



図1 SeVゲノム構造およびSeVベクター生活環

■iPS細胞作製への応用

体細胞に初期化因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, あるいはNANOG, LIN28など) を導入することにより、数多くの組織に分化可能な、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) が作製できることは、2006年の京都大学・山中伸弥教授グループによるマウスiPS細胞および2007年のヒトiPS細胞樹立発表²⁾以来、周知の通りである。この発明により、従来胚を破壊しなければ得られなかったヒトES細胞の倫理面の問題の克服や、個別化医療への応用の可能性など数多くの再生医療の可能性が現実のものとなってきた。さらに、望むヒト分化細胞を比較的容易に実験室で調製ないし使用できるようになったことも重要である。初期のiPS細胞誘導では初期化因子の導入に、レトロウイルスベクターが主流であったが、宿主ゲノムへの外来遺伝子のランダムな組み込みが、がん化のリスクを高めることが明らかになっており、それに替わる安全な誘導法が求められてきた。現在、レトロ/レンチウイルスベクター以外のウイルスベクターやプラスミド、トランスポゾン、核初期化タンパク質導入、最近では改変RNAや核初期化遺伝子に替わるものとしてのmiRNAや化学物質を用いた方法などが考案されている。また補助的に効率を上げるための薬剤なども頻繁に使われている。現在までのiPS細胞作製法については表にまとめた通りである。

これらの手法の中で、我々が昨年発表したセンダイウイルスベクターによるヒトiPS細胞作製法は、非常に高い外来遺伝子発現効率に起因する高

表 iPS細胞誘導法一覧

	ベクター/物質	備考	
組込み型	レトロウイルスベクター	ランダム挿入	
	レンチウイルスベクター	ランダム挿入	
切り出し型	レンチウイルスベクター (Cre/LoxP)	一部残存	
	トランスポゾン (piggyBac)	ヒト細胞では切り出し難い	
非組込み型	アデノウイルスベクター	DNA	低効率/組込可能性あり
	プラスミド		低効率/組込可能性あり
	エピソードベクター		
	バキュロウイルス		
	SeVベクター	RNA	高効率・1回の感染
その他	人工染色体		
	タンパク質		低効率・繰り返し導入
	改変RNA		高効率・繰り返し導入
その他	miRNA		
	化合物		

誘導効率と、宿主ゲノムに非組み込み型であること、ベクター除去の容易性・簡便性という点で、より優れた方法として評価を受けている³⁾。そのiPS細胞誘導効率はヒト線維芽細胞をソースとした場合、最大で1~4%程度、また従来難しいと言われていたヒトT細胞からも、効率よくiPS細胞を誘導することが可能となっている。末梢血をソースとした場合、レンチウイルスベクターやレトロウイルスベクターの手法に比較し、非常に少量の血液 (1 ml) からiPS細胞樹立が可能であることを今年度発表している⁴⁾。このことは、例えば疾患患者由来iPS細胞作製の際の検体の取得時、患者の負担を軽減することに貢献できる。また線維芽細胞の初代培養の時間やレトロウイルスベクターの受容体強制発現のステップも省け、iPS細胞の樹立期間も短縮出来ている。

■ベクターの構成および樹立方法

CytoTune™-iPSキットは、山中初期化4因子 (ヒトOCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC遺伝子) をそれぞれ搭載した4つのベクターから構成されている。それぞれのベクターは精製され、力価測定された凍結溶液として提供される。保存はマイナス80℃で安定である。F欠失型ベクターを用いているため、感染後に細胞から感染性のウイルス粒子が再放出される恐れもなく、取り扱い条件はP2である。

ベクターカクテルには、温度高感受性ベクターが組み込まれ、従来のベクターより容易に除去可能となっている。iPS細胞樹立後、37℃で培養を続

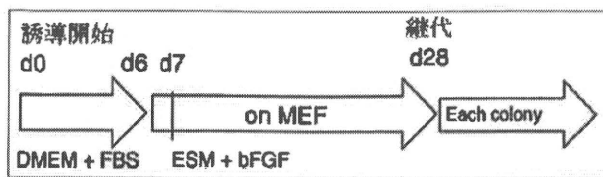


図2 iPS細胞誘導法

けることにより、特別な操作不要で自然に消えるような組み合わせとなっている⁴⁾(論文投稿中)。もちろん、サブクローニングとRT-PCRおよび抗SeV抗体による免疫染色確認を経て、更に早くSeV陰性コロニーを得ることも可能である。

キットには、ヒト新生児包皮由来線維芽細胞、BJ細胞をソースとしたiPS細胞誘導法の例についてマニュアルを添付しているが、特にtransfection試薬もウイルス受容体の導入も必要なく、ただベクターカクテルを混ぜた培地を1回感染させるだけで、容易に線維芽細胞由来iPS細胞を得ることが出来る(図2)。T細胞をソースとする場合は、CD3でT細胞を活性化する必要がある⁴⁾。得られたES細胞様コロニーは容易に継代可能で、ヒトES細胞のマーカーを発現し、かつ無限増殖能と三胚葉への多分化能を獲得しており、iPS細胞の特徴を持っている(図3)。ベクターフリーになった後は、得られたiPS細胞と、それから得られた分化細胞・組織は外来遺伝子をもはや保持していない。レトロウイルスベクターによるiPS細胞誘導のように、非常に数多くのiPS細胞コロニーから、低い挿入因子コピー数、外来遺伝子の発現抑制(サイレンシング)、分化後の外来遺伝子の再活性化のリスクを考慮した大規模スクリーニングをする必要がなく、均質なiPS細胞が得られるため、その解析および省力化が可能である。この点で、我々の方法は疾患細胞由来iPS細胞の樹立等に大いに力を発揮しており、厚生労働科研費・難治性疾患克服事業に於ける種々の難治性疾患由来iPS細胞樹立への取り組みでは、我々は既に33症例からiPS細胞を樹立している(研究代表者:熊本大学・江良沢実教授)。現在のところ、このCytoTune™-iPSを用いて数多くのヒト体細胞(新生児~成人由来、健康人~患者由来線維芽細胞、ケラチノサイト、活性化T細胞ほか)からiPS細胞の樹立実績がある。

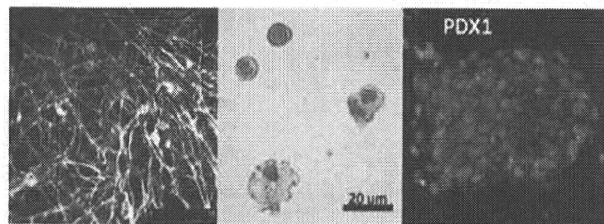


図3 外来遺伝子フリー・ヒトiPS細胞の優れた分化誘導法。左からドーパミン産生ニューロン(外胚葉由来)、血球細胞(中胚葉由来)、膵β細胞(内胚葉由来)。

■今後の展望

最近、海外のグループが改変RNAを持続的に添加することで、ヒト新生児細胞からiPS細胞の樹立に成功している⁵⁾。効率という点では、センダイウイルスベクターによるiPS細胞樹立効率と同程度になるが、17日間という長期間のRNA持続的添加、インターフェロンの影響を避けるためのデコイ受容体の添加の必要性や、RNAが生体内で除去されないためのCap構造の付与などの工夫がなされている。しかしながらこれらの工夫は、本来SeVベクターが自分自身で持ち合わせている性質でもあるため、その人工的な模倣に過ぎないとも言える。SeVベクターは、たった1回の感染で必要な遺伝子を持続的に発現し、かつ宿主ゲノムにも組み込まれず、iPS細胞化による増殖速度の上昇により緩やかに希釈され除去される。さらに細胞温度感受性ベクターの樹立により、ベクター除去が非常に容易になったことで、我々のSeVベクター法が現在最も簡便で効率のよい方法の1つと位置づけられると考えている。現在、上記細胞種以外に適用するための、より強力な発現ベクターを開発中であり、細胞種により選択できる幾つかの至適ベクターを、補助因子のラインナップと共に、次世代ベクターとして提供して行く予定である。

商品問い合わせ先
 ・株式会社 医学生物研究所 (MBL)
 〒460-0008 愛知県名古屋市中区栄4-5-3 KDX名古屋栄ビル10階 support@mbl.co.jp
 ・デйнаベック株式会社
 〒300-2611 茨城県つくば市大久保6番
 cytotune@dnavec-corp.com

文献

- 1) Nagai, Y., Takakura, A., Irie, T., *et al* (Norwich, The United Kingdom: Horizon Scientific Press), 2010, in press
- 2) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., *et al*, 2007 Cell 131, 861-872.
- 3) Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., *et al*, 2009 Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-362.
- 4) Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., 2010 Cell Stem Cell 7, 11-14.
- 5) Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., *et al*, 2010 Cell Stem Cell, 7, 1-13.

