

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＞では iPS 誘導可能な HAC ベクターを作製し、線維芽細胞に導入することにより iPS 化するかを検討した。＜課題2:iPS細胞を用いた糖尿病治療＞では膵β細胞を分ける仕組みの基盤となるベクター作製を行った。＜課題3:iPS細胞を用いた筋ジストロフィー治療＞では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 細胞に DMD-HAC ベクターを導入することに成功した。今後は 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、糖尿病、筋ジストロフィー治療にむけた基盤整備を行う。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は4.(1)に対応する)

＜課題1:HACベクターによる iPS 誘導＞

iPS 誘導用の HAC ベクターを作製し、線維芽細胞に導入することにより iPS 化するかを検討したところ、iPS 化への4因子の発現量が重要であることが明らかとなった。今後は4因子の発現量の最適化を HAC ベクターを用いて行う。

＜課題2:iPS細胞を用いた糖尿病治療＞

糖尿病治療グループでは、iPS 細胞から機能性膵β細胞を樹立することで膵島移植に代わる

新規糖尿病治療法の開発をめざしている。本年度は膵臓β細胞の治療用の糖尿病治療用 HAC ベクターのプロトタイプ構築、ES 細胞と iPS 細胞の膵β細胞への分化誘導法の比較・検討、マウス膵管上皮由来細胞から膵β細胞への分化誘導法の開発を計画し実施した。また、当初予定を前倒して樹立した高機能性膵β細胞を臨床応用するため、移植細胞カプセル化技術開発に成功した。

以下の3つの課題に取り組んだ。

1. 膵臓β細胞の治療用の糖尿病治療用 HAC ベクターのプロトタイプ構築

膵β細胞への分化を「誘う」因子としては、Pdx1, Ngn3, MafA の3種の転写因子を選択した。分化した細胞を「分ける」仕掛けとして、インスリンの発現を蛍光でモニターする為のマーカー遺伝子を作製した。この遺伝子を iPS 細胞と樹立した膵組織幹細胞様細胞に移入する準備を進めた。

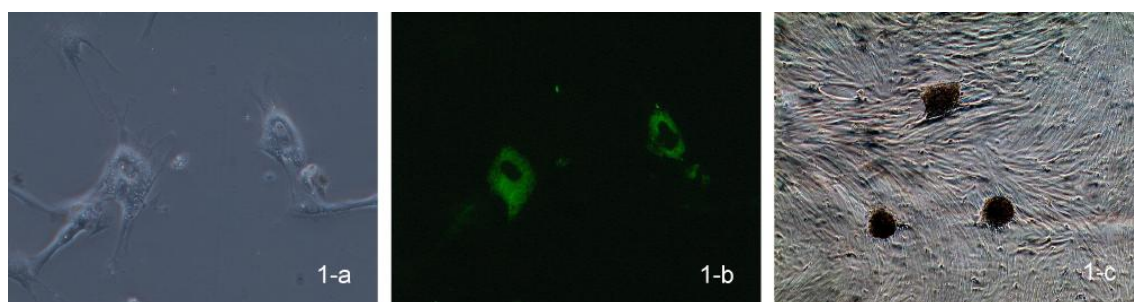
2. ES 細胞と iPS 細胞の膵β細胞への分化誘導法の比較・検討

他のグループから発表された ES 細胞から膵β細胞への分化誘導法に関するプロトコルを比較して、マウス及びヒト iPS 細胞の分化誘導法を検討した。

3. マウス膵管上皮由来細胞から膵β細胞への分化誘導法の開発

マウス膵管上皮由来細胞から長期継代可能な膵組織幹細胞様細胞の培養及び膵島様細胞塊の作製に成功した。この細胞の多くが PDX-1 を発現し(図1a: 明視野、b: PDX-1 蛍光免疫染色)、長期培養によって膵島様細胞塊(図1c)が得られることを見いだした。現在、この細胞の増殖促進と分化(細胞塊形成)促進の条件を検討するとともに、細胞塊の分析を進めている。また、ヒト細胞で同様の研究が実施できるよう、手術標本の一部あるいは膵島分離後の膵外分泌組織を研究用に転用することを目指して、施設の倫理委員会への申請、および我が国の膵島移植を統括する膵・膵島移植研究会を通じて制度的な整備を行う準備を進めた。また、バイオ人工膵の臨床応用を目指すマクロカプセル化膵島の研究では、凍結・解凍による PVA マクロカプセル化膵島作成条件の最適化を進めるとともに、常温では液状であり体温でゲル化する、注入可能な新しいカプセル化素材を用いて、糖尿病治療実験に向けた基礎的検討を行った¹⁾。

図1



<課題 3:iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療>

以下の3つの課題を検討した。

1. iPS 細胞の誘導

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

Coliell 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(図2)。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。今後、これらが多能性を持つかを検討するため、ヌードマウスに移植する。

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、Coliell 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3)。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。

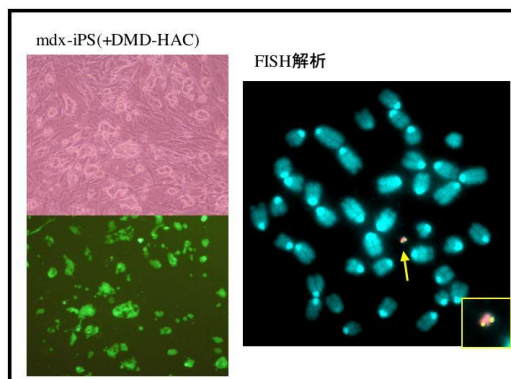


図 2

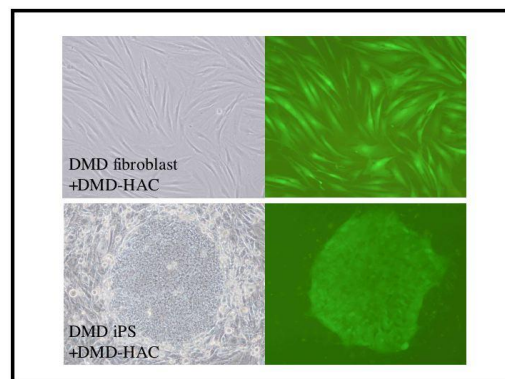


図 3

3. 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

本年度は 1,2 の作製が終了した。今後、ヌードマウスへの移植後の分化能の検討、そして発現解析が終了次第、2 で作製した遺伝子修復済みの iPS 細胞に PAX3 を強制発現させることで筋芽細胞に分化するかを Perlingeiro ら(Nature,2008)の報告に従い、検討する(誘うしくみの検討)。この実験が再現できれば DMD-HAC ベクターへ PAX3 を搭載する予定である。

3. 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 B 細胞を用いた糖尿病治療

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Yang KC, Wu CC, Lin FH, Qi Z, Kou TF, Cheng YH, Chen MP, Sumi S. Chitosan/gelatin hydrogel as immunoisulative matrix for injectable bioartificial pancreas. Xenotransplantation 15: 407-416, 2008

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数： 1 件 (CREST 研究期間累積件数：1 件)