

ナノメディックによる安全な再生医療等製品の作出技術の開発 —新規タンパク質送達法の医用応用にかかる基盤技術の確立—

1. 研究の目的

(1) 我々は iPS 細胞を経由せず体細胞を直接別の系統の細胞に分化させる direct cell reprogramming (DCR) をモデルに、再生医療に欠かせない「安全な再生医療等製品」を作出するための基盤技術を構築することを研究の目的に掲げる。

①日本が世界に貢献したiPS細胞は再生医療成功の鍵を握っている。しかし、臨床応用に際しては安全性への懸念がある。そのひとつが治療用細胞の腫瘍化である。iPS細胞は転写因子を体細胞に導入することにより作出されるが、導入法に内在する問題は改善の余地がある。タンパク質を直接細胞内に導入する技術も報告されているが技術的な完成度は高いとは言えない。エフェクター分子導入技術の開発とは別に、近年ではiPS細胞に内在性のゲノム不安定性があると指摘されている。脱分化そのものがゲノム不安定性を誘発していると考えられる (Adv Exp Med Biol 2019)。

②iPS細胞を利用した臨床試験に注目が集まる一方、安全性に関する懸念を払拭するための基礎的な技術開発は遅れている。iPS細胞を経由しないDCRは治療用細胞の作出に要する期間も短く、変異誘発リスクが比較的低いとされ、再生医療を実用化する観点から高く評価されている (J Biol Engineer 2019)。そこで、我々はDCRを研究の柱として位置付ける。

(2) 線維芽細胞から神経系や筋肉細胞を直接誘導するDCRは以前から報告されてきた。中でも単一転写因子によるDCR技術はin vivo投与を念頭においた再生医療に極めて有用である。しかし、iPS細胞の樹立・再分化と共通する問題点としてゲノム障害・細胞悪性化を回避できる簡便かつ一過性の転写因子導入技術は確立されていなかった。

①我々はAMEDの支援を得てこれを解決する技術基盤NanoMEDIC法を開発した。これはタンパク質やRNAを直接細胞に導入する非常に簡便な方法で、我々がウイルス学の基礎研究で得た成果に基づいて独自に開発した技術である (Nat Commun 2020)。他のエフェクター分子の細胞導入手法と比較すると、全ての点においてNanoMEDIC法が優れている。これまでに遺伝子編集酵素Cas9やレポータータンパク質を細胞に送達することに成功している。

②本研究では転写因子Ngn2及びMyoDタンパク質をヒト線維芽細胞にNanoMEDICを用いて導入してDCRが達成できるかを検証する。この技術が確立すれば、安全性の観点から足踏みしていた再生医療の多くが実現に向かって大きく前進すると期待される。

2. 研究の計画

(1) 転写因子誘導体の構築：単一の転写因子で線維芽細胞を脱分化させる Ngn2 及び MyoD をモデルとする。これらに NanoMEDIC 粒子への取り込みを促進するための DmrC タグを融合させた哺乳類細胞発現プラスミドベクターを構築する。融合遺伝子の発現を Western blot 法により確認すると同時に、融合遺伝子の発現により標的遺伝子 MyoG, fMyHC, MyoD NeuroD4, N Sox 1, Ngn2 などの発現誘導が可能かをトランスフェクションした細胞から RNA を抽出し RT-PCR により検証する。増幅のインターナルコントロールに GAPDH を用いる。細胞はヒト細胞株 NP2, 293FT, 初代線維芽細胞 IMR-90 を用いる。タグの位置を Ngn2 と MyoD の N 末端または C 末端側にするか、リンカーのアミノ酸配列と長さを数種類試験して転写因子機能が保たれている誘導体を選択する。一方、dCas9-VPR を利用して内在性の Ngn2 と MyoD 発現を誘導する dCas9 哺乳類細胞発現プラスミドベクターを構築し、Ngn2 と MyoD のプロモーター配列に対する guide RNA を数種類デザインして一過性トランスフェクション系にて機能解析する。遺伝子発現が十分に誘導できない場合には VP16, 64, VPR 誘導体, gRNA などを逐次改変し転写活性が増強できるように工夫する。また、タンパク質デリバリー効率 VSV-G 以外の膜融合タンパク質で上昇するかについて Measles virus glycoprotein 及び Baboon retrovirus envelope を用いて検証する。

(2) NanoMEDICの産生と機能評価：最も生物学的活性が高い誘導体を選択しNanoMEDICを産生させる。293T細胞へDmrAタグを付加したNanoMEDIC構造タンパク質、転写因子、粒子表面を被服するVSV-Gの発現プラスミドをtripartite transfectionし、転写活性を有する分子を

NanoMEDIC粒子に取り込ませるため培養液にA/C heterodimerizerを添加する。細胞培養上清を0.45 μ mフィルターで濾過し、PEG沈殿にてNanoMEDICを回収し、容量を指標に100倍濃縮する。Western blot法にてNanoMEDIC粒子への取り込み効率を評価する。

3. 研究の成果

全ての予定していた NanoMEDIC production 用の plasmid 構築を完成させ、ヒト細胞におけるタンパク質発現を Western blotting により検証した。転写因子の機能は、その標的活性化分子に対する RT-PCR により確かめた。NanoMEDIC 粒子への Cargo 取り込みは VP16 や VPR 付加により次第に低下することがわかった。これは分子量、protein trafficking の2つの要因があると推定されるが、VP16 と VPR は NLS の機能が強いいため NanoMEDIC 形成の場である細胞質に Cargo 分子が分布しにくいことが主な原因と思われた。VSV-G pseudotyping に対して Baboon retrovirus envelope は NanoMEDIC producer cells への細胞融合による毒性が強く、反復的収穫が出来ないため、予想に反して total yield が低くなることが分かった。送達効率の増大よりも産生効率の低さの方が問題となることが判明した。

4. 研究の反省・考察

NanoMEDIC による転写因子の導入を機能的に評価したところ、RT-PCR で標的因子の発現増強を確認した。あらかじめ予定していた実験計画の通りに実施できた。NanoMEDIC 粒子の中に封じ込めることができる分子の特性がわかるようになってきたこと、転写因子を NanoMEDIC で送達することができることが証明できたことは DCR の実現に向けて評価できる結果である。細胞の形態的、機能的分化の検証は今後の研究に期待する。以上より、NanoMEDIC protein にかかる技術的な基礎はある程度固めることが出来たと考える。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

①2021年第44回分子生物学会 Kurita et al.,

新規タンパク質送達法 NanoMEDIC による転写因子送達の実証

②2022年第7回日本ゲノム編集学会 Tomita et al., (ポスター賞)

新規 RNP 導入法 NanoMEDIC による Cas9/gRNA 送達の有用性に関する研究

(3) 出版物

なし