

表 3. ヒトES、iPS細胞のEB形成の手順*

手 順	時間
培地を吸引.	
1unit/ml Dispase [®] (Roche/ 解凍後 3 日以内に使用)を 1ml入れる. 37°C・CO2 インキュベーターに入れてインキュベーション.	3~10 min ®
Dispase を吸引.	
hES 培地 10ml を入れて、セルスクレーパーを使用してコロニーをはがす.	
顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する.	
15ml チューブに細胞浮遊液を入れて、300rpm にて遠心 (大きいコロニーのみを回収する) .	2 min
新しい hES 培地を入れて細胞浮遊液とする (ピペッティングはしない) .	
10cm細菌培養用ペトリディッシュに 3-5 x 10 ⁶ にて播種	
顕微鏡でコロニーの分散状態を確認.	
CO2 インキュベーターに入れて培養.	3 日間
EB 用培地を必要量準備	
37°Cウォーターバスで培地を温める.	5 分
EBと培地を合わせてチューブに回収し、EB用培地**を加える。	
浮遊細胞培養用 25cm ² フラスコ 5 つに分種	
CO2 インキュベーターに入れて、培養.	
1 週間に 2 回、2-ME を含む培地で交換をおこない、その後は 2-ME なしの培地で交換をおこなう	
DNA/RNA回収***	

* (林田、小澤、松村、その他、論文投稿準備中)

** 10%FBS+0.1mM 2-ME / DMEM(low glucose)

*** 初期分化であれば 10 日間程度の培養により様々な分化マーカーが発現していく。十分な分化を見るためには、一般的には 1 ヶ月から 3 ヶ月間培養が必要だと言われている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Miho K. Furue, Jie Na, Jamie P Jackson, Tetsuji Okamoto, Mark Jones, Duncan Baker, Ryu-Ichiro Hata, Harry D. Moore, J. Denry Sato, Peter W. Andrews Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105 13409-14 (2008)
- (2) 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 27: 139-147 (2008)
- (3) 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)
- (4) Mio Nakanishi, Akira Kurisaki, Yohei Hayashi, Masaki Warashina, Shoichi Ishiura, Miho Kusuda-Furue, and Makoto Asashima: Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology 23:114-22. (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2 分化能の評価, Tissue Culture Research Communications. 28:129-133. (2009)
- (6) 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)
- (7) Yohei Hayashi, Techuan Chan, Masaki Warashina, Masakazu Fukuda, Takashi Ariizumi, 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)
- (8) 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)
- (9) 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)
- (10) 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)
- (11) 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)
- (12) Hayashi Y, Furue MK, Satoshi Tanaka, Michiko Hirose, Hiroki Danno, Kiyoshi Ohnuma, Shiho Oeda, Yuko Aihara, Kunio Shiota, Atsuo Ogura, Shoichi Ishiura, and Makoto Asashima BMP4 Induces Trophoblast from Mouse Embryonic Stem Cells through the activation of Cdx2 expression. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal 46: 416-430 (2010)
- (13) 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)
- (14) 古江-楠田美保, 山田 弘、水口裕之: iPS細胞を活用した安全性・有効性評価系の構築、iPS細胞の産業的応用技術シーエムシー出版. 218-224. (2009)
- (15) 古江-楠田美保: 第5章細胞周辺環境のための培養技術 1 培養液, 330-333 「ますます重要になる細胞周辺環境(細胞ニッチ)の最新科学技術」—細胞の生存、増殖、機能のコントロールから創薬研究、再生医療まで— 遺伝子医学MOOK別冊 メディカルドゥ (2009)
2. 学会発表
【国際学会発表】
- (1) Daiki Tateyama, Naohiro Kimura, Midori Hyashida, Yutaka Ozawa, Hiroko Matsumura, Arihiro Kohara, Tetsuji Okamoto, Akihiro Umesawa, and Miho Kusuda Furue: Integrins expression profile in human ES and iPS cells in the defined culture conditions. 第7回 ISSCR バルセロナ 6月(2009)
- (2) Inamura, Mitsuru, Kawabata, Kenji, Sakurai, Fuminori, Katayama, Kazufumi, Hayashida, Midori, Matsumura, Hiroko, Furue, Miho Kusuda, Mizuguchi, Hiroyuki :LAMININ PROMOTES HUMAN EMBRYONIC STEM CELL DIFFERENTIATION INTO MESODERM. 第7回 ISSCR バルセロナ 6月(2009)
- (3) Masaki Kinehara, Daiki Tateyama, Hiroko Matsumura, Miho Kusuda Furue Development of an alkaline phosphatase activity-based high throughput screening assay using human iPScells with chemical

- lly defined culture conditions. 第8回ISSCR サンプルシスコ 6月(2010)
- (4) 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 サンプルシスコ 6月(2010)
- 【国内学会】
(シンポジウム・ワークショップ)
- (5) 古江一楠田美保 彩都・医薬基盤研連携フォーラム 創薬開発ツールとしてのヒトES細胞培養法 大阪 12月(2008)
- (6) 古江一楠田 美保 歯周病学会 若手研究者の集い。マウス、ヒトES細胞の無血清培地開発 三重 10月(2008)
- (7) 古江一楠田 美保:ヒトES、iPS細胞における創薬応用のための標準化. 第22回日本動物実験代替法学会総会 大阪 11月(2009)
- (8) 古江-楠田 美保、創薬応用のためのヒトES、iPS細胞の標準化. 日本組織培養学会第82回大会 シンポジウム(III) 創薬茨木 5月(2009)
- (9) 古江一楠田 美保:ヒトES細胞ならびにiPS細胞の細胞表面抗原発現による標準化 Standardization of human ES and iPS cells by analyzing cell surface antigens 第32回日本分子生物学会 ワークショップ幹細胞と糖鎖 横浜 12月(2009)
- (10) 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 東京 5月(2010)
- (11) 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 岡山 5月(2010)
- (12) 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 岡山 5月(2010)
- (13) 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 大阪 8月(2010)
- (14) 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 札幌 9月(2010)
- (一般口演)
- (15) 舘山 大揮 木村 直大 林田みどり 小澤 裕 松村 紘子 小原 有弘 Paul J Gokhale岡本 哲治 梅澤 明弘Peter W. Andrews 古江-楠田 美保:無血清培養下におけるヒト胚性幹細胞ならびに人工多能性幹細胞のインテグリン発現プロファイル 日本組織培養学会第82回大会 一般口演 茨木 5月 (2009)
- (16) Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama, Midori Hayashida, Hiroko Matsumura, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi. 未分化ヒトES細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果 Laminin promotes human embryonic

stem cell differentiation into mesodendoderm.
日本組織培養学会第 82 回大会 一般口演
茨木 5月(2009)

(17) Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura,
Noriyoshi Furukawa, Kenji Kawabata, Fuminori
Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki
Mizuguchi: Adenovirus vector-mediated
efficient transduction into human induced
pluripotent stem cells. 第 32 回日本分子生物
学会 一般口演 横浜 12月(2009)

(18) 稲村 充、川端 健二、形山 和史、
梅澤明弘、阿久津英憲、林田 みどり、松
村 紘子、古江一楠田美保、水口裕之:ヒト
ES細胞やiPS細胞からの内胚葉系細胞およ
び肝細胞への分化誘導法の開発

第 16 回肝細胞研究会 山形 6月(2009)

(19) 稲村 充、川端 健二、形山 和史、
林田 みどり、松村 紘子、古江一楠田美
保、水口裕之: 未分化ヒトES細胞から中内
胚葉へのラミニンによる分化促進効果

フォーラム・バイオフィオーラム 2009

(20) 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】岡山 5月(2010)

(21) 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】
岡山 5月(2010)

(22) 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

【口頭発表】秋田 6月(2010)

(23) 鍋島巧 古江一楠田美保 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
日本口腔科学会学術集会 北海道 6月
(2010)

(24) 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 秋田 6月(2010) (25)

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・バイオフィオーラム
2010 京都 10月(2010)

(26) 山崎佐知子 古江一楠田美保 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術大
会 高知 11月(2010)

(27) 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 東京 3月
(2011)

(28) 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 静岡 3
月(2011)

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 一朗 (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。iPS細胞の作製効率をあげるために遺伝子の組み合わせを見直すためにすでに作製されたiPS細胞の発現解析を次世代シーケンサーで行った。その結果初期化遺伝子の一つNANOG遺伝子の発現が昂進していることがわかった。そこで4遺伝子で体細胞を初期化するかわりにもう1つ遺伝子を加え、5遺伝子にし、さらにそれらの遺伝子を連続してつなげて発現するように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。しかし、作製効率は低く 0.2 % ほどである。この作製方法は一般的には体細胞(線維芽細胞など)にリプログラミングを起こさせる4遺伝子を導入し、約1カ月間培養誘導することでES細胞様の自己増殖能と多分化能を持った細胞が得られる。

そこで、効率よく体細胞をiPS細胞化する技術を確立することは、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

すでに作製され広く使用されているiPS細胞よりRNAを抽出し発現解析を次世代シーケンサーSOLiD3でおこなった。

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組換えレトロウィルス(図2上)を作製し、ヒト成人皮膚細胞にこの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

次世代シーケンサーSOLiD3で発現解析を行うと発現レベルがデジタルに出力される。そのなかでNANOG遺伝子の発現が昂進していることが判明した(図1)。

NANOG遺伝子を含む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(図3上)をヒト成人皮膚細胞に導入し、iPS細胞を分離した(図2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(図2右)であった。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4) NANOG 遺伝子に関しては、iPS 細胞のものと体細胞で全く発現がみられていなかったの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。

E. 結論

既存の iPS 細胞の発現解析を行ったところ NANOG 遺伝子の発現が昂進していることがわかった。これから初期化遺伝子のうち発現が上昇している NANOG 遺伝子をリプログラミング遺伝子として加え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 細胞の発現解析から NANOG 遺伝子の発現が昂進していることより NANOG 遺伝子を強制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

Whole transcriptome analysis

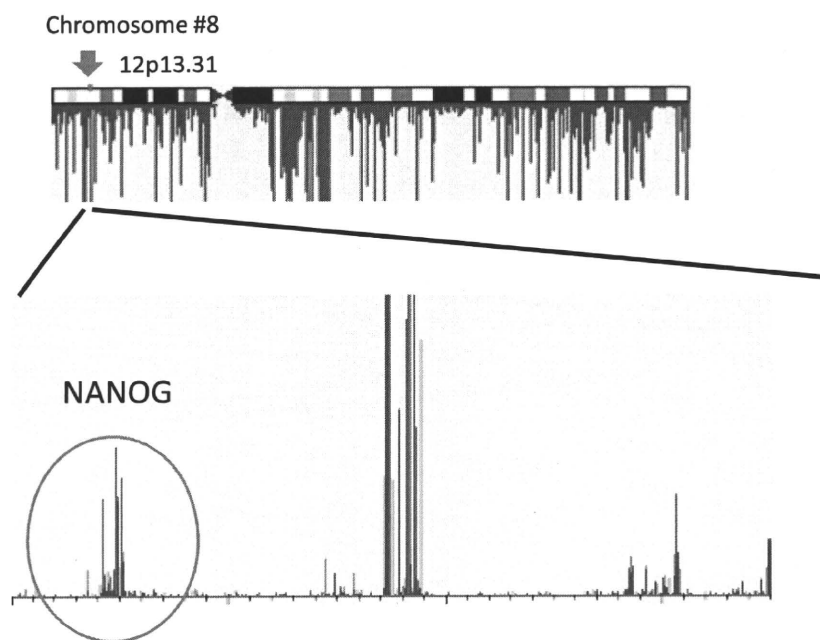


図1 次世代シーケンサー SOLiD3 での発現解析

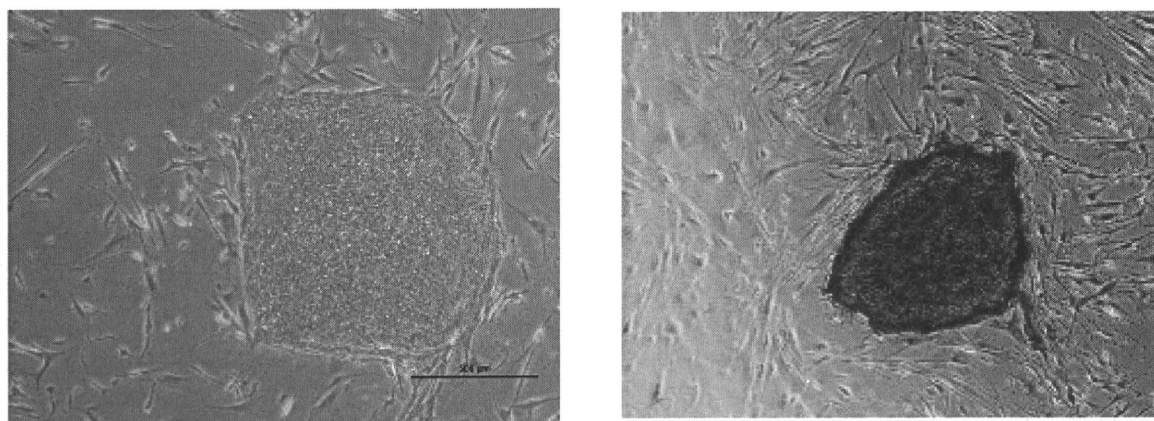


図2 iPS 細胞 (左) アルカリフォスファターゼ染色 (右)

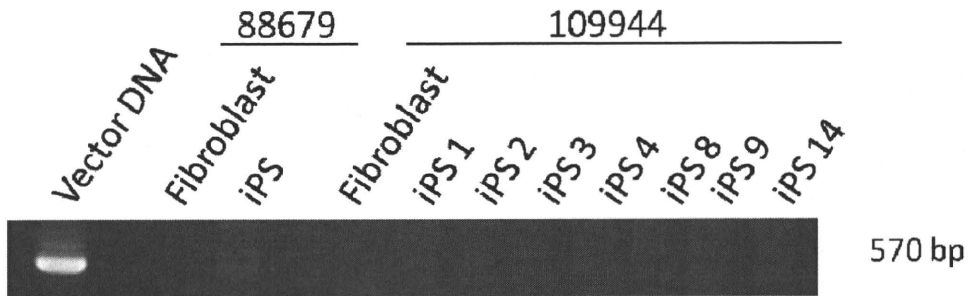
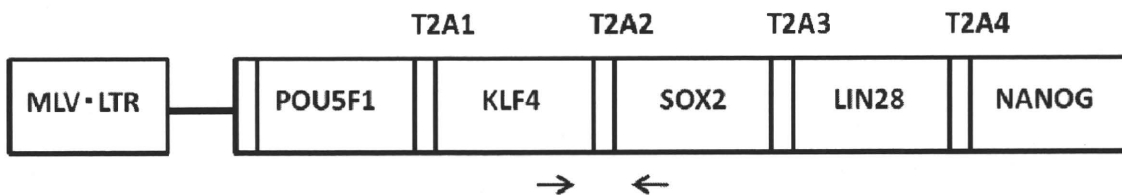


図3 導入した初期化遺伝子 (上) と iPS 細胞での導入した遺伝子の発現の停止 (下)

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

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

研究分担者 梅澤 明弘 （独）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：医薬品開発における細胞を用いた *in vitro* での様々な安全性・有効性評価は ヒト iPS 細胞の登場に伴い期待が高まってきている。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・機能を有した幹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。具体的にはヒト 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の品質管理・品質評価法の開発を行う。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。また羊膜由来組織から 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も行った。培養過程におけるゲノム安定性に与える影響についての検証を行い、最終的に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・機能を有した幹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。

(1) 培養技術の標準化

ヒト iPS 細胞をフィーダーフリー、血清フリー条件下で安定定期に培養可能な培地組成を検討する。この条件下で培養した細胞において、ゲノム安定性や未分化性安定評価を評価した。

(2) ゲノム安定性評価法の確立

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。

(3) 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。

(4) 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、国立成育医療研究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) 培養技術の標準化

これまで有していたヒト幹細胞(ES細胞や間葉系幹細胞)の培養実績や遺伝子発現解析に基づき、ヒトiPS細胞を安定的に培養する方法について検討した。結果、iPS細胞を長期にわたって安定的に培養する方法を確立した。

(2) 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。

(3) 未分化性安定評価法開発

ヒト胎児性肺組織由来MRC-5細胞および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。さらに免疫組織学的解析において表面マーカであるTRA-1-60、SSEA-4の発現が確認できた。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、ほぼ同様な結果がえられた。

(4) 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。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。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。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しての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.

315(16):2727-2740, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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.

Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. **Genes Cells**, 14(12):1395-1404, 2009.

Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. **Exp Cell Res**.

総合研究報告書

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。本研究では、レトロウイルス、レンチウイルスおよびアデノウイルスの 3 種類のウイルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。その結果、レンチウイルスベクターを利用した場合の作製効率が最も高く、さらに Oct3/4 の発現量を増加させることで、iPS 細胞の誘導効率を高めることに成功した。また、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。以上の iPS 細胞作製促進および阻害メカニズムをさらに詳細に検討することで、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

本研究では、各種ウイルスベクターを利用した場合のヒト iPS 細胞作製効率について検討すると共に、それらの作製効率の違いをもたらす要因について解析を行った。具体的には、レトロウイルス、レンチウイルスおよびファイバー改変型アデノウイルスの 3 種類のウイルスベクターを用いてヒト iPS 細胞の作製を試み、作製効率と遺伝子導入効率について検討した。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 細胞作製時に細胞に及ぼす影響について詳細に解析を行った。iPS 細胞作製促進および阻害メカニズムの解析は、安全かつ効率の良い、次世代 iPS 細胞作製技術開発において非常に重要な基盤研究である。

B. 研究方法

B-1. プラスミド構築

レトロウイルスまたはレンチウイルスベクタープラスミドは、ヒト Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の各遺伝子が挿入されたプラスミドより PCR で増幅した後、ベクタープラスミドのマルチクローニング部位に挿入することで作製した。なお、レトロウイルスベクターは pMX プラスミド（東京大学医科学研究所、北村俊雄先生より供与）、レンチウイルスベクターは CSII-CMV-MCS プラスミド（理化学研究所、三好浩之先生より供与）を使用した。2A ペプチドを用いて 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、各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. レトロウイルスベクターの作製

PLAT-E 細胞（東京大学医科学研究所、北村俊雄先生より供与）を 5×10^5 cells/60mm dish で播種し、一晚培養後、各遺伝子を搭載したレトロウイルスベクタープラスミドを FuGENE6 Transfection 試薬 (Roche) を用いてトランスフェクションした。翌日培地を交換し、トランスフェクションから 48 時間後に上清を回収し、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過してレトロウイルス溶液とした。レトロウイルス溶液は 4°C で保存し、調整後 1 週間以内に使用した。

B-3. 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-4. 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-5. 細胞の培養

ヒト胎児肺由来繊維芽細胞は、医薬基盤研究所、細胞資源研究室より入手し、10% FCS を含む MEM 培地 (IMR-90、WI-38 細胞) または BME 培地 (MRC-5 細胞) で培養した。ヒト皮膚繊維芽細胞 (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。PLAT-E 細胞と Hela 細胞は 10% FCS を含む DMEM 培地で培養し、293 細胞と 293T 細胞は 10% FCS と L-glutamine を添加した High Glucose DMEM 培地で培養した。

B-6. レトロウイルスベクターを用いた iPS 細胞の誘導

ヒト胎児肺由来繊維芽細胞にアデノウイルスベクター ($1,000\text{vp}/\text{cell}$) またはレンチウイルスベクター (Invitrogen) でマウスレトロウイルス受容体遺伝子を導入して一晚培養後、レトロウイルス溶液とポリブレン ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む培地でさらに一晚培養した。レトロウイルス感染 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。レトロウイルス感染後 7 日後から bFGF (4ng/ml)を含む Primate ES medium (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-7. 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 μ g/ml) を含む培地で一晩培養した。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-8. Western Blot

細胞を PBS で洗浄し、Cell Lysis Buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.0), 137mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% glycerol) を加えて 4°C で 10-20 分間培養した後、スクレイパーで細胞をはがして集め、13,500rpm で 2 分間遠心して上清を回収した。タンパク質定量試薬 (Bio-Rad Protein Assay Reagent) を用いてタンパク質定量を行った後、Western Blot に用いた。Total Protein 20 μ g を電気泳動してメンブレンに転写させ、5%スキムミルク/TBST で希釈した抗体と反応させた後、ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Life Sciences) で発色させ、ルミノイメージアナライザー (FUJIFILM) を用いて検出した。抗体は、Oct3/4 (sc-5279)、Sox2 (sc-17320)、Klf4 (sc-20691)、c-Myc

(sc-40) (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。

B-9. RT-PCR

フィーダー細胞上で培養したヒト iPS/ES 細胞は、EDTA を加えてはがれた細胞を回収することでフィーダー細胞と分離した後、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA 1 μ g から SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて cDNA を合成し、以下のプライマーを用いて PCR を行った。hOCT3/4 (Endo), 5'- GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG -3' (hOCT3/4-S1165) and 5'- CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC -3' (hOCT3/4-AS1283); hSOX2 (Endo), 5'- GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG -3' (hSOX2-S1430) and 5'- TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG -3' (hSOX2-AS1555); hNANOG, 5'- TTC CTT CCT CCA TGG ATC TG -3' (hNanog-F) and 5'- CTG GGG TAG GTA GGT GCT GA -3' (hNANOG-R); hGAPDH, 5'- GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CA -3' (humanGAPDH-F) and 5'- GTG GTC GTT GAG GGC AAT G -3' (humanGAPDH-R)

B-10. 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

始めに、レトロウイルスベクターを用いてヒト iPS 細胞の作製を試みた。ヒト胎児肺由来繊維芽細胞 (IMR-90, WI-38 または MRC-5) に、マウスレトロウイルス受容体をファイバー改変型アデノウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを用いて導入した後に、レトロウイルスベクターで Oct3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc の 4 遺伝子を導入した。レトロウイルス感染 6 日後に細胞を MEF 上に移し、7 日後よりヒト ES 細胞用の培地に交換し培養を続けた。しかしながらヒト ES 細胞様の形態をしたコロニーは出現しなかった (data not shown)。GFP 遺伝子を発現するレトロウイルスベクターをヒト胎児肺由来繊維芽細胞へ導入後、FACS を用いて遺伝子導入効率を調べたところ、遺伝子導入効率は最大でも 60%程度であった。ヒト ES 細胞様コロニーが出現しなかった原因のひとつは、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率の低さであると予想された。

次に、ヒト細胞への遺伝子導入効率に優れたレンチウイルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。レンチウイルスベクターは、トランスジーンを発現を増強する効果がある Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) 配列と Central polypurine tract (cPPT) 配列を有するベクターに変更した (Fig. 1)。Oct3/4, Sox2, Klf4 と c-Myc の 4 遺伝子を別々のレンチウイルスベクターに搭載してヒト皮膚繊維芽細胞 (HDF 細胞) に導入したところ、ヒト ES 細胞様のコロニーが出現した。複数のコロニーをピックアップして培養し続けると、ヒト ES 細胞様の形態を示し、アルカリフォスファターゼ陽性の細胞が得られた。細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で遺伝子発現を調べた結果、Nanog

や内在性の Oct3/4, Sox2 などの ES 細胞マーカー遺伝子が発現していることが確認された (Fig. 2)。

次に、4 つの遺伝子を 2A ペプチドで連結することで、単一のレンチウイルスベクターを用いてヒト iPS 細胞を樹立することを試みた。Oct3/4, Sox2, Klf4 と c-Myc の 4 遺伝子を 2A ペプチドでつないでレンチウイルスベクターに搭載したところ、4 つのタンパク質が別々に発現していることを Western Blot により確認した (Fig. 1)。しかしながら、HDF 細胞へ導入しても、ヒト iPS 細胞のコロニー出現率は低かった (Fig. 3)。そこで 2A ペプチドを用いて複数の遺伝子を発現させる際に、効率良くヒト iPS 細胞が誘導される条件を探す事を目的とし、4 遺伝子を同時に発現するレンチウイルスベクター (2A ペプチドで連結) と各遺伝子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、ヒト iPS 細胞様コロニー出現率が変化するかどうか検討した。その結果、4 遺伝子を同時に発現するレンチウイルスベクターと Oct3/4 遺伝子を単独で発現するレンチウイルスベクターを HDF 細胞へ共導入した場合にのみ、ヒト iPS 細胞のコロニー出現率が上昇した (Fig. 3)。レンチウイルス感染 3 日後の細胞よりタンパク質を回収し、各遺伝子の発現量を Western blot により調べた。その結果、Oct3/4 遺伝子を単独で発現するレンチウイルスベクターを共導入した場合に予想どおり Oct3/4 遺伝子の発現量が高くなっていたことから (Fig. 4)、HDF 細胞から効率良くヒト 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が示唆された。

より安全性の高いヒト iPS 細胞作製法を確立するために、アデノウイルスベクターを用いて Oct3/4, Sox2, Klf4 と c-Myc の

4 遺伝子をヒト繊維芽細胞へ導入し、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。まず GFP を発現するアデノウイルスベクターを各ヒト繊維芽細胞へ導入し、FACS を用いて遺伝子導入効率を調べた。その結果、汎用されている 5 型ベクターを標準的な範囲のタイター (1,000vp/cell) で作用させた場合、ヒト胎児肺由来繊維芽細胞では 30%程度の遺伝子導入効率を示したが、成体由来の HDF 細胞への遺伝子導入効率は 5%以下であった。これに対して、ファイバー領域を 35 型に置換したファイバー改変型アデノウイルスベクターを用いた場合は、どちらの細胞に対しても 80%以上の遺伝子導入効率を示した (Fig. 5)。そこで各遺伝子を発現するファイバー改変型アデノウイルスベクターを作製し、ヒト胎児肺由来繊維芽細胞または HDF 細胞に 300vp/cell または 1,000vp/cell ずつ 3 日毎に 3~4 回作用させた後、MEF 上に移しヒト ES 細胞用の培地に交換し培養を続けた。しかしながら、ヒト ES 細胞様のコロニーは出現しなかった。アデノウイルスベクターを用いた時のヒト iPS 細胞誘導遺伝子の発現を Western Blot で調べた結果、アデノウイルスベクターを加えた翌日には各遺伝子の発現が確認されたが、3 日経過した後の発現量は、レンチウイルスベクターを用いてヒト iPS 細胞コロニーが得られた時の発現量と比較して低いことが判明した。

次に、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.6A) 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、本研究で使用した 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.6B)。

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 ベクターを高タイター (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.7A)。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.7B)。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.8A)。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.8B)。

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.9A)。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.10B)。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.10B)。

D. 考察

初年度は、レトロウイルス、レンチウイルスおよびアデノウイルスの 3 種類のウイルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。始めにレトロウイルスベクターを用いて 4 遺伝子の導入を行ったが、ヒト iPS 細胞は得ることは出来なかった。この原因としては、細胞への遺伝子導入効率が十分でなかったことが考えられた。次に、遺伝子導入ベクターをヒト細胞への遺伝子導入効率がよいレンチウイルスベクターに変更したところ、ヒト ES 細胞様の形態を示し、未分化マーカー遺伝子を発現したコロニーが得られた。また、アデノウイルスベクターを用いた場合には、ファイバー改変型アデノウイルスベクターを用いることでヒト繊維芽細胞への遺伝子導入が可能であったが、ヒト iPS 細胞の作製は成功しなかった。

複数の遺伝子を単一のプロモーターから同時に発現させる方法としては、2A ペプチドや IRES 配列を利用する方法が知られている。本研究では、複数の遺伝子を等量ずつ発現可能な 2A ペプチドを用いて、4 つの遺伝子を単一のレンチウイルスベクターに搭載して細胞に導入したが、ヒト iPS 細胞様コロニーの出現効率は低かった。既に樹立された iPS 細胞では、ウイルスベクターにより導入された遺伝子はサイレンシングされているため、各遺伝子がどの程度の量で発現して iPS 細胞になったのかを調べるのは困難である。Sox2 遺伝子を発現している神経幹細胞から iPS 細胞を作製する場合は、Sox2 遺伝子の導入なしでも iPS 細胞は得られるが、一方で、Sox2 遺伝子を導入すると作製効率が低下することが知られてお

り、効率よく iPS 細胞を誘導されるためには、導入遺伝子を適切なバランスで発現させる必要があることが示唆されている。本研究で使用した 2A ペプチドは連結したタンパクが等量ずつ発現することから、別のレンチウイルスベクターを用いて共導入することで、各遺伝子発現量のバランスを変えた検討を行った。その結果、2A ペプチドによって 4 遺伝子を等量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 細胞へ共導入した場合にのみ、ヒト iPS 細胞のコロニー出現率が上昇した。この結果は、HDF 細胞から効率よくヒト 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示唆している。

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。そこで次年度は、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、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) の複製の開始に必須な 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。

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 細胞様のコロニーが出現しなくなった (Fig.8)。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.9B)。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.10B)。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.9B, 10B)。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.7B)、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が強く阻害された (Fig.9B, 10B)。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.9B, 10B)。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