

押村 光雄

鳥取大学大学院医学系研究科・教授

ヒト人工染色体を用いた iPS 細胞の作製と遺伝子・再生医療

§1. 研究実施の概要

本研究の目標は、1) 遺伝子搭載サイズに制限がなく、自立複製するミニ染色体であるヒト人工染色体 (HAC) ベクターを用いて、がん化の危険性がない安全な患者由来 iPS 細胞を作製し、2) その iPS 細胞に、さらに①治療用遺伝子、②分化誘導用遺伝子、③分化細胞分取用遺伝子を搭載した HAC ベクターを導入し、遺伝子治療・再生医療に役立てることである。具体的には筋ジストロフィー (DMD: Duchenne's muscular dystrophy) および糖尿病モデルマウスを対照として iPS 細胞を用いた自己細胞治療に向けた基盤研究を行う。さらに上記ヒト患者由来の線維芽細胞からの iPS 細胞の誘導・分化誘導を行い、モデルマウスを用いた *in vivo* 系での治療効果を検証する。3つの課題を行い、以下の進捗および成果を出すことができた。

<課題1: HAC ベクターによる iPS 誘導>

これまでに作製してきた HAC ベクターの中で、CAG プロモーター下に 4 因子を 2 コピー連結した HAC ベクター単独、もしくは未分化細胞特異的マイクロ RNA 導入の併用により、マウス線維芽細胞を初期化することには成功したが、キメラ形成能は示さず初期化がまだ十分ではないことが示唆された。そこで、CAG プロモーター下に *Klf4*, *c-Myc*, *Sox2* を2コピーずつ、*Oct4* を 4 コピー、およびマウス *p53shRNA* を連結した HAC ベクターを作製し、マウス胎児線維芽細胞に対する初期化能を検討したところ、4 因子 2 コピーだけのものに比べて、より高い未分化性を示すクローンが獲得でき、このクローンから HAC ベクターを脱落させた、所謂外来因子をまったく持たない iPS 細胞の獲得にも成功した。今年度はこのコンストラクトをヒト細胞用に改変し、ヒト細胞の iPS 誘導を目指す。

<課題 2: iPS 細胞を用いた糖尿病治療>

iPS に由来する膵臓 β 細胞を用いて臨床的な糖尿病治療を実現するための出口戦略として、①人工染色体ベクターを用いて機能的膵 β 細胞を高効率に分化誘導する技術開発、②樹立した細胞を安全に移植する方法の開発を行った。分化誘導法の細胞を樹立するために複数の遺伝子を

HACベクターに導入する技術を構築し⁴⁾、この技術を用いて、インスリン、Ngn3 をモニタリングできる遺伝子を HAC ベクターに導入し、さらに HAC ベクターを移入したマウス ES-D3 細胞の作製に成功した。今後はこのベクターを iPS 細胞に移入して高機能生膵 β 細胞への分化誘導を試みる。

<課題 3:iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療>

DMD-HAC ベクターを導入した筋ジストロフィーモデルマウスおよび筋ジス患者由来 iPS 細胞から筋肉細胞に *in vitro* で分化させ、筋肉細胞への分化誘導に成功し、ヒトジストロフィン遺伝子の発現も確認した。一方、遺伝子修復した iPS 細胞からの癌化に備えて、DMD-HAC 上には自殺遺伝子 TK が搭載されているので、*in vivo* での DMD-HAC 導入細胞の除去が可能であった。今後は効率良く、筋肉細胞へ分化させる仕組みを構築する。また HAC ベクターを用いて安全な iPS 細胞を作製し、「分ける仕組み」「誘う仕組み」を搭載した HAC ベクターを作製することで、筋ジストロフィー治療にむけた基盤整備を行う。

§ 2. 研究実施体制

(1)「押村」グループ

- ① 研究分担グループ長:押村 光雄(鳥取大学、教授)
- ② 研究項目
 - ・ヒト人工染色体を用いた iPS 細胞の作製と遺伝子・再生医療

(2)「角」グループ

- ① 研究分担グループ長:角 昭一郎(京都大学、准教授)
- ② 研究項目
 - ・iPS 由来膵臓 β 細胞を用いた糖尿病治療

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

<課題1:HAC ベクターによる iPS 誘導>

1. iPS 誘導用マルチコピー HAC ベクターの作成

CAG プロモーター下に Klf4, c-Myc, Sox2 を2コピーずつ、Oct4 を 4 コピー、およびマウス p53shRNA を連結した HAC ベクターを作製した。

2. HAC ベクターによるマウス iPS 細胞の誘導

1. で作製した HAC ベクターをマウス線維芽細胞に微小核細胞融合法により導入した。HAC ベクターが導入された細胞を 21 クローン獲得し、そのうち 13 クローンが ES 細胞様に形態変化した。これらのクローンでは Nanog、Dppa5、Utf1、Dnmt3l、Esrrb、Sox2、Oct4 等の未分化マーカーの発現も確認され、その発現レベルは 4 因子 2 コピーだけの HAC ベクターで誘導した iPS 細胞クローンよりもはるかに高く、ES 細胞レベルにより近いものであった。さらに、この 13 クローンのうち 7 クローンから HAC 脱落クローンも獲得出来た。全ての HAC 脱落クローンは更に高い未分化性を示し、未分化マーカーの発現レベルは ES 細胞と同レベルに達し、マイクロアレイ解析においてもレトロウイルスで作製した iPS 細胞より ES 細胞に近いことが示された。染色体も正常であり、キメラマウス形成にも寄与できたことから、今回作製した HAC ベクターは、十分な未分化性を示す iPS 細胞を獲得するための有用なツールであることが示された。また、21 個の HAC 導入クローンから、HAC 脱落 iPS 細胞クローンが 7 クローン得られたことになり、33% という非常に高い効率であった (図 1)。HAC ベクター導入細胞ではトランスジーンが発現レベルが均一であることが一つの要因と推察されるが、このことは、誘導因子のスクリーニングにおいても HAC ベクターが有用なツールになりうることを示している^{1,2)}。

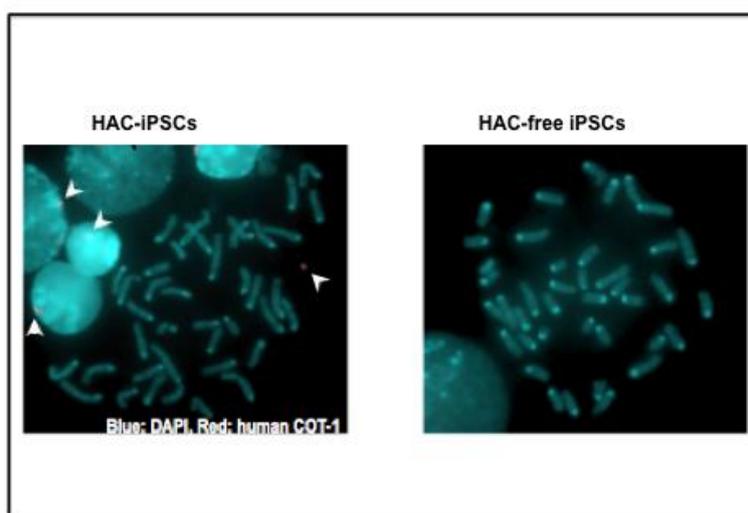


図1 HACありiPS細胞とHACなしiPS細胞のFISH解析

3. HAC ベクターの導入効率の改善

現行の PEG を用いた微小核細胞融合法(MMCT 法)では、ヒト染色体の移入効率は受容細胞あたり 10^{-5-6} 程度である。本年度は麻疹ウイルスの融合タンパク質(H/F)を利用して、HT1080, hiMSC, HFL1 細胞への融合能を検討した³⁾。その結果、HT1080, hiMSC において PEG 法に比べ、染色体導入効率が 50-100 倍上昇した。来年度以降は iPS 細胞や線維芽細胞への融合剤と融合方法を最適化する。

<課題 2:iPS 細胞を用いた糖尿病治療>

iPS に由来する膵臓 B 細胞を用いて臨床的な糖尿病治療を実現するための出口戦略として、①人工染色体ベクターを用いて機能的膵 B 細胞を高効率に分化誘導する技術開発、②樹立した細胞を安全に移植する方法の開発を行った。分化誘導法の細胞を樹立するために複数の遺伝子を HAC ベクターに導入する技術を構築し⁴⁾、この技術を用いて、インスリン、

Ngn3をモニタリングできる遺伝子を Chinese Hamster Ovary cells (CHO 細胞)中の HAC ベクターに導入した。さらに HAC ベクターを移入したマウス ES-D3 細胞の作製に成功し、バイオイメージング技術を利用した分化誘導法の開発を進めている。安全な移植法の開発としては、ポリビニルアルコール・マクロカプセル化膵島 (poly-vinyl alcohol macro-encapsulated islets, PVA-MEI)を用いた技術開発を進めた。本年度は PVA-MEI において *in vitro* でヒト新鮮血漿によるラット膵島障害が完全に阻止されること⁵⁾、また、無処置では速やかに拒絶される Wistar ラットから Lewis ラットへの同種移植において、免疫拒絶を受けない同系膵島を用いた PVA-MEI と同等の移植効果が得られることを示した⁵⁾。また、凍結・解凍操作を含む PVA-MEI の作製工程で、凍結時間を30日まで延長しても、十分に有意な移植効果が得られることを確認した⁶⁾。このほか、キトサン/コラーゲンゲルによるカプセル化でラットからマウスへの膵島移植が可能になること⁷⁾、および、人工骨の素材であるリン酸カルシウムセメントで作製したチャンバーを骨髓腔内へ移植する方法を用いて、マウスのインスリンノーマ細胞によるイヌ^{8,9,10)}あるいはネコ¹¹⁾の糖尿病治療が可能であることを示した。

<課題 3:iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療>

昨年度までに作製した DMD-HAC ベクターを導入した DMD 患者由来 iPS 細胞から2種類の方法により筋肉細胞への分化誘導を行った。1) mesoangioblast 様の前駆細胞を誘導し、その後筋肉へ誘導する方法を実施し、筋肉細胞を作製することに成功した。2)

inducible-PAX3を導入することで一過性に PAX3 を発現させ、mdx-scid マウスに移植することで筋肉細胞が作製できることを実証した。

一方、遺伝子修復した iPS 細胞からの癌化に備えて、DMD-HAC 上には自殺遺伝子 TK が搭載されている。そこで、mdx-iPS(DMD-HAC)細胞ならび mdx-iPS 細胞をヌードマウスの左右の皮下に移植し、

の結果、PBS 群では両細胞とも同等レベルに増殖したのに対し、Ganciclovir 投与群では mdx-iPS 細胞に比較して、mdx-iPS(DMD-HAC)細胞においてのみ優位に増殖が抑えられることが示された(図 2)。今後は効率良く、筋肉細胞へ分化させる仕組みを構築する。

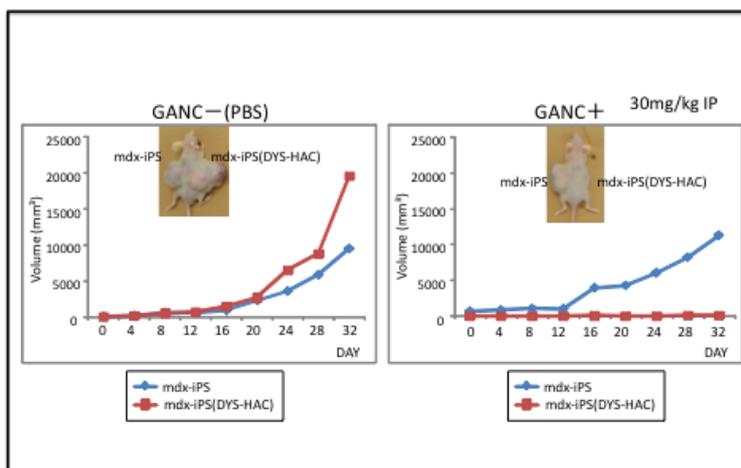


図2 mdx-iPS(DMD-HAC)細胞とmdx-iPS細胞に対するin vivoでのガンシクロビル効果

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Katoh M, Kazuki Y, Kazuki K, Kajitani N, Takiguchi M, Nakayama Y, Nakamura T, Oshimura M. : Exploitation of the interaction of measles virus fusogenic envelope proteins with the surface receptor CD46 on human cells for microcell-mediated chromosome transfer. *BMC Biotechnol.* 10:37,2010 (doi:10.1186/1472-6750-10-37)
2. Iida Y, Kim JH, Kazuki Y, Hoshiya H, Takiguchi M, Hayashi M, Erliandri I, Lee HS, Samoshkin A, Masumoto H, Earnshaw WC, Kouprina N, Larionov V, Oshimura M. : Human Artificial Chromosome with a Conditional Centromere for Gene Delivery and Gene Expression. *DNA Res.* 17:293-301. 2010 (doi: 10.1093/dnares/dsq020)
3. Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Abe s., Iida Y., Osaki M., Katoh M., Hiratsuka M., Shirayoshi Y., Hiramatsu K., Ueno E., Kajitani N., Yoshino T., Kazuki K., Ishihara C., Takehara S., Tsuji S., Ejima F., Toyoda A., Sakaki Y., Larionov V., Kouprina N., Oshimura M.: Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. *Gene Therapy*, 18(4):384-93. 2010 (doi:10.1038/gt.2010.147)
4. Yamaguchi S, Kazuki Y, Nakayama Y, Nanba E, Oshimura M, Ohbayashi T. A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector.. *PLoS ONE*. (In press)
5. Qi Z, Yamamoto C, Imori N, Kinukawa A, Yang KC, Yanai G, Ikenoue E, Shen Y, Shirouzu Y, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. *Cell Transplant*. (In press)
6. Qi Z, Shen Y, Yanai G, Yang K, Shirouzu Y, Hiura A, Sumi S. The in vivo performance of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets. *Biomaterials*. 31: 4026-4031, 2010. (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.088)
7. Yang KC, Qi Z, Wu CC, Shirouzu Y, Lin FH, Yanai G, Sumi S. The cytoprotection of chitosan based hydrogels in xenogeneic islet transplantation: An in vivo study in streptozotocin-induced diabetic mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 393: 818-823, 2010. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.089)
8. Yang KC, Wu CC, Qi Z, Chen JC, Sumi S, Lin FH. Comparison of bioartificial pancreas performance in the bone marrow cavity and intramuscular space. *Archives of Medical Research* 41: 151-153, 2010. (DOI: 10.1016/j.arcmed.2010.03.002)
9. Yang KC, Wu CC, Sumi S, Tseng CL, Wu YH, Kuo TF, Lin FH. Calcium phosphate

- cement chamber as an immunoisolative device for bioartificial pancreas: In vitro and preliminary in vivo study. *Pancreas* 39: 444-451, 2010. (DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181be2f95)
10. Yang KC, Wu CC, Sumi S, Kuo TF, Lin SC, Lin FH. Intramedullary cavity as an implant site for bioartificial pancreas: An in vivo study on diabetic canine. *Transplantation*. 90: 604-611, 2010. (DOI: 10.1097/TP.0b013e3181ca64d1)
11. Yang KC, Wu CC, Lin SC, Sumi S, Lin FH. The in vivo performance of bioartificial pancreas in bone marrow cavity: A case report of a spontaneous diabetic feline. *Biochem Biophys Res Commun*. 393: 362-364, 2010. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.152)

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)