

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

HAC ベクターの導入効率の改善

HAC ベクターを用いた未分化細胞除去システムの開発

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 in vitro 分化誘導法の開発

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23年度までに作製したトランスフェリン受容体(CD71)に対する一本鎖抗体を麻疹ウイルス Hタンパクに付加した「改変」麻疹ウイルスエンベロープを用いた麻疹融合法により、ヒト線維芽細胞への HAC 移入効率が、これまでのポリエチレングリコール(PEG)による融合法に比べて約10倍上昇した¹。この手法を用いて、ヒト P53shRNA を持つ初期化用 HAC ベクターをヒト線維芽細胞に導入したところ、マウス線維芽細胞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。更に、これらのクローンの中から、1クローンではあるが、移入した HAC ベクターが脱落し、テラトーマ形成まで示す完全な初期化クローンを得ることに成功した。

未分化細胞及びがん化細胞除去システムについては、平成23年度に作製した未分化性因子プロモーターにより制御される除去システムを用いて、コンセプトの検証を進めている。

また、上記実験のために、マウスで安定な人工染色体等の構築にも成功した^{2,4,5}。

<課題 2:iPS 細胞を用いた糖尿病治療>

平成23年度までに、ES 細胞から膵β細胞への *in vitro* 分化をモニターできるマルチカラー HAC ベクター（膵β HAC ベクター）を作製し、マウス ES 細胞株に導入した。この膵β HAC ベクター保持マウス ES 細胞を用いて膵β細胞への *in vitro* 分化誘導を実施したところ、一部のβ細胞しかモニターできずモニター・システムが不完全なことが明らかとなった。今後、搭載したプロモーター領域を検証し、モニター・システムの再構築を行う。

<課題 3:iPS 細胞を用いた筋ジストロフィー治療>

平成 23 年度までに DYS-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³。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、1細胞中に 1, 2, 3 コピーの DYS-HAC ベクターを微小核細胞融合法にてそれぞれ導入し、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。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

1. 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)
2. 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.)
3. 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)
4. 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)
5. Uno N., Uno K., Zatti S., Ueda K., Hiratsuka M., Katoh M., Oshimura M.: The Transfer of Human Artificial Chromosomes via cryopreserved microcells. *Cytotechnology*, 2013 (in press)
(DOI:10.1007/s10616-013-9548-4)
6. 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)

(3-2) 知財出願

- ① CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)