

課題番号 : 28A-5001
研究課題名 : 人工転写因子を用いた安全な膵β細胞作成
主任研究者名 : 石坂幸人
分担研究者名 : 霜田雅之 (NCGM)、佐久間哲史 (広島大学)
キーワード : ペプチドベクター、人工転写因子、膵β細胞、ダイレクトリプログラミング
研究成果 :

背景: 本課題では、「1型糖尿病に対する次世代細胞療法」の臨床展開に向けた基盤技術を確立する。

我が国における1型糖尿病の患者数は約10万人と推定され、血糖コントロール不全のために膵島移植を必要とする患者数は、数百人と推定される。当センターでは、分担研究者である霜田らが中心となって膵島移植をおこなっているが、絶対的にドナーが不足しており、医療ニーズに応えるための革新的な技術開発が必要である。移植に使用される膵島は、膵臓組織を構成する細胞の1~2%であり、残りの90%以上は通常廃棄される。しかし、その中に含まれる非内分泌性膵組織内皮細胞 (NEPEC: non-endocrine pancreatic endothelial cells) は増幅可能で、膵β細胞へ分化できることが報告されている。霜田は、NEPECに転写因子の一つである NeuroD1 を強制発現させることで、内分泌細胞への分化誘導が可能になることを報告した。一方、欧米の研究グループから、膵外分泌細胞に Nrg3、MafA 及び Pdx1 の3つの転写因子を同時に発現させると、内分泌細胞へ分化誘導できることや (Zhao Q et al. *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature 455: 627, 2008*)、複数のマイクロ RNA を間葉系幹細胞 (hMSC: human mesenchymal stem cell) や iPS 細胞に発現させると、膵β細胞へ分化誘導できることが報告された。以上の知見は、転写因子の操作によって、目的の細胞に分化誘導できる可能性を示唆する。

本課題では、この課題を克服することを目標に、NCGMの国際特許知財であるペプチドベクター (NTP: nuclear trafficking peptide) を付加した人工転写因子 (ATF: artificial transcription factor) を用いて、膵β細胞へのダイレクトリプログラミング法による分化誘導を実現することを目標としている。研究代表者は HIV-1 研究の過程で、ウイルス蛋白質である Vpr に由来する新規ペプチドベクターである NTP を同定し、国際特許を取得した (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)。NTPは組み換え蛋白質を効率良く細胞内へ導入し、これまでに、

- a. NTPは、既知のペプチドベクターである tat 由来ペプチドや、アルギニンが9または、11個連続したペプチド (R9 または、R11) よりも強い細胞内輸送機能を持っていること。
 - b. NTP 付き蛋白質には、tat 由来ペプチドで認められる細胞毒性が無いこと。
- を認めた。また、
- c. NTP 付き蛋白質を細胞の培養液中に添加すると、速やかに細胞内へ輸送され、数時間以内に細胞内輸送が完了することも分かった。

組み換え蛋白質を用いたこのようなシステムは、遺伝子導入システムよりも安全性に優れていることは疑問の余地は無い。即ち、外来性遺伝子の強制発現では、使用したベクターが標的細胞のゲノム内に導入されるため、細胞形質が不可逆的に変化し、挿入部位によっては、細胞ががん化する可能性も危惧される。フランス行われた重症免疫不全症例に対する遺伝子治療において、介入試験が劇的な効果を示した一方、複数の症例で白血病が発症したことは記憶に新しい。

以上を背景に、研究代表者は長年、組み換え蛋白質による細胞形質転換法の開発を試みてきた。予備実験として、NTP システムを用いて iPS 化に必要な Oct3/4、Sox2、Klf4 と Myc の 4 つの蛋白質をマウス線維芽細胞に作用させたところ、iPS 様細胞が得られたことから、本システムが大きな可能性を秘めた優れたシステムであることが期待された。

現在 NCGM では、臨床での応用を前提に、iPS 細胞から膵β細胞の作製が試みられているが、本課題では、次世代の膵β細胞移植として、hMSC から膵β細胞へ分化誘導させるためのシステムを開発する(図 1)。今回、初めての試みとして、ラット肝上皮細胞株(WB1-F344)に種々の人工転写因子を作用させることで膵β細胞へ分化誘導できるかどうかを検証し、得られる結果を元に、ヒト細胞で検証する。NEPEC を用いた実験系については、当センター膵・胆・肝外科の枝元医長の協力のもと、既に膵臓がん摘出組織を用いたトライアルを行っており、ラットを用いて得られた成果をヒト細胞に外装する。

方法：人工転写因子の設計と調製(石坂、霜田)

人工転写因子の構造：本研究で使用する人工転写因子は、分担研究者である広島大学佐久間らが開発したプラチナ TALE:pTALE を DNA 結合モジュールとして有し、これに転写制御モジュール(VP64, VPR, p300 などの転写因子のコアドメイン)を融合させた構造からなる。pTALE は、標的配列に対してより優れた特異性と結合性を示す。VP64 は単純ヘルペスウイルス由来転写誘導因子である VP16 を 4 つ並列させた分子で、VPR は VP64、p65 と Rta (replication and transcription activator) を融合させた分子である。ヒストンアセチル転移酵素である p300 のコアドメイン(p300/CD)も使用する。これまでの予備実験で、各因子の転写誘導作用は標的配列毎に異なり、作用発現時間も異なることが分かっている。例えば、p300 は作用後 12 時間以内に転写を誘導する一方、VP64/VPR は作用後 24 時間で最大効果を示す。そこで、最も効率的に発現誘導できる分子を組み合わせ使用する。

膵β細胞の機能として、グルコースに反応してインスリンを分泌させることは重要である。興味深い知見として、膵β細胞への分化誘導因子として作用する miR-375 は、この最終分化ステップを抑制することや、miRNA-9 を抑制するとグルコース反応性が誘導されることが報告された(図 2)。そこで、本研究では、内在性 miRNA 発現の阻害分子として機能する人工転写制御因子の機能も検証する。転写制御する因子として SID と Krab を使用する(SID, mSin interaction domain; Krab, Kruppel-associated box)。

NTP-ATF の発現と精製：NTP-ATF は、コムギ胚芽無細胞系で発現する。NTP 付 ATF には、GST(グルタチン S 転スフェラーゼ)が挿入されている一方、コムギ胚芽抽出液は、グルタチオンビーズでプレクリーンされているため、一回の操作で目的の蛋白質はほぼ一本バンドとして精製できる。また、これまでの予備実験で、pTALE-転写誘導因子を単独で作用させる方が、NTP-GST を付加した分子よりも、強い転写活性を有することが示唆された。そこで、GST と TEV の間にプロテアーゼ認識配列(Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln/Gly、"/"が切断部位)を挿入した設計となっている。NTP-ATF の添加 3 時間後に NTP-TEV を添加することで、細胞内で NTP-GST を切断する。

II. 人工転写因子の同定(佐久間、石坂、霜田)：

a. 転写誘導因子の同定：膵β細胞への分化誘導因子として、Mafa/Pdx1/Nrg3/NeuroD1 と miRNA-375/-186 を中心とした複数の人工転写因子を作製する。各遺伝子プロモーターについて、

2種類以上の pTALE を作製し、VP64/VPR/p300CD とのキメラ分子の機能性を評価する。最も強く機能する分子と投与条件を決定する。

b. 転写抑制：グルコースに対する反応性を誘導する因子として報告のある miRNA-9 の発現を抑制する分子を pTALE と SID または Krab の融合分子を作製し、その機能評価を行う。これら分子の機能並びに、作製した細胞の in vivo 機能の評価するためには、大量の細胞を調整することが必要であり、ヒト細胞を用いた実験系には限界がある。そこで、膵β細胞への分化誘導に関する報告のあるラット由来肝上皮様細胞株 (WB1-F344 細胞) を用いて解析を進める。

III. 分化誘導：in vitro 実験で、インスリン産生陽性細胞を最も効率良く作製できる転写制御因子セットと投与方法を確立し、糖尿病モデルマウスで有効性を評価する。

結果：

まず、ラット Pdx1、Pax4 及び、MafA 遺伝子に対する ATF を作製し、ラット肝臓細胞株 (WB1-F344) に作用した後、細胞機能の評価した。その結果、内在性 Pdx1 や MafA 遺伝子の発現誘導を検出することはできなかった。これらの遺伝子を強制発現させることで、膵β細胞への分化誘導が可能になることが報告されているが、より機能性に優れた人工転写因子を作製し、その投与条件の検討が必要であると考えられた。

今回、ヒト MSC を用いて迅速に膵β細胞を作製することも試みたが、こちらについてもうまく稼働しなかった。一方、実臨床では、移植に足るだけの十分な膵β細胞を作製することが必須であり、そのソースとなる MSC や NEPEC を大量に調製することが律速となる。しかし、現時点ではこれらの細胞を安全に拡張することは難しく、NTP システムを臨床展開するためには、この課題を解決することが先決であると考えられる。そのため、本課題を今年度で終了することとし、MSC を用いた拡張技術の開発に主力を投入し、そのシステムを NEPEC に応用して行く予定である。

考察：

近年の再生医学研究の成果として、細胞の分化形質は転写ネットワークで維持されており、そこでコアとして機能する複数の転写因子 (マスター遺伝子) を同時に発現させることで、目的の細胞へ誘導誘導できることが分かってきた (図 3・4)。例えば、体細胞に四つの遺伝子を同時に発現すると iPS 細胞が作製できることや、膵臓外分泌細胞に三つの遺伝子を同時に発現すると膵β細胞に分化誘導できることはその典型例であると考えられる。特に、「ダイレクトリプログラミング」によって、線維芽細胞から心筋細胞や神経細胞を自在に作製できるようになれば、様々な難病に対する新しい治療法の可能性が広がる。しかし、図 4 に示す報告のほとんどは、ウイルスベクターなどの遺伝子発現システムで得られた結果であり、研究成果をそのまま臨床に実装することはできない。その意味でも、蛋白質による「ダイレクトリプログラミング」法の確立は重要であり、NTP を付加した人工転写因子の機能を再現発揮できるシステムを確立することは、大変、重要であると思われる。

Subject No. : 28A-5001
Title : Establishment of a reliable system for production of pancreatic β cells
Researchers : Yukihiro Ishizaka
Masayuki Shimoda (NCGM) , Tetsushi Sakuma (Hiroshima University)
Key word : Peptide vector, Direct reprogramming, pancreatic β cells

Abstract :

Approximate numbers of type 1 diabetes mellitus (type-1 DM) patients are 100 thousands in Japan. Among them, several hundred persons require transplantation of pancreas islets due to unstable concentration of blood glucose. In NCGM, Shimoda, a collaborator of the current project, recently initiated transplantation of pancreas islets, but it is a serious problem that numbers of donors are strictly limited. It would be necessary to establish a method, by which a benefit of islet transplantation can be offered to many type-1 DM patients.

Islets of pancreas comprise 1~2% of cells derived from pancreas tissues, and other 90% of cells are discarded during preparation for pancreas islet transplantation, because they are non-endocrine cells. Notably, however, these non-endocrine cells contain non-endocrine pancreatic endothelial cells (NEPEC), which have been shown to be competent for both proliferation and differentiation to pancreatic β cells: Shimoda reported that overexpression of NeuroD1 in NEPEC induced differentiation to endocrine cells. Moreover, it has been reported that simultaneous expression of exogenous Nrg3, Maf and Pdx1 differentiated pancreatic exocrine cells to endocrine cells (Zhao Q et al. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455: 627, 2008). Additionally, transduction of several types of miRNAs in human mesenchymal stem cells (hMSC) or iPS cells generated cells like pancreatic β cells. These observations suggest that manipulation of transcriptional factors is an elegant approach to prepare and expand pancreatic β cells.

Ishizaka, a principle investigator, identified an amino acid sequence that possessed an activity as a cell penetrating peptide (CPP) and named it nuclear trafficking peptide (NTP). Here, we tried to establish a system, by which it is possible to differentiate hMSC to pancreatic β cells. Of note, we here use recombinant proteins of artificial transcription factors (ATFs) that are tagged with NTP. NTP is a part of a viral protein of HIV-1, and was proved to have following functional properties:

- a. NTP has a more potent trafficking activity, compared to tat and R11 (a peptide composed of eleven arginines), which are well-known CPPs.
- b. NTP is free of cytotoxic effects, whereas tat is toxic to cells.
- c. NTP-tagged protein, when added to the culture medium, is quickly incorporated to cells, and intracellular content of NTP-tagged protein showed a maximum within several hours, then is quickly decreased.

Based on these findings, Ishizaka has been trying to establish a reliable system, which is applicable to synthetic biology that includes trans-differentiation. A preliminary experiment revealed that treatment

of mouse embryonic fibroblasts with four NTP-tagged transcriptional factors of Oct3/4, Sox2, Klf4 and Myc generated iPS-like cells, strongly suggesting that the NTP system is a versatile system useful for cell manipulations.

It is clear that a cellular manipulation by recombinant proteins is much safer than gene transduction, because gene delivery can irreversibly change cell property due to integration of exogenous gene in the genome. Moreover, target cells are possibly transformed, when exogenous gene is integrated into the critical locus of the genome. Although dramatic clinical effects were obtained by the gene therapy done on patients of congenital severe immunodeficiency, leukemia was unfortunately emerged in several patients who received the gene therapy. In Japan, it would be hard to apply gene therapy to clinical fields.

At moment, a research is ongoing to establish a differentiation-inducing system to pancreatic β cells from iPS cells. The current study is a trial to establish a next-generation method for novel transplantation of manipulated islets (Figure 1). Here, we investigated whether our system is applicable to rat cells. NTP-tagged ATFs were prepared and applied to both hMSCs and a rat epithelial cell line (WB1-F344).

Methods : Design and preparation of ATFs (Ishizaka and Shimoda)

Structures of ATFs : ATFs were designed and constructed by Dr. Sakuma of Hiroshima University, a collaborator. ATF is composed of two domains: DNA binding module and transcription module. Platina TALE (pTALE), which was invented by Dr. Sakuma, was proved to bind target sequences with a high affinity. VP64, VPR and core domain of p300 were used as transcription module: VP64 has 4 copies of VP16, a transcriptional domain of Herpes Simplex virus. VPR is a fused protein of VP64, p65 and Rta (replication and transcription activator). Preliminary experiments indicated that modes of functions of each ATF differ depending a combination of pTALE and effector molecule used as a transcription module. This was because we separately checked an activity of each combination of pTALE and transcription module

Notably, insulin production in response to glucose concentration is one of the most important functions of pancreatic β cells. It has been reported that miR-375 is negatively involved in a final step of differentiation of pancreatic β cells. Additionally, suppression of miRNA-9 upregulates responsiveness to glucose (Figure 2). Taking these reports into account, we used repressor molecules that included SID and Krab (SID, mSin interaction domain; Krab, Kruppel-associated box).

Expression of NTP-ATF and purification : NTP-ATFs were expressed by an wheat germ extract, a quick system of protein expression. To simply purify expressed proteins, pTALE-based ATF is expressed as a chimeric protein with glutathione S transferase (GST). Briefly, mRNA was synthesized using SP6 RNA polymerase, and purified mRNA was mixed with a wheat germ extract. After overnight incubation at 26 °C, proteins were purified with a glutathione-conjugated beads. Because pTALE-based ATF may function better than a chimeric protein with GST, a recognition amino acid sequence (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln/Gly, [/] : incision site) was inserted in the region between GST and

NTP. It was confirmed that NTP-tagged TEV works well within the cells when added to the culture medium.

Results :

ATFs for expressing rat Pdx1, Pax4 and Maf were constructed and treated to WB1-F344 cells. Then, expression of endogenous Pdx1 and Maf mRNA expression was examined. Unfortunately, however, no increase of mRNA expression was detected. We also examined human versions of ATFs, but they did not activate expression of endogenous gene expression, implying it necessary to construct other pTALE-based ATFs that target different nucleotide sequence.

Discussion :

Recent progress of regenerative medicine reveals that a transcriptional network of transcriptional factors maintains a phenotype of each cell, and replacement of the transcriptional network with other set of transcriptional factors changes cells with different phenotype (Figure 3 and 4) . By such a direct reprogramming approach, it would be possible to make any cells of interest, for example, cardiac muscle cells or neuronal cells from fibroblasts. However, these remarkable progresses of trans-differentiation were achieved by gene transduction system, and it is not easily apply to clinical fields. If we can manipulate differentiation status of cells by a protein-based approach, benefit of cell therapy can be offered to patients. We propose that the NTP-tagged ATF system is the most promising approach for cell manipulation by recombinant proteins.

図1. 1型糖尿病に対する新規細胞療法開発の流れ



膵島移植(霜田) ----> 次世代膵β細胞移植

特定認定再生医療等委員会

IRB

安全性試験

応用

体細胞の
拡張技術開発

前臨床試験

情報提供
技術移転

本課題:人工転写因子を用いた膵b細胞作成技術の開発

図2. 人工転写因子を用いたダイレクトリプログラミング

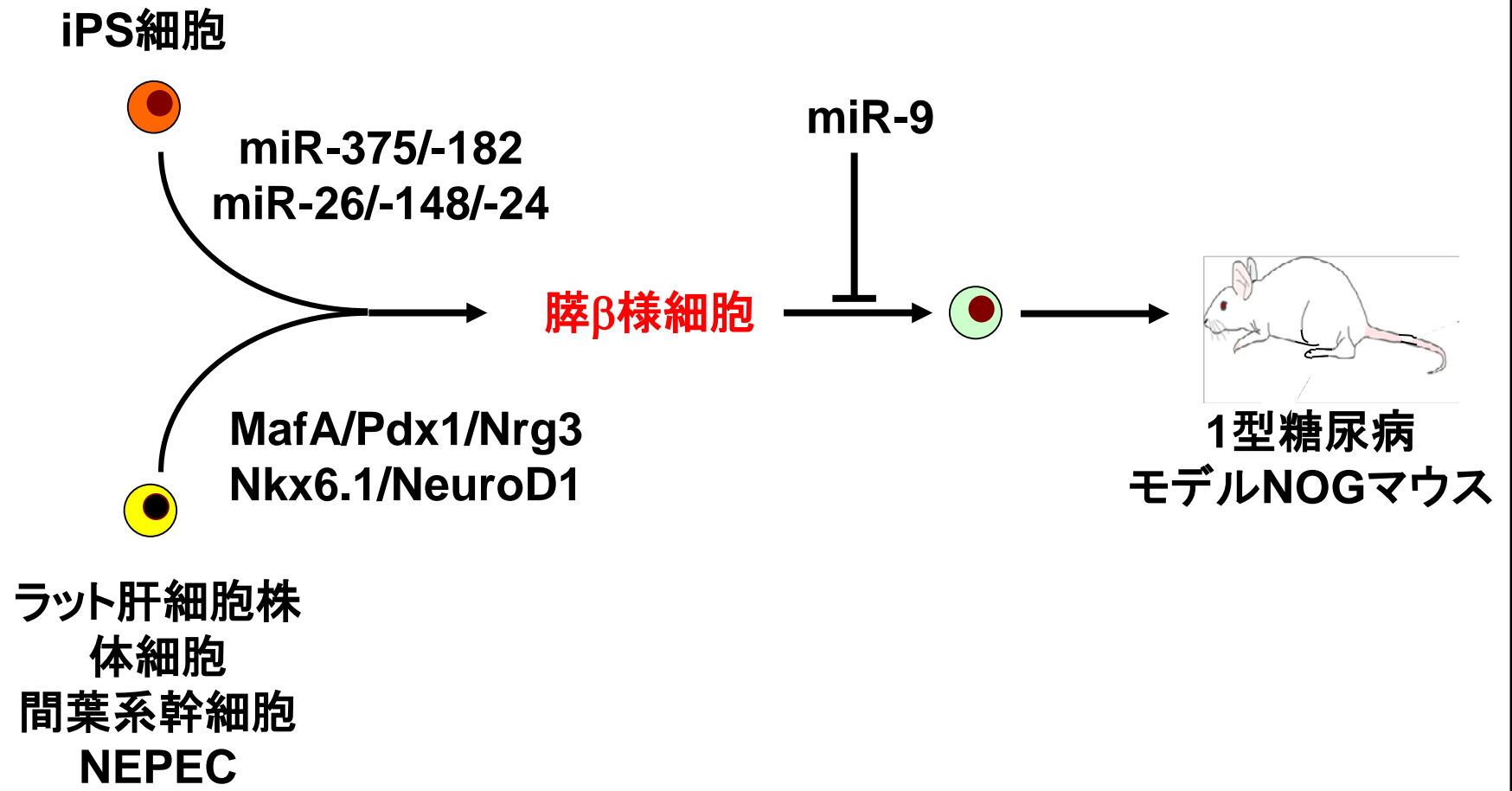
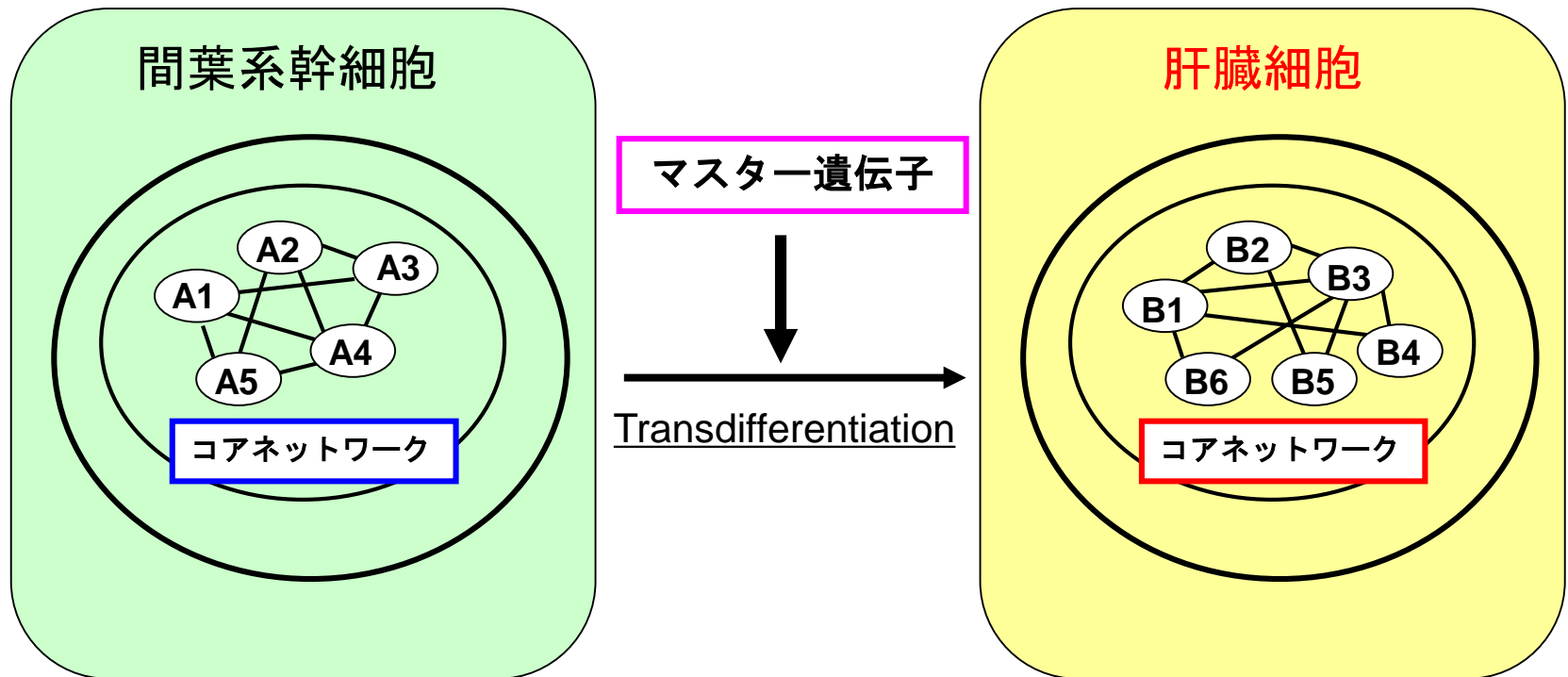


図3. NTPによる細胞形質転換法の基本コンセプト：
各細胞形質を維持するコアネットワークを置換することで
目的の細胞へ分化誘導できる？



体細胞	$\xrightarrow{\text{Myc-Sox2-Klf4-Oct3/4}}$	多能性幹細胞
膵外分泌細胞	$\xrightarrow{\text{Ngn3-Pdx1-Mafa}}$	インスリン産生細胞
骨髄間葉系幹細胞	$\xrightarrow{\text{HNF3}\beta\text{-HNF4}\alpha}$	肝臓様細胞(補助資料)

図4. ダイレクトリプログラミングによって、様々な細胞へ分化誘導できる

Target organs	Cell origins	Species	Factors
Muscles	Fibroblasts	m	MyoD
Cardiomyocytes	↓	m	Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2
Neurons		m	Ascl1, Brn2, Myt1l
		h	Ascl1, Brn2, Myt1L, NeuroD
Hepatocytes		m, h	HNF3 γ , HNF1 α , HNF4 α
Endothelial cells		m	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (4-day partial reprogramming)
		h	EVT2, FLII, ERGI
β -cells	Pancreatic (Exocrine)	m	Ngn3, Pdx1, MafA

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：28A-5001

研究課題名：人工転写因子を用いた安全な膵β細胞作成

主任研究者名：石坂幸人

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus.	Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K.	Genes Cells	21(11):1253-1262	2016
Non-RVD mutations that enhance the dynamics of the TAL repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy.	Tochio N, Umehara K, Uewaki JI, Flechsigg H, Kondo M, Dewa T, Sakuma T, Yamamoto T, Saitoh T, Togashi Y, Tate SI.	Sci. Rep.	6:37887	2016
Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ.	Aida T, Nakade S, Sakuma T, Izu Y, Oishi A, Mochida K, Ishikubo H, Usami T, Aizawa H, Yamamoto T, Tanaka K.	BMC Genomics	17(1):979	2016
Modulation of long interspersed nuclear element-1 in the mouse hippocampus during maturation.	Ueno M, Okamura T, Mishina M, Ishizaka Y.	Mob. Genet. Elem	6(4):e121198	2016
Morphine and Fentanyl Citrate Induce Retrotransposition of Long Interspersed Element-1.	Okudaira N, Ishizaka Y, Nishio H, Hiroshi Sakagami.	In vivo	30(2):113-8	2016

研究発表及び特許取得報告について

Imaging of intracellular fatty acids by scanning X-ray fluorescence microscopy.	Shimura M, Shindou H, Szyrwiel L, Tokuoka SM, Hamano F, Matsuyama S, Okamoto M, Matsunaga A, Kita Y, Ishizaka Y, Yamauchi K, Kohmura Y, Lobinski R, Shimizu I, Shimizu T.	FASEB J	30(12):4149-4158	2016
Microencapsulation in Clinical Islet Xenotransplantation.	Shimoda M, Matsumoto S.	Methods Mol Biol.	1479:335-345.	2017
学会発表				
タイトル	発表者	学会名	場所	年月
HIV-1 Vpr induces DNA damage and DNA damage response by changing DNA structure.	Iijima K, Ishizaka Y.	第15回あわじしま 感染症・免疫 フォーラム	淡路市	2016 9月
The activity of retrotransposition detectable in blood of HIV-1 positive patients has possible link with neurocognitive disorder.	石坂幸人	遺伝研研究会	三島	2016 9月
その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)				
タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				
特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。				
発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
転写調節融合ポリペプチドを用いた細胞ダイレクトリプログラミング方法	2017-036557	国立国際医療研究センター アステラス製薬株式会社 広島大学	2017年2月28日	日本
新規転写調節融合ポリペプチド	AP0656AJ0	国立国際医療研究センター アステラス製薬株式会社 広島大学	2016年12月12日	日本

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと