

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞(iPS細胞)作製・
制御等の医療基盤技術」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成26年3月

研究代表者:押村 光雄
(鳥取大学染色体工学研究センター、
教授)

§ 1. 研究実施の概要

(1) 実施概要

我々は、人工染色体ベクターの(1)ホストゲノムに組み込まれない(2)搭載出来る遺伝子サイズに制限がない(3)正確な遺伝子発現制御が可能であるという特徴を活用して、1本の HAC ベクターに初期化用遺伝子、分化モニター用遺伝子、治療用遺伝子及び iPS 細胞から分化誘導させた治療用細胞の安全性を向上させるためのシステム（セーフガードシステム）を搭載し、iPS 細胞を用いた遺伝子再生医療に応用することを最終ゴールとして、その基盤作りを目指して、本プロジェクトはスタートした。本プロジェクトでは、HAC ベクターに加えて、治療用モデルマウスでの実証を行うためにマウス細胞中で安定なマウス人工染色体 (MAC) ベクター、及び複数の遺伝子導入部位を備えた「Multi-Integrase (MI) システム」を持つ MI-HAC/MI-MAC ベクターも開発した。これら様々な HAC/MAC ベクターを用いて以下のことを明らかにした。

- (1) マルチコピー化した初期化因子を 1 本の HAC ベクターに搭載し、マウス及びヒト線維芽細胞に導入することにより均質な iPS 細胞を作製できること
- (2) 未分化因子のプロモーター制御下に自殺遺伝子(HSV-TK)あるいは高抗原性タンパク質(ガン精巣抗原や同種異系主要組織適合遺伝子複合体抗原)を発現させるシステムにより、in vitro/in vivo において未分化細胞やガン細胞を除去できること
- (3) MI システムに Fucci システムを導入することによりホストゲノムを傷つけずに多色モニターが可能となったこと
- (4) 広範な発現制御領域を用いた、発生・分化段階のモニターシステムの有用性を実証したこと
- (5) デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の原因遺伝子ジストロフィン の全ゲノム領域 2.4Mb を搭載した DMD-HAC ベクターにより遺伝子欠損を完全に修復し、遺伝子機能を修復できたこと
- (6) 血友病 A の原因遺伝子 FVIII のマルチコピー高発現ベクター或いは血小板特異的発現ベクターを構築し、機能的 FVIII 産生細胞株の樹立に成功したこと及び高発現ベクターについては in vivo にて止血効果も確認できたこと

さらに、標的細胞への HAC ベクターの導入効率を上昇させる方法として麻疹ウイルスタンパク質を応用した麻疹融合法の開発や、除去可能 HAC ベクターとの併用方法の開発に成功した。また、完全な動作確認まで至らなかったが、膵β細胞分化モニターとしてインスリン、Ngn3、MafA 発現モニターシステムの構築を行った(角/押村グループ)。

HAC/MAC ベクターに搭載した遺伝子は安定に保持され、遺伝子の発現レベルも長期にわたり持続されることから、導入細胞の形質も長期間にわたり安定であった。このことから HAC ベクターは再生医療における治療用細胞作製に適したベクターであると考えられる。また、HAC ベクター、MAC ベクターは共通の遺伝子搭載用プラットフォームで設計してあるので、モデル細胞/モデルマウスで実証できた成果は容易にヒトに外挿できると考えられ、細胞再生医療を進める上での Proof-of-Concept の獲得にも役立つと期待される。なお、全ての研究は、当初2研究グループ(押村・角グループ)としてスタートしたが、平成 22 年度からは押村グループのみで進められた。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の原因遺伝子であるジストロフィンは 2.4Mb にも及ぶ巨大な遺伝子であり、従来の遺伝子導入ベクターではクローニングすることが困難であった。そこで DMD 患者とそのマウスモデルから iPS 細胞を作製し、それぞれにジストロフィン遺伝子のゲノム全長を搭載した HAC ベクターを導入することで、内在ゲノムを傷つけることなく、その原因遺伝子を完全に修復することに成功した。さらに遺伝子修復済みの iPS 細胞を用いて中胚葉性血管芽細胞への分化誘導技術を確立し、また胚様体形成によ

る分化誘導により機能的発現を示す心筋の作製に成功した。

2. 強制発現系プロモーターを用いた FVIII-HAC/MAC ベクターでは、長期間において発現レベルが維持され、細胞移植系あるいはキメラマウスにおいて止血効果が発揮されるレベルの FVIII 産生に成功すると共に、血友病治療における課題の一つである中和抗体の産生を回避させるシステムとして、血小板特異的プロモーターにより第 VIII 因子を発現させる MAC ベクターの構築にも成功した。今後、この HAC/MAC ベクターを用いた iPS 細胞由来の造血幹細胞移植による治療効果が期待される。
3. マルチコピー化した初期化因子搭載 HAC ベクターにより、インテグレーションの無い均質なマウス iPS 細胞を作製することでできた。さらに、モデルマウス由来の線維芽細胞からもインテグレーションの無いマウス iPS 細胞を作製することができたことは、遺伝子・再生医療を進める上での Proof-of-Concept の獲得及びモデルマウスを用いた遺伝病の解析に大いに貢献するものである。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. ヒト人工染色体ベクターはマウスにおいて必ずしも安定ではない。そこでマウスを用いたモデル実験を行うために、マウスのセントロメアを保持したマウス人工染色体(MAC)ベクターを構築したところ、マウスの *in vivo*, *in vitro* において MAC ベクターは極めて安定に維持されることが明らかとなった。さらに MAC ベクターはヒト細胞も含めた哺乳類細胞全般で安定に維持されることも明らかとなったことから、創薬等の産業応用も可能であることが示唆された。なお、MAC ベクターは JST 特許出願支援制度のもと PCT 出願を行い、現在各国で審査が行われているところである。この MAC は鳥取大学発ベンチャー企業クロモセンター(株)において事業化が進められている。
2. HAC 及び MAC ベクターを用いて、①複数の遺伝子を効率良く導くこと、②導入した遺伝子の発現を長期間安定にコントロールできること、③導入したシステムは多能性幹細胞を含めて種々の細胞に導入可能なこと、④導入システムを持つ遺伝子導入動物も効率良く作成できること等が実証できたことから、様々な生命現象に関わる遺伝子群を一括して搭載し、機能解析するシステムを HAC/MAC ベクターで構築できる可能性が示された。
3. HAC/MAC を用いて発光や蛍光タンパク質といったレポーター遺伝子を導入した iPS 細胞や ES 細胞は、安全性試験や薬理薬効試験開発における HTP スクリーニングシステム開発に貢献することが期待されている。今回の発生や分化のレポーターシステムは、これら創薬開発システムへの応用が可能である。すでに鳥取大学発ベンチャー企業 2 社において、人工染色体ベクターを用いたレポーターシステムの創薬開発への事業化を見据えたデータ蓄積が開始されている。

§ 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「押村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
押村 光雄	鳥取大学	教授	H20. 6～
大林 徹也	同上	准教授	H20. 6～
平塚 正治	同上	助教	H20. 6～
香月 康宏	同上	助教	H20. 6～
黒崎 創	同上	助教	H20. 6～
黒崎 とう子	同上	技術補佐員	H20. 6～H24. 3
香月 加奈子	同上	プロジェクト研究員	H20. 6～
井川 千芽	同上	技術補佐員	H20. 6～H23. 3
山口 繁幸	同上	大学院生 D3	H20. 6～H23. 3
川上 きよ子	同上	技術補佐員	H23. 4～H24. 3
上野 悦也	同上	大学院生 M2	H23. 4～H24. 3
上田 佳奈	同上	大学院生 D2	H23. 4～
赤倉 裕太郎	同上	大学院生 M2	H23. 4～
飯田 雄一	同上	大学院生 D3	H20. 6～
藤元 佳代	同上	プロジェクト研究員	H23. 4～H25. 3
宇野 愛海	同上	大学院生 D3	H20. 6～
梶谷 尚世	同上	プロジェクト研究員	H21. 4～H23. 3
増田 成子	同上	技術補佐員	H20. 6～H23. 4
嵩原 昇子	同上	プロジェクト研究員	H21. 4～H22. 12
石原 千恵	同上	プロジェクト研究員	H21. 4～H23. 3
福浦 真努香	同上	技術補佐員	H21. 4～H24. 3
多田 政子	同上	教授	H21. 10～
鈴木 輝彦	同上	プロジェクト研究員	H23. 6～H24. 3
飯塚 愛美	同上	技術補佐員	H24. 4～
宇野 勝洋	同上	大学院生 M1	H24. 4～
尾古 憲泰	同上	技術補佐員	H24. 5～H25. 3
本間 和久	同上	プロジェクト研究員	H25. 4～
福原 早也佳	同上	大学院生 M1	H25. 4～
矢倉 裕奈	同上	プロジェクト研究員	H25. 4～

研究項目

1. 4因子搭載HACベクターを用いたiPS誘導
2. 糖尿病治療用HACベクターを用いた膵臓β細胞誘導
3. DMD治療用HACベクターを用いた筋分化誘導と筋ジストロフィー治療

② 「角」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
角 昭一郎	京都大学再生医科学研究所	准教授	H20. 6～H22. 3
白水 泰昌	同上	助教	H21. 4～H22. 3

研究項目

1. 糖尿病治療用HACベクターを用いた膵臓 β 細胞の治療

§ 3. 研究実施内容及び成果

(1) HAC ベクターによる iPS 誘導 (鳥取大学 押村グループ)

① 研究実施内容及び成果

以下の 5 つの研究内容を実施した。

1. iPS 誘導用マルチコピーHAC ベクターの作製及びマウス線維芽細胞への導入

HAC ベクターとしては、ヒト 21 番染色体に由来する 21HAC ベクターを用いた。

初期化因子発現用のプロモーターとして、強制発現系プロモーター (CAG プロモーター) あるいは線維芽細胞特異的プロモーター (ヒト I 型コラーゲン由来エンハンサー/プロモーター) を用い、いずれかのプロモーター下に初期化 4 因子 (あるいは c-Myc を除いた 3 因子) を個別に連結し、loxP 配列を持つ PAC ベクターに組み込んだ。その後、Cre-loxP システムを用いて HAC ベクターに初期化因子を搭載させた。最終的には、それぞれの初期化因子を 1 コピー、2 コピー、4 コピー保持するもの、及び、これらに加えて p53shRNA 発現カセットを追加したものを構築した。

これらのベクターを微小核細胞融合法 (MMCT 法) によりマウス線維芽細胞 (MEF) に導入したところ、未分化細胞特異的マイクロ RNA (miR-294 及び miR-295) との併用により、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 (iHAC1) 導入クローンから高頻度 (57%) に ES 細胞様形態を示すクローンが得られた (図 1)。しかし、これらのクローンは ES 細胞様形態を示したものの、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、4 因子 2 コピーに加えて、更に Oct4 を 2 コピー、およびマウス p53shRNA を連結した HAC ベクター (iHAC2) を作製し、MEF 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た。iHAC2 の場合には、miR-294 及び miR-295 の併用は必ずしも必要ではなかった。更に、これらのクローンから HAC ベクターが脱落した、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、この HAC-free iPS 細胞はキメラ形成能を持った十分な未分化性を有していた (図 2)。

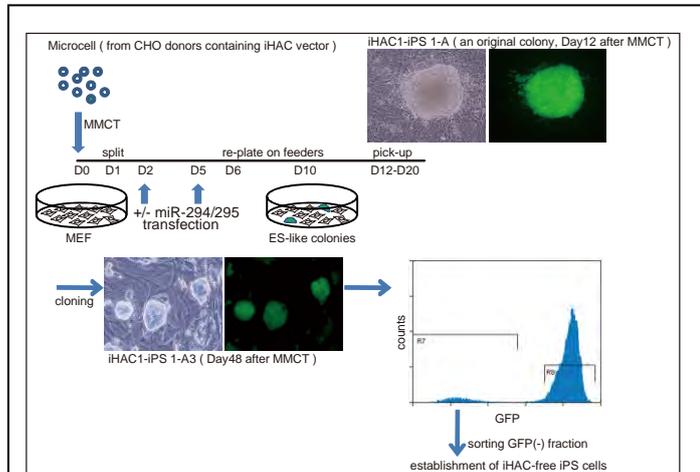


図 1 iHAC ベクターによるマウス iPS 細胞作製のフローチャート



図 2 HAC-free iPS 細胞から作製したキメラマウス

2. HAC ベクターのヒト線維芽細胞への新たな導入法の開発

iHAC2 により MEF の初期化に成功したので、続いて、この iHAC2 ベクターのマウス p53shRNA をヒト P53shRNA に置き換え、ヒト体細胞の初期化を検討した。HAC ベクターの体細胞への導入は、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた MMCT 法により実施していたが、これまでの経験から正常ヒト線維芽細胞への導入についてはマウス細胞やがん細胞等と比べて効率が低いことが分かっているので、新たに麻疹ウイルスタンパク質を応

用した麻疹(MV)融合法の開発を行った。

1) MV 融合法の最適化

PEG に代わる融合法として、麻疹ウイルスのエンベロープタンパク質 (ヘマグルチニン; H およびフュージョン; F) の利用について HT1080 (ヒト線維肉腫), hiMSC (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞), HFL1 (ヒト線維芽細胞) を用いて検討した。その結果、HT1080, hiMSC では PEG 法と比較して HAC 導入効率が 50-100 倍上昇した。しかし HFL1 細胞では PEG 法と同程度の移入効率にとどまった。H タンパク質の受容体 CD46 の発現量を検索したところ、受容細胞の CD46 発現と HAC 導入効率が相関することが示唆された (図 3)。

受容体の発現量が高い細胞に対しては、麻疹法が有効なことが明らかとなった。

一方、先行する麻疹ウイルス感染実験では、H タンパク質の受容体結合ドメインに一本鎖抗体を付加することで、感染能を損なうことなく標的受容体を人為的に変更する「リターゲティング」が可能である、と報告されている。この例に倣い、微小

核細胞(MC)融合のリターゲティングが可能か検討した (図 4)。初期化に用いるヒト線維芽細胞における表面発現の高い膜タンパク質として CD71 (トランスフェリン受容体)、CD9、CD13 を選び、これらに対する 1 本鎖抗体を H タンパク質に付加して HFL1 に対する MC 融合能を検索した。いずれの 1 本鎖抗体を用いた場合も、野生型 H タンパク質と比較して高い MC 融合能を示した。そこで改変 H タンパク質を用いて初期化 HAC 移入を試みた結果、HAC ベクターによる初期化が達成された (別途詳述)。

2) 膜融合以外の最適化

HAC 導入のための MMCT 法は、多数のステップからなる。細胞膜融合のステップに関しては、麻疹法によって効率が改善されたが、最終的な移入効率をより高める為には、

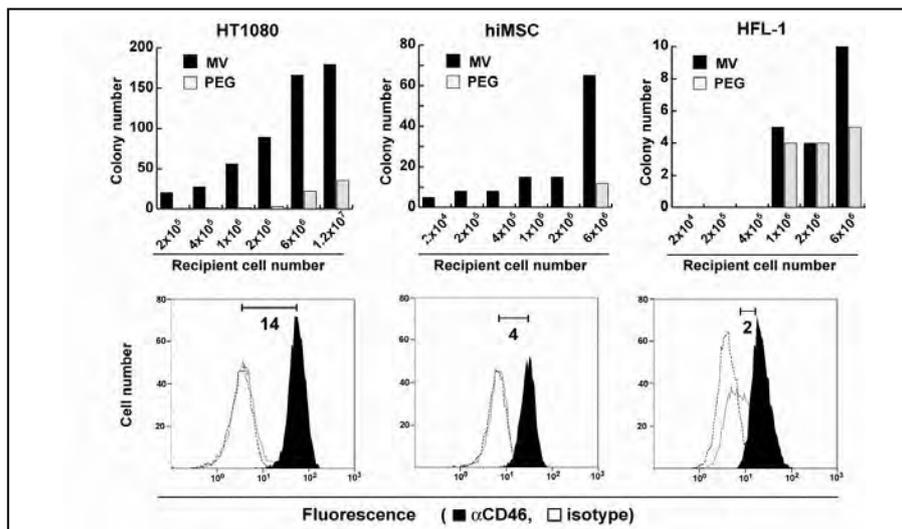


図 3 麻疹ウイルス (Measles Virus; MV) 法による HAC 移入効率の改善

A) 受容細胞数を変えたとき (横軸) の薬剤耐性コロニー数 (縦軸) を指標として、MV 法と PEG 法について HAC 移入効率を比較した。効率の改善は、受容細胞ごとに異なる。 B) MV-H タンパク質の受容体である CD46 の表面発現をフローサイトメーターにて評価した。HAC 移入効率と受容細胞での CD46 発現量には相関性がみられた。

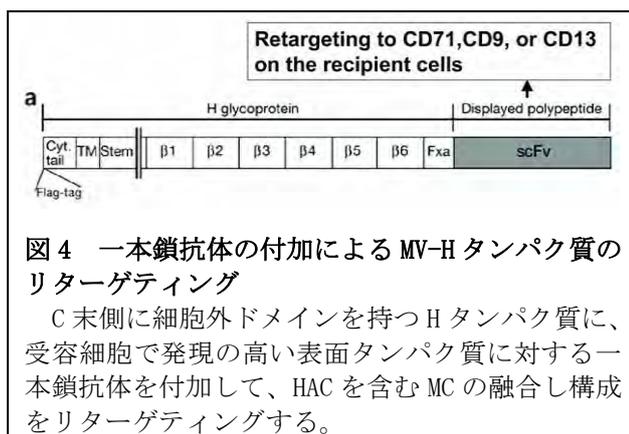


図 4 一本鎖抗体の付加による MV-H タンパク質のリターゲティング

C 末側に細胞外ドメインを持つ H タンパク質に、受容細胞で発現の高い表面タンパク質に対する一本鎖抗体を付加して、HAC を含む MC の融合し構成をリターゲティングする。

膜融合以外のステップについても改善の余地がある。そこで A) 供与細胞から HAC 微小核細胞を分取する過程と、B) 融合時の受容細胞の細胞周期、について検討した。

2-A) 供与細胞からの HAC 微小核細胞の分取

現在 HAC 供与細胞として汎用している CHO 細胞 (K-1 株) は、20 本の染色体を持つ。コルセミド処理により形成される微小核に含まれる染色体の内容は偶然に任されており、CHO 供与細胞から調整した微小核細胞 (MC) のうち HAC 移入に寄与するのはごく一部にすぎない。HAC を含む MC のみを識別して選択的に分取できれば、受容細胞あたりの HAC 移入率を高めることに繋がると予想される。(図 5A)

細胞あたりの染色体数は、古くから染色体研究において着目されてきた。哺乳類についていえば、染色体数が最も少ない動物種としてインドホエジカ(染色体数;メス 2n=6、オス 2n=7) が知られている。かつて CREST にて行ったゲノム刷り込み研究において、刷り込み遺伝子クラスターが存在するヒト 11 番染色体をインドホエジカ細胞株 FM7(染色体数 6) に移入したところ、FM7 の内在染色体は移入したヒト 11 番染色体 (135Mb) よりも大きいことを FISH 解析により確認している。HAC サイズ (5Mb) は内在染色体と比較して極小であることから、MC を粒径で分画すると HAC 画分を分取できる可能性がある。そこで最初に FM7 細胞に HAC を移入し、HAC 供与細胞として機能しうるか検討した。HAC に搭載した GFP およびブラストサイジン耐性遺伝子を指標に HAC 移入クローンを取得し、FISH 解析により HAC 移入を確認した (図 5B)。コルセミド投与による微小核誘導能を検索したところ、低濃度であっても細胞障害性が高いことが明らかとなった。

コルセミドに代わる紡錘糸形成阻害剤としてノコダゾールないしパクリタキセルを投与したところ、ノコダゾールではコルセミド同様細胞障害が生じたが、パクリタキセルでは細胞障害は

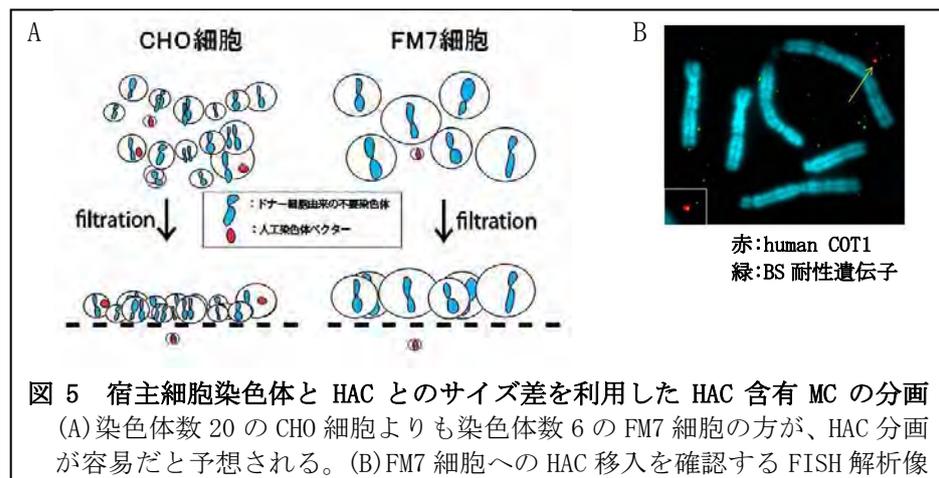


図 5 宿主細胞染色体と HAC とのサイズ差を利用した HAC 含有 MC の分画 (A)染色体数 20 の CHO 細胞よりも染色体数 6 の FM7 細胞の方が、HAC 分画が容易だと予想される。(B)FM7 細胞への HAC 移入を確認する FISH 解析像

低く微小核形成が確認された。微小核誘導の至適条件は 0.07ug/ml, 48 時間であることが明らかと成った。これらの HAC 保持 FM7 細胞供与細胞として MC を調整し、サイズ分画による HAC-MC 分取が可能かを検討する予定である。

2-B) MC 融合時の受容細胞-細胞周期の影響

MC 融合により HAC 微小核が受容細胞に移入されたのち受容細胞核に合流する過程は明らかでない。このため MC との融合時点での受容細胞の細胞周期が、移入された HAC の動態に影響する可能性が考えられる。そこで受容細胞の細胞周期分画を FACS により分画して MC との融合を行い、HAC 移入の多寡を検索した。(図 6)

受容細胞として Fucci 標識 HeLa 細胞を用い、赤色ないし緑色蛍光を指標に G1 および S/G2/M の細胞集団を分取し、各 2×10^5 細胞に対して HAC 供与 CHO 細胞より調整した MC と融合した。HAC 上に搭載したブラストサイジン耐性遺伝子の獲得を指標に耐性コロニー出現頻度を評価したところ、S/G2/M 画分は G1 画分と比較して約 2 倍の頻度を呈した。以上から、HAC 移入が受容細胞の周期に依存すること、S 期から M 期での HAC 移入が受容細胞ゲノムへの合流に若干有利であることが明らかとなった。

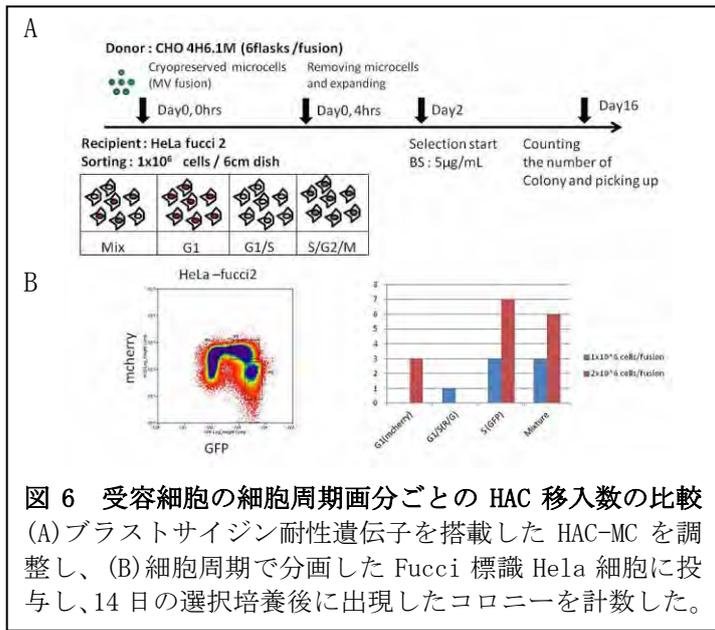


図 6 受容細胞の細胞周期画分ごとの HAC 移入数の比較 (A)ブラストサイジン耐性遺伝子を搭載した HAC-MC を調整し、(B)細胞周期で分画した Fucci 標識 HeLa 細胞に投与し、14 日の選択培養後に出現したコロニーを計数した。

3. iPS 誘導用 HAC ベクターのヒト線維芽細胞への導入

MEF を初期化出来た iHAC2 ベクターのマウス p53shRNA をヒト P53shRNA に置き換えたヒト細胞用 HAC ベクターを、MV 融合法によりヒト線維芽細胞 HFL-1 へ導入したところ、MEF と同等レベルの頻度で部分的初期化クローンを得ることに成功した。更なるクローンの中から、移入した HAC ベクターが脱落し、ヒト ES 細胞様形態を示すクローンが 2 クローン獲得できた。1 つのクローン (clone A) はテラトーマ形成まで示す完全な初期化クローンであり (図 7)、残り 1 クローン (clone C) は現在、未分化性の検証を行っているところである。

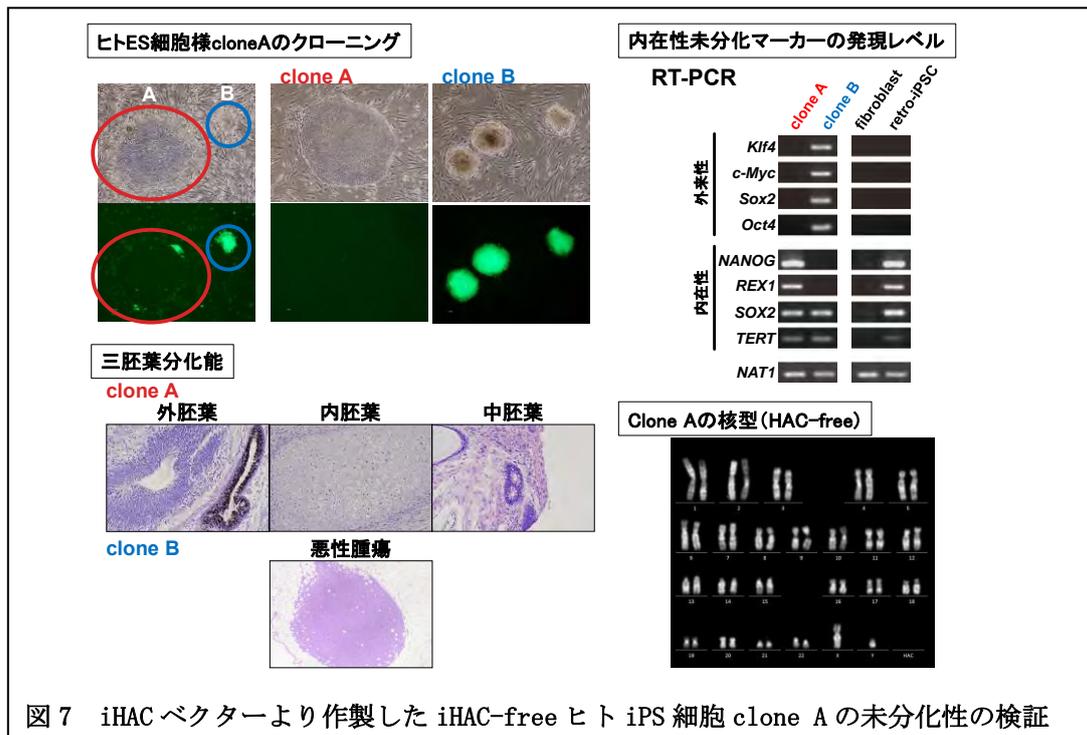
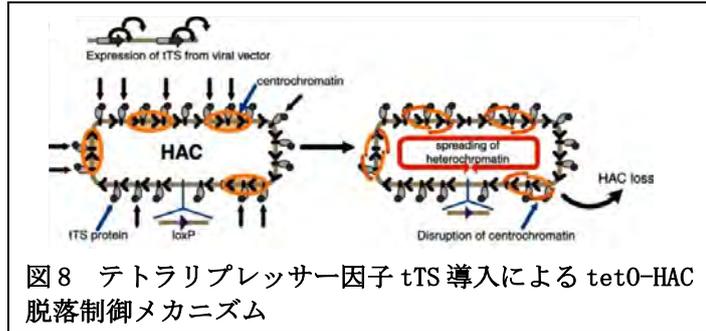


図 7 iHAC ベクターより作製した iHAC-free ヒト iPS 細胞 clone A の未分化性の検証

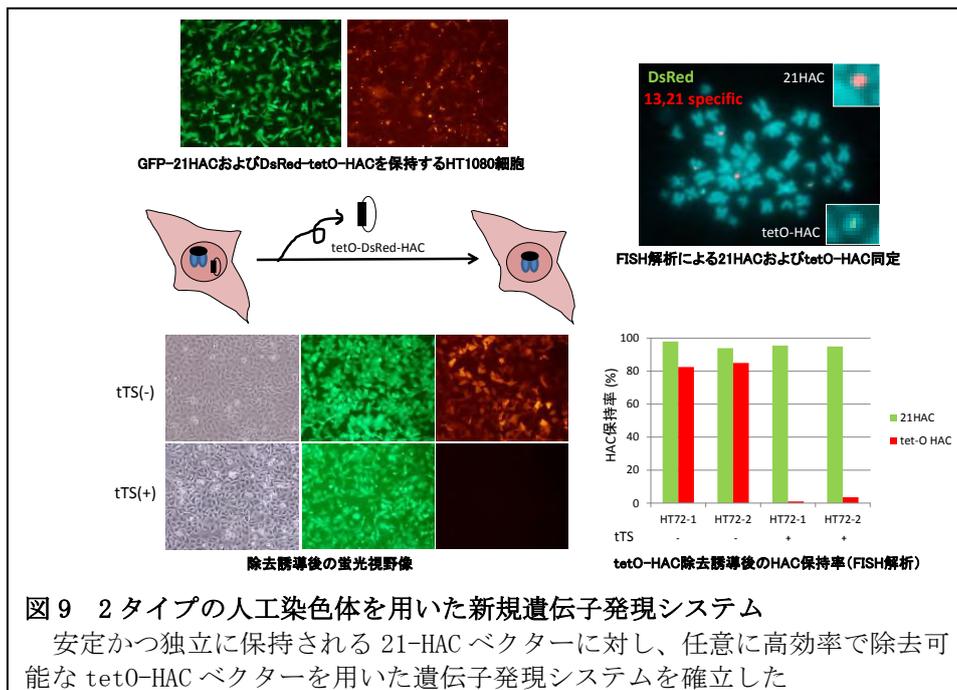
4. 除去可能 HAC ベクターの構築

HAC ベクターによるヒト細胞の初期化においても HAC ベクターの脱落が重要な要素であることが示唆されたため、任意な時期に細胞から除去可能なヒト人工染色体ベクターを米国 NIH・Larionov 博士らと共同開発を行った。上述した 21HAC が染色体をベースとして改変されて構築された手法(トープダウンアプローチ)に対し、除去可能ヒト人工染色体ベクターはヒトセントロメア配列および tet operator 配列を含むベクターから構築された(ボトムアップアプローチ)。セントロメア領域に tet operator 配列を含むことにより転写活性を制御可能にしたこの tet0-HAC ベクターは外来遺伝子導入可能でありヒト培養細胞において高効率で除去可能である(図8, *Y. Iida et al., 2010 DNA Res*)。安定な 21HAC を遺伝子治療用に、除去可能な tet0-HAC を初期化因子搭載用として応用できるという期待から、これら異なる 2 つのヒト人工染色体ベクターを用いて新たな遺伝子発現系を試みた。



まず、蛍光遺伝子をそれぞれの HAC ベクターへ搭載することでコンセプトの検証を行った。EGFP 遺伝子を 21HAC、DsRed 遺伝子を tet0-HAC へそれぞれ Cre/loxP 組み換えを用いて搭載した。EGFP-21HAC または DsRed-tet0-HAC を保持する CHO 細胞からそれぞれヒト HT1080 細胞へ染色体導入を行い異なる 2 つの HAC ベクターを保持する HT1080 細胞の作製に成功した。さらに、EGFP-21HAC は長期間安定に保持され発現も認められることを確認し、DsRed-tet0-HAC のみを任意に除去することに成功した(図9)。異なるタイプの人工染色体を同一細胞に導入した前例はなく、本成果は遺伝子の宿主挿入を伴わない新規遺伝子発現系である。遺伝子治療および細胞初期化を同時に行う新たな遺伝子発現システムになりうると期待される。

今後、この除去可能な tet0-HAC に初期化因子を搭載し、有用性を検討したい。



5. HAC ベクターを用いた未分化細胞及びガン化細胞除去システムの開発

iPS 細胞を分化誘導させた治療用細胞を用いた細胞移植治療の問題点は、iPS 細胞由来機能性細胞の移植片中への未分化細胞の混入と、それらの細胞への予期せぬ DNA 変異の発生により移植細胞が癌化することである。この問題が解決されなければ、iPS 細胞を用いた再生医療の更なる発展は厳しいものと考えられる。我々は、HAC ベクターの(1)ホストゲノムに組み込まれない(2)搭載出来る遺伝子サイズに制限がない(3)正確な遺伝子発現制御が可能であるという特徴を活用して、1 本の HAC ベクターに初期化用遺伝子、分化モニター用遺伝子、治療用遺伝子に加えて iPS 細胞から分化誘導させた治療用細胞の安全性を向上させるためのシステム (セーフガードシステム) を搭載し、iPS 細胞を用いた再生医療に貢献することを最終ゴールとして目指している(図 10)。ここでは、未分化因子のプロモーター制御下で自殺遺伝子 (HSV-TK) あるいは高抗原性タンパク質であるガン精巣抗原または同種異系主要組織適合遺伝子複合体抗原を発現させるセーフガードシステムの開発を行った。尚、本検討はマウスを用いた *in vivo* 実験が必須であるが、マウスにおいては HAC ベクターの安定性が良くないことが明らかになってきたので、新たに開発したマウスにおいて安定であるマウス人工染色体(MAC)ベクターを用いて以下の研究を実施した。上記の HSV-TK 及び高抗原性タンパク質を発現する MAC ベクターを Tumor Suppressor-MAC (Ts-MAC) と呼ぶ。

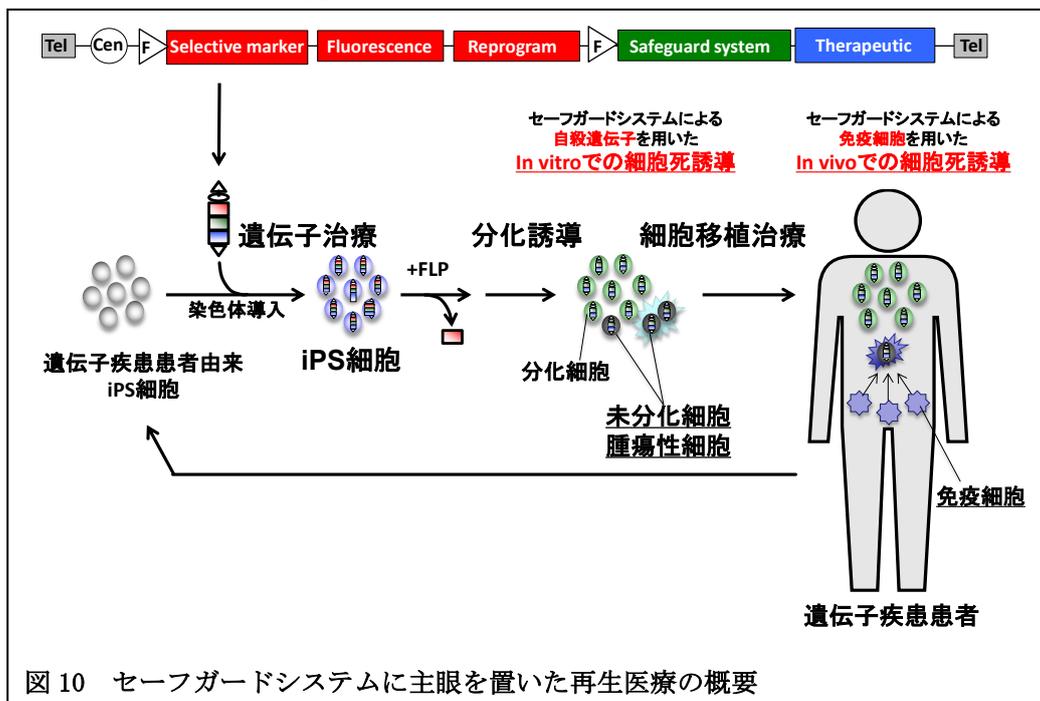


図 10 セーフガードシステムに主眼を置いた再生医療の概要

1) 未分化細胞マーカーNanog のプロモーターにより発現誘導される自殺遺伝子による未分化細胞除去の検証

Nanog 遺伝子の発現制御領域 2.5kb 下に自殺遺伝子 HSV-TK 及び tdTomato(RFP)を 2A 配列で連結したものを MAC ベクターに構築した(Ts-MAC)。この Ts-MAC ベクターを B6ES 細胞へ導入し tdTomato(RFP)の蛍光を指標にして Ts-MAC 導入クローンを樹立し、これらのクローンを用いて *in vitro* での未分化細胞の除去を検証した。HSV-TK の基質である Ganciclovir 投与により細胞障害性を誘引することが出来るが、Ts-MAC 導入 B6ES 細胞は 60 μ M Ganciclovir 投与により一週間後には 90-100%の細胞が死滅した。これに対して、これらの B6ES 細胞を分化誘導させ Nanog プロモーター活性を低下させた場合には 60 μ M Ganciclovir による細胞障害性は抑制された。しかし、非特異的細胞障害

性も観察された(図 11)ことから、Nanog 遺伝子上流 2.5kb では十分なプロモーター活性が発揮されていない可能性が考えられ、今後、未分化細胞の除去が実際に必要と考えられる細胞移植治療モデルにおいて、より有効と考えられる HSV-TK 発現制御システムを構築することが必要である。

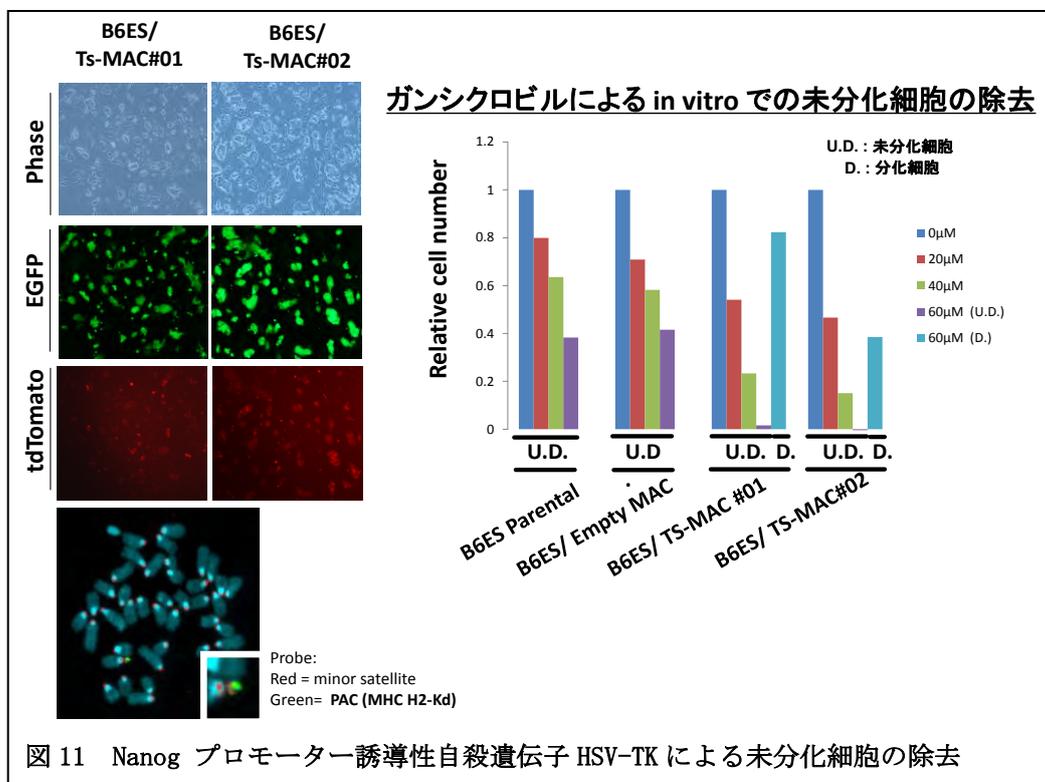


図 11 Nanog プロモーター誘導性自殺遺伝子 HSV-TK による未分化細胞の除去

2) iPS 細胞から派生した腫瘍細胞を除去するシステムの検証

次に、iPS 細胞から派生した腫瘍細胞を標的としたシステム構築を行った。腫瘍細胞を初めとして不死化細胞において重要な役割を持つテロメラーゼの構成要素である TERT 遺伝子の発現制御領域 1.7kb をプロモーターとして使用し、高抗原性を示すことが知られているガン精巣抗原(NY-ESO-1)または同種異系主要組織適合遺伝子複合体抗原(MHC H2-K^d)を発現させるシステムを MAC ベクターに構築した。iPS 細胞から派生した腫瘍細胞のモデルとして C57BL6/J マウス由来メラノーマ細胞株 B16F10 細胞を用い、C57BL6/J マウスへの自家移植の系において、Ts-MAC ベクターを導入した B16F10 細胞が免疫拒絶されるか否か検証した。

Ts-MAC ベクター導入 B16F10 細胞クローンにおける NY-ESO-1 及び MHC H2-K^d の発現については、それぞれウエスタンブロッティング、FACS 解析により確認した。これらのクローンを C57BL6/J に移植したところ、組織学的には Ts-MAC ベクター導入クローンのみに弱いながら有意に CD3 陽性の細胞障害性 T 細胞の浸潤が確認されたが、腫瘍退縮効果はほとんど観察されなかった。これは、親株と同様にこれらのクローンが非常に高い増殖能を有しているため、マウスの免疫機構が十分に活性化される前に腫瘍が増殖してしまったためと考えられた。そこで、移植前に抗原性蛋白を感作し、抗原性蛋白に対する免疫記憶を促したマウスを用いて腫瘍細胞の増殖を評価した。初めに、C57BL6/J マウスに対して、MHC H2-K^d を発現する NOD マウス由来脾臓細胞を移植し MHC H2-K^d に対する細胞性免疫を獲得させた後に、腫瘍細胞を移植したところ、移植後 11 日の時点において、親株 B16F10 の生着率 83% に対して、MHC H2-K^d 発現 B16F10 の生着率は 17% という結果となり、増殖抑制効果が認められた(図 12)。

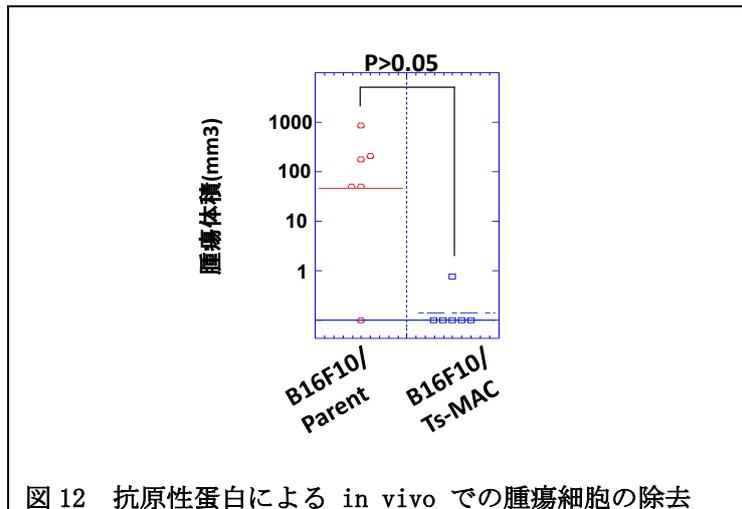


図 12 抗原性蛋白による in vivo での腫瘍細胞の除去

NY-ESO-1 発現による腫瘍細胞の増殖抑制作用については今後検証する予定である。

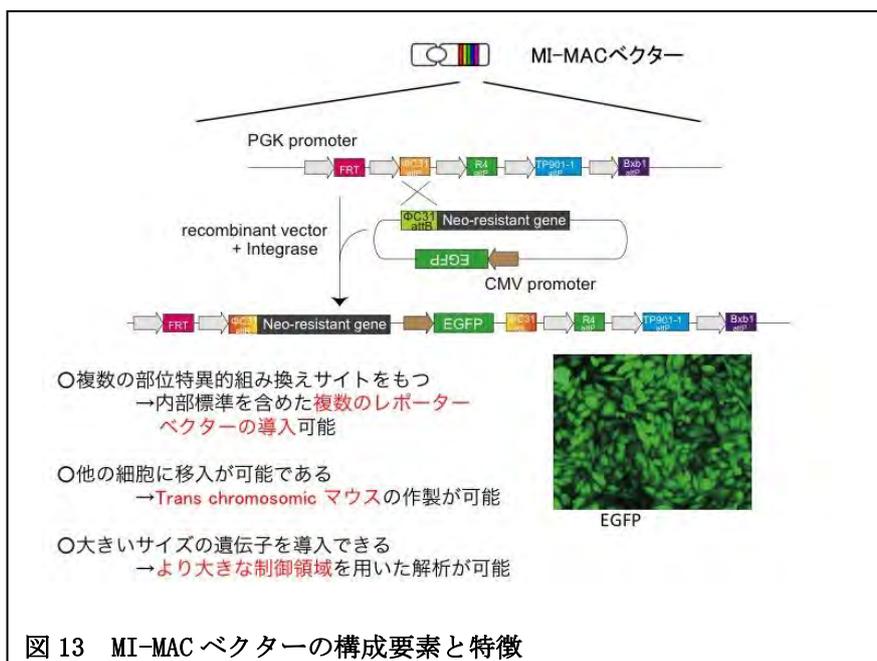
人工染色体を用いたホストゲノムを傷つけない遺伝子導入法により、これまでの自殺遺伝子を用いた細胞障害システムと違い、薬剤投与を必要とせず、腫瘍細胞の生着、進展を in vivo において抑制できることを示すことができた。将来的には、in vitro 未分化細胞特異的細胞障害性システムの場合と同様に、抗原性タンパク質のより良い発現のための最適なプロモーターを検討することにより、更に腫瘍細胞除去効果を高められると期待される。また、抗原性タンパク質についても、臨床において一般的に用いられている各種ウイルスや細菌由来のワクチンを用いることにより、より高い腫瘍細胞除去効果を惹起できる可能性が考えられる。

(2) iPS 細胞を用いた糖尿病治療(鳥取大学 押村グループ)

①研究実施内容及び成果

1. 複数の遺伝子を効率良く導入できるマウス人工染色体ベクターの開発

複数(現在5種まで検証終了)の部位特異的組み換え酵素「インテグラーゼ」を用いることで高効率に HAC の複数の導入部位に目的の遺伝子導入するシステムの構築に成功した。このシステムを「複数」の遺伝子を染色体に「統合」という意味で「Multi-Integrase(MI)システム」と名付けて発表した(Yamaguchi, S et al., PLoS ONE, 6(2): e17267, 2011)。HAC ベクター上に図に示すような5カ所(A, B, C, D, E)の遺伝子導入部位を持つ CHO 細胞を構築した。この細胞への遺伝子の導入効率を、従来の Flp/FRT システムと比較したところ、遺伝子導入効率が極めて高いことを明らかにした。さらにマウス人工染色体(MAC)ベクターにも、MI システムを導入し、HAC と同様に MAC でも MI システムが効率良く機能することを示した。この MI システム対応マウス人工染色体に、EGFP を発現させたところ、極めて効率良く EGFP 遺伝子が安定に発現する細胞を作成できた(図 13)。



2. 膵β細胞への分化誘導モニターシステムの開発

膵β細胞への分化誘導をモニターする遺伝子としてインスリン、Ngn3 の二つの遺伝子を選択して実験を行った。Ngn3 およびインスリンの遺伝子発現を発光タンパク質でモニターする両者のプロモーター領域は、トランスジェニックマウスを用いた既存の論文報告を基にしてそれぞれ 3 kbp 以下の部位を選定した。これらプロモーター領域を蛍光タンパク質遺伝子上流にクローニングして、膵β細胞分化誘導をモニターするレポーター遺伝子を構築した。構築したレポーター遺伝子をマルチインテグレーションシステム対応の人工染色体ベクターに搭載し、これを保持する ES 細胞を構築した。この ES 細胞を既存の論文を参考にした改良した *in vitro* 分化誘導プロトコルを用いて膵β細胞への分化誘導を実施したところ、一部のβ細胞分化しかモニターできなかった。さらにこの ES 細胞をマウス胚にインジェクションしてキメラマウスを作成することで、個体でのレポーター遺伝子の発現を観察したところ膵臓での明確な蛍光は観察できなかった。このことから、このβ細胞分化モニターシステムが不完全なことが明らかとなった。この原因としては、レポーターを作成する際に選定したプロモーター領域が不十分であることが予測された。これまでトランスジェニックマウスを用いた組織特異的なレポーター遺伝子導入マウス作製が数多く報告されている。従来のトランスジェニックマウス作成法は、受精卵に目的遺伝子をインジェクションして、内在染色体にランダムにレポーター遺伝子を導入して作成する。その後、実験目的に適した遺伝子導入マウスを選定して実験に用いられているが、導入された部位による位置効果やコピー数の増幅などにより導入遺伝子のプロモーターが有する発現特異性や強度を正確には反映することができていない。一方で、人工染色体ベクターにレポーター遺伝子を導入した場合、特定部位に遺伝子が導入され、かつ導入遺伝子は 1 コピーである。本実験では既存のトランスジェニックマウスを用いた報告とは異なる結果になったが、これは作成したレポーター遺伝子のプロモーター領域が短いため本来の発現強度が不十分であったと考えた。ゲノムプロジェクトにより、マウス、ラット、ヒトのホモログ遺伝子の比較ゲノム解析が可能になった。3 種のホモログ遺伝子の構造を比較してみると、転写開始点の上流 20kbp 以内にも非常に保存された領域が存在することが確認できる。このことから、発生や組織特異的な発現をする遺伝子のレポーター遺伝子を作成する場合、比較ゲノム解析を行

った上で、長大な領域を導入することが有効であるといえる。作成したレポーター遺伝子の遺伝子導入マウス作製には、従来のトランスジェニックマウス作成法、ノックイン法などが挙げられるが、申請者が開発した MI-MAC を用いた遺伝子導入マウス作製技術には、複数の遺伝子を導入することができる、導入した遺伝子が安定に発現する、極めて迅速に作成できるといった利点がある。MI-MAC を用いた人工染色体導入キメラマウスの利点と従来技術の比較を図 14 に示す。

	作成法	遺伝子構築からマウス20匹供給可能になる期間	個体での均一性	導入した遺伝子の発現	複数遺伝子の導入
トランスジェニックマウス	受精卵に遺伝子を直接導入→マウスを選定→使えるマウスを交配	1年以上 →マウスの検定に時間がかかる。(複数遺伝子)	均一	不安定(運任せ) →染色体のどこに入るかわからない。多くは導入	困難 →交配を行なえば可能。ただし、コストと時間がかかる)現実的には2遺伝子なら可能か?
ノックインマウス	ES細胞を改変→キメラマウス→交配→ヘテロマウス→交配	2年以上 →交配に時間がかかる	均一	安定 →相同組み換えで染色体の特定部位に導入	困難 →大量の交配を行なえば可能。ただし、コストと時間がかかる)現実的には2遺伝子なら可能か?(2年くらい)
人工染色体導入キメラマウス	人工染色体導入ES細胞を導入→キメラマウス	早い 1遺伝子なら3ヶ月 2遺伝子なら5ヶ月 3遺伝子でも7ヶ月 で作成可能(現在は2遺伝子まで)	キメラ(80%以上) ただしてテトラプロイドレスキュー法を用いればほぼ100%で均一	安定 →部位特異的組み換えで人工染色体ベクターの特定部位に導入	容易 →3つの遺伝子までなら導入可能なことを確認済み

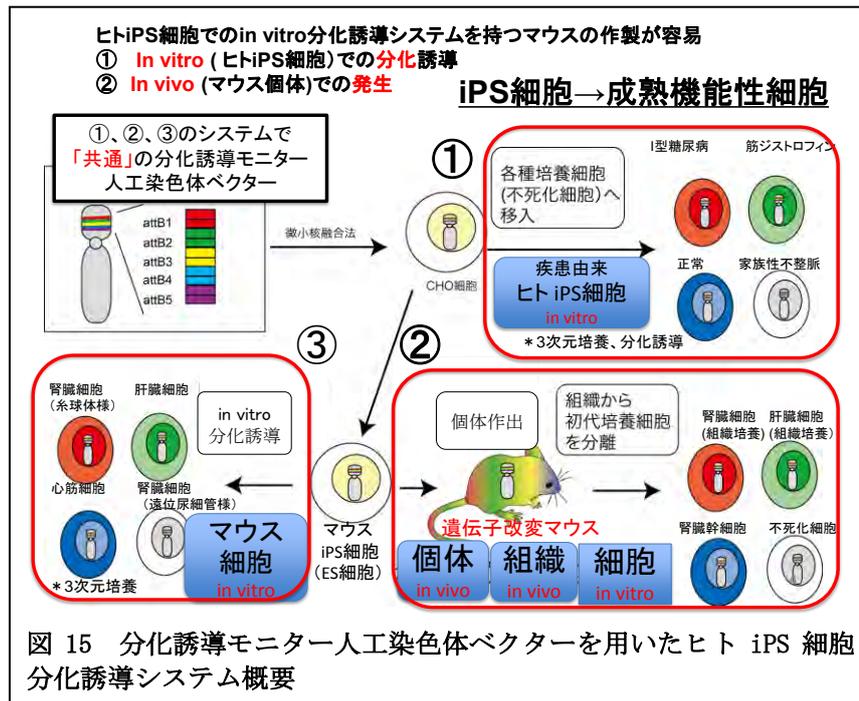
図 14 人工染色体導入キメラマウスの利点と従来技術の比較

分化誘導用のレポーター遺伝子は、iPS 細胞の分化誘導法の開発に貢献するが、in vitro 分化誘導法が確立されていない組織や細胞を構築するためには、そのレポーター遺伝子の作動性を検証するのが困難である。その場合、in vitro 分化誘導ではなくマウスの個体の発生を利用して検証することが有効であり、この部分で複数遺伝子導入できる MAC ベクターを用いた人工染色体キメラマウスは大いに貢献できる。特に、MAC ベクターは微小核融合法で種々の細胞に移入できることから、人工染色体キメラマウスによる検証で作動性が確認されたレポーターシステムをそのままヒト iPS 細胞に活用できるという利点がある。安全性試験や薬理薬効試験においてヒト iPS 細胞の活用が期待されているが、この場合問題になるのは、実験動物とヒトの「種差」の壁と、「in vitro と in vivo」の評価システムの違いによる壁である。

MAC ベクターの移入できるという利点を生かすことで、これらの壁を乗り越えた相互評価可能なシステムの構築が可能になる。

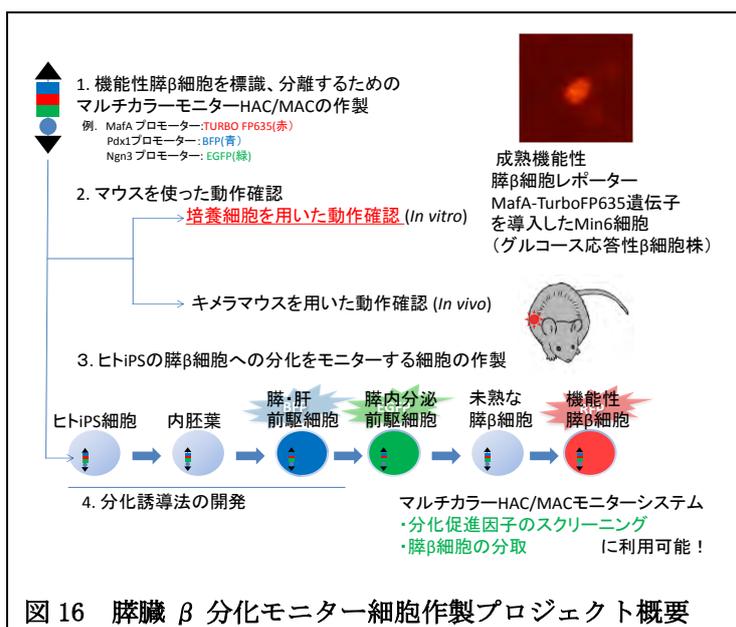
なお、このシステムは経済産業省の有害性評価試験法開発プロジェクトで実際に活用している。このプロジェクトでは、遺伝子導入細胞を用いて動物実験を代替した有害性評価システムの開発を目指しているが、その中で組織特異的な障害をモニターするレポーター遺伝子を作成し、その作動性を確認する必要があった。その結果、腎臓近位尿管が特異的に光るキメラマウス、発生期の肝臓や再生している肝臓が光るキメラマウス、

全身が光るキメラマウスなどの開発に成功している(図 15)。



本プロジェクトを行っている5年間でiPS細胞の膵β細胞への分化誘導法の研究は非常に進み、実際にモデル動物への前臨床試験が開始した。一方で、他の研究者らによる報告により、既存の分化誘導系では十分なインスリン産出能をもった成熟膵β細胞の産出が困難であることが明らかとなってきた。そこで、成熟膵β細胞のマーカーをモニターシステムに搭載することで、この問題の解決に貢献することが重要と考え、マーカー遺伝子の再設定を行った。成熟膵β細胞の重要なマーカーとしてMafAが挙げられる。MafAは、膵臓において成熟した膵β細胞でのみ発現する遺伝子であり、十分量のインスリンの産出、β細胞維持に必要な遺伝子である。このため、新たに搭載するマーカー遺伝子として、成熟膵β細胞マーカーであるMafA遺伝子、また膵臓細胞の分化段階で重要な役割をもち、未熟な膵臓細胞のマーカーであるPDX1遺伝子の二つを新たに選択し、MI-MACベクターへの搭載を行うこととした。まず、より重要と考えられるMafA遺伝子のプロモーター領域からMACベクターへの搭載を始めた。この際に、比較ゲノム解析を行い、レポーター遺伝子作成に充分であると予測される領域を選定した。選定したプロモーター領域の動作確認は、人工染色体導入キメラマウスで行うが、それに先立ちMafAを発現しているMouse Insulinoma 6 (MIN6)細胞で行い、プロモーター下の蛍光タンパク質TURBO FP635遺伝子の発現を確認した。次に、マウスES細胞(TT2)に導入したMI-MAC上へこのMafAプロモーター:TURBO FP635遺伝子を搭載し、MafAモニターMACベクターを保持するマウスES細胞の作製に成功した。現在は、このES細胞を用いてキメラマウスの作製を進めており、*in vivo*でのMafAのモニターの可否を検証する予定である。人工染色体ベクターは、同じベクターをヒト、マウス間で移動することが可能であるので、キメラマウスでモニターができれば、即そのベクターをヒトの細胞に用いることができる。このモニターシステムを開発することで、成熟した膵β細胞までの効率的な分化誘導法の開発に寄与できる(図 16)。十分なインスリン産出能をもつ膵β細胞を*in vitro*で効率的に誘導できるようになれば、I型糖尿病の細胞治療の実用化への大きな一歩であると考えられる。また、本研究により、「ホスト染色体に組み込まれずに安定に維持され、かつ複数の遺伝子の搭載が可能である」という人工染色体の

特徴を生かした、安全な多色モニターシステムの構築が可能になると期待される。



(3) iPS細胞を用いた筋ジストロフィー治療 (鳥取大学 押村グループ)

①研究実施内容及び成果

以下の8つの研究内容を実施した。

1. mdx マウスまたは DMD 患者由来 iPS 細胞の誘導と評価

筋ジストロフィーモデル(mdx)マウスまたは患者由来の線維芽細胞から従来のレトロウイルスベクターによる4因子または3因子導入によりiPS細胞の誘導を行った。

1) mdx マウス iPS 細胞

mdx マウス尻尾由来繊維芽細胞(TTF)および胎児由来繊維芽細胞(MEF)へ従来のレトロウイルスベクターによる4因子または3因子導入を行ったところ、従来と同等の頻度でiPS細胞を取得することができた。mdxTTF-iPSではRT-PCR解析による未分化マーカーが見られるクローンが少なく、ヌードマウス移植による多分化能も検出できなかった。一方、mdxMEF-iPSでは、ほとんどのクローンでRT-PCR解析による未分化マーカーが見られ、ヌードマウス移植による多分化能も検出できた。

2) DMD 患者由来 iPS 細胞

Coriellより購入したDMD患者由来繊維芽細胞へ従来のレトロウイルスベクターによる4因子または3因子導入を行ったところ、従来と同等の頻度でiPS細胞を取得することができた。ほとんどのクローンでRT-PCR解析による未分化マーカーが見られた。一方で導入した外来の4因子または3因子の発現はサイレンシングを受けるものや、受けないクローンが存在した。

2. mdx マウスまたは DMD 患者由来 iPS 細胞への DMD-HAC の導入と in vitro 性能評価

1) mdx マウス iPS 細胞

1で作製したmdxマウスiPS細胞に、これまでに作製できているDMD-HACベクターをMMCT法を用いて導入したところ、従来の効率と同程度の頻度でクローンを得ることができた。FISH解析の結果、DMD-HACベクターは内在染色体に転座することなく、

維持されており、HAC ベクター上に搭載された GFP により、HAC 導入細胞は GFP 蛍光が観察された。また、ほとんどのクローンで RT-PCR 解析による未分化マーカーが見られた(図 17)。

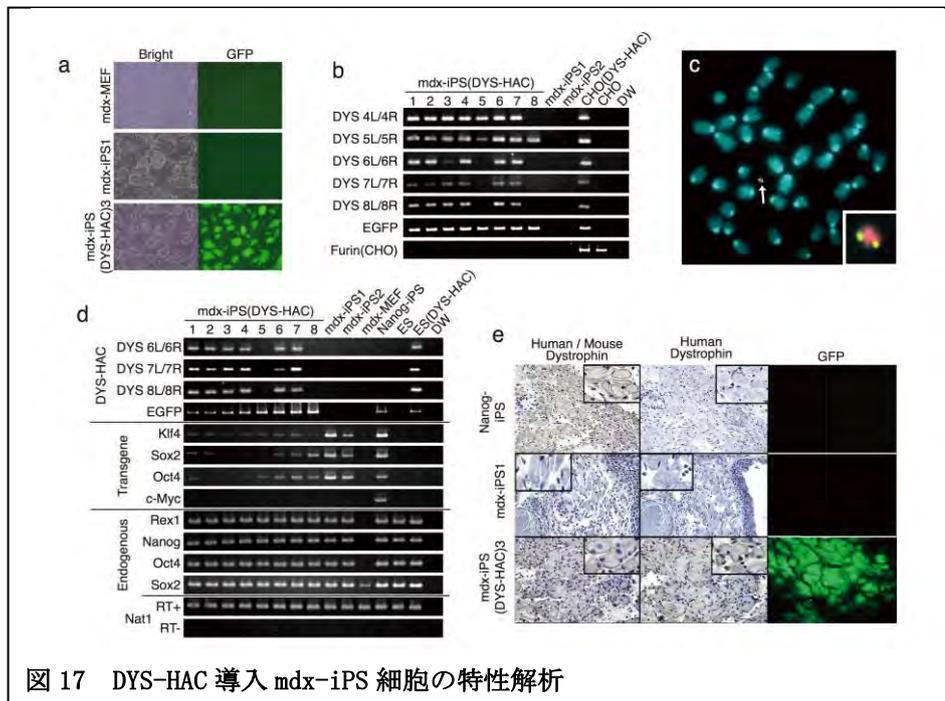


図 17 DYS-HAC 導入 mdx-iPS 細胞の特性解析

2) DMD 患者由来 iPS 細胞

1で作製した DMD 患者由来 iPS 細胞に、これまでに作製できている DMD-HAC ベクターを MMCT 法を用いて導入したが、クローンを得ることができなかった。ヒト ES 細胞またはヒト iPS 細胞への染色体導入法の効率化を検討しなければいけないことがわかった。一方で、Coriell より購入した DMD 患者由来繊維芽細胞へこれまでに作製できている DMD-HAC ベクターを MMCT 法を用いて導入した、従来の効率と同程度の頻度でクローンを得ることができた。この DMD 患者由来繊維芽細胞 (+DMD-HAC) へ従来のレトロウイルスベクターによる 4 因子導入を行ったところ、従来と同等の頻度で iPS 細胞を取得することができた。また、HAC ベクター上に搭載された GFP により、HAC 導入細胞は GFP 蛍光が観察された (図 18b)。ほとんどのクローンで RT-PCR 解析による未分化マーカーが見られた。一方で導入した外来の 4 因子の発現はサイレンシングを受けるものや、受けないクローンが存在した。

DMD-HAC ベクターを導入した DMD 患者由来 iPS 細胞において、患者で欠損しているエクソンが修復されているかを確認するため、multiplex PCR 法により解析したところ、欠損領域は DMD-HAC ベクター導入により修復されていることが確認された (図 18a)。さらに、DMD-HAC ベクターを導入した DMD 患者由来 iPS 細胞では、長期間安定に DMD-HAC ベクターが維持されることが確かめられた (図 18e)。

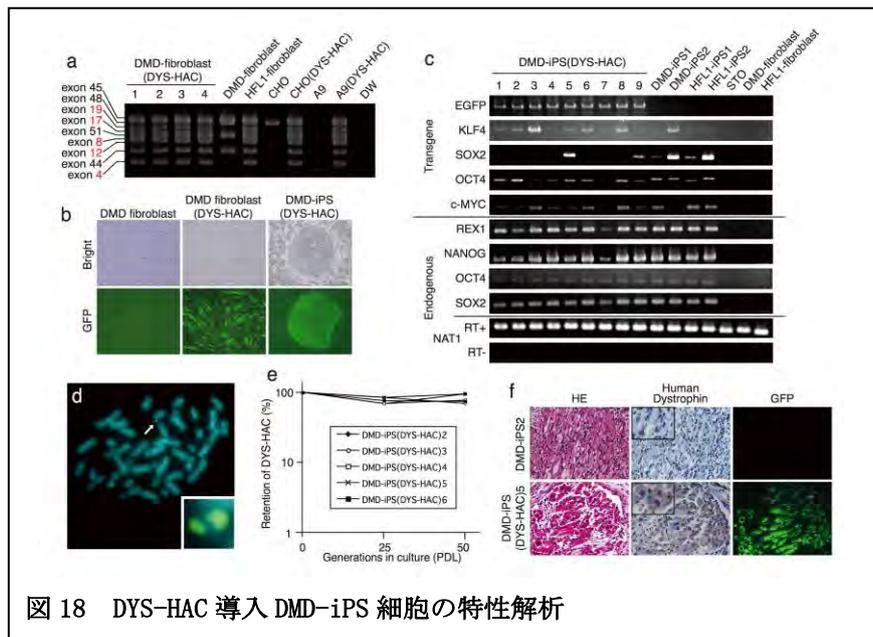


図 18 DYS-HAC 導入 DMD-iPS 細胞の特性解析

3. DMD-HAC 導入 mdx マウスまたは DMD 患者由来 iPS 細胞からのテラトーマにおけるジストロフィン発現

DMD-HAC ベクターを導入した mdx マウスまたは DMD 患者由来 iPS 細胞が多能性を持つかを検討するため、免疫不全マウスに移植した。これらのテラトーマ組織においては、3 胚葉が検出され、多能性を持つことが確かめられた。また、ジストロフィン遺伝子が発現するかをジストロフィン特異的抗体を用いた免疫染色で検討したところ、細胞膜周辺にジストロフィン蛋白質が検出された(図 17e 及び 18f)。

4. DMD-HAC 導入 mdx-iPS 細胞由来キメラマウスにおける組織特異的ジストロフィン発現

DMD-HAC ベクターを導入した mdx マウス由来 iPS 細胞をマウス胚盤胞に移植し、その胚盤胞を仮親に移植することにより、mdx-iPS (DYS-HAC) 由来のキメラマウスを作製した。キメラマウス組織において上記 iPS 細胞が寄与するかを PCR 解析および、HAC ベクター上の GFP 蛍光で観察したところ、各組織において DMD-HAC ベクターの高い寄与が認められた。また、筋肉組織において、ジストロフィン抗体を用いた免疫染色

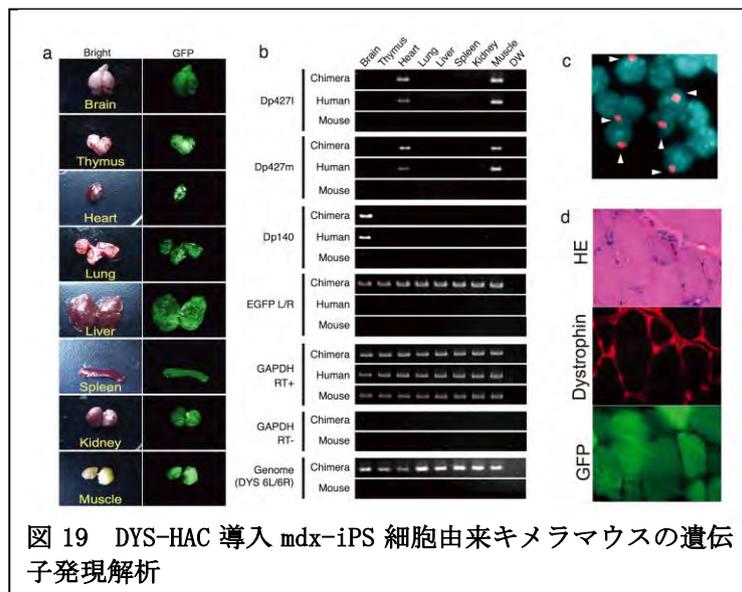


図 19 DYS-HAC 導入 mdx-iPS 細胞由来キメラマウスの遺伝子発現解析

により、部位特異的なジストロフィン蛋白質の発現を呈した。また、ジストロフィン遺伝子は組織特異的アイソフォームが知られているが、脳、筋肉、心臓特異的なスプライシングアイソフォームが各組織で特異的に検出された。FISH 解析においても各組織で 1 コピー DMD-HAC が導入されていることを確認した(図 19)。

5. DMD-HAC 導入 DMD 患者由来 iPS 細胞の in vitro 筋分化

DMD-HAC ベクターを導入した DMD 患者由来 iPS 細胞から mesoangioblast 様の前駆細胞を誘導し、その前駆細胞を介した筋肉細胞を誘導することに成功した(図 20)。また、同様に胚様体を形成を介して心筋細胞を誘導することにも成功した(図 21)。今後モデルマウスを用いて in vivo での治療効果を検証する。

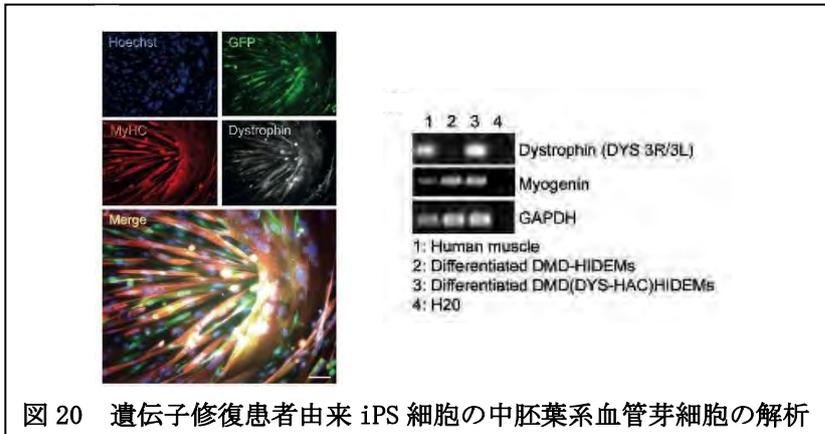


図 20 遺伝子修復患者由来 iPS 細胞の中胚葉系血管芽細胞の解析

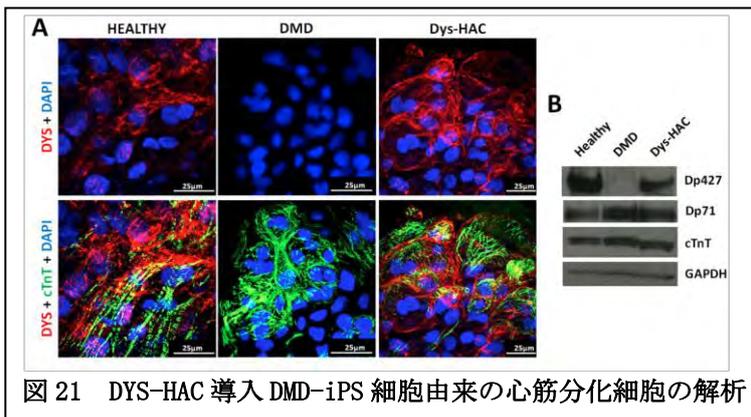


図 21 DYS-HAC 導入 DMD-iPS 細胞由来の心筋分化細胞の解析

6. DMD-HAC 導入 mdx マウス iPS 細胞の in vivo 除去の検討

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、Ganciclovir による上記細胞の死滅効果を検証した。その結果、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 22)。

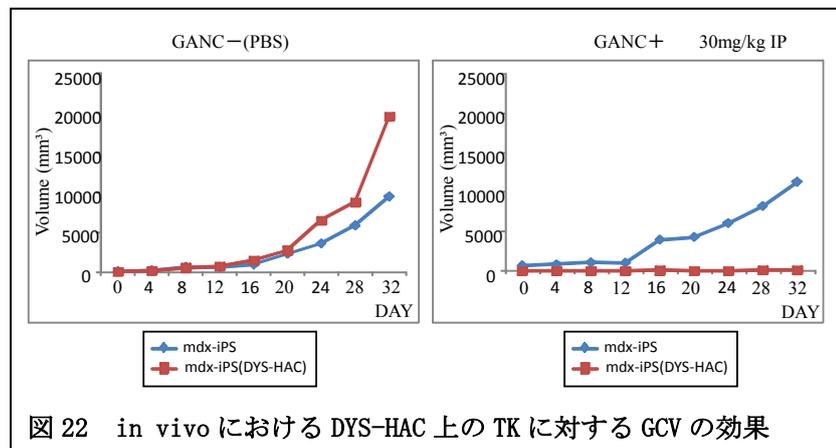


図 22 in vivo における DYS-HAC 上の TK に対する GCV の効果

7. 改良型 DMD-HAC ベクターの構築

DYS-HAC ベクターに搭載された 2.5Mb のジストロフィン遺伝子コピー数は 1 コピーであり、個体へ導入できる中胚葉系血管芽細胞の細胞数も限られてくることから 1 細胞あたりの発現量を上昇させることが必要と考えられた。そこで、複数の薬剤で選択できるように、DMD-HAC ベクターを相同組換え頻度の高い DT40 細胞中で改変した。それぞれの薬剤選択マーカを持つ DMD-HAC ベクターを 1 つずつ微小核細胞融合法にてそれぞれ導入し、1 細胞中に 1, 2, 3 コピー導入することが可能となり、1 細胞あたりに発現するジストロフィン発現量を高めることに成功した(図 23)。さらに、DMD-HAC ベクター上に分化誘導用遺伝子(MyoD-ER)および可逆的不死化遺伝子を搭載するためのベクターコンストラクトを構築できた。今後、改良型 DMD-HAC ベクターを用いて治療効果を検証する。

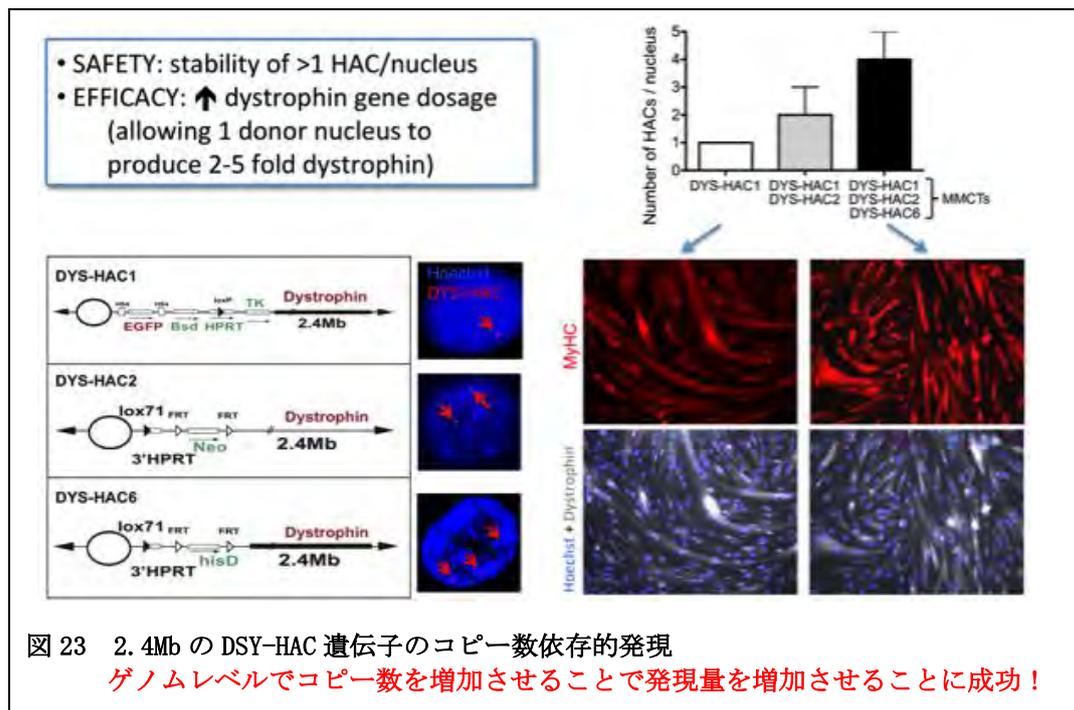


図 23 2.4Mb の DYS-HAC 遺伝子のコピー数依存的発現
ゲノムレベルでコピー数を増加させることで発現量を増加させることに成功！

8. 血友病 A モデルマウスを用いた遺伝子修復と遺伝子治療のための基盤研究

筋ジストロフィー以外の欠損型遺伝病での HAC ベクターの遺伝子治療への有効性を検討するため、血友病 A をターゲットとした HAC ベクターと iPS 細胞による遺伝子治療のための基盤研究をマウスモデルを用いて実施した。マウスにおいては、HAC ベクターの安定性が良くないことが明らかになってきたので、本検討でもマウスにおいて安定である MAC ベクターを用いて以下の研究を実施した。課題 1 および課題 3 でこれまでに習得したノウハウを利用して細胞あたりの発現量を高め、以下の 2 つの方法で拒絶反応や癌化の危険性が少ない安全な遺伝子治療用の MAC ベクターを構築し、自己 iPS 細胞を用いたモデルマウスによる遺伝子治療効果を検証した。

(1) CAG-FVIII-MAC ベクターによる遺伝子修復と機能性評価

研究課題 1 で作製してきた iHAC ベクターを用いて血友病モデルマウス A の iPS 細胞を樹立した。樹立については平塚らが発表した手法に準じて行い (図 1)、iHAC ベクター上に搭載されている GFP を発現している細胞の中から GFP 消失した、自然に iHAC ベクターが脱落した細胞を FACS により分取クローンを取得した。取得したクローンにつ

いて染色体解析及びテラトーマ形成を観察した。染色体核型解析より iHAC ベクターの脱落が認められ、また染色体異数性もない 40 本の染色体核型であることがわかった。テラトーマ形成能と三胚葉への分化も観察され、以前までの報告のように本来の染色体ゲノムに傷をつけない iPS 細胞であり、血友病治療モデル確立のために有用であることが示唆された(図 24)。

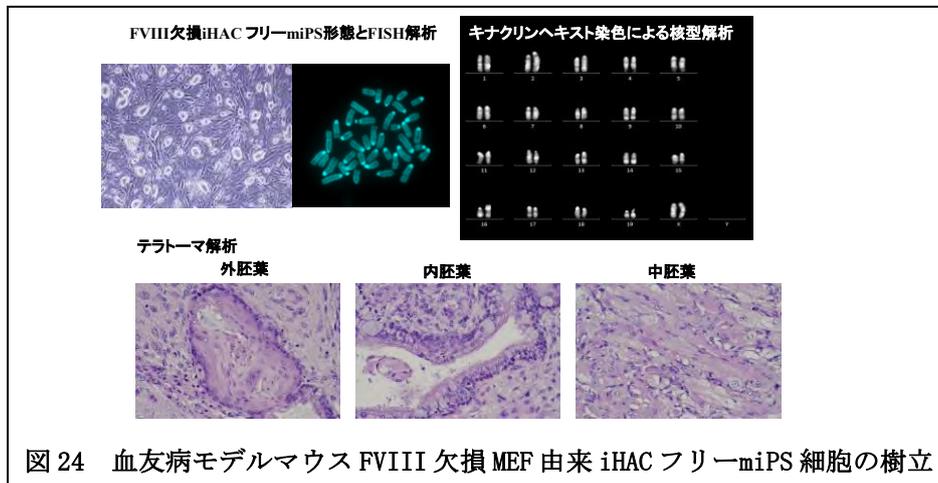


図 24 血友病モデルマウス FVIII 欠損 MEF 由来 iHAC フリーmiPS 細胞の樹立

次に血友病 A 原因遺伝子である第 8 因子遺伝子をもつ人工染色体(FVIII-MAC)を既に構築済みなので、ここで得られた iHAC フリーmiPS 細胞へ微小核細胞融合法により導入した。クローン取得後、染色体解析と未分化マーカー、FVIII 発現を調べた。FISH 解析により FVIII-MAC が 40 本のマウス染色体から独立して維持されていることがわかった。未分化マーカーについては京大山中研から分与された 20D17K (4 因子のレトロウイルスベクターにより作製された) に比べ遜色のない発現と FVIII の発現も見られ、MMCT 導入によって FVIII-MAC が機能していることがわかった(図 25)。

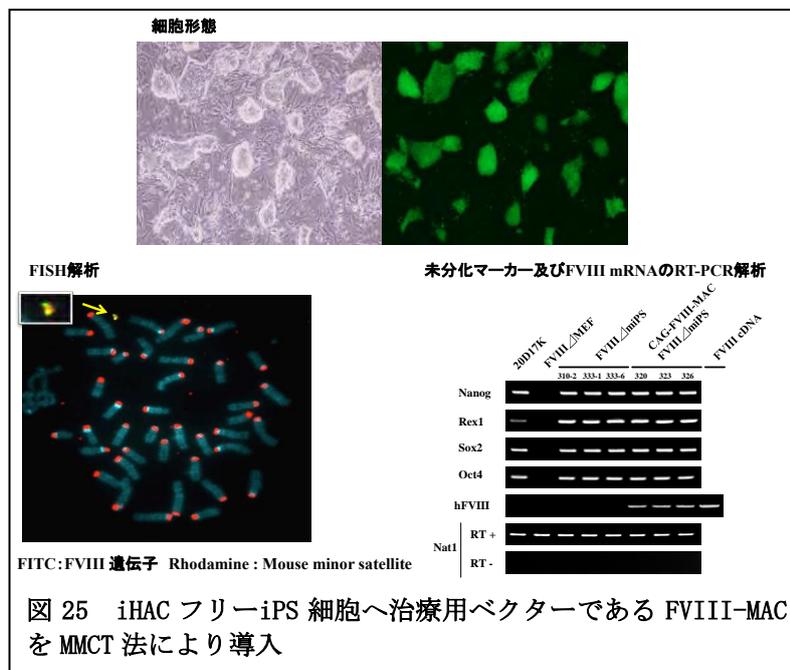
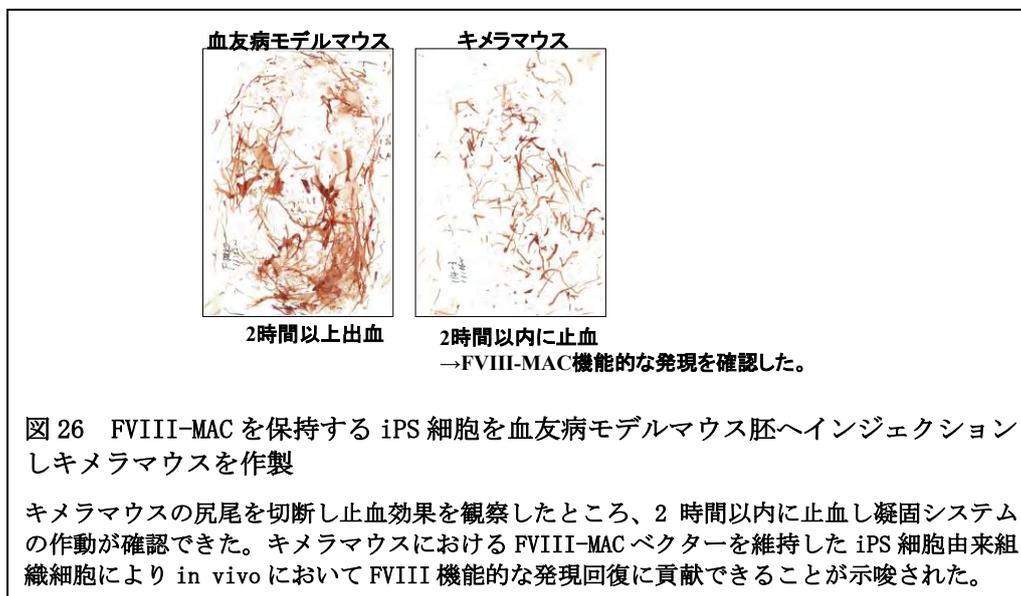
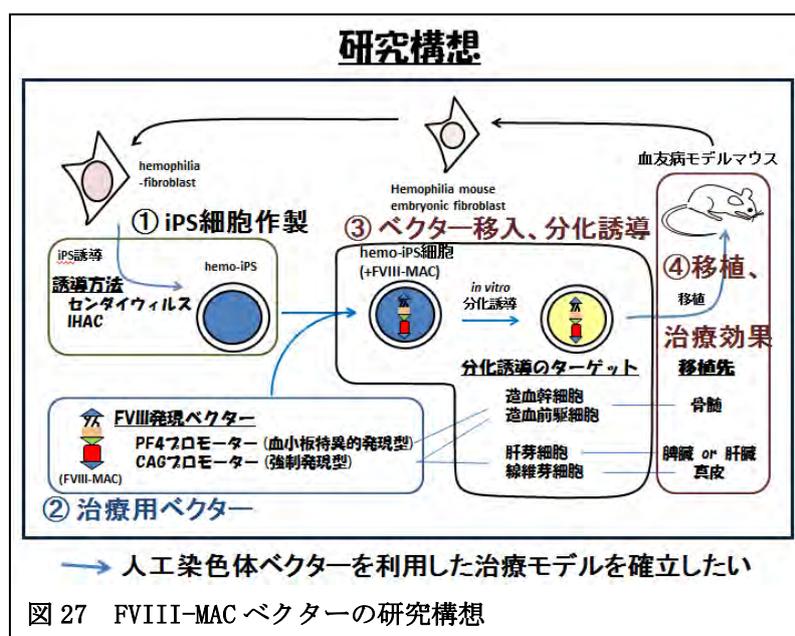


図 25 iHAC フリーiPS 細胞へ治療用ベクターである FVIII-MAC を MMCT 法により導入

得られてきた血友病モデルマウス由来の iHAC free iPS 細胞の性能をさらに評価するため、FVIII 欠損モデルマウスの胚へインジェクションを行い、キメラマウスの作製と解析を行った。止血実験を行ったところ、iPS をインジェクションした低キメラマウスにおいても止血効果があったことから、FVIII-MAC は機能していることがわかり in vivo における治療効果を確認することができた(図 26)。



現在、キメラマウスを作製できたクローンについて in vitro における分化誘導と移植生着の条件検討を行っており、モデルマウスへの移植により血友病治療できることを最終ゴールとしている(図 27)。以上のことから、人工染色体を用いた幹細胞作製技術(iHAC ベクター)と治療細胞作製技術(FVIII-MAC ベクター)の両方について有用性が示された。



(2) PF4-FVIII-MAC ベクターによる遺伝子修復と機能性評価

血友病モデルマウス胚性線維芽細胞に初期化 4 因子のセンダイウイルスベクターを感染させて誘導した iPS 細胞 (SeV-iPS) に、微小核細胞融合法を用いて FVIII 因子搭載 MAC (FVIII-MAC) を移入し、得られたクローンを *in vitro* において巨核球/血小板へ分化誘導を行った。RT-PCR 解析により、巨核球/血小板に分化したサンプルのみで VIII 因子の発現を認めた (図 28)。FVIII-MAC は巨核球/血小板特異的な発現を誘導する platelet factor-4 (PF4) プロモーターを用いていることから、*in vitro* においては、組織特異的に VIII 因子の発現を誘導することが確認できた。

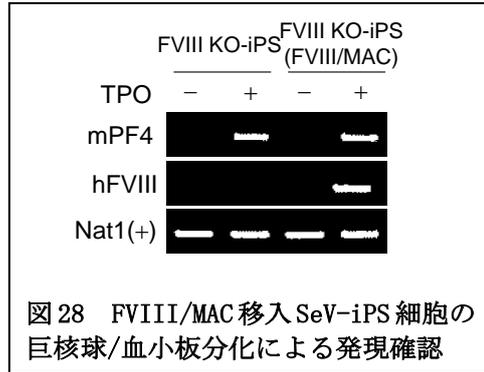


図 28 FVIII/MAC 移入 SeV-iPS 細胞の巨核球/血小板分化による発現確認

より安全な動物実験を実施することを目的として上記 iPS 細胞とは別に、初期化 4 因子搭載 HAC ベクターを用いて誘導した血友病モデルマウス由来 iPS 細胞 (iHAC-iPS) でも FVIII-MAC 移入クローンを取得してきた。正常核型かつ未分化能を有することが確認できたクローンを ICR マウスに移植してキメラマウスを作製し、骨髓細胞および末梢血を用いて VIII 因子の発現を確認した。骨髓細胞において免疫組織化学染色法により評価したところ、integrin α IIb (CD41) で染まる巨核球細胞でのみ GFP (MAC 上に搭載) および VIII 因子ともに染色が認められた。一方、コントロールとしての強制発現系 (CAG プロモーターを使用) では integrin α IIb (CD41) で染まらない細胞でも GFP および VIII 因子の染色を認めたことから、*in vivo* において組織特異的に VIII 因子の発現を誘導することが確認できた (図 29)。

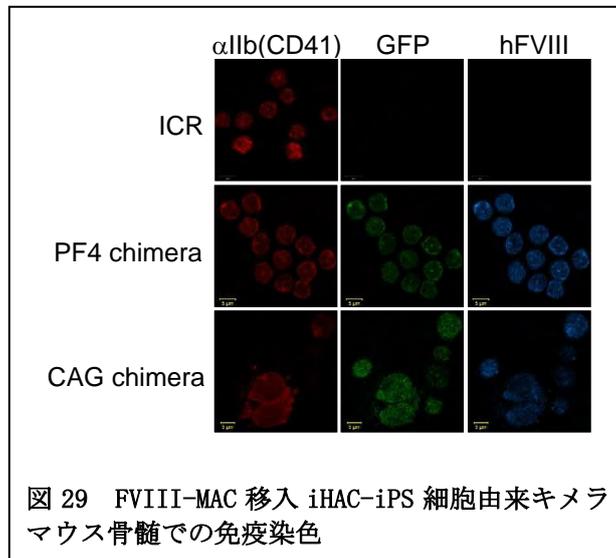


図 29 FVIII-MAC 移入 iHAC-iPS 細胞由来キメラマウス骨髓での免疫染色

これまでの成果で、FVIII-MAC が巨核球/血小板特異的に VIII 因子の発現を誘導することおよび iHAC-iPS 細胞でキメラマウスを作製できることを示してきた。現在、血友病モデルマウス胚を用いたキメラマウス作製を進めている。今後、上記 iPS 細胞由来の造血幹細胞移植による治療効果の検証も行い、臨床応用を目指した自家細胞移植による治療効果の検証を進めていく (図 27)。

§ 4. 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 25件)

1. Yang KC, Wu CC, Lin FH, Qi Z, Kou TF, Cheng YH, Chen MP, Sumi S. Chitosan/gelatin hydrogel as immunoisolative matrix for injectable bioartificial pancreas. *Xenotransplantation* **15**: 407-416, 2008 (DOI:10.1111/j.1399-3089.2008.00503.x)
2. Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, Kajitani N, Hoshiya H, Hiramatsu K, Yoshino T, Kazuki K, Ishihara C, Takehara S, Higaki K, Nakagawa M, Takahashi K, Yamanaka S, Oshimura M. Complete genetic correction of iPS cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Therapy***18**: 238-240,2009 (DOI:10.1038/mt.2009.303)
3. 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)
4. 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)
5. Iida Y, Kim JH, Kazuki Y, Hoshiya H, Takiguchi M, Hayashi M, Erliandri I, Lee HS, Samoshkin A, Masumoto 5H, 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)
6. 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**:384-93. 2010 (DOI:10.1038/gt.2010.147)
7. 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.* **6**: e17267, 2011. (DOI:10.1371/journal.pone.0017267)
8. 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.* **21**:525-34. 2012. (DOI:10.3727/096368911X605448)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. Tedesco FS, Hoshiya H, D'Antona G, Gerli MFM, Messina G, Antonini S, Tonlorenzi R, Benedetti S, Berghella L, Torrente Y, Kazuki H, Bottinelli R, Oshimura M, Cossu G. Stem Cell-Mediated transfer of a Human Artificial Chromosome Containing the Entire Dystrophin Locus Ameliorates Muscular Dystrophy. *Sci Transl Med.* **3**:96ra78, 2011 (DOI:10.1126/scitranslmed.3002342).
 15. Kurosaki H, Hiratsuka M, Imaoka N, Iida Y, Uno N, Kazuki Y, Ishihara C, Yakura Y, Mimuro J, Sakata Y, Takeya H, Oshimura M. Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome. *J Hum Genet.* **56**:727-33, 2011 (DOI:10.1038/jhg.2011.88).
 16. 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, Oshimura M. Integration-Free iPS Cells Engineered Using Human Artificial Chromosome Vectors. *PLoS One.* **6**:e25961, 2011 (DOI:10.1371/journal.pone.0025961).
 17. 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 USA.* **108**:20048-53, 2011 (DOI:10.1073/pnas.1114483108)
 18. 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, 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**:439-44, 2011 (DOI:10.1016/j.bbrc.2011.10.088).
 19. Tedesco FS, Gerli MF, Perani L, Benedetti S, Ungaro F, Cassano M, Antonini S, Tagliafico E, Artusi V, Longa E, Tonlorenzi R, Ragazzi M, Calderazzi G, Hoshiya H, Cappellari O, Mora M, Schoser B, Schneiderat P, Oshimura M, Bottinelli R, Sampaolesi M, Torrente Y, Broccoli V, Cossu G. Transplantation of Genetically Corrected Human iPSC-Derived Progenitors in Mice with Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Sci Transl Med.*, **4**:140ra89, 2012 (DOI:10.1126/scitranslmed.3003541)
 20. Kouprina N, Samoshkin A, Erliandri I, Nakano M, Lee HS, Fu H, Iida Y, Aladjem M, Oshimura M, Masumoto H, Earnshaw WC, Larionov V. Organization of Synthetic Alphoid DNA Array in Human Artificial Chromosome (HAC) with a Conditional Centromere. *ACS Synth Biol.* **1**:590-601, 2012 (DOI:10.1021/sb3000436)
 21. Yakura Y, Ishihara C, Kurosaki H, Kazuki Y, Komatsu N, Okada Y, Doi T, Takeya H, Oshimura M. An Induced Pluripotent Stem Cell-mediated and integration-free factor VIII expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**: 336-41, 2013. (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.12.096.)
 22. Takiguchi M, Kazuki K, Hiramatsu K, Abe S, Iida Y, Takehara S, Nishida T, Ohbayashi T, Wakayama T, Oshimura M. A Novel and Stable Mouse Artificial Chromosome Vector. *ACS Synth. Biol.* 2012 (in press) (DOI:10.1021/sb3000723)
 23. Uno N, Uno K, Zatti S, Ueda K, Hiratsuka M, Katoh M, Oshimura M. The Transfer of Human Artificial Chromosomes via cryopreserved microcells. *Cytotechnology*, **65**:803-9, 2013 (DOI:10.1007/s10616-013-9548-4)
 24. Oshimura M, Kazuki Y, Iida Y, Uno N. New Vectors For Gene Delivery: Human and Mouse Artificial Chromosomes. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2013 (in press) (DOI:10.1002/9780470015902.a0024474)
 25. Zatti S, Martewicz S, Serena E, Uno N, Giobbe G, Kazuki Y, Oshimura M, Elvassore N. Complete restoration of multiple dystrophin isoforms in genetically corrected Duchenne Muscular Dystrophy patient-derived cardiomyocytes. *Mol. Therapy*, **1**:1, 2014 (DOI:10.1038/mtm.2013.1)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 香月康宏、松岡隆之、押村光雄：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へ向けて. *再生医療* **7**, 2008
2. 角昭一郎. バイオ人工臓. 新時代の糖尿病学(3)-病因・診断・治療研究の進歩-(*日本臨床* **66**巻 増刊号7). P477-481, 2008
3. 香月康宏、星谷英寿、押村光雄：ヒト人工染色体と iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー遺伝子治療へ向けて、*再生医療* **8**, p21-26 (2009)
4. 黒崎創、押村光雄：幹細胞へのヒト人工染色体導入-医学・薬学への応用- *最新医学* 159-168, 2009.
5. 香月康宏、押村光雄：幹細胞のゲノム操作：ヒト人工染色体ベクターの開発、*ゲノム医学* **9**, p37-40 (2009)
6. 角昭一郎：生体臓移植. 特集「生体移植医療の実際」. *医学と薬学*. **61**:314-320, 2009.
7. 角昭一郎：日本の再生医学研究の現状と展望. *独立行政法人 科学技術振興機構 (JST) 中国総合研究センター編. 中国・日本科学最前線-研究の現場から-* 2009年版(分担).
8. 角昭一郎：再生医療の現在とこれからの可能性. *カワニシホールディングス社長室編. 正々の旗堂々の陣 (分担)*. P213-p268, 2009.
9. 山口繁幸、大林徹也、香月康宏、押村光雄：ヒト人工染色体ベクターの利点とその応用. *生化学*, **82**. 2010.
10. Kazuki Y, Oshimura M. : Human artificial chromosomes (HAC) for gene delivery and animal models. *Mol. Therapy. Mol Ther.* **19**:1591-601, 2011 (DOI:10.1038/mt.2011.136).
11. 香月康宏、押村光雄：ヒト人工染色体ベクターによる遺伝子細胞治療へ向けて、*日本臨床*, **69**, p 2142-7 (2011)
12. 香月康宏、押村光雄：染色体工学技術による医薬品開発のためのヒト化モデル動物の開発、*谷本学校 毒性質問箱*, **13**, p124-126 (2011)
13. 香月康宏、押村光雄：iPS 細胞とヒト人工染色体ベクターを用いた新たな筋ジストロフィー遺伝子治療に向けて、*Medical Science Digest*, **37**, p5-6 (2011)
14. 香月康宏、押村光雄 (2011年2月)：ヒト染色体導入ヒト型マウス、---生物機能モデルと新しいリソース・リサーチツール---編集：小幡裕一・城石俊彦・芦川忠夫・田中啓二・米川博道、p432-435
15. 香月康宏、押村光雄：iPS 細胞を用いた遺伝子・細胞治療への挑戦、*実験医学* **30**, (増刊)、2012
16. 香月康宏、押村光雄：遺伝子導入のための新規ヒト人工染色体ベクター、*細胞工学* **31**, 2012
17. 押村光雄：ヒト人工染色体を用いたデュシャンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子・細胞治療への期待、*Bios*, **17-III**, 2012
18. Oshimura M., Kazuki Y., Uno N. : Challenge toward gene-therapy using iPS cells for Duchenne muscular dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku*. **52**:1139-1142, 2012

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 34 件、国際会議 8 件)

1. 押村光雄：生化学若い研究者の会 中四国支部秋のセミナー「ヒト人工染色体によって何が出来るか」(2008年11月22日、鳥取大)
2. 角昭一郎：糖尿病の再生医療. 第15回滋賀消化器分子生物学懇話会 (2008年11月27日 大津市)
3. 角昭一郎. 糖尿病の再生医療など. 第78回医用器材研究者サロン. 2009年2月 京都市
4. 角昭一郎. 糖尿病における再生医療. 大津医学生会サマーセミナー2009 第13回市民健康講座. 2009年8月 大津市

5. 押村光雄. 「ヒト人工染色体を用いた医学・薬学への応用」. 日本生化学会. 2009年5月 鳥取市
6. 押村光雄. 「幹細胞と人工染色体との出会い-医学・薬学への応用」. 第19回日本サイトメトリー学会. 2009年6月 松江市
7. 押村光雄. 「染色体異数性がもたらすエピジェネティックな変化」. 日本エピジェネティクス研究会. 2009年5月 東京
8. 押村光雄. 「染色体工学技術の医学・薬学への応用」. 東北大学セミナー. 2009年11月 仙台
9. 押村光雄. 「染色体研究の歩みと今後の展望」. 第60回染色体学会60周年記念公開講座. 2009年11月 松江市
10. 押村光雄. 「ヒト人工染色体-遺伝子/再生医療、医薬品開発を目指して」. 中国分子病態研究会. 2009年11月 広島市
11. 押村光雄. 「ヒト人工染色体 遺伝子・再生医療と医薬品開発への応用」. (独) 医薬基盤研セミナー. 2009年12月 大阪市
12. 押村光雄. 「幹細胞研究と医学応用」. 再生医療学セミナー. 2009年12月 米子市
13. 押村光雄. 人工染色体を用いた遺伝子/再生医療、第180回川崎医学会講演会招待講演、川崎医科大学・倉敷、2010.5.12
14. 押村光雄. 染色体工学技術による医学・薬学への応用、第34回国立大学アイソトープ総合センター長会議講演、米子コンベンションセンター、2010.6.3
15. 押村光雄. 筋ジストロフィーの遺伝子治療に向けた新たな展開、(社) 日本筋ジストロフィー協会鳥取県支部療育キャンプ講演、米子、2010.6.20
16. 押村光雄. ヒト人工染色体(HAC)の医療及び医薬品開発への応用、第9回国際バイオEXPO バイオアカデミックフォーラム講演、東京ビッグサイト、2010.6.30
17. 押村光雄. 染色体工学技術を用いたヒト人工染色体の構築とその医学応用、日本遺伝学会第82回大会、札幌、2010.9.20~22
18. 押村光雄. ヒト人工染色体と幹細胞の出会いー遺伝子・再生医療を目指してー、第26回Wakoワークショップ 幹細胞・iPS細胞研究の最前線、東京品川、2010.11.26
19. 押村光雄. ヒト人工染色体の薬学及び医学応用、第49回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、米子コンベンションセンター、2010.11.6~7
20. 押村光雄. Human artificial chromosome and its medical and pharmaceutical applications、The 4th Asian Chromosome Colloquium (ACC4) Plenary Lectures、北京・中国、2010.10.11~14
21. 押村光雄. Chromosome engineering for regenerative medicine and gene therapy、Future in Medicine Symposium、延世大学校 原州医科大学・韓国、2010.10.17~19
22. 押村光雄. ヒト人工染色体の医学・薬学への応用、第100回日本病理学会総会、東京、4月28日
23. 押村光雄. 人工染色体技術を用いた再生医療および創薬研究への挑戦、第3回創薬塾セミナー、米子、6月10日
24. 押村光雄. 染色体工学技術を用いた医学・薬学への応用、第8回薬剤学懇談会研究討論会、山形、7月6日
25. 押村光雄. とっとりバイオフロンティア事業ー世界最先端の染色体工学技術開発とその限りない可能性ー、地域イノベーション創出2011 in おかやま、岡山、7月20日
26. 押村光雄. ヒト人工染色体を用いた安全な治療用iPS細胞の作製を目指して、染色体学会、平塚、11月13日
27. 押村光雄. ヒト人工染色体を用いた遺伝子・再生医療への挑戦、文部科学省iPS細胞等研究ネットワーク第3回合同シンポジウム、京都、11月19日
28. 押村光雄. 遺伝子発現ベクターとしての人工染色体、文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト」ヒト多能性幹細胞の培養・解析の標準化レクチャーシリーズ第6回「幹細胞の遺伝子操作の実践(つば)」、神戸、2月2日

29. 押村光雄、Human artificial chromosome (HAC) for gene delivery and animal models、vimm seminar、Italy、5月19日
 30. 押村光雄、Human artificial chromosomes for gene delivery and its applications、日本学術振興会二国間交流事業・日独セミナー、Germany、10月30日
 31. 押村光雄、Human artificial chromosomes for gene delivery and stable expression、Pep Talk 2012、USA、1月9日
 32. 押村光雄、Human artificial chromosome for the non-integrated stable gene expression、ASGCT、USA、5月18日
 33. 押村光雄、Human artificial chromosomes for gene- and cell-therapies、Human Stem Cells Institute、V Annual International Symposium、Moscow、5月28日
 34. 押村光雄、ヒト人工染色体を用いた筋ジストロフィー治療への挑戦、第53回日本神経学会学術大会シンポジウム、東京、5月24日
 35. 押村光雄、染色体医工学とその医療・創薬への応用に向けて、東京都医学総合研究所セミナー、7月25日
 36. 押村光雄、老化、再生医療への挑戦、鳥取県保険医協会総会講演、米子、7月29日
 37. 押村光雄、第11回中四国口腔癌研究会、染色体工学技術の医学・薬学応用 一遺伝子・再生医療と創薬支援一、広島、10月5日
 38. 押村光雄、第12回 Haemostasis 研究会特別講演、ヒト人工染色体(HAC)を用いた安全安心な遺伝子・再生医療に向けて、松山市、10月27日
 39. Mitsuo Oshimura, World iPS Cell Summit (Boston) , 「iPS Cell Formation with Human Artificial Chromosomes for Medical and Pharmaceutical Applications, Boston, 10月31日
 40. 押村光雄、第65回国立病院総合医学会シンポジウム、ヒト人工染色体を用いたデュシヤンヌ型筋ジストロフィー遺伝子治療への挑戦、神戸、11月16日
 41. 押村光雄、染色体工学技術を用いた創薬研究講演会、人工染色体工学技術を用いた創薬研究への展望、東京、11月19日
 42. 押村光雄、第2回毒性研究会、鳥取大学の毒性に関わる研究概要、米子、11月27日
- ② 口頭発表（国内会議 12件、国際会議 4件）
1. 押村光雄：日本人類遺伝学会 第53回大会「ヒト化マウスの作製とその医学・薬学への応用」(2008年9月30日)
 2. 押村光雄：第3回アジア染色体コロキウム「ヒト人工染色体の構築とその応用」(大阪)(2008年12月3日)
 3. 角昭一郎：膝再生医療の可能性。第70回日本臨床外科学会総会 シンポジウム：消化器外科における再生医療の未来 (2008年11月28日 東京都)
 4. Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, Hoshiya H, Hiramatsu K, Kajitani N, Yoshino T, Kazuki K, Nakagawa M, Takahashi K, Yamanaka S, Oshimura M. (平成21年5月東京) Correction of Duchenne muscular dystrophy in induced pluripotent stem cells using a human artificial chromosome、第7回幹細胞シンポジウム
 5. 角昭一郎。移植医療に代わる次世代糖尿病治療の展望。第109回日本外科学会定期学術集会 シンポジウム7. I型糖尿病移植治療の現況と展望 一膝移植 vs. 膝島移植。4月2日。福岡
 6. Yang KC, Qi Z, Lin FH, Sumi S. Chitosan Hydrogel as Immunoisolative Matrix for Xenogeneic Islet Transplantation. 8th Japan Regenerative Medicine Society Annual Meeting. P154, 2009. Tokyo, Japan. Mar 5 2009.
 7. Yang KC, Qi Z, Sumi S, Kuo TF, Lin FH. Chitosan/Gelatin Hydrogel as Immunoisolative Matrix for Xenogeneic Islet Transplantation. 2009 Annual Meeting of the Polymer Society. P100, (Best oral presentation award) Taipei, Taiwan. Jan 10 2009
 8. 香月康宏（第10回日本再生医療学会総会）遺伝子再生医療・ヒト型モデル動物作製のためのヒト人工染色体ベクター(HAC)システムの開発、東京、2011.3.1-2

9. 山口繁幸, 香月康宏, 中山祐二, 西田直史, 上野悦也, 赤倉裕太郎, 押村光雄, 大林徹也 (第10回日本再生医療学会総会) 再生医療を目指した複数遺伝子搭載可能な改良型ヒト人工染色体 (HAC) ベクターの開発、東京、2011.3.1-2
10. Kazuki Y. and Oshimura M., Novel human artificial chromosome vector for gene delivery、第34回日本分子生物学会年会 (ワークショップ)、横浜、12月
11. 矢倉裕奈、石原千恵、藤井昂洗、香月康宏、黒崎創、土井健史、小松則夫、押村光雄、武谷浩之、ヒト人工染色体と iPS 細胞を用いた新規血友病遺伝子治療法/ A novel gene therapy for hemophilia using human artificial chromosomes and iPS cells、第84回日本生化学会総会、京都、9月21-24日
12. 吉村祐貴、中村和臣、山口繁幸、遠藤志穂、中島芳浩、香月康宏、近江谷克裕、押村光雄、大林徹也、ヒト人工染色体ベクターを用いた in vitro/in vivo デュアルイメージングシステム、第58回日本実験動物学会総会、東京、5月25-27日
13. 押村光雄、Human artificial chromosomes for gene delivery, and their medical and pharmaceutical applications、Scripps 研究所セミナー、USA、1月11日
14. 押村光雄、Human artificial chromosomes for gene delivery, and their medical and pharmaceutical applications、キリン研究所セミナー、USA、1月11日
15. 押村光雄、鳥取大学発の染色体工学技術とその限らない応用、第3回アジア産業技術フォーラム、米子、5月31日
16. 押村光雄、第35回分子生物学会シンポジウム、ヒト人工染色体を用いたゲノム編集、福岡、12月13日

③ ポスター発表 (国内会議 25 件、国際会議 16 件)

1. Qi Z, Qi M, Sakata N, Yamamoto C, Yanai G, Ikenoue E, Wu Q, Hiura A, Sumi S. Application of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes treatment International Symposium on Regenerative Medicine -Tenth Anniversary of Institute for Frontier Medical Sciences- (2008年12月4日 京都市)
2. 漆智、柳井伍一、池之上悦子、呉倩、日裏彰人、井上一知、角昭一郎. 臍島移植における PVA マクロカプセル化臍島の応用. 第44回日本移植学会 (2008年9月21日 大阪市)
3. Iida Y, Ohzeki J, Kazuki Y, Hoshiya H, Takiguchi M, Hayashi M, Nakano M, Masumoto H, Earnshaw CW, Larionov V, Oshimura M. (平成21年2月 USA, サンフランシスコ) Towards reversible immortalization of human mesenchymal stem cells using a human artificial chromosome with a conditional centromere, Molecular Medicine Tri-Conference
4. Hiratsuka M, Uno N, Imaoka N, Masuda S, Kazuki Y, Osaki M, Higaki K, Takahashi K, Yamanaka S, Oshimura M. (平成21年5月東京) Characterization of human iPS cells established from Down syndrome patient-derived fibroblast cell lines、第7回幹細胞シンポジウム
5. Iida Y, Ohzeki J, Kazuki Y, Hoshiya H, Takiguchi M, Hayashi M, Nakano M, Masumoto H, Earnshaw WC, Larionov V, Oshimura M. (平成21年5月東京) Towards extension of life-span of a human mesenchymal stem cells using a human artificial chromosome carrying a conditional centromere、第7回幹細胞シンポジウム
6. Kurosaki H., Uno N., Hiratsuka M., Iida Y., Kazuki Y., Ishihara C., Yakura Y, Takeya T. Oshimura M. (平成21年5月東京) Human FVIII Expression Using a HAC Vector Toward Stem Cell-Mediated Gene Therapy for Hemophilia A、第7回幹細胞シンポジウム
7. Hoshiya H, Kazuki Y, Tedesci S, Abe S, Takiguchi M, Kajitani N, Watanabe Y, Yoshino T, Shirayoshi Y, Higaki K, Messina G, Cossu G, Oshimura M. (平成21年5月東京) Recovery of human dystrophin expression in the mdx mesoangioblast-derived skeletal muscle using the human artificial chromosome (HAC)、第7回幹細胞シンポジウム
8. Hiratsuka M, Uno N, Imaoka N, Masuda S, Ueda K, Kazuki Y, Osaki M, Higaki K, Takahashi K, Yamanaka S, Oshimura M. Characterization of human iPS cells established from Down syndrome patient-derived fibroblast cell lines. (2009 Oct., USA) ASHG 59th annual meeting.
9. Kurosaki H, Hiratsuka M, Iida Y, Kazuki Y, Ishihara C, Yakura Y, Uno N, Takeya H, Oshimura M. Human FVIII expression using a HAC vector toward stem cell-mediated gene therapy for

- hemophilia A (2009 Oct., USA) ASHG 59th annual meeting
10. Iida Y, Ohzeki J, Kazuki Y, Hoshiya H, Takiguchi M, Hayashi M, Nakano M, Masumoto H, Earnshaw WC, Larionov V, Oshimura M. A novel non-integrated human artificial chromosome vector carrying a conditional centromere (2009 Oct., USA) ASHG 59th annual meeting
 11. Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, Hoshiya H, Hiramatsu K, Kajitani N, Yoshino T, Kazuki K, Uno N, Nakagawa M, Takahashi K, Yamanaka S, Oshimura M. Correction of Duchenne muscular dystrophy in induced pluripotent stem cells using a human artificial chromosome (2009 Oct., USA) ASHG 59th annual meeting
 12. 漆智、山本ちづる、柳井伍一、池之上悦子、呉倩、日裏彰人、角昭一郎. ラット同種膵島移植における PVA マクロカプセル化膵島の作用. 第8回日本再生医療学会総会、2009年3月 東京
 13. Qi Z, Ikenoue E, Yanai G, Wu Q, Hiura A, Sumi S. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. Cell Transplant Society & Organ Preservation and Medical Biology. April 2009, Okayama
 14. Qi Z, Qi M, Sakata N, Yamamoto C, Yanai G, Ikenoue E, Wu Q, Hiura A, Sumi S. Application of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in islet transplantation. The 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. June, 2009, Beijing
 15. 漆智、柳井伍一、白水泰昌、日裏彰人、角昭一郎. ラット膵島の同種移植における PVA マクロカプセル化膵島の応用. 第40回日本膵臓学会 2009年7月 東京
 16. Qi Z, Yanai G, Ikenoue E, Wu Q, Hiura A, Sumi S. Long term cryopreservation of rat islets using PVA hydrogel. The 40th Anniversary Meeting for American Pancreas Society and Japanese Pancreas Society, Joint Meeting. Nov., 2009, Hawaii
 17. 飯田雄一、除去可能な新規ヒト人工染色体ベクター、iPS・ES・体性幹細胞 Forum2010、UDX Gallery(秋葉原)、2010.6.29
 18. 宇野愛海、ヒト人工染色体による iPS 細胞の作製、iPS・ES・体性幹細胞 Forum2010、UDX Gallery(秋葉原)、2010.6.29
 19. 加藤基伸、Chromosome transfer via microcell fusion utilizing fusogenic envelope proteins of Measles Virus、BMB2010(第33回分子生物学会年会)、神戸、2010.12.7-10
 20. 山口繁幸、複数遺伝子の搭載が可能な改良型ヒト人工染色体(HAC)ベクターの開発、BMB2010(第33回分子生物学会年会)、神戸、2010.12.7-10
 21. 平塚正治、CREST/さきがけ「iPS 細胞」研究領域 合同シンポジウム、日本科学未来館、2010.1.14
 22. 平塚正治、宇野愛海、上田佳奈、黒崎創、今岡奈津子、増田成子、加藤基伸、尾崎充彦、石原千恵、香月康宏、中川誠人、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、押村光雄(第10回日本再生医療学会総会)ヒト人工染色体ベクターを用いた iPS 細胞の作製、東京、2011.3.1-2
 23. 丹羽良輔、山口 繁幸、香月康宏、押村光雄、大林徹也(第10回日本再生医療学会総会) ES 細胞から膵 β 細胞への分化をモニタリングできるヒト人工染色体ベクターの作成、東京、2011.3.1-2
 24. 宇野愛海、Human artificial chromosome and its medical and pharmaceutical applications、第4回アジア染色体コロキウム、中国、2010.10.10-14
 25. 平松敬、Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis、第4回アジア染色体コロキウム、中国、2010.10.10-14
 26. 香月康宏、滝口正人、平松敬、上野悦也、赤倉裕太郎、梶谷尚世、吉野とう子、香月加奈子、嵩原昇子、石原千恵、押村光雄、様々な動物種への外来染色体導入技術、第25回モロシヌス研究会、越後湯沢、7月8-9日
 27. 首浦武作志、平塚正治、伊藤恭介、尾崎充彦、押村光雄、多田政子、ヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の長期維持、第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日
 28. 加藤基伸、宇野愛海、上田佳奈、平塚正治、中山祐二、香月康宏、中村貴史、押村光雄、麻疹ウイルスエンベロープタンパク質の指向性改変による微小核細胞融合法の標的化、第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日
 29. 大林徹也、中村和臣、西田直人、富松航佑、吉村祐貴、佐々木勝嵩、香月康宏、押村

- 光雄、任意の生命現象を制御できるバイオコントローラーとしての哺乳類人工染色体を搭載したモデル細胞とモデル動物、第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月
30. 富松航佑、森大吾、香月康宏、押村光雄、大林徹也、発光と蛍光を組み合わせた多色イメージング細胞/動物の開発、第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月
 31. 押村光雄、香月康宏、飯田雄一、黒崎創、宇野愛海、平塚正治、大林徹也、Human artificial chromosomes for gene delivery, Stem Cell Summit, USA、10月3日
 32. 宇野愛海、平塚正治、上田佳奈、香月康宏、押村光雄、Integration-Free iPS Cells Reprogrammed Using Human Artificial Chromosome, Stem Cell Summit, USA、10月3日
 33. 押村光雄、香月康宏、平塚正治、大林徹也、飯田雄一、宇野愛海、上野悦也、上田佳奈、大平崇人、黒崎創、阿部智志、久郷裕之、Human artificial chromosomes for gene delivery, Pep Talk 2012, USA、1月9日
 34. 矢倉裕奈、黒崎創、石原千恵、香月康宏、土井健史、松下正、武谷浩之、押村光雄、ヒト人工染色体を用いた血小板特異的 FVIII 発現 iPS 細胞の作製-新規治療法確立へ向けて一、第34回日本血栓止血学会学術集会、東京、6月7~9日
 35. 鈴木輝彦、宇野愛海、香月康宏、黒田英志、牛飼美春、平塚正治、佐伯武頼、押村光雄、iPS細胞とヒト/マウス人工染色体を用いた成人発症II型シトルリン血症遺伝子治療モデルの開発、第11回日本再生医療学会総会、横浜、6月12~14日
 36. 矢倉裕奈、黒崎創、石原千恵、香月康宏、土井健史、松下正、武谷浩之、押村光雄、人工染色体ベクターを用いた新規血友病A型遺伝子治療法の開発、第11回日本再生医療学会総会、横浜、6月12~14日
 37. Ueda K, Hiratsuka M, Uno N, Kurosaki H, Imaoka N, Uno K, Suzuki T, Kazuki K, Akakura Y, Katoh M, Osaki M, Kazuki Y, and Oshimura M, Generation of integration-free mouse and human iPS cells using human artificial chromosomes, ISSCR 10th Annual meeting, 横浜、6月13~16日
 38. Uno N, Suzuki T, Ueda K, Uno K, Kazuki Y, Hiratsuka M and Oshimura M, Towards a non immunogenic gene delivery vector system using human artificial chromosome for gene and cell therapy, ISSCR 10th Annual meeting, 横浜、6月13~16日
 39. 阿部智志、滝口正人、香月康宏、平松敬、飯田雄一、髙原昇子、西田直史、大林徹也、若山照彦、押村光雄、マウス人工染色体 (MAC) の構築とマウス細胞における安定、日本人類遺伝学会第57回大会、東京、10月24~27日
 40. 宇野愛海、宇野勝洋、上田佳奈、福原早也佳、平塚正治、香月康宏、鈴木輝彦、押村光雄、人工染色体を用いた iPS 細胞の未分化細胞除去及び腫瘍化抑制システムの開発、第35回日本分子生物学会、福岡、12月11~14日
 41. Uno N, Ueda K, Iida Y, Yakura Y, Kurosaki H, Uno K, Osaki M, Ohbayashi T, Kazuki Y, Hiratsuka M, Oshimura M, Toward safe and effective gene- and cell-therapies using human artificial chromosomes and stem cells, CiRA International Symposium, 京都、3月11日

(4)知財出願

① 国内出願 (4件)

1. 発明の名称:外来性核初期化因子またはそれをコードする DNA を含まない人工多能性幹細胞およびその作製方法
 発明者:押村光雄、平塚正治、香月康宏、山中伸弥、中川誠人、高橋和利、松岡隆之
 出願人:国立大学法人鳥取大学、国立大学法人京都大学、株式会社 chromocenter
 出願日:2008/9/30
 出願番号:特願 2008-255702
2. 発明の名称:高効率のマイクロセル融合法
 発明者:押村光雄、香月康宏、加藤基伸、中村貴史、松岡隆之

出願人:国立大学法人鳥取大学、国立大学法人東京大学医科学研究所、
株式会社 chromocenter

出願日:2010/3/3

出願番号:特願 2010-047109

3. 発明の名称:マイクロセル保存方法

発明者:押村光雄、宇野愛海、香月康宏

出願人:国立大学法人鳥取大学

出願日:2012/3/16

出願番号:特願 2012-060096

4. 発明の名称:マウス人工染色体ベクター

発明者:押村光雄、香月康宏、滝口正人、松岡隆之

出願人:国立大学法人鳥取大学、株式会社 chromocenter

出願日:2010/1/6

出願番号:特願 2010-001425

② 海外出願 (2 件)

1. 発明の名称:外来性核初期化因子またはそれをコードするDNAを含まない人工多能性幹細胞およびその作製方法

発明者:押村光雄、平塚正治、香月康宏、山中伸弥、中川誠人、高橋和利、松岡隆之

出願人:国立大学法人鳥取大学、国立大学法人京都大学、株式会社 chromocenter

出願日:2009/9/30

出願番号:PCT/JP2009/067448

2. 発明の名称:マウス人工染色体ベクター

発明者:押村光雄、香月康宏、滝口正人、松岡隆之

出願人:国立大学法人鳥取大学、株式会社 chromocenter

出願日:2011/1/6

出願番号:PCT/JP2011/050490

(5)受賞・報道等

① マスコミ(新聞・TV等)報道

1. Molecular Therapy の論文に関して、JST・鳥取大学にて「筋ジストロフィー患者由来の iPS 細胞における遺伝子修復に成功 (ヒト人工染色体ベクターによる新たな遺伝子治療戦略の可能性)」と題してプレス発表。
2. プレス発表によって、NHK 全国放送により紹介され、および下記の新聞に記事が掲載される、
2009 年 12 月 9 日読売新聞、毎日新聞、日本経済新聞、化学工業新聞、産経新聞、東京新聞、日本海新聞、山陰中央新報、京都新聞
3. 山陰中央新報:とっとりバイオフィロンティア開設 産官学で染色体工学活用. 4 月 27 日
4. 毎日新聞:筋ジス遺伝子治療へ前進. 8 月 20 日
5. The Mainichi Daily News: Research team successfully treats muscular dystrophy in mice using gene therapy. 8 月 20 日
6. 読売新聞:科学 Monday 筋ジス進行押さえた. 10 月 31 日
7. ニュートンムック別冊:「遺伝子」治療と融合した新医療へ、2012 年 10 月

§ 5. 研究期間中の活動

(1) 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2008. 12. 8	ダイアログ（株）講演会	神戸	200 人	様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線「ヒト人工染色体（HAC）ベクターを用いた遺伝子・再生医療に向けて」
2010. 1. 14	平成 22 年度特許庁先端技術研修	霞ヶ関・東京	100 人	染色体工学技術の医薬・薬学への応用
2010. 7. 25	進行性筋ジストロフィー 遺伝子治療に関する講演会	松江医療センター	50 人	患者さんへの iPS 細胞を用いた新しい遺伝子治療法の紹介
2010. 8. 23	理研 CDB セミナー	理研 CDB	80 人	人工染色体技術の紹介
2010. 5. 28～29	第 4 回日本エピジェネティクス研究会年会	米子コンベンションセンター	300 人	学会の主催
2010. 3. 1	第 4 回産学官連携新産業創出研究会講演	米子市	50 名	
2010. 8. 27	とっとりバイオフロンティアシンポジウム	東京都	40 名	染色体工学技術と多色発光技術の融合とその応用を目指して
2011. 3. 17	(社)米子法人会講演	米子市	80 名	I P S 細胞がもたらす未来
2011. 8. 6	日本教育会鳥取県支部教育講演会	米子市	100 名	染色体医工学の未来
2012. 2. 7	関西経済連合会セミナー	大阪	200 名	染色体工学技術に係る基盤研究開発 世界最先端の染色体工学技術とその限らない可能性
2012. 6. 8	バイオフロンティアセミナー	米子市	38 名	人工染色体工学技術を用いた医学・創薬への利用に向けて
2012. 6. 29	食品・医薬品・化学物質の毒性勉強会		61 名	
2012. 11. 30～12. 1	研究開発戦略セミナー		26 名	バイオフロンティア染色体工学技術の展望
2013. 6. 21	バイオフロンティアセミナー	とっとりバイオフロンティア	17 名	人工染色体工学技術の医学・創薬の利用に向けて
2013. 9. 17	奥出雲三沢小学校及び奥出雲町立中学校	奥出雲町	400 名	「病気を治すためのいのちの研究」iPS 細胞をつかって

§ 6. 最後に

iPS作製に関する技術の思いもよらない急速な展開に関してHAC技術は遅れを取った。しかしながら、その過程で学んだ技術によりHACを用いた今後の展開の可能性が見えてきたと思っています。サポート有り難うございました。