mM MEM-NEAA solution, 55mM 2-メルカプトエタノール, bFGF (4ng/ml) を添加した培養液を用いて維持した。培地は3日おきに交換し, iPS 様のコロニーが出現するまで培養を続けた。出現したコロニーについては, 初期化した細胞に特徴的なマーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性を, ALP の発色性基質を添加することにより

検出し, iPS細胞の同定を行った。

3. 結果

1) GB1101による TGF-β1 および EMT 関連遺伝子の発現抑制

MCF10A細胞に PMA を投与すると EMT が誘導され, TGF-β1, SNAI1, Fibronectin, Vimentin の発現上昇と E-cadherin の発現低下といった EMT に特徴的な遺伝子の発現変化が起こる。ここに GB1101 を添加したところ, EMT 様の遺伝子発現パターンが抑制された。図 2A に示すように, PMA による E-cadherin の発現抑制は GB1101 により転写レベルおよび蛋白レベルで解除され発現上昇を示し, 一方 Vimentin の発現は GB1101 により抑制された。既存の TGF-B1 阻害剤 SB43152 によっても同様の効果が得

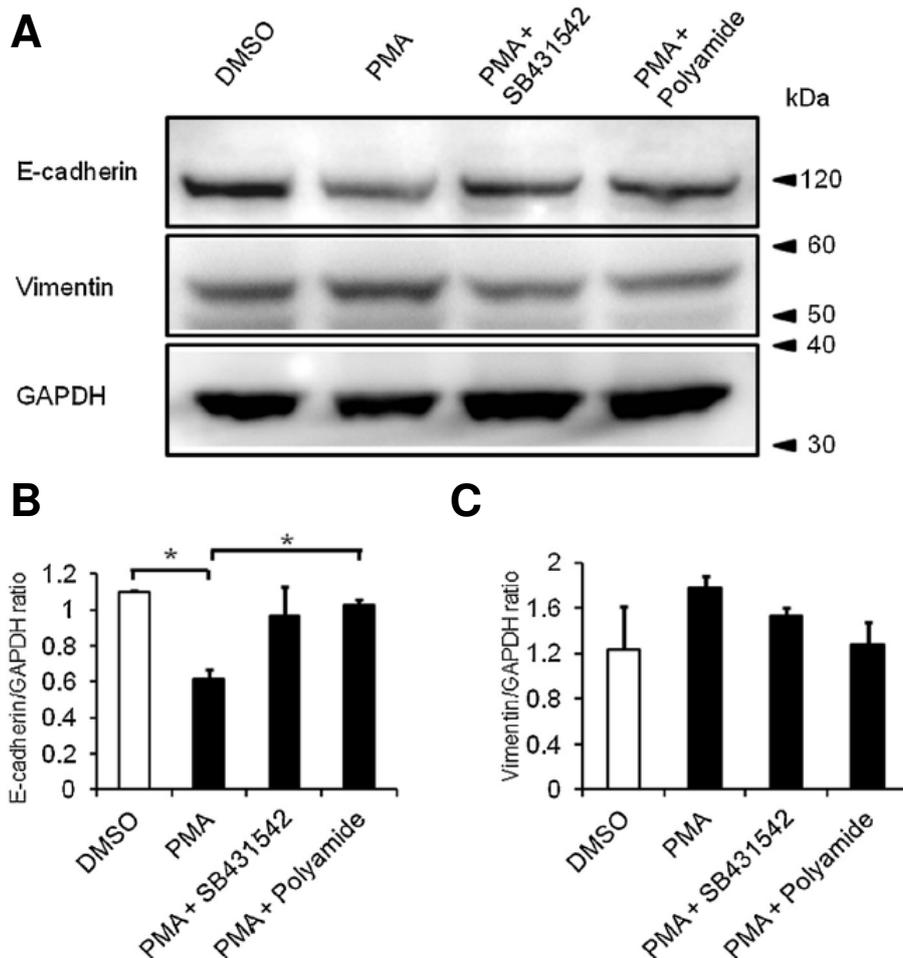


図 2 PMAによる EMT 誘導に対する GB1101 の抑制効果
MCF10A細胞に PMA を投与すると, E-cadherin の発現低下, Vimentin の発現上昇といった EMT に特徴的な変化が起こるが, GB1101 および SB431542 の存在下では, それらの変化が蛋白レベルにおいても (A), 転写レベルにおいても (B, C) 抑制された。

られた。

2) GB1101によるEMTの抑制

Wound healing assay によりGB1101によるEMTへの影響を調べた。通常はPMAを投与した状態で、細胞の層をスクラッチすると、細胞の遊走能がEMTにより亢進しているためPMA非投与細胞と比較して早い段階で創傷部分が細胞で満たされ、細胞層が回復するが、GB1101存在下では損傷部分の回復が遅かった(図3)。このことはGB1101がEMTの抑制/METの誘導を促進している可能性を示唆した。

3) GB1101によるiPS誘導効率の上昇

次に繊維芽細胞HDFよりiPS細胞を誘導する際にGB1101を添加し、誘導効率を比較した。HDFにSOX2, OCT4, KLF4, C-MYCを導入する際に、GB1101を添加し、その後iPS細胞が誘導されるまで、培地交換時には常にGB1101を添加し続けた。出現したALP陽性コロニー数を計測したところ、未処理群およびTGF-β1プロモーターを標的としないミスマッチPIポリアミド投与群と比較して、GB1101投与群で有意なコロニー数の増加を認めた(図4A)。GB1101存在下で誘導されたALP陽性コロニーは、iPS細胞に特徴的なNanogの発現を認め(図4B)、

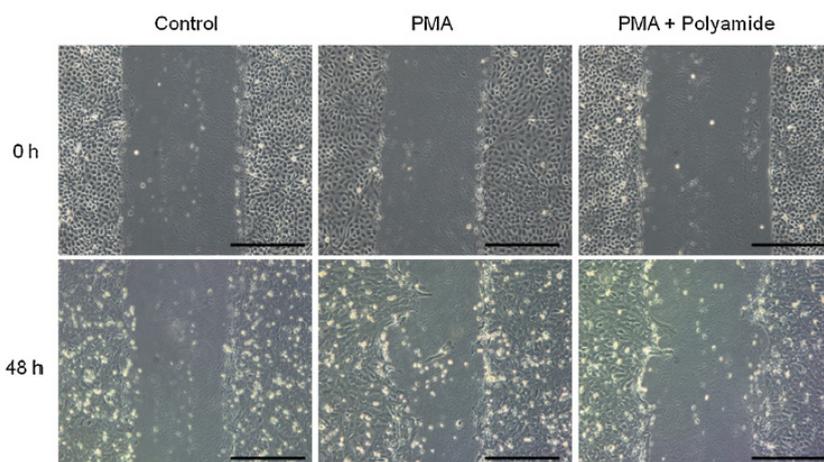


図3 GB1101による細胞遊走能の抑制
MCF10A細胞にPMAを投与すると、EMTの誘導により細胞遊走能が活性化するが、GB1101の添加により抑制された。

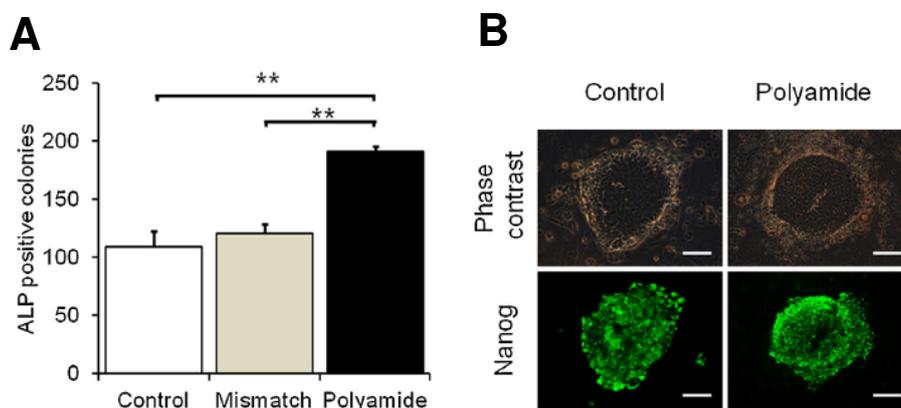


図4 GB1101によるiPS細胞の誘導効率の上昇
A. HDF細胞よりiPS細胞を誘導する際に、GB1101を投与すると、ALP陽性コロニー数が有意に増加した。B. 形成されたコロニーはコントロールと同様、GB1101投与条件下でもiPS細胞等のマーカーであるNanogを発現していた。

また網羅的遺伝子発現解析により、GB1101存在下で誘導したiPSの遺伝子の発現パターンは通常の方法で誘導したiPSと極めて類似していることを確認した。このことから、GB1101はiPS細胞の誘導効率を上昇させたと言える⁴⁾。

4. 考察・今後の展望

本研究の結果、GB1101がTGF- β 1発現を抑制し、それによりEMTの抑制およびMETの誘導を亢進させることが確認できた。さらにこのGB1101を従来法と併用することにより、iPS細胞の誘導効率が上昇することが証明できた。

この研究と並行して、我々の研究チームでは山中4因子をDNAではなく、タンパク質の形で導入する試みを続けている。現時点では初期化因子の導入はウイルスを用いる手法が主流であるため安全性に問題があるが、蛋白質を直接導入することにより、感染の危険性が無くなる。日本大学生物資源科学部の舩廣らは蛋白を細胞内に高効率に導入するSutabilon蛋白を開発しており、この手法を用いて、山中4因子タンパク質を導入する試みを続けている。この手法と今回開発したTGF- β 1抑制ポリアミドを併用することで、安全でかつ効率の高いiPS誘導が可能になると期待できるため、引き続き開発を続けている。

文 献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem.* 2001;9(9):2215-35.
- 2) Li R1, Liang J, Ni S, Zhou T, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell.* 2010 Jul 2;7(1):51-63.
- 3) Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M. Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF- β 1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. *PLoS One.* 2015 May 4; 10(5): e0125295.
- 4) Saito K, Fukuda N, Shinohara K, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M. Modulation of EMT/MET process by pyrrole-imidazole polyamide targeting human transforming growth factor- β 1. *International Journal Biochemistry & Cell Biology* 66:112-120, 2015.7