

押村 光雄

鳥取大学 染色体工学研究センター・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. 研究実施体制

(1)「押村」グループ

① 研究代表者:押村 光雄(鳥取大学、教授)

② 研究項目

課題1:HAC ベクターによる iPS 誘導

iPS 誘導用 HAC ベクターの作成およびヒト iPS 細胞の誘導

課題 2:iPS 細胞を用いた糖尿病治療

マルチカラーHAC ベクターによる膵 β 細胞への分化誘導をバイオイメージングする技術  
開発

課題 3:iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療

DMD-HAC 導入 mdx マウスまたは DMD 患者由来 iPS 細胞の in vitro 筋分化

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### <課題 1:HAC ベクターによる iPS 誘導>

平成22年度までに作製した、マウス線維芽細胞を初期化出来る HAC ベクター(iHAC2)をヒト細胞用に改変した。現在、この HAC ベクターをヒト細胞に導入し、初期化能を検証しているところである。また、HAC ベクターの導入効率の改善を目指して開発した、麻疹ウイルス由来のヘマグルチニン(H)およびフュージョン(F)タンパク質を用いた新たな HAC 導入法については、H タンパクに改変を加え、ヒト細胞用に最適化させることに成功した。H タンパク質は CD46 を認識しており、CD46 高発現細胞にしか融合能を示さなかったため、ヒト線維芽細胞で発現の高い CD13 および CD71 (トランスフェリン受容体)に対する1本鎖抗体を付加した H タンパク質に改変することにより、ヒト線維芽細胞との融合が可能になった。今後、この麻疹融合法により、高効率な HAC 導入を実現させ、HAC ベクターによるヒト細胞の初期化を目指していく。

平成 23 年度より、iPS 細胞を分化誘導させた治療用細胞の安全性を向上させるために、非抗原性自殺遺伝子として変異型 Tmpk を発現させるシステムと、未分化因子のプロモーター制御下で自殺遺伝子(変異型 TK)あるいは高抗原性タンパク質を発現させるシステムの開発を開始した。

#### <課題 2:iPS 細胞を用いた糖尿病治療>

平成 22 年度までに作製した、ES 細胞から膵  $\beta$  細胞への各分化段階をモニタリングできる HAC ベクターの性能評価のため、マウス ES 細胞にこの HAC ベクターを導入し、キメラマウス作製を行っている。また、ヒト iPS 細胞からの分化誘導系として、Activin A, ITS, FGF4, BMP2 など連続処理する既存の方法を改良し、未熟な膵臓細胞マーカーである PDX1 に加えて肝芽細胞マーカーの EpCAM, AFP, ALB などが共陽性である膵・肝前駆細胞を獲得することが出来た。これらの評価系を用いて、HAC ベクターによるモニタリング・システムの有効性を検証する。

#### <課題 3:iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療>

平成 22 年度までに作製した DMD-HAC ベクターを導入した筋ジス患者由来 iPS 細胞から中胚葉系血管芽細胞への効率的な誘導に成功した。この In vitro で iPS 細胞から誘導した中胚葉系血管芽細胞は生体から取り出した中胚葉系血管芽細胞と同様のマーカー発現(CD13, CD44, CD146 などの発現)を呈することを確認した。さらに中胚葉系血管芽細胞に MyoD 遺伝子を導入することで、効率的に筋肉前駆細胞へ分化誘導できることが確認され、ヒトジストロフィン遺伝子の発現も観察された。今後は、この筋肉前駆細胞が生体内で機能するか、心筋細胞に分化誘導できるかを検討し、筋ジストロフィー遺伝子治療のための基盤整備を行う。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Tedesco FS, Hoshiya H, D'Antona G, Gerli M FM, Messina G, Antonini S, Tonlorenzi R, Benedetti S, Berghella L, Torrente Y, Kazuki H, Bottinelli R, Oshimura M, and Cossu G, "Stem Cell-Mediated transfer of a Human Artificial Chromosome Containing the Entire Dystrophin Locus Ameliorates Muscular Dystrophy", *Sci Transl. Med.*, 3(96), 96ra78, 2011, (DOI:10.1126/scitranslmed.3002342)
2. Kurosaki H, Hiratsuka M, Imaoka N, Iida Y, Uno N, Kazuki Y, Ishihara C, Yakura Y, Mimuro J, Sakata Y, Takeya H and Oshimura M, "Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome" *J. Hum. Genet.*, 56(10), 727-33, 2011, (DOI: 10.1038/jhg.2011.88)
3. Hiratsuka M, Uno N, Ueda K, Kurosaki H, Imaoka N, Kazuki K, Ueno E, Akakura Y, Katoh M, Osaki M, Kazuki Y, Nakagawa M, Yamanaka S and Oshimura M, "Integration-Free iPS Cells Engineered Using Human Artificial Chromosome Vectors", *PLoS One.*, 6(10), e25961, 2011, (DOI:10.1371/journal.pone.0025961)

4. Kim JH, Kononenko A, Erliandri I, Kim TA, Nakano M, Iida Y, Barrett JC, Oshimura M, Masumoto H, Earnshaw WC, Larionov V, Kouprina N, “Human artificial chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 108(50), 20048-53, 2011, (DOI:10.1073/pnas.1114483108)
5. Kakeda M, Nagata K, Osawa K, Matsuno H, Hiratsuka M, Sano A, Okazaki A, Shitara S, Nishikawa S, Masuya A, Hata T, Wako S, Osaki M, Kazuki Y, Oshimura M and Tomizuka K, “A new chromosome 14-based human artificial chromosome (HAC) vector system for efficient transgene expression in human primary cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 415(3), 439-44, 2011, (DOI:10.1016/j.bbrc.2011.10.088)

**(3-2) 知財出願**

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)