

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

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>

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。前年度に、CAG プロモーター下に 4 因子を個別に連結した HAC ベクターをマウス線維芽細胞に導入することにより、不完全ながら未分化マーカーを発現し ES 細胞様形態を呈するクローンを獲得することに成功している。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ほぼ完全に初期化することに成功したが、完全な iPS 化には不十分であることが示唆されたので、4 因子の更なるコピー数の増加あるいは iPS 化を促進する因子 (未分化細胞特異的マイクロ RNA 発現誘導や p53 ノックダウン) の追加を HAC ベクターに施し、HAC ベクター単独での iPS 誘導を目指していく。

<課題2: iPS 細胞を用いた糖尿病治療>

複数の遺伝子を安定的にかつ効率よく導入するシステム「マルチインテグレーションシステム」を開発し、従来の部位特異的組み換えに用いられてきたシステムと比較して、染色体の特定への遺

伝子の導入効率が高いことを実証した。このシステムを用いて、糖尿病治療用の HAC ベクターの構築に成功した。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 vivo*(テラトーマおよびキメラマウス)で分化させ、筋肉でのジストロフィンの発現を確認した。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、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

<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 4 因子を個別に連結したベクターについて、4 因子それぞれについて 1 コピー、2 コピー、4 コピーを保持する 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。2 コピー版の HAC ベクター導入により iPS 細胞様に形態変化したクローンを 3 クローン獲得できた。これらのクローンでは Nanog、Rex1、Sox2、Oct4 等の未分化マーカーの発現も確認された。このうち 2 クローンはマウス ES 細胞 TT2F と同レベルの発現を示し、テラトーマも形成したことからほぼ完全に初期化していると考えられた。FISH 解析により、HAC ベクターの存在も確認されたが、宿主側の染色体数に異常が観察され、付加的な変化が起こっていることが示唆された。4 因子 2 コピーだけでは誘導が不十分であることが推察されたので、未分化細胞で特異的に発現しているマイクロ RNA(miR-294 及び miR-295)を HAC ベクター導入後添加したところ、iPS 細胞様形態を示すクロ

ーンが 30 クローン得られた。今後、染色体解析等の評価を進め、マイクロ RNA の効果を検証する。

<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、1) 複数の遺伝子を安定的にかつ効率よく導入するシステム「マルチインテグレーションシステム」の改良を進めた。このシステムを用いて、インスリンの発現をモニターするHACベクターを樹立した。このベクターではインスリンのプロモーターによりEGFPが発現誘導されるため、iPS 細胞から分化誘導した膵β細胞バイオイメージングにより「分ける」ことができる。この HAC ベクターをマウスES細胞およびマウス iPS 細胞に移入している。また、HAC ベクターを用いた膵β細胞への分化誘導には Ngn3 をコンディショナルに発現誘導することが有効であると判断した。従来コンディショナルな発現制御には Tet-on/off や Cre/loxP を用いたシステムが広く用いられているが、本プロジェクトではより詳細な制御が必要であるため、「マルチインテグレーションシステム」を応用した新しいシステムの開発に取り組んだ。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、PVA マクロカプセル化膵島といったバイオ人工膵用デバイスが動物実験で有効であることを検証し、臨床応用を視野に向けた条件検討を開始した。

<課題 3:iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療> 図 1,2

昨年度作製した 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1)。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2)。次に 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2)。また、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、iPS 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。今後は、これまでに ES 細胞で蓄積された筋肉分化誘導法により、上記 iPS 細胞を筋肉細胞へ効率よく分化誘導する。

図 1

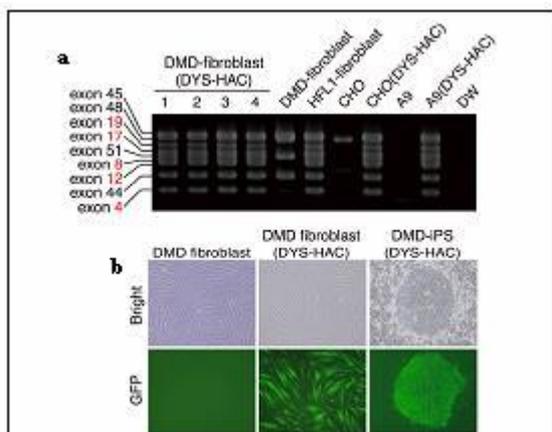
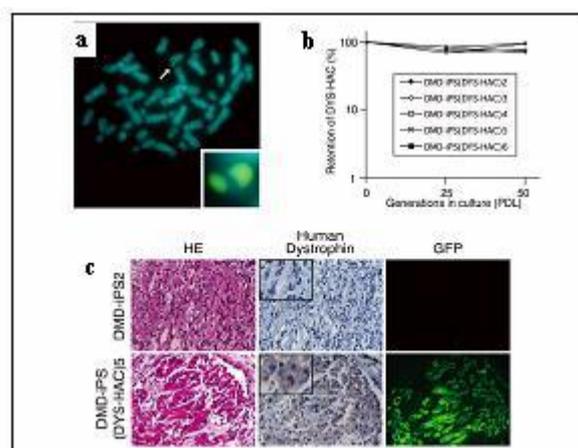


図 2



§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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. and Oshimura M. Complete genetic correction of iPS cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Therapy*.18; 238-240,2009 DOI:10.1038/mt.2009.303
2. Zhi Qi, Chizuru Yamamoto, Naomi Imori, Ayano Kinukawa, Kai-chiang Yang, Goichi Yanai, Etsuko Ikenoue, Yanna Shen, Yasumasa Shirouzu, Akihito Hiura, Kazutomo Inoue, and Shoichiro Sumi. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. *Cell Transplant.* (In press)
3. Yang KC, Wu CC, Sumi S, Kuo TF, SC Lin, Lin FH. Intramedullary Cavity as an Implant Site for Bioartificial Pancreas: An *In Vivo* Study on Diabetic Canine. *Transplantation* (in press)
4. Yang KC, Wu CC, SC Lin, Sumi S, Lin FH. The In Vivo Performance of Bioartificial Pancreas in Bone Marrow Cavity: A Case Report of a Spontaneous Diabetic Feline. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (in press)
5. Yang KC, Wu CC, Sumi S, Theng 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* (in press)

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願内訳(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2件)