

D. 考察

多くの iPS 細胞が樹立され、さらに分化誘導技術が進む中、分化効率のより良い細胞株を未分化状態から予測することも重要な評価項目となると考えられる。今回、我々は未分化状態における遺伝子プロファイリングを検討したが、一般的に使用されている未分化マーカー遺伝子発現を解析しても、顕著な所見が得られないことが明らかとなった。むしろ、癌関連遺伝子などの発現の解析を行うことにより細胞株の評価を行うことが示唆された。品質評価を行うに当たり、従来解析されてきた遺伝子群では十分ではないとすれば、より多くの遺伝子発現について解析が可能な DNA アレイを用いた解析などの使用が考えられるが、PCR 法を用いて発現を再確認する必要があり、また、高価となる。癌関連遺伝子やシグナル関連遺伝子などの PCR アレイを用いて、解析していくことにより、評価に用いることが可能な遺伝子群が明らかとなることが予測される。今後、他研究プロジェクトに

おいて、評価に用いる遺伝子群の同定を行う予定である。

また、今回報告した我々の内胚葉細胞への分化プロトコールは、これまで報告されている内胚葉細胞への分化誘導方法に比べ、安価で簡便な方法である。さらに内胚葉細胞への分化効率が、本研究事業の成果であるアデノウィルスベクターによる高効率な成熟肝細胞への分化(Inamura et al. 2010)と相関性があることが示唆された。この結果から、分化誘導せず、早期の分化段階での選択が可能になり、評価のコストおよび時間短縮が期待される。

E. 結論

我々が開発したハイスループットな内胚葉分化誘導効率評価方法は、ヒト肝細胞への分化効率を予測することが可能であることが示唆され、安定で簡便、安価な方法であり、細胞機能評価方法としての利用が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Molecular Therapy* Feb;19(2):400-7 (2010)
- (2) Yohei Hayashi, Techuan Chan, Masaki Warashina, Masakazu Fukuda, Takashi Ariizumi1, Koji Okabayashi, Naoya Takayama, Makoto Otsu, Koji Eto, Miho Kusuda Furue. Tatsuo Michiue, Kiyoshi Ohnuma, Hiromitsu Nakauchi, Makoto Asashima. Reduction of N-glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or cultured under Feeder- and Serum-free Defined Conditions. *Plos One* Nov 23;5(11) (2010)
- (3) Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H., Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* Oct;12(5):501-7 (2010)
- (4) Yuko Aihara, Yohei Hayashi, Mitsuhi Hirata, Nobutaka Ariki, Shinsuke Shibata, Narihito Nagoshi, Mio Nakanishi, Kiyoshi Ohnuma, Masaki Warashina, Tatsuo Michiue, Hideho Uchiyama, Hideyuki Okano, Makoto Asashima and Miho Kusuda Furue. Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. *The international Journal of Developmental Biology* 54: 1287 - 129 (2010)
- (5) Jie Na, Miho K. Furue and Peter W. Andrews. Inhibition of ERK1/2 Prevents Neural and Mesendodermal Differentiation and Promotes Human Embryonic Stem Cell Self-renewal. *Stem Cell Research* 5(2):157-69 (2010)
- (6) Miho Kusuda Furue. Daiki Tateyama, Masaki Kinehara, Jie Na, Tetsuji Okamoto, J. Denry Sato. Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 46: 573-576 (2010)
- (7) S. Mimura, N. Kimura, M. Hirata, D. Tateyama, M. Hayashida, A. Umezawa, A. Kohara, H. Nikawa, T. Okamoto, M. Kusuda Furue. Growth Factor-Defined Culture Medium for Human Mesenchymal Stem Cells. *The international Journal of Developmental Biology*, Doi: 10.1387 (2011)

2. 学会発表

【国際学会】

- (1) Masaki Kinehara, Daiki Tateyama, Hiroko Matsumura, Miho Kusuda Furue

Development of an alkaline phosphatase activity-based high throughput screening assay using human iPScells with chemically defined culture conditions. 第8回 ISSCR 6月 サンフランシスコ

(2) Mitsuhi Hirata, Midori Hayashida, Daiki Tateyama, Yutaka Ozawa, Hiroko Matsumura, Masashi Iemura, Arihiro Kohara, Miho Kusuda Furue Comparison analysis of characteristics among human iPS, ES and neuroblastoma cell lines. 第8回 ISSCR 6月 サンフランシスコ

【国内学会】
(一般演題)

(3) Masaki Kinehara, Miho Kusuda Furue Development of an alkaline phosphatase activity-based high throughput screening assay using human iPS cells with chemically defined culture conditions. 日本組織培養学会第83回大会【口頭発表】 5月 岡山

(4) 三村 純代、木村 直大、平田 みつひ、館山 大輝、林田 みどり、小原 有弘、岡本 哲治、二川 浩樹、古江一楠田 美保 TGF- β 1は未分化性と多分化能を維持したヒト間葉系幹細胞増殖を促進する。日本組織培養学会第83回大会【口頭発表】 5月 岡山

(5) 稲村充、川端健二、高山和雄、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田 美保、水口裕：HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導。第16回肝細胞研究会【口頭発表】6月 秋田

(6) 鍋島巧 マウス人工多能性幹(iPS)細胞の未分化性と多分化能を維持した単層

無血清培養系の確立。第64回日本口腔科学会学会術集会6月 北海道

(7) 高山和雄、稲村 充、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田 美保、川端健二、水口裕之：SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・ヒト iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導。第17回 肝細胞研究会 6月 秋田

(8) 高山和雄、稲村 充、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田 美保、川端健二、水口裕之：SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・ヒト iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的な分化誘導。第9回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2010 10月 京都

(9) 山崎佐知子 マウス人工多能性幹(iPS)細胞の無血清培養系の確立。第47回日本口腔組織培養学会学会術大会 平成22年11月 高知

(10) 高山和雄、稲村 充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田 美保、水口裕之：SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・ヒト iPS 細胞からの内胚葉あるいは胚体外内胚葉への選択的な分化誘導。第10回 日本再生医療学会総会 2011年3月 東京

(11) 高山和雄、稲村 充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江一楠田 美保、水口裕之：HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・ヒト iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導。第131年会 日本薬学会 2011年3月 静岡

(シンポジウム・ワークショップ等)

(12) 古江一楠田 美保

スーパー特区「ヒト iPS 細胞を用いた新

規 in vitro 毒性評価系の構築」

セミナー バンク事業及び幹細胞全般の
状況について 日本製薬工業協会 5月 東
京

(13) 古江一楠田 美保 上田忠佳、浅香
勲、藤井万紀子、坂野俊宏

細胞培養士の育成に向けて培養指導士養
成講習会 研究教育システム委員会主
催・細胞 培養技術講習会 日本組織培養
学会第83回大会 5月 岡山

(14) 小原有弘、古江一楠田 美保

マイコプラズマ汚染の現状と論文投稿に
おける国際動向 日本組織培養学会第83回
大会 ワークショップ 5月 岡山

(15) 古江一楠田 美保

ヒト iPS 細胞培養の経験

S-イノベ網膜細胞移植医療に用いるヒト
iPS 細胞から移植細胞への分化誘導に係わ
る工程および品質管理技術の開発研究会合
8月 大阪

(16) 古江一楠田 美保

「Development of a drug toxicity test
using iPS cells and serum-free culture
conditions」第23回日本動物細胞工学会
2010年度国際会議 シンポジウム 9月 札
幌

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

分担研究者 高橋 一郎 (医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部難病資源研究室)
分担研究者 亀岡 洋祐 (医薬基盤研究所・難病・疾患資源研究部難病資源研究室)

研究要旨

iPS 細胞作製の効率は 低く0.2 % 前後である。昨年度既存のiPS細胞の発現解析をおこなったところNANOG 遺伝子の発現が昂進していることがみられたので、リプログラミング遺伝子としてNANOG遺伝子を加えた。またリプログラミング遺伝子を連結し続けて発現するようにして一つの組換えウィルスを作製し体細胞(皮膚線維芽細胞)に導入した。その結果多数のiPS細胞が得られた。これらのiPS細胞は導入した外来の遺伝子群の発現はなく、細胞自身の遺伝子の発現量が上昇していた。ただしNANOG遺伝子はもとの体細胞ではまったく発現がみられなかったが、iPS細胞では内在性の遺伝子の発現がみられるようになった。

A. 研究目的

iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に自己増殖能と多分化能をもつが、ヒト ES 細胞のようにヒトの初期胚を壊して作製するわけではないので、倫理的な問題を回避することができる。作製方法は体細胞(線維芽細胞など)にリプログラミングを起こさせる4遺伝子を導入することで ES 細胞様の自己増殖能と多分化能を持った細胞を得ることである。この過程ははなはだ効率が悪くだいたい 0.2 % 前後である。

そこで、効率よく体細胞を iPS 細胞化する技術を確認することは、iPS 細胞の研究や iPS 細胞を分化させて特定の体細胞にする技術の確立とともに、iPS 細胞の研究を進めるために重要であるという認識の下効率的な iPS 細胞の作製について検討を加えた。

B. 研究方法

iPS 細胞化するにあたって報告されている5遺伝子(POU5F1, SOX2, KLF4, NANOG, LIN28)を連続してつなげた(図2上)組換えレトロウィルスを作製し、ヒト成人皮膚細胞にレトロウィルスを感染させ遺伝子を発現させた。ウィルスからの遺伝子発現により体細胞を再

プログラミングすることで ES 様細胞となった細胞コロニーを分離した。皮膚由来の細胞を2種類用いて上記のリプログラミングを行った。iPS細胞の誘導には ES 培地(F12/DMEM, KSR, bFGF)を用い遺伝子導入後1カ月後にiPS様細胞のコロニーを分離した。分離した後、安定したiPS細胞からRNAを抽出して発現解析を行った。

C/D. 結果および考察

5種の遺伝子を連続してつないだ組換えレトロウィルスをヒト成人皮膚細胞に導入し、iPS細胞を分離した(図1左)。iPS細胞の分離はかなりクリティカルな部分があり未分化な細胞が即分化してしまうことがあった。iPS細胞として分離したものはES様細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ陽性であった(図1右)。分離したiPS細胞8株につき初期化遺伝子の発現をqPCRで解析したところ(図3)NANOG遺伝子に関しては、iPS細胞もとの体細胞で全く発現がみられていなかったもので表には載せていないが、POU5F1に関しては千倍、SOX2に関しては四百倍程度の上昇があった。KLF4遺伝子に関してはもとの体細胞の約半分に減り違いをみせた。また下記のXIST遺伝子については初期化がどこまでいくのかということを見るために解析したが、ヒトES細胞で

報告されているように値がばらついており ES 細胞と同様な性質をもつということが、これからも考えられた。このことより効率のよい方法として、いままで4遺伝子を導入していたが、NANOG 遺伝子も強制発現させる、という方法で iPS 化を効率よくさせることが可能になる。

E. 結論

リプログラミング遺伝子として既存の iPS 細胞で発現が昂進している NANOG 遺伝子を加えて体細胞をリプログラミングすることができた。分離した細胞はすべてアルカリフォスファターゼ陽性であった。さらにその中の 8 株について発現解析をおこなったところ、初期化遺伝子の POU5F1, SOX2 遺伝子の発現が体

細胞に比べ四百倍以上上昇していた。また既に作成された iPS 細胞の発現解析の結果より NANOG 遺伝子の重要性が考察され、NANOG 遺伝子を発現させることでリプログラミングが起きやすくなることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(論文発表)

関係論文なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

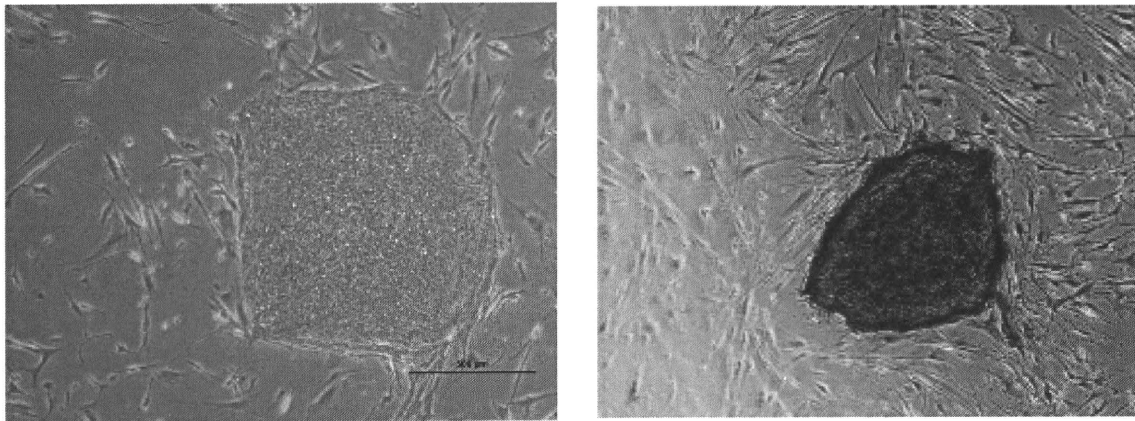


図1 iPS 細胞(左) アルカリフォスファターゼ染色(右)

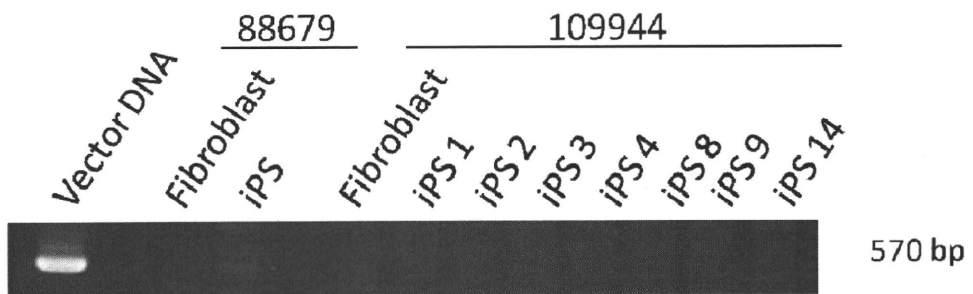
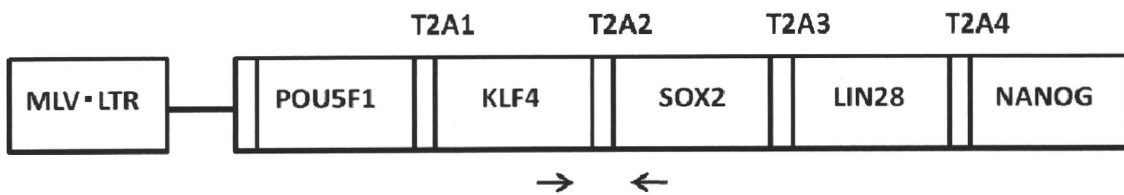


図2 導入した初期化遺伝子(上)とiPS 細胞での導入した遺伝子の発現の停止(下)

	88679	109944						
	PS	①	②	③	④	⑧	⑨	⑭
POU5F1	1,260	1,520	1,573	1,640	1,584	1,428	1,341	1,509
SOX2	317	410	369	407	596	436	364	302
KLF4	0.72	0.56	0.45	0.67	1.16	0.47	0.5	0.57
XIST	0.9	1.84	1.82	2.13	2.64	1.27	1.66	1.46

$\Delta \Delta Ct$

図3 iPS 細胞での遺伝子発現 もとの細胞との比較 (qPCR $\Delta \Delta Ct$ 法)

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

研究分担者 梅澤 明弘 独立行政法人国立成育医療研究センター 生殖・細胞医療研究部長

研究要旨：創薬研究への応用が期待されているヒト iPS 細胞に関して、医薬品開発に応用可能な新しい安全性・有効性の細胞評価系開発のための基盤研究を担当する。前年度までにヒト 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の品質管理・品質評価法の開発をおこない、特にヒト胎児肺組織由来細胞から樹立した iPS 細胞を用いて未分化性の安定評価のための基盤を確立した。本年度は、前年度に引き続き、羊膜由来組織から iPS 細胞を樹立し、これまで確立した未分化性評価に関する検証を行う。最終年度であるため、バイオインフォマティクスの手法を用いた包括的な解析を行い、再現性のある品質評価手法を確立した。

A. 研究目的

毒性安全性評価および創薬における医薬品候補物質の効率的なスクリーニングを図るうえで、生体組織に近い性質・機能を有した iPS 細胞を用いた評価系の確立は重要な課題である。そのため幹細胞の再現性や安定供給にむけた培養条件の開発、またその安全性・有効性の評価系の確立が必要である。そこで本研究では毒性安全性評価および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 iPS 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、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・品質管理法の開発を目的とする。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞による新規細胞評価系構築にとつて大事なことが元々の iPS 細胞が安定的に培養できるかどうかである。

(1) ゲノム安定性評価法の確立

前年度に引き続き培養過程における継代、凍結等ゲノム安定性に与える影響について核型解析ならびにアレイ CGH により検定する。

(2) 未分化性安定評価法開発

ヒト iPS 細胞の継代過程における経時変化について、未分化マーカーの発現プロファイルを定量的 PCR により評価し、表面マーカーは免疫組織学的解析により行うことで、未分化性安定評価法の検定を行う。

(3) データの統合及びバイオインフォマティクスの手法を用いた解析

アレイ CGH、マイクロアレイ等で得られた

網羅的な発現データに付いて主成分解析、クラスターリング解析を行い、有用な評価指標を抽出する。また、エピゲノム解析を行う。

(倫理面への配慮)

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の樹立と基礎研究応用に関し、既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91、平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238、平成 19 年 11 月承認、受付番号 293、315、平成 20 年 10 月承認、受付番号 319、平成 20 年 12 月承認、承認番号 350、平成 22 年 1 月）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

C. 研究結果

(1) ゲノム安定性評価法

ヒト iPS 細胞の長期にわたる未分化性評価に加え、ゲノムレベルでの変異について検証した。その結果、前年度同様、染色体レベルおよびゲノムレベルで異常はほとんど検出されなかった。

(2) 未分化性安定評価法開発

ヒト羊膜細胞から樹立した iPS 細胞について、継代数に応じて未分化マーカーである *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *TERT* の遺伝子発現を、ヒト ES 細胞での発現を基準として定量 PCR を行った。その結果未分化マーカーの発現はヒト ES 細胞と比較していずれも同等もしくはそれ以上の発現が認められ、継代数による大きな変化は認めなかった。細胞表面マーカーについてもいずれも陽性であり未分化性を維持していることが示された。この方法で新たに樹立した羊膜由来の iPS 細胞で検証したところ、ほぼ同様な結果が得られた。

(3) データの統合及びバイオインフォマティクスの手法を用いた解析

アレイ CGH、マイクロアレイ等で得られた網羅的な発現データに付いて主成分解析、クラスタリング解析を行い、有用な評価指標を抽出した。また、エピゲノムの発現様式も視野に入れた解析を行った結果、iPS 細胞の分化傾向はメチレーションによって明確に規定されている箇所があることを明らかにした。

D. 考察

ヒト iPS 細胞の未分化マーカーによる評価系について経時的安定性について検証し品質管理技術をほぼ確立できた。また最もシビアな問題として考えられているゲノム変異について、染色体レベルおよびゲノムレベルでの検証法を確立した。本年度は特にエピゲノムまで解析範囲を広げた手法を確立することができた。この評価系を用いるで染色体異常を認める iPS 細胞の細胞形質を詳細に解析し、正常な iPS 細胞と比較検証する基盤ができ、毒性安全性評価および創薬開発に必要な良質な iPS 細胞とは何かということの規定することが可能となる。また未分化性評価とゲノム安定性評価による結果は現在の培養システムがヒト iPS 細胞を長期にわたって安定的に培養できていることを示している。今後、フィーダフリー、血清フリー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。その評価を行う対象となる培養システムが確立できたことは、フ

ィーダフリー、血清フリー培養下で長期にわたって安定した培養環境を構築し、品質管理・評価法の確立へとつながると考えられた。

E. 結論

ヒト iPS 細胞による新規細胞評価系構築にとって大事なことが元々の iPS 細胞が安定的に培養できるかどうかである。ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、iPS 細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。さらにゲノムレベル、エピゲノムでの安定性に関する解析を加え品質評価技術の基盤整備が整った。今後はフィーダフリー、血清フリー培養条件下での細胞についてこの評価系を応用して、毒性安全性評価および創薬開発に資する安定した評価技術の開発を行っていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. **Genes Cells**, 16(1):1-11, 2011.

Higuchi A, Ling QD, Ko YA, Chang Y, Umezawa A. Biomaterials for the Feeder-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. **Chem Rev**, dx.doi.org/10.1021/cr1003612, 2011.

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. **PLoS One**, 5(9):e13017, 2010.

Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 401(3): 480-486, 2010.

Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. **Curr Med Chem**, 17(28):3245-3252, 2010.

Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M. Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. **Biotechnol Bioeng**,

106(6): 860-870, 2010.

Fujino T, Nomura K, Ishikawa Y, Makino H,
Umezawa A, Aburatani H, Nagasaki K, Nakamura
T. Function of EWS-POU5F1 in sarcomagenesis
and tumor cell maintenance. **Am J Pathol**, 176(4):
1973-1982, 2010.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究報告書

レンチウイルスベクターを利用した iPS 細胞の作製とその評価に関する研究

分担研究者 形山 和史

大阪大学 大学院薬学研究科

分子生物学分野 助教

ヒト iPS 細胞の作製効率は非常に低く、形質転換に要する期間が 30 日程度と長期にわたる。さらに、研究グループ毎にヒト iPS 細胞作製因子の一部や遺伝子導入ベクターが異なっている。そこで、ヒト iPS 細胞作製因子と遺伝子導入ベクターの組み合わせ等を最適化することにより、効率良く、安全性に優れたヒト iPS 細胞作製システムを開発することを目指す。本年度は、アデノウイルスベクターが iPS 細胞の作製を阻害していること、その阻害効果は外来遺伝子導入効率とは相関しないことを明らかにした。今後はアデノウイルスベクターによる iPS 細胞作製阻害メカニズムを詳細に検討することにより、次世代の iPS 細胞作製技術開発へと繋がることが期待される。

A. 研究目的

安全に、一過的に、幅広い細胞種に対して高効率で遺伝子導入可能なアデノウイルス(Ad)ベクターは、iPS 細胞作製用ベクターとしての有用性が期待されていた。しかしながら、Ad ベクターを用いた iPS 細胞作製例はこれまでに僅か 2 例しか報告されておらず、その効率も極めて低い。また、我々のグループでも Ad ベクターを用いて iPS 細胞作製を試みたが、今のところ成功していない。

このような背景のもと、本年度は、Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を検討した。また、複数のファイバー置換型 Ad ベクターや HDAd ベクターを用いて検討を行うことで、Ad ベクターが iPS

細胞作製時に及ぼす影響について詳細に解析を行った。本研究は、Ad ベクターによる安全性の高い iPS 細胞作製法の開発のみならず、汎用されるレンチウイルスベクター等を用いた iPS 細胞作製法の更なる改良に繋がる知見を見出すための非常に重要な基盤研究として位置づけられる。

B. 研究方法

B-1. プラスミド構築

ヒト iPS 細胞誘導遺伝子を搭載したレンチウイルスベクタープラスミドは、遺伝子を CSII-EF-MCS-IRES2-Venus プラスミド（理化学研究所、三好浩之先生より供与）のマルチクロニング部位に挿入して得た。2A ペプチドを用いてヒト Oct3/4,

Sox2, Klf4 と c-Myc の 4 つの遺伝子をつなげたプラスミドは、それぞれの遺伝子を挿入したプラスミドを鋳型とし、2A ペプチドをコードする配列を含む合成オリゴプライマーを使用して **Overlapping PCR** 法により増幅後、プラスミドのマルチクローニング部位に挿入して作製した。

B-2. レンチウイルスベクターの作製

293T 細胞を poly-L-lysine (Sigma) でコートした 100mm dish へ 5×10^6 cells ずつ播種した。一晚培養後、各遺伝子を搭載したレンチウイルスベクタープラスミドを HIVgp 発現プラスミド、VSV-G, Rev 発現プラスミドと共に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。翌日、Forskolin (Sigma) を含む培地に交換し、トランスフェクションから 2-3 日培養後上清を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過してレンチウイルス溶液とした。レンチウイルス溶液は、 -80°C で保存した。レンチウイルスベクターのタイターは、HeLa 細胞にウイルス溶液を加えた時の GFP 陽性細胞の割合を FACS で求めることにより測定した。

B-3. 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のマルチクローニング部位に遺伝子を挿入し、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とライゲーションを行うことにより Ad ベクタープラスミドを得た。作製した Ad ベクタ

ープラスミドを Pac I で消化し、SuperFect (Qiagen) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、各 Ad ベクターを得た。定法により Ad ベクターの増殖、精製を行い、精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定した。

B-4. 細胞の培養

ヒト成体皮膚由来繊維芽細胞 (Human Dermal Fibroblast; HDF from 34 years old Caucasian female) は、Cell Applications 社から購入し、10% FCS を含む DMEM 培地で培養した。

B-5. レンチウイルスベクターを用いた iPS 細胞の誘導

HDF 細胞を 1×10^5 cells/60mm dish または 1×10^5 cells/6well plate へ播種し、翌日、レンチウイルス溶液とポリブレン ($4 \mu\text{g/ml}$) を含む培地で一晚培養した。レンチウイルス感染 6 日後に、トリプシンで細胞をはがし、あらかじめ MEF (Millipore-Chemicon) を播種したプレート上にまき直した。レンチウイルス感染 7 日後から bFGF (4ng/ml) を含むヒト iPS 細胞用培地 ReproStem (ReproCELL) に交換し、以後、1 日毎に培地を交換して培養を続けた。

B-6. アルカリフォスファターゼ染色

細胞を PBS で洗浄し、固定液 (4.5mM citric acid, 2.25mM sodium citrate, 3.0mM

sodium chloride, 65% methanol, 3% formaldehyde) で固定した後、反応液 (0.1M Tris-HCl (pH9.5), 0.25mg/ml Naphthol AS-BI phosphate (Sigma), 0.25mg/ml FAST Red violet LB salt (Sigma)) を添加して室温で 15 分間反応させた

C. 研究結果

Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を検討した。また、その原因について検討するために、複数のファイバー置換型 Ad ベクターや Helper-dependent (HD) Ad ベクターを利用した。

ヒト iPS 細胞の作製阻害効果は、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4 と c-Myc) を同時に発現するレンチウイルスベクター 4F(2A) と Oct3/4 遺伝子を発現するレンチウイルスベクター OG(2A) (Fig.1A) をヒト成体皮膚由来繊維芽細胞 (HDF 細胞) へ共導入し、出現するアルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニー数を測定することで評価した。また、本研究で利用した HDAd ベクター (HD-Ad5-CMV-GFP) が、従来型 Ad ベクター (Ad5-CMV-GFP) と同程度の遺伝子導入効率を示すことを HeLa 細胞で確認した (Fig.1B)。

GFP を発現する Ad ベクターを HDF 細胞へ導入し、FACS を用いて遺伝子導入効率を調べた。各種 Ad ベクターを高タイトル (10,000vp/cell) で HDF 細胞へ加えた時の遺伝子導入効率は、従来型 Ad ベクター (Ad5-CMV-GFP) で約 48% であったが、2 種類のファイバー置換型 Ad ベクター (AdF35-CMV-GFP および AdK7-CMV-GFP) では 90% 以上と非常に高効率であった。一方、HDAd ベクター

(HD-Ad5-CMV-GFP) では、導入遺伝子の発現は約 2% とほとんど見られなかった (Fig.2A)。次に各種 Ad ベクターの量を減らして (1,000vp/cell) HDF 細胞へ加えた時の遺伝子導入効率は、従来型 Ad ベクター (Ad5-CMV-GFP) で約 9% であり、2 種類のファイバー置換型 Ad ベクター (AdF35-CMV-GFP および AdK7-CMV-GFP) ではそれぞれ約 65% と約 52% であった。一方、HDAd ベクター (HD-Ad5-CMV-GFP) では、導入遺伝子の発現は約 1% とほとんど見られなかった (Fig.2B)。なお、本実験で用いた各種ベクターと同一ロットのベクターストックを、以降の検討においても使用した。

Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害するか否かを評価するため、各種 Ad ベクターを 1 回感染させた HDF 細胞と感染させていない HDF 細胞へレンチウイルスベクターで山中 4 因子を導入し、アルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニー数を測定した (Fig.3A)。Ad ベクターを加えていない条件 (*Control*) では、約 0.03% の効率でアルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニーが出現した。それに対して、先の検討で HDF 細胞への遺伝子導入がほとんど観察されなかった HDAd ベクターを含め、Ad ベクターを加えるとアルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニーが現れなくなった (Fig.3B)。

次に Ad ベクターの量を減らして (1,000vp/cell) 同様の実験を行った (Fig.4A)。その結果、従来型 Ad ベクター (Ad5-CMV-GFP) やファイバーをポリリジン配列に置換した K7 型の Ad ベクター (AdK7-CMV-GFP) では、アルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニーが現れなかった。一方、HDAd ベクター

(HD-Ad-CMV-GFP) やファイバーを従来型 Ad ベクターとは受容体が異なる 35 型のファイバーに置換した F35 型の Ad ベクター (AdF35-CMV-GFP) では、Ad ベクターを加えなかった条件 (*Control*) に比べて減少したものの、アルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニーが出現した。

最後に、Ad ベクターを加えるタイミングを変更して同様の実験を行った。レンチウイルスベクターで 4 因子を導入し、その 3 日後に 1 度細胞を継代した。その翌日、各種 Ad ベクターを加えて培養を続けた (Fig.5B)。その結果、前述の検討と同様に、従来型 Ad ベクター (Ad5-CMV-GFP) や K7 型の Ad ベクター (AdK7-CMV-GFP) では、アルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニーが現れなかった。一方、HDAd ベクター (HD-Ad-CMV-GFP) や F35 型の Ad ベクター (AdF35-CMV-GFP) では、アルカリフォスファターゼ陽性のヒト ES 細胞様コロニーが出現した (Fig.5B)。

D. 考察

昨年度の研究では、レンチウイルスベクターを用いた場合には、山中 4 因子を同時に発現するレンチウイルスベクターと Oct3/4 を単独で発現するレンチウイルスベクターを HDF 細胞へ共導入した時にのみヒト iPS 細胞のコロニーが多く出現し、効率よくヒト iPS 細胞を誘導するためには Oct3/4 の発現量が他の因子よりも多く必要であることを明らかにした。現在のところ、同様の方法でヒト iPS 細胞を再現性良く作製することに成功している。一方、Ad ベクターを用いた場合には、ファイバー改変型 Ad ベクターを用いることでヒト繊維芽細

胞への高効率遺伝子導入を達成したが、ヒト iPS 細胞の作製には成功していなかった。そこで本研究では、Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を検討した。また、Ad ベクターによる iPS 細胞作製阻害メカニズムを考察するために、タイプの異なるファイバー置換型 Ad ベクターや HDAd ベクターを用いて検討した。

汎用されている E1 欠損型 Ad ベクターは、Ad ゲノム (約 36kbp) の複製の開始に必要な E1 領域を欠損しているため、E1 遺伝子を持たない通常の細胞では増殖しない。しかしながら、E1 領域以外の Ad ゲノムが残っているため、弱いながらもウイルス由来遺伝子の転写・翻訳が起こること (VA-RNA、pIX、Hexon、E2、E4 等) が知られている。それに対して、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域 (左端約 0.4kb、右端約 0.2kb) 以外のすべてのウイルス遺伝子を欠損させた HDAd ベクターでは、ウイルス由来 RNA やタンパクは産生されない。そのため、従来型 Ad ベクターあるいは HDAd ベクターを細胞へ加えた場合の iPS 細胞作製効率が異なれば、Ad ゲノムが iPS 細胞作製へ何らかの影響を与えていることが予想される。

本研究では、Ad ベクターを高タイターで細胞へ加えた場合には、いずれの Ad ベクターを加えた場合にもヒト ES 細胞様コロニーが出現しなくなった (Fig.3)。そのため、Ad ベクターは iPS 細胞作製を阻害している可能性が考えられた。また、細胞へ加える Ad ベクターの量を減らした場合においてもヒト ES 細胞様コロニーの出現効率は減少し、その減少率は Ad ベクターの種類により異なっていた (Fig.4B)。これらの結果は Ad ベクターを加えるタイミングを変更しても同様であった (Fig.5B)。HDAd ベクターを加えた場合には、従来型

Ad ベクターに比べて阻害効果が減弱し、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が認められた (Fig.4B, 5B)。本結果から、Ad 由来ゲノム配列の存在が iPS 細胞作製阻害へ何らかの影響を与えている可能性も考えられた。ただし、原因は不明であるが HDF 細胞では HDAd ベクターの遺伝子導入効率が極めて低い為、Ad ゲノムが iPS 細胞作製阻害へ与える影響については検討の余地があると考えられる。一方、従来型 Ad ベクターの量を減らした場合には、細胞への外来遺伝子の導入効率が低いにも関わらず (Fig.2B)、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が強く阻害された (Fig.4B, 5B)。また、ファイバーを 35 型へ置換した Ad ベクター (AdF35-CMV-GFP) を加えた場合には、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が認められた (Fig.4B, 5B)。従来型 Ad ベクターは細胞表面上の CAR を受容体として利用するのに対して、35 型ファイバーは CD46 を受容体として利用する。このような違いが iPS 細胞作製阻害効果の違いに反映される可能性も考えられた。なお、外来遺伝子の導入効率と iPS 細胞作製阻害効果の相関は、本研究では確認できなかった。

Ad ベクターを用いた iPS 細胞作製に関する論文は 2 報存在するが、それらの iPS 細胞作製効率は非常に低く、また特定の細胞からのみ樹立されている (マウス成体肝細胞より 0.0005% の効率で 3 株 ; ヒト胎児肺由来繊維芽細胞 (IMR-90) より 0.0002% の効率で 3 株)。これまでに、染色体への挿入がない一過的な遺伝子発現によるヒト iPS 細胞樹立の報告は存在するが、一過的な方法での iPS 細胞樹立効率は非常に低いことが知られており、改善の余地があると考えられる。本研究では、Ad ベクターが iPS 細胞の作製を阻害することを明らかとした。

今後は、Ad ベクターによる iPS 細胞阻害メカニズムを明らかにし、それらを回避可能な Ad ベクターを開発することで、安全なヒト iPS 細胞を効率良く作製する新規基盤技術の開発が期待できる。

E. 結論

数種類のファイバー置換型 Ad ベクターおよび HDAd ベクターを利用し、Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, in press.
- 2) Tashiro K, Kawabata K, Inamura M, Takayama K, Furukawa N, Sakurai F, Katayama K, Hayakawa H, Furue-Kusuda M, Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Rerogram.*, 12, 501-507 (2010)

2. 学会発表

- 1) 高山和雄, 稲村充, 川端健二, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京.
- 2) 高山和雄, 稲村充, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 川端健二, 水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的な分化誘導, 第 9 回次世代を担うファーマ・バイオフィォーラム 2010, 2010 年 10 月, 京都.
- 3) 稲村充, 川端健二, 高山和雄, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 水口裕之. HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導, 第 16 回肝細胞研究会, 2010 年 6 月, 秋田.
- 4) 高山和雄, 稲村充, 田代克久, 形山和史, 櫻井文教, 古江一楠田美保, 川端健二, 水口裕之. SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘

導, 第 16 回肝細胞研究会, 2010 年 6 月, 秋田.

G. 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

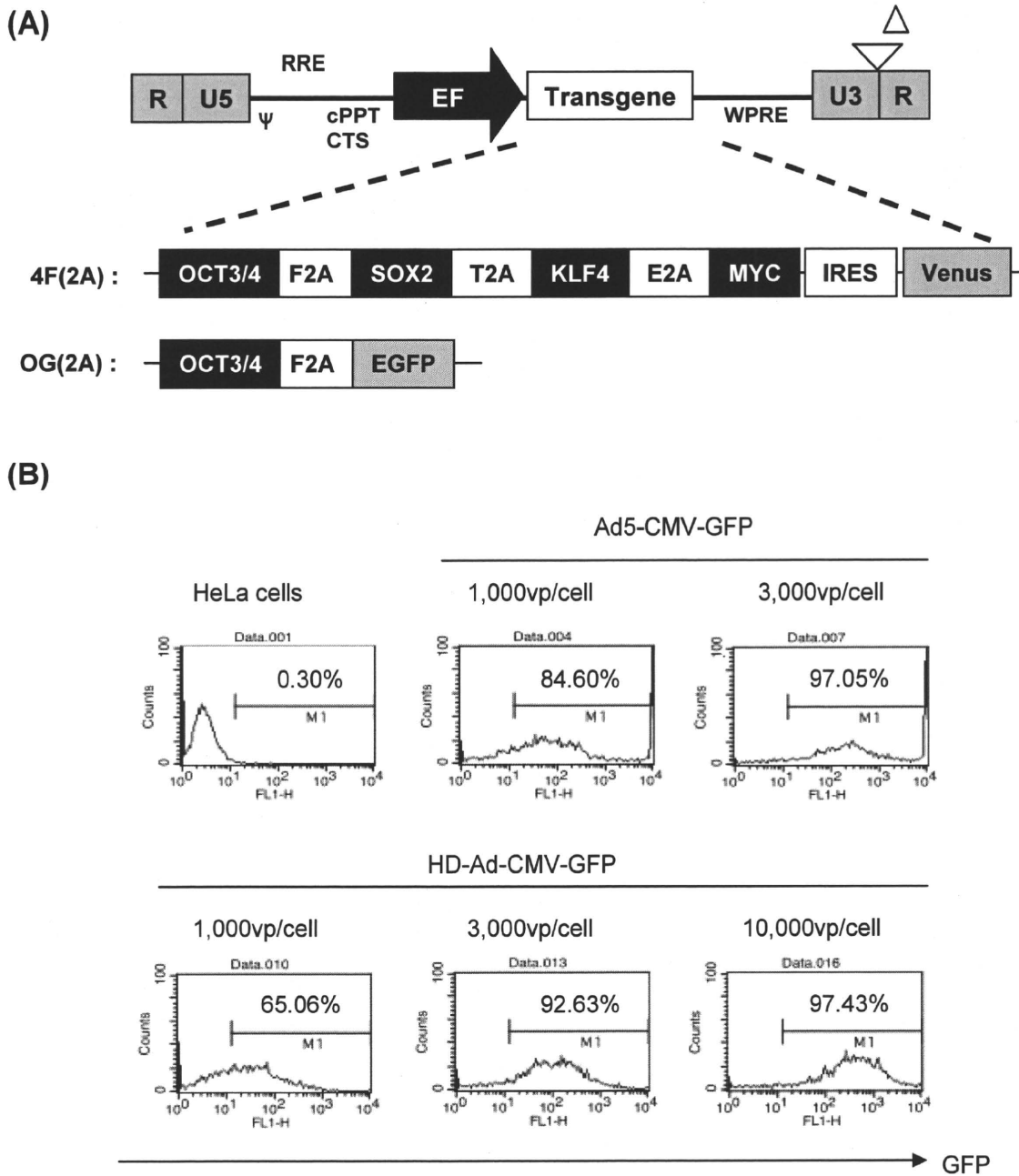
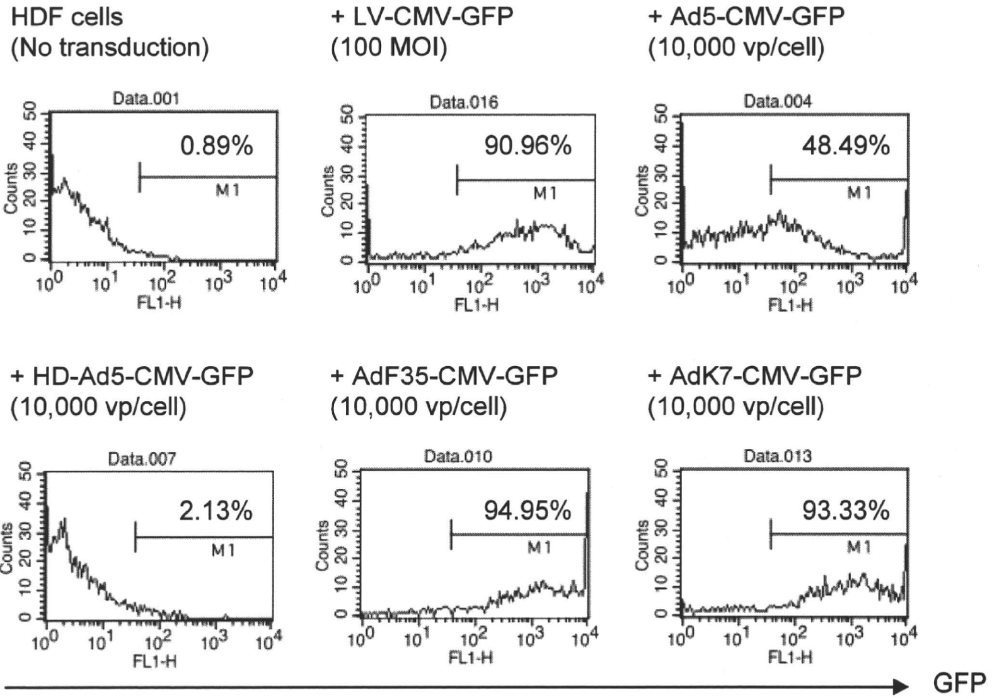


Fig. 1 Constructions of lentiviral vectors and Ad vector-mediated transduction efficiency in HeLa cells

(A) All transgenes were expressed under the control of the EF1- α promoter. Lentiviral vectors used in this study were developed in the RIKEN (Dr. Miyoshi Lab). Abbreviations: Ψ , Packaging signal; RRE, Rev responsive element; cPPT, Central polyuracine tract; CTS, Central termination sequence; WPRE, Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; F2A, 2A peptide sequence from foot-and-mouth disease virus (FMDV); E2A, 2A peptide sequence from equine rinitis A virus (ERAV); T2A, 2A peptide sequence from *Thosea asigna* virus (TaV)

(B) HeLa cells were transduced with GFP expressing Ad vectors for 1.5h. Two days after transduction, GFP positive cells were counted by flow cytometry analysis. Ad5: type 5 Ad vector; HD: helper dependent Ad vector.

(A)



(B)

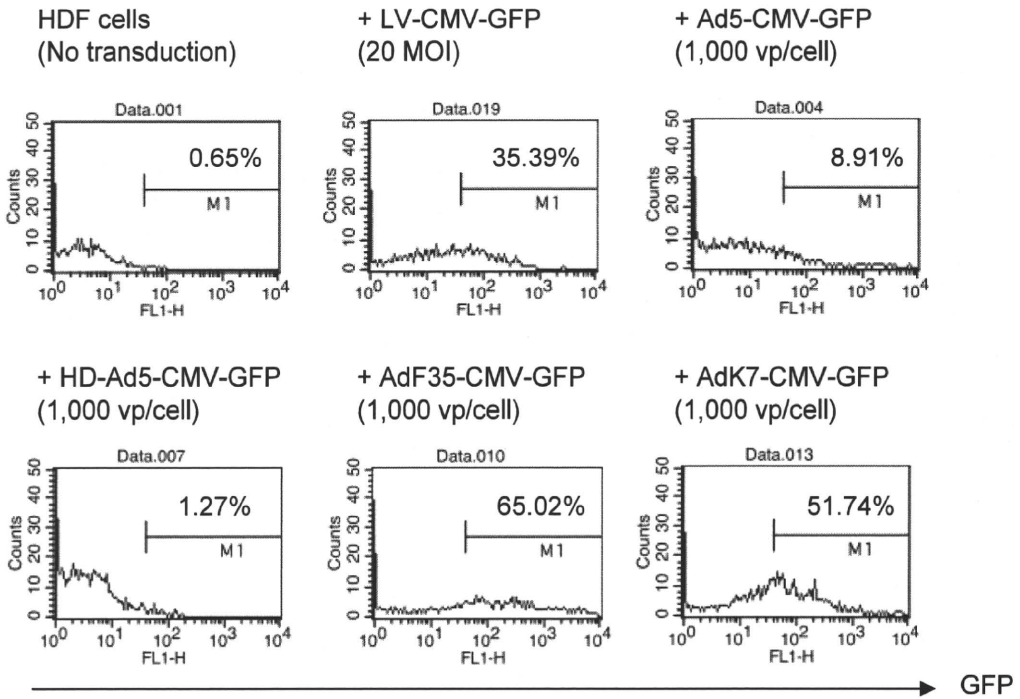
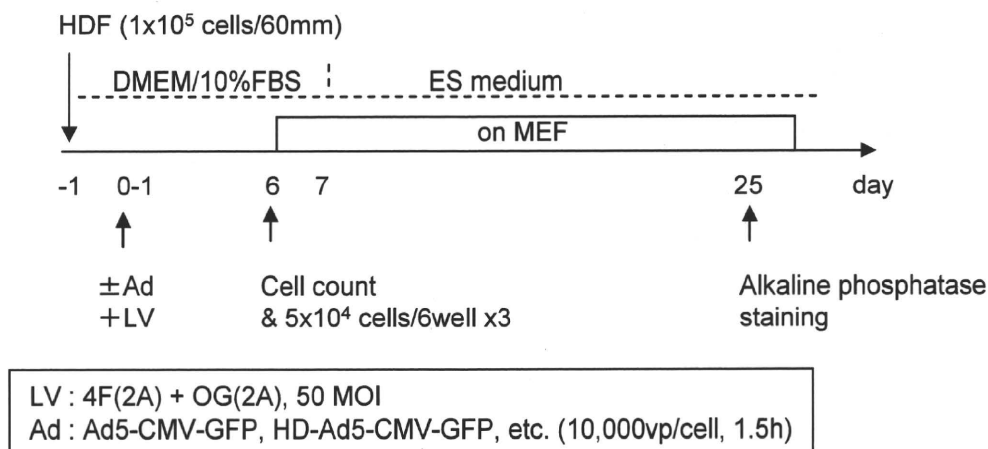


Fig. 2 Ad vector-mediated transduction efficiency in human adult dermal fibroblasts

Human adult dermal fibroblasts (HDF) were transduced with either high (A) or low (B) dose of GFP expressing Ad vectors for 1.5h or lentiviral vectors for overnight. Two days after transduction, GFP positive cells were counted by flow cytometry. These Ad vectors were used in the following experiments.

(A)



(B)

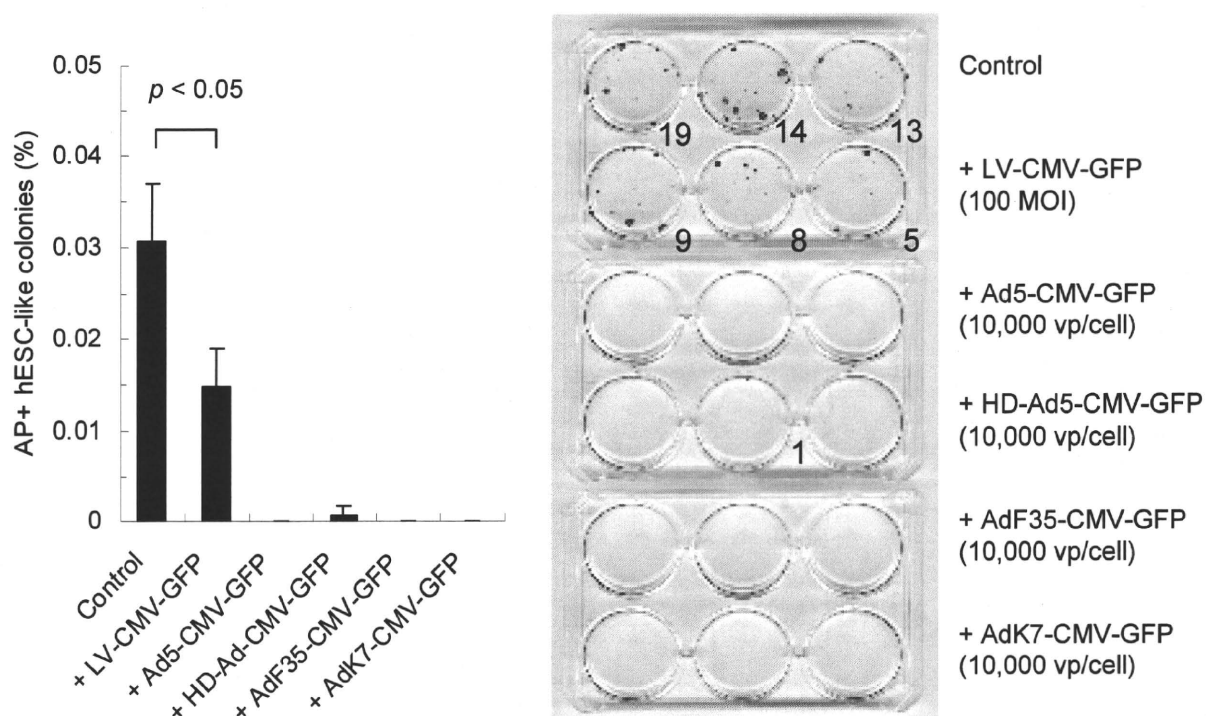


Fig. 3 Effects of Ad vector transduction (high titer) on iPS cell generation

(A) Experimental procedures. HDF cells were transduced with Ad vectors for 1.5h and then the cells were transduced with lentiviral vectors expressing four reprogramming genes (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc). Six days after lentiviral transduction, the cells were harvested and plated onto MEF feeder cells. The next day, the medium (DMEM containing 10% FBS) was replaced with a medium for human ES cell culture supplemented with 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF). The ES cell culture medium was changed every other day. Alkaline phosphatase (AP) staining was performed 25 days after lentiviral transduction. (B) The number of AP-positive human ES cell-like colonies was counted and photographed.