

2008/1022A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構
築のための基盤研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構
築のための基盤研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成21(2009)年4月

目 次

I. 総括研究報告	
ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構築のための基盤研究	1
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト)	
II. 分担研究報告	
遺伝子導入技術を利用したヒトiPS細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発	8
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト)	
iPS 細胞等の幹細胞の細胞特性の評価、ならびに細胞試験系における品質管理技術の開発	28
古江 美保 (独立行政法人医薬基盤研究所 細胞資源研究室)	
iPS 細胞を効率よく作製し、さらに効率よく目的の体細胞に分化させる技術の開発研究	36
高橋 一郎 (独立行政法人医薬基盤研究所 遺伝子資源研究室)	
iPS細胞等の幹細胞の再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発	38
梅澤 明弘 (国立成育医療センター 生殖医療研究部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

総括研究報告書

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構築のための基盤研究

主任研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞（ES 細胞）や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。

本年度は、iPS 細胞培養法の標準化、高効率遺伝子導入法の開発等を行った。その結果、

①培養技術の標準化として我々が確立したヒト幹細胞の培養や遺伝子発現解析に基づき、ヒト iPS 細胞を無フィーダー無血清培地によって長期安定的な培養方法をほぼ確立できた。

②ヒト ES、iPS 細胞の培養プロトコールの標準化に成功した。

③ヒト iPS 細胞への高効率遺伝子導入法を開発した。

分担研究者

古江美保 （独）医薬基盤研究所

高橋一朗 （独）医薬基盤研究所

梅澤明弘 国立成育医療センター研究所

A. 研究目的

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞（ES 細胞）や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等

が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。

本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、

①遺伝子導入法の最適化等による iPS 細胞の作製

②再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発

③遺伝子導入技術の応用による高効率分化誘導技術の開発及び生体機能類似細胞評価手法の開発

などに関して研究を実施し、ヒト由来の iPS 細胞等各種幹細胞及び分化誘導細胞コレクションの構築、創薬研究として実用性・汎用性の高い新規細胞評価系開発の基盤構築を行う。本年度は特に 体細胞と iPS 細胞への遺伝子導入法の最適化、iPS 細胞の未分化性安定評価法の開発、および多分化能安定性評価法の開発を行う。

このようなヒト特異的毒性の予測精度向上およびヒトへの外挿性向上実現のための基盤構築を行うことにより、安全性の向上、創薬初期段階での簡便な有効性・安全性評価が可能となり、創薬後期段階での開発中止の低減、新薬開発コストの低減、新薬開発期間の短縮などが期待される。

B. 研究方法

本研究は、主任研究者水口、分担研究者 3 名（古江、高橋、梅澤）の計 4 名が遂行した。当該年度においては、主にヒト iPS 細胞培養法の標準化、培養プロトコールの確立、iPS 細胞作製法の改良、iPS 細胞に

対する高効率遺伝子導入法の開発、に分けて遂行された。

（倫理面への配慮）

「ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究」文部科学大臣確認済み（医薬基盤研究所）

「ヒト ES 細胞樹立・使用研究」文部科学大臣確認済み（国立成育医療センター）

C. 研究結果

1. 遺伝子導入技術を利用したヒト iPS 細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発

マウス iPS 細胞に対する高効率遺伝子導入法を確立した。また、その技術を用いることにより、従来法より高い効率で脂肪細胞や骨芽細胞に分化誘導することが可能となった。ただし、ヒト iPS 細胞では、マウス iPS 細胞と同様の手法では効率良い遺伝子導入ができず、ROCK 阻害剤を併用することで改善がみとめられた。

2. iPS 細胞等の幹細胞の細胞特性の評価、ならびに細胞試験系における品質管理技術の開発

安定的に未分化性を維持できるような培養技術・培養プロトコールを、京都大学樹立ヒト ES 細胞 khES-1 を基準として作成した。同プロトコールを、京都大学樹立ヒト iPS 細胞に応用したところ、ヒト ES 細胞と同様に未分化な形態を維持することが可能であった。さらに、成育医療センターにて作成樹立されたヒト iPS 細胞にも、上記で作成したプロトコールを応用したところ、上記と同様に、未分化な形態を維持することが可能であった。以上のことから、ヒト ES、iPS 細胞の培養プロトコールの標

準化に成功したことが明らかとなった。

3. iPS 細胞を効率よく作製し、さらに効率よく目的の体細胞に分化させる技術の開発研究

iPS 細胞化する基本の 4 遺伝子 (POU5F1, SOX2, c-MYC, KLF4) を公知のヒト細胞に導入して iPS 細胞の作製を試みている。まだ preliminary ではあるが、ほぼ iPS 細胞を作製する条件は確立した。現在、培養を継続中である。

4. iPS 細胞等の幹細胞の再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発

本研究はヒト iPS 細胞等の幹細胞の再現性ある安定した細胞培養系の確立のため未分化性安定評価法開発と培養技術の標準化を行った。未分化の評価として iPS 細胞について未分化マーカー遺伝子の発現をヒト ES 細胞と比較し、いずれも同等またはそれ以上の発現を認めた。さらに表面マーカーの発現も確認できた。培養技術の標準化として我々が確立したヒト幹細胞の培養や遺伝子発現解析に基づき、ヒト iPS 細胞を無フィーダー無血清培地によって長期安定的な培養方法をほぼ確立できた。

D. 考察

マウス iPS 細胞を用いた研究により、外来遺伝子を効率良く導入できれば、iPS 細胞の機能細胞への分化を遺伝子導入により自由に制御できる可能性が示された。しかしながら、ヒト iPS 細胞においては Ad ベクター単独では遺伝子導入効率が極めて低く、ROCK 阻害剤を併用することで初めて

遺伝子導入が可能であった。ROCK 阻害剤が分化誘導に悪影響を及ぼすことも考えられるため、今後は薬剤併用を伴わない遺伝子導入ベクターの開発が重要であると考えられる。また、iPS 細胞は分化効率においてクローン間の差が大きいことが指摘されており、種々の iPS クローンをを用いた検討も重要になると思われる。

ヒト ES 細胞は、その樹立の方法や培養条件がラボにより異なるために、株間の差が大きく、ヒト ES 細胞に関連する報告が追試できないことも多いことが知られている。そのために、シェフィールド大学の Andrews らが中心となって、ヒト ES 細胞研究の標準化が行われている。ヒト iPS 細胞についても各研究室で作成方法や培養方法が異なり、さらに、同じ細胞から作製された iPS 細胞であっても、クローン間で形質が異なる。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様の形質を有している。従って、ヒト iPS 細胞独自に標準化するのではなく、ヒト ES 細胞と比較することにより、標準化を行う必要があると考える。当分担者は、Andrews らが行っているヒト ES 細胞研究の標準化研究に参加をしており、これらの標準化されたヒト ES 細胞の分析データを持っている。これらの結果と、ヒト iPS 細胞の分析結果と比較することにより、より効率的かつ正確に標準化することが可能である。今回、hESF9 培地を用いて、国内樹立ヒト ES 細胞 khES-1 ならびにヒト iPS 細胞を用いて、細胞外マトリックスの接着性を検討した。その結果 khES-1 は、シェフィールド大学やハーバード大学の ES 細胞とは細胞外マトリックスに対する接着性は異なることが明らかとなった。しかし、ヒト iPS 細

胞は同様の形質を示していた。これらの結果は、ヒトES、iPS細胞は、細胞株によって様々な形質を有していることが示唆された。しかし、ファイブロネクチンは、そのいずれの細胞にも強い接着性を示すことから、ファイブロネクチンを標準培養法として使用することが可能であることが示唆された。最近、オランダの研究チームが、無血清培地においては、合成ビトロネクチンが有効であることが発表された。今後、合成ファイブロネクチンや合成ビトロネクチンも検討する必要がある。

細胞分散法は、ヒトES細胞の培養において、もっとも難しいと言われている。特に、無血清培養下における細胞分散は、種々の検討が行われ、各種企業から、組成の明らかにされていない細胞分散液が販売されている。EDTAは、合成物質であり、ロット差がほとんどなく、シンプルであり、EDTAを用いた細胞分散法が使用できれば、安定した結果が得られるはずである。シェフィールド大学やハーバード大学、あるいは、ウィスコンシン大学のヒト細胞はEDTAを用いることにより、未分化な細胞だけが回収でき、それにより、細胞死することは、ほとんど見られなかった。しかし、京都大学ヒトES細胞 khES-1細胞は、EDTAにより、未分化コロニーのみが回収できず、さらには、EDTAを用いることにより、細胞死することが明らかとなった。細胞表面に発現する蛋白や糖質が異なることも予想される。今後、輸入ヒトES細胞の培養が許可されれば、これらの細胞と比較していく予定である。

hESF9におけるコロニー形成率は、フィーダー細胞とKSRを用いた条件に比べると

低い。おそらく、フィーダー細胞とKSRを用いた条件においては、細胞死を救済する因子が含まれていると考えられる。しかし、一方で、分化誘導する因子も含まれているために、多くの分化細胞が認められた。今後、細胞死を救済する因子を検討していく必要があるだろう。単一細胞の細胞死を救済すると報告されたロックインヒビターの使用も検討していく予定である。

ヒトES細胞、iPS細胞は、分化細胞を得るために、非常に有効な細胞である。しかし、その分化制御が非常に難しいために、様々な研究が行われている。これまで、フィーダーやKSRなどロット差の異なる培養条件を用いていたために、未分化状態を保っていたとしても、若干の分化細胞が発現する。そういった細胞を含んだ状態で分化誘導を始めれば、当然、様々な分化細胞が発現するだろう。安定した分化誘導を行うためには、ロットができるだけ少ない培養条件を用いることが必要だろう。hESF9を改良したhESF5-differは、精製成分を用いた既知の因子よりなる培地であり、ロットがほとんどない。この培養条件を用いることにより、毎回、同様の結果が得られる。また、増殖因子による影響も正確に解析することが可能である。これにより、細胞株による分化傾向を解析でき、分化能を指標とした品質評価法開発にもつながるものと考えられる。

iPS細胞の作製に関しては、現在作製に取り組んでいるところで、iPS様の細胞が得られるに至っていないので、解析はできていない。基本的な4遺伝子を導入する系でiPS細胞が得られるということが確認できたところで、効率のよい方法、たとえば

DNA のメチル化の阻害剤などの添加を検討していく予定である。あわせて、発現している遺伝子、発現が抑えられている遺伝子の解析を詳細に行うことで、効率のよい誘導法そして分化法を検討していく。

また、ヒト iPS 細胞の未分化マーカーによる評価系をほぼ確立できた。そこでこの評価系を用いて培養下における経時的安定性、凍結融解後の細胞評価へ展開していくことが可能になったといえる。さらに創薬開発において非臨床データをヒトへの外挿性向上を図るためには従来のフィーダー細胞を用いた幹細胞培養条件では、再現性・安定性に問題が残る。そこで無フィーダー無血清培養条件で長期安定的に未分化性を維持できる細胞培養条件が課題となる。今回無フィーダー無血清培養下で長期にわたって安定した培養が可能となる条件をほぼ確立できた。今後さらに今回確立した未分化マーカーによる評価を加えるとともに、ゲノム安定性評価法を開発し品質管理・評価法の確立へとつなげていく。

E. 結論

- ①培養技術の標準化として我々が確立したヒト幹細胞の培養法に基づき、ヒト iPS 細胞を無フィーダー無血清培地によって長期安定的に培養する方法をほぼ確立できた。
- ②ヒト ES、iPS 細胞の培養プロトコールの標準化に成功した。
- ③ヒト iPS 細胞への高効率遺伝子導入法を開発した。

F. 健康危機管理情報

特に問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro K, Kondo A, Kawabata K, Sakurai H, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 127-132 (2009).
2. Tashiro K, Kawabata K, Sakurai H, Kurachi S, Sakurai F, Yamanishi K, Mizuguchi H. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J. Gene Med.*, **10**, 498-507 (2008).
3. Furue MK, Na J, Jackson JP, Okamoto T, Jones M, Baker D, Hata R, Moore HD, Sato JD, Andrews PW. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13409-13414 (2008).
4. Nakanishi M, Kurisaki A, Hayashi Y, Warashina M, Ishiura S, Kusuda-Furue M, Asashima M. Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium. *FASEB J.*, **23**, 114-122 (2009).
5. 古江一楠田 美保 日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化 その1 Tissue culture research communications 印刷中

6. 林 洋平, 古江一楠田 美保, 明石 靖史, 岡本 哲治, 浅島 誠 :マウス ES 細胞の無血清培養法. *Tissue culture research communications*, **27**: 107-115 (2008)
7. Umezawa A, Akutsu H. Osteogenesis and chondrogenesis from a stem cell source. *Clin Calcium.*, **18**, 1721-1727 (2008).
8. Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 12921-12926 (2008).
9. Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A, Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature*, **454**, 345-349 (2008).
10. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*, **26**, 1695-1704 (2008).
11. Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A. Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis. *PLoS ONE*, **3**, e2407 (2008).
12. Umezawa A, Makino H. Cell source for regenerative medicine. *Nippon Rinsho*, **66**, 865-872 (2008).
13. Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, Umezawa A, Kiyokawa N. Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell. Biol.*, **28**, 2125-2137 (2008).
14. Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, Umezawa A. Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *PLoS ONE*, **3**, e3945 (2008).
15. Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, Umezawa A. Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution. *PLoS ONE*, **3**, e3709 (2008).
16. Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach. *Reprod. Biomed. Online*, **16**, 41-50 (2008).

2. 学会発表

1. 田代克久、稲村充、川端健二、櫻井文教、水口裕之：アデノウイルスベクターによるマウス iPS 細胞への遺伝子導入の最適化と分化誘導. 日本薬学会第 129 年会、京都、2009 年 3 月 26 日-28 日

2. 稲村充、川端健二、櫻井文教、山西弘一、水口裕之：内胚葉関連遺伝子 FOXA2 および SOX17 の転写制御機構の解明. 日本薬学会第 129 年会、京都、2009 年 3 月 26 日-28 日

3. 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之：アデノウイルスベクターを用いたマウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入と細胞分化. 第 8 回日本再生医療学会総会、東京、2009 年 3 月 5 日-6 日

4. 田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、櫻井文教、水口裕之：改良型アデノウイルスベクターを用いた骨芽細胞への高効率分化誘導法の開発. 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 9 日-12 日

5. Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Asami Ino, Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi: Efficient Differentiation into Osteoblastic Lineage from Both Mouse Embryoid Bodies and Bone Marrow Stromal Cells by Adenovirus Vectors. 11th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, May 28 - June 1, 2008

6. 田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、櫻井文教、水口裕之：最適化アデノ

ウイルスベクターを用いた高効率骨芽細胞分化. 遺伝子デリバリー研究会第 8 回シンポジウム、大阪、2008 年 5 月 8 日

7. 古江一楠田美保
彩都・医薬基盤研連携フォーラム
平成 20 年 12 月(大阪)
創薬開発ツールとしてのヒト ES 細胞培養法

8. 古江一楠田美保
歯周病学会 若手研究者の集い
平成 20 年 10 月(三重)
マウス、ヒト ES 細胞の無血清培地開発

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

分担研究報告書

遺伝子導入技術を利用したヒト iPS 細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発

分担研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

本研究は、ヒト iPS 細胞を薬物毒性スクリーニングに応用するため、疾患・性別・年齢等種々のバリエーションから成る iPS 細胞コレクションを作製する。また、iPS 細胞に対する高効率遺伝子導入法を開発し、それを利用した iPS 細胞からの肝細胞等の薬物スクリーニング用細胞への分化誘導法を確立する。本年度は iPS 細胞への遺伝子導入および分化誘導に関する基礎的知見を得ることを目的として、マウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の開発および遺伝子導入による機能細胞への分化誘導法の開発を行った。また、ヒト iPS 細胞への遺伝子導入に関する基礎的検討を行った。その結果、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いることにより、効率良くマウス iPS 細胞に遺伝子導入することが可能となり、この技術を用いて細胞分化に重要な遺伝子を iPS 細胞に導入することにより、脂肪細胞や骨芽細胞などに分化誘導可能であることが明らかとなった。さらに、ヒト iPS 細胞においては、Ad ベクターを単独で作用させても遺伝子導入効率は十分には向上しないことが明らかとなり、ROCK 阻害剤併用が有効であることが新たに判明した。

研究協力者

川端健二 (独) 医薬基盤研究所
櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
古川智久 (独) 医薬基盤研究所
田代克久 (独) 医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科
稲村 充 (独) 医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞 (ES 細胞) や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。

そこで本研究では、創薬研究の加速化お

よび非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、iPS 細胞への遺伝子導入および分化誘導に関する基礎的知見を得ることを目的として、マウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の開発および遺伝子導入による機能細胞への分化誘導法の開発を行った。また、ヒト iPS 細胞への遺伝子導入に関する基礎的検討を行った。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved *in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHMCMV5 およびそのプロモーターを CA プロモーター、EF-1 α プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を作製した。それぞれのマルチクローニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMCMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作製した。また、pHMCA5 および pHMEF5 のマルチクローニングサイトに赤色蛍光蛋白質である mCherry を挿入することにより、pHMCA5-mCherry、pHMEF5-mCherry を作製した。さらに、CA プロモーター制御下でマウス peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2、以後 PPAR γ と表記)、またはマウス runt-related transcription factor 2 (Runx2) を発現するシャトルプラスミド pHMCA5-PPAR γ 、pHMCA5-Runx2 を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド

pAdHM4 に挿入することにより、pAd-CMV-LacZ、pAd-CA-LacZ、pAd-EF-LacZ、pAd-CA-mCherry、pAd-EF-mCherry、pAd-CA-PPAR γ 、pAd-CA-Runx2 を作製した。なお、外来遺伝子を発現しない Ad ベクターである Ad-null のベクタープラスミドは pAdHM4 を用いた。作製した Ad ベクタープラスミドを *PacI* で消化し、SuperFect (Qiagen 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-CA-mCherry、Ad-EF-mCherry、Ad-CA-PPAR γ 、Ad-CA-Runx2、Ad-null を作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。Rous sarcoma virus (RSV) プロモーター制御下で LacZ を発現する Ad ベクターである Ad-RSV-LacZ はスタンフォード大学 Dr. M.A.Kay より供与して頂いた。各 Ad ベクターの物理学的 (particle) タイターは Maizel らの方法により、生物学的 (biological) タイターは AdenoX Rapid Titer Kit (Clontech 社) により測定した。

B-2. マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞の培養

E14 マウス ES 細胞はマウス ES 細胞用 leukemia inhibitory factor (LIF) 含有培地 (Specialty Media Inc 社) にてマイトマイシン C 処理をした mouse embryonic fibroblast (MEF; Specialty Media Inc 社) 上、またはゼラチンコートしたディッシュで培養した。Nanog プロモーター制御下に GFP/ IRES/ピュロマイシン耐性遺伝子の発現カセットが導入されているマウス iPS 細胞株 20D17 (理化学研究所バイオリソースセンターを

介して京都大学山中伸弥教授から供与)は上記のマウス ES 細胞の培養法に準じて行った。なお、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシン (SIGMA 社)を培地に加え、ゼラチンコートディッシュで培養することにより GFP を発現する未分化 iPS 細胞を濃縮した。

B-3. 胚様体形成

マウス ES 細胞またはマウス iPS 細胞からの胚様体形成は以下のように行った。MEF 上で培養しているマウス ES 細胞、マウス iPS 細胞を 0.25%トリプシン/1 mM EDTA (Invitrogen 社)で単細胞にし、通常の培養ディッシュに移して 37°C で 45 分間静置した後、上清 (ES 細胞、iPS 細胞が含まれている)を回収し MEF と分離した。次に回収した ES 細胞、iPS 細胞を分化培地 (15% fetal calf serum for ES cell (Specialty Media Inc 社)、1 x non-essential amino acid (Specialty Media Inc 社)、1 x nucleoside (Specialty Media Inc 社)、100 μM β -mercaptoethanol (Nacalai Tesque 社)、1 x penicillin/streptomycin (Invitrogen 社)、2 mM L-glutamine (Invitrogen 社)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wako 社))で 1 x 10⁵ cells/mL となるように懸濁した後、30 μL (約 3 x 10³ cells/drop)ずつ 10 cm ペトリディッシュの蓋の裏に付着させ、PBS 20 mL を予め加えておいたペトリディッシュ (底)に蓋を被せた。その状態のまま 37°C で 2 日または 5 日静置して ES 細胞由来 EB (ES-EB)、iPS 細胞由来 EB (iPS-EB) を作製した。

B-4. LacZ 発現解析

マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞を

予め MEF を播種しておいた 24 well プレートに 5 x 10⁴ cells/well となるように播種し、翌日に各 LacZ 発現 Ad ベクター (Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-RSV-LacZ、Ad-null) を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で作用させた。翌日に下記の方法で X-gal 染色を行った。マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.5%グルタルアルデヒド溶液を加えて室温で 5 分間静置した。再度 PBS で洗浄し、X-gal 染色溶液 (1.3 mM MgCl₂、15 mM NaCl、44 mM Hepes (pH8.0)、3 mM K₃Fe(CN)₆、3 mM K₄Fe(CN)₆、0.05% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)) を加えて LacZ 発現細胞を染色した。また、5 日間浮遊培養することにより作製した ES-EB、iPS-EB に対しても各 LacZ 発現 Ad ベクターを 3,000 VP/cell の濃度で作用させ、2 日後に X-gal 染色と β -gal chemiluminescent assay を行った。 β -ガラクトシダーゼの酵素活性の測定の際には、PBS で洗浄したあとの ES-EB および iPS-EB を、1/5 濃度に希釈し 24 well プレートへ入れておいた 100 μL の細胞溶解剤 (LC- β ; TOYO INK Co. LTD. 社)中に移し、室温で 5 分静置した。回収した EB を凍結融解後に 15,000 x g、4°C 条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。サンプル中の β -ガラクトシダーゼ活性は Luminescent β -gal Detection Kit II (Clontech)を用いて測定した。また、Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad)を用いてサンプル中の総タンパク質濃度を定量し、 β -ガラクトシダーゼ活性をタンパク質量で補正した。

B-5. mCherry 発現解析

ES 細胞あるいは iPS 細胞を 5×10^4 cells/well でゼラチンコートした 24 well プレートに播種し、翌日に各 Ad ベクター (Ad-CA-mCherry、Ad-EF-mCherry、Ad-null) を 1,000、3,000、10,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。24 時間後、それぞれの細胞をトリプシン-EDTA で回収し、mCherry および GFP の発現をフローサイトメーター (LSR II; BD Bioscience 社) により解析した。なお、蛍光顕微鏡を用いて mCherry および GFP の発現を観察する際は以下の手順で行った。マウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞をゼラチンコートした 2 well チャンバースライド (Nunc 社) に 5×10^4 cells/well で播種し、翌日に Ad-CA-mCherry、Ad-EF-mCherry を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。24 時間後、それぞれの細胞を 4% パラホルムアルデヒド (PFA)/PBS を用いて固定し、0.2% Triton X-100/PBS により細胞透過処理を行った。その後、ProlongGold with DAPI (Invitrogen 社) により核染色を行い、蛍光顕微鏡 (IX81, Olympus 社) で観察した。

B-6. CAR 発現解析

ゼラチンコートしたディッシュ上で培養したマウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞に 1 mM EDTA/PBS を加え、37°C で 15 分反応させてそれぞれの細胞を回収し、1% FBS/PBS に懸濁した。回収した細胞に rat anti-mouse CAR monoclonal antibody (KAN Research Institute, Inc. 社 今井俊夫博士より供与) を反応させた後、phycoerythrin (PE) 標識 donkey anti-rat antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社) を反応させた。CAR 発現細胞の割合は LSR II フローサイトメーターを用いて解析した。

B-7. アルカリフォスファターゼ染色

MEF を播種しておいた 12 well プレートにマウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞を 1×10^4 cells/well で播種し、翌日に Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。3 日後、Alkaline phosphatase detection kit (Chemicon 社) を用いてアルカリフォスファターゼ (ALP) 発現細胞を染色した。

B-8. Oct-3/4 染色

MEF を播種しておいた 2 well チャンバースライドにマウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞を 1×10^4 cells/well で播種し、翌日に Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。3 日後、4% PFA/PBS を加え室温で 10 分間固定し、2% BSA/PBS によりブロッキングを行った。0.2% Triton X-100/PBS により細胞透過処理を行った後、mouse anti-Oct-3/4 antibody (Santa Cruz biotechnology、ブロッキング液で 1/100 倍希釈) を 4°C、overnight で反応させた。次に HRP 標識 anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology 社) を室温で 1 時間反応させた。その後 diaminobenzidine (Vector Laboratories 社) を用いて Oct-3/4 発現細胞を可視化した。

B-9. RT-PCR

各細胞集団から ISOGEN (Nippon gene 社) を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Oligo (dT) プライマー (Qiagen 社) と SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen 社) を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA

(cDNA) を合成した。KOD Plus DNA Polymerase (Toyobo 社)を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR)を行い各遺伝子の cDNA を増幅した。PCR に用いたプライマーは Table 1 に示した。

B-10. 脂肪細胞への分化誘導

マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞から脂肪細胞への分化誘導は以下の方法で行った。マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞をハンギングドロップで2日間培養してEBを形成させた後、100 nM の *all-trans*-retinoic acid (RA ; Wako 社)を含む分化培地(B-3 参照)中で3日間浮遊培養した。その後 RA を除いた分化培地でさらに2日間浮遊培養した。これまでに、我々の研究室では Day 0、2、5 の EB に対して Ad ベクターを用いて遺伝子導入することで、EB の内部においても外来遺伝子を発現させることに成功している(Tashiro K et al. J. Gene Med., 2008, 10, 498-507)。そこで、Ad ベクターを用いて脂肪細胞分化のマスター遺伝子である PPAR γ 遺伝子を上記誘導法の 0、2、5 日目に導入し(triple transduction)、7 日目にゼラチンコートしたディッシュに播種した。その後、脂肪細胞分化用の液性因子 (0.1 M 3-isobutyl-L-methylxanthine (Sigma 社)、100 nM insulin (Sigma 社)、100 nM dexamethasone (Wako)、2 nM triiodothyronine (Sigma))を含む分化培地または液性因子を含まない分化培地で15日間培養した。培地交換は2-3日おきに行った。

B-11. GPDH 活性の測定、オイルレッド O 染色

脂肪細胞分化誘導因子を含むまたは含ま

ない培地で細胞を培養した後、脂質合成酵素である glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)の活性を GPDH Assay Kit (Primary Cell 社)を用いて測定した。また、細胞抽出液中のタンパク質濃度を測定し、GPDH の活性をタンパク質濃度で補正した。また、オイルレッド O 染色(Lipid Assay Kit; (Primary Cell 社))を用いて細胞内の脂肪滴を染色した。

B-12. 骨芽細胞への分化誘導

マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞をハンギングドロップで2日間培養してEBを形成させた後、100 nM の RA を含む分化培地で3日間浮遊培養し、その後 RA を除いた分化培地でさらに2日間浮遊培養した。なお、骨芽細胞への分化誘導においては0、2、5日目に Ad ベクターを用いて骨芽細胞分化に必須の Runx2 遺伝子を導入した(triple transduction)。7日目にゼラチンコートディッシュに播種した ES-EB および iPS-EB は骨芽細胞分化用の液性因子(50 μ g/mL ascorbic acid 2-phosphate (Sigma 社)、5 mM β -glycerophosphate (Sigma 社)、10 nM dexamethasone (Wako 社))を分化培地に加え、2-3日おきに培地交換をしながら培養した。15日間培養した後、骨芽細胞への分化効率を評価した。

B-13. ALP 活性の測定

骨芽細胞への分化誘導を行った細胞を 1/100 量のプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 100 μ L の ALP 用 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM MgCl $_2$ 、0.1% Triton X-100) に懸濁し、氷上で 30 分静置した。細胞懸濁液を凍結融解後、15,000 x g、4°C

条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。サンプル中の ALP 活性は LabAssay ALP Kit (Wako 社)を用いて測定した。またサンプル中のタンパク質濃度を測定し、ALP 活性をタンパク質濃度で補正した。

B-14. von Kossa 染色、カルシウム定量

von Kossa 染色は以下の方法で行った。分化誘導を行った細胞を 4% PFA/PBS により室温条件下で 5 分間固定し、次に 5% AgNO₃ を加えて UV ランプ下で 1 時間静置することにより染色した。カルシウム定量の際は、細胞を PBS で洗浄し、0.5 M acetic acid を加えて室温で一晩浸とうした後、15,000 x g で遠心して上清を回収した。上清サンプル中のカルシウムは Calcium C-test Wako Kit (Wako 社)を用いて定量し、遠心後のペレットから DNeasy Tissue and Blood Kit (Qiagen 社)を用いてゲノム DNA を抽出することにより、カルシウム沈着量をゲノム DNA で補正した。

B-15. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 および 253G1 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は 4 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF) を含む霊長類 ES 細胞用培地 (ReproCell) にて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞 (MEF, Chemicon) 上で培養した。ヒト iPS 細胞の 201B7 株は Myc を含む 4 因子 (Oct-3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc) を、253G1 株は Myc を含まない 3 因子 (Oct-3/4, Sox2, Klf-4) を、それぞれヒト皮膚繊維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts, HDF) へ遺伝子導入することにより樹立された。5-7 日ごとにコラゲナーゼとスクレイパーまた

は、霊長類 ES 細胞用細胞剥離液 (CTK) を用いてヒト iPS 細胞コロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。ヒト iPS 細胞を単細胞で継代する時は、継代の前に 10 μ M の ROCK 阻害剤 (Y-27632, Wako) を含む培地中で 1 時間培養し、CTK を用いてヒト iPS 細胞コロニーを回収した後ピペッティングによりヒト iPS 細胞を単細胞にした。その後 MEF に播種し、10 μ M の ROCK 阻害剤を含む培地にて 12 時間培養した。その後は ROCK 阻害剤を含まない培地で培地交換を行った。

B-16. 免疫染色

2 well チャンバースライドに播種したヒト iPS 細胞を PBS にて 2 回洗浄し、4% PFA/PBS を加えて室温で 15 分固定した後、2% BSA/PBS でブロッキングを行った。Oct-3/4、Nanog を検出する時はブロッキングの後に 0.2% Triton X-100/PBS にて細胞透過処理を行った。一次抗体として mouse anti-Oct-3/4 antibody (Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-human CAR monoclonal antibody (Upstate Biotechnology) を 4°C で一晩反応させ、続いて fluorescein isothiocyanate (FITC) または Alexa Fluor594 で標識した 2 次抗体 (それぞれ BD Bioscience, Molecular Probe) を室温で 1 時間反応させた。その後、ProlongGold with DAPI を用いて核染色および封入を行い、蛍光顕微鏡 (BIOREVO、キーエンス) にて観察した。なお、Ad ベクターにて遺伝子導入したヒト iPS 細胞の免疫染色は、ヒト iPS 細胞へ Ad-EF-mCherry を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させて 48 時間後に上述の手順で行った。

C. 研究結果

これまでの研究から、マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞と同じ遺伝子発現パターンを有していることが示されている。そこで、本研究で使用しているマウス iPS 細胞もその特徴を保持しているかどうかを RT-PCR 法により解析したところ、マウス iPS 細胞は、未分化マーカーである Oct-3/4 や Nanog をマウス ES 細胞と同様に強く発現していることが確認できた(Fig. 1A)。なお、本研究で使用しているマウス iPS 細胞株 20D17 は Nanog プロモーターの下流に GFP/IRES/ピューロマイシン耐性遺伝子の発現カセットを挿入した細胞であるため、未分化マウス iPS 細胞でのみ GFP の発現がみられる。また、胚様体(embryoid body; EB) 形成によりマウス iPS 細胞の未分化マーカーの遺伝子発現量は減少し三胚葉系のマーカー遺伝子(外胚葉; FGF5, Nestin, 中胚葉; brachyury T, flk-1, 内胚葉; GATA6, AFP) の発現は上昇していることが観察され(Fig. 1A)、マウス iPS 細胞の遺伝子発現パターンはマウス ES 細胞のそれと一致していることが示された。

従来型 Ad ベクターによる遺伝子導入には CAR の発現量が重要であることが知られている。そこで、マウス iPS 細胞の CAR の発現を RT-PCR 法およびフローサイトメトリーにより解析した結果、マウス iPS 細胞およびマウス iPS 細胞由来 EB (iPS-EB) はそれぞれマウス ES 細胞およびマウス ES 細胞由来 EB (ES-EB) と同程度の CAR を発現していることが明らかとなった(Fig. 1A, 1B)。なお、95%以上の GFP 発現未分化 iPS 細胞が CAR を発現していることが確認され、Ad ベクターによる遺伝子導入が可能で

あることが示唆された。そこで次にマウス iPS 細胞への遺伝子導入に適した Ad ベクターを調べるため、プロモーターの異なる LacZ 発現 Ad ベクター(Ad-RSV-LacZ、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ) を用いて遺伝子導入効率を検討した。また、外来遺伝子を発現しない Ad ベクターである Ad-null をコントロールベクターとして用いた。それぞれの Ad ベクターを 3,000 VP/cell の濃度でマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞へ作用させ、翌日に X-gal 染色を行った。その結果、マウス ES 細胞の結果と同様に、CA および EF-1 α プロモーターはマウス iPS 細胞においても極めて効率良く遺伝子導入できることが示された(Fig. 2)。なお、マウス iPS 細胞においても RSV および CMV プロモーターはほとんど機能しなかった(Fig. 2)。次に、GFP を発現する未分化マウス iPS 細胞への遺伝子導入が可能かどうかを調べるために、赤色蛍光蛋白質である mCherry を発現する Ad ベクター、Ad-CA-mCherry および Ad-EF-mCherry を作製し、マウス iPS 細胞への遺伝子導入を行った。フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡を用いて mCherry 発現を解析した結果、Ad-CA-mCherry または Ad-EF-mCherry をマウス iPS 細胞へ作用させることにより、GFP 発現未分化 iPS 細胞へ効率良く遺伝子導入できることが示された(Fig. 3A, 3B, and data not shown)。さらに、mCherry の発現量は Ad ベクターの作用量依存的に上昇し、Ad-CA-mCherry または Ad-EF-mCherry を 10,000 VP/cell の濃度で作用させることにより 90%以上の iPS 細胞に対して遺伝子導入可能であることが明らかとなった(Fig. 3C and data not shown)。また、いずれの Ad ベ

クターの作用量においても GFP 陽性細胞の割合が変わっていないことから、Ad ベクターによる遺伝子導入後の iPS 細胞は未分化を維持していることが示された(Fig. 3D)。なお、マウス iPS 細胞が Ad ベクターによる遺伝子導入後に未分化性を維持していることはアルカリフォスファターゼ活性および Oct-3/4 の発現が維持されていることから実証された(Fig. 4A)。さらに、Ad ベクターによる遺伝子導入後の iPS 細胞の生細胞数を計測したところ、10,000 VP/cell の濃度で作用させた場合はわずかに生細胞数が減少するものの(有意差はなし $p > 0.05$)、3,000 VP/cell で作用させた場合には未処理の iPS 細胞と同程度の生細胞数であり、これらの結果はマウス ES 細胞と一致していた(Fig. 4B)。したがって、Ad ベクターによる遺伝子導入はマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞へほとんど細胞毒性を示さないことが明らかとなった。以上の結果から、マウス iPS 細胞へ効率良く遺伝子導入するには CA または EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクターが適していることが明らかとなり、マウス iPS 細胞は Ad ベクターを用いた遺伝子導入系においてもマウス ES 細胞と同様の特徴を示すことが明らかとなった。

次に、上述の LacZ 発現 Ad ベクターを用いてマウス iPS-EB への遺伝子導入を行った。その結果、これまでに我々が報告しているように(Tashiro K et al. *J. Gene Med.*, 2008, 10, 498-507)、ES-EB においては CA プロモーターを有する Ad ベクターが最も高い遺伝子発現を示した(Fig. 5A, upper)。同様に、iPS-EB においても、調べた 4 種類のプロモーターの中では CA プロモーターが最も高い遺伝子発現活性を有していた(Fig.

5A, lower)。興味深いことに、CMV プロモーターはマウス ES 細胞、ES-EB、未分化 iPS 細胞において活性が低いにも関わらず、iPS-EB においては比較的高い遺伝子発現を示した(Fig. 5)。これらの結果から、マウス ES 細胞およびマウス ES-EB と同様に、マウス iPS 細胞およびマウス iPS-EB においてもプロモーターの選択が効率の良い遺伝子発現には重要であることが示された。

これまでに CA または EF-1 α プロモーターを有する従来型 Ad ベクターを用いることにより、マウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入に成功した。そこで次に最適化した Ad ベクターを用いてマウス iPS 細胞へ分化関連遺伝子を導入することにより、液性因子のみを利用する従来の誘導法よりも効率良く目的の細胞へ分化誘導できるかどうか検討した。まず両細胞に脂肪細胞分化のマスター遺伝子である PPAR γ 遺伝子を導入することにより、脂肪細胞への効率的な分化誘導が可能かどうか検討した。CA プロモーター制御下でマウス PPAR γ 遺伝子を発現する Ad ベクター、Ad-CA-PPAR γ をマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞へ作用させた後に EB を作製し、さらに同 Ad ベクターを 2 日目の EB および 5 日目の EB に作用させた(triple transduction)。その後脂肪細胞分化用の液性因子中で 15 日間培養することにより脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞への分化効率をオイルレッド O 染色により評価した結果、iPS 細胞の脂肪細胞への分化効率は ES 細胞の分化効率よりも低いものの、液性因子を作用させて培養することにより細胞内に脂肪滴が観察された(Fig. 6A, a, b, e, f)ことから、iPS 細胞は ES 細胞と同じ誘導法で脂肪細胞へ分化するこ

とが明らかとなった。また、液性因子のみを用いた分化誘導法と比較し、液性因子を加えさらに Ad ベクターによる PPAR γ 遺伝子を導入した ES 細胞および iPS 細胞は、極めて効率良く脂肪細胞へ分化することも示された(Fig. 6A, d, h)。さらに、Ad ベクターを用いた PPAR γ 遺伝子導入による脂肪細胞への分化効率の上昇は、GPDH 活性の上昇および脂肪細胞特異的なマーカー遺伝子の発現上昇によっても確認された(Fig. 6B, 6C)。興味深いことに、Ad ベクターによる PPAR γ 遺伝子導入後の脂肪細胞への分化効率は、iPS 細胞の方が増大していた。すなわち、ES 細胞においては PPAR γ 遺伝子による GPDH 活性の上昇は約 2 倍であったのに対し、iPS 細胞においては GPDH 活性が約 4 倍上昇していた(Fig. 6B)。なお、コントロールとして LacZ 遺伝子を導入した ES 細胞、iPS 細胞においては、脂肪細胞への分化効率が上昇することはなかった。これらの結果から、マウス ES 細胞と同様に、マウス iPS 細胞は脂肪細胞への分化能力を有していること、そして脂肪細胞への分化効率は Ad ベクターを用いた PPAR γ 遺伝子の導入により飛躍的に上昇することが示された。

次に、マウス iPS 細胞からの骨芽細胞への分化誘導を行うとともに、Ad ベクターを用いた iPS 細胞への Runx2 遺伝子導入により骨芽細胞への分化効率が改善されるかどうか併せて検討した。Runx2 遺伝子は骨芽細胞分化に必須の転写として知られている遺伝子である。マウス ES 細胞、マウス iPS 細胞へ CA プロモーターを有する従来型 Ad ベクターにより LacZ 遺伝子または Runx2 遺伝子を導入し、骨芽細胞用の液性因子中で 15 日間培養した。まず、初期骨芽

細胞分化のマーカーである ALP 活性を測定したところ、期待通り Runx2 導入細胞において高い活性が認められた(Fig. 7A)。そこで次に、iPS 細胞が成熟骨芽細胞へ分化しているかどうかを von Kossa 染色により石灰化を検出した。その結果、iPS 細胞は ES 細胞と同じ誘導法を用いることにより、骨芽細胞への分化することが明らかとなった(Fig. 7B, a, b, e, f)。なお、マウス ES 細胞の結果と同様に、骨芽細胞の石灰化は Runx2 遺伝子の導入によりさらに上昇していることが確認された(Fig. 7B, d, h)。また、カルシウムの沈着を定量したところ、LacZ 遺伝子導入群においては液性因子のみの誘導法と著差は認められなかったものの、Runx2 遺伝子導入細胞においては約 8 倍のカルシウムが蓄積していた(Fig. 7C)。この結果からも Runx2 遺伝子導入細胞の石灰化が上昇していることが確認された。また、骨芽細胞分化のマーカー遺伝子を RT-PCR 法により解析した結果、Runx2 遺伝子導入細胞は Runx2、osterix、bone sialoprotein、osteocalcin、collagen I 遺伝子の発現上昇が認められた(Fig 7D)。したがって、Ad ベクターを用いたマウス iPS 細胞への分化関連遺伝子の導入により、脂肪細胞分化だけでなく骨芽脂肪分化においても分化効率を劇的に改善できることが示され、本研究において確立した遺伝子導入法はマウス iPS 細胞を用いた細胞分化研究に有用であることが示された。

Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞への遺伝子導入法を確立するため、プロモーターの異なる LacZ 発現従来型 Ad ベクターを作用させて遺伝子導入効率を検討した。ヒト iPS 細胞は、Myc を含む 4 因子の遺伝子導入により樹立された 201B7 株と、Myc を含まない 3 因

子の遺伝子導入により樹立された253G1株を用いて検討した。その結果、いずれの従来型Adベクターを使用してもヒトiPS細胞コロニーの辺縁部においてはLacZ発現が認められるものの、コロニーの中心部ではほとんど発現が認められなかった (Fig. 8)。

ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞と同様、単細胞にして継代すると生存率が著しく低下するため、コロニーで継代する必要がある。しかしながらコロニーを形成しているヒトiPS細胞においてはAdベクターが細胞内に侵入できていない可能性が考えられたため、ヒトiPS細胞を単細胞にまで解離してAdベクターを作用させることを考えた。ヒトES・iPS細胞を単細胞にまで解離して継代すると生存率は著しく低下するが、ROCK阻害剤がヒトES細胞継代時における細胞死を抑制することが報告され、さらに、ROCK阻害剤はヒトiPS細胞継代においても細胞死を抑制できることが示されている。そこでROCK阻害剤により単細胞にまで解離したヒトiPS細胞(201B7)にAd-EF-mCherryを作用させ、その48時間後のOct-3/4の発現と共に解析した。その結果、mCherryの発現は70-80%のヒトiPS細胞コロニーにおいて観察され、さらに、これらの細胞はOct-3/4を発現していることが明らかとなった (Fig. 9)。したがって、EF-1 α プロモーターを有するAdベクターはOct-3/4を発現しているヒトiPS細胞の未分化な部分へ遺伝子導入されていることが示された。

D. 考察

マウスiPS細胞を用いた研究により、外来遺伝子を効率良く導入できれば、iPS細胞の機能細胞への分化を遺伝子導入により自由に制御できる可能性が示された。しか

しながら、ヒトiPS細胞においてはAdベクター単独では遺伝子導入効率が極めて低く、ROCK阻害剤を併用することで初めて遺伝子導入が可能であった。ROCK阻害剤が分化誘導に悪影響を及ぼすことも考えられるため、今後は薬剤併用を伴わない遺伝子導入ベクターの開発が重要であると考えられる。また、iPS細胞は分化効率においてクローン間の差が大きいことが指摘されており、種々のiPSクローンをを用いた検討も重要になると思われる。

E. 結論

マウスiPS細胞に対する高効率遺伝子導入法を確立した。また、その技術を用いることにより、従来法より高い効率で脂肪細胞や骨芽細胞に分化誘導することが可能となった。ただし、ヒトiPS細胞では、マウスiPS細胞と同様の手法では効率良い遺伝子導入ができず、ROCK阻害剤を併用することで改善がみとめられた。これらの知見は今後の薬物毒性スクリーニング用細胞作製に有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro K, Kondo A, Kawabata K, Sakurai H, Sakurai F, Yamanishi K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 127-132 (2009).

2. Tashiro K, Kawabata K, Sakurai H, Kurachi S, Sakurai F, Yamanishi K, Mizuguchi H.