



## 難治性疾患患者皮膚からの皮膚線維芽細胞樹立

分担研究者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野教授  
協力者 神人正寿 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野講師

### 研究要旨

症例数が限られる難治性疾患の生体試料提供体制を確立する事を目的として難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けて基盤研究を行なっている。そのために我々は、難治性疾患の皮膚から iPS 細胞を樹立する際の皮膚線維芽細胞の樹立について検討を行った。

#### A. 目的

症例数が限られる難治性疾患の生体試料は希少性が高いため、公平性を確保した提供体制が必要とされる。しかしながら、生体試料は有限であり、多くの研究者の要求に応じて幅広く提供する事は困難である。そこでこの問題を解決するために、難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けての基盤研究を行っている。

本研究では iPS 細胞を作製するためにその前段階として難治性疾患の皮膚から生検を行い、皮膚線維芽細胞を樹立する事を目的として研究を行った。

#### B. 背景

症例数が限られる難治性疾患の生体試料は希少性が高いため、公平性を確保した提供体制が必要とされる。しかしながら、

生体試料は有限であり、多くの研究者の要求に応じて幅広く提供する事は困難である。そこでこの問題を解決するために、難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けての基盤研究を行っている。

患者試料から作製された iPS 細胞は、無制限に増幅させ、長期にわたり貯蔵可能であり、多くの研究者に必要時に容易に提供可能である。従って、さまざまな分野の研究者が難治性疾患を研究する機会が増え、治療法の開発を促進する可能性がある。

iPS 細胞確立に際してはヒト皮膚からヒト皮膚線維芽細胞を培養増殖させ、SeV ベクターによって初期因子 Oct-4、Sox-2、KLF4、c-Myc を一過性に発現させ、iPS 細胞を作製する事が外来因子フリー iPS

細胞を確立する事が最も簡単で、確実にあると考えられる。

### C. 方法

本研究は、皮膚試料を手術にて採取する事及び採取した皮膚からヒト皮膚線維芽細胞を培養増殖させその後 iPS 細胞を樹立する事を熊本大学倫理委員会に申請し、承認されている。

まず正常および難治性疾患患者に、研究目的、予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後同意（インフォームドコンセント）を得た上で皮膚生検を行なった。

対象は Kugelberg-Welander disease 1 例、肢帯型筋ジストロフィー2 例、先天性筋繊維タイプ不均衡症 1 例、糖原病 I 型 (1A) 1 例、sporadic ALS 1 例、familial ALS 1 例、全身性強皮症 11 例、副腎過形成症候群 2 例、副腎皮質過形成症候群 1 例、CADASIL 2 例、CADASIL 疑い 2 例、皮膚筋炎 3 例、封入体筋炎 2 例、筋炎疑い 1 例、原発性骨形成不全症 1 例、異染性白質ジストロフィー1 例、Perry 病 1 例、家族性アミロイドーシス 2 例、Galoway-Mowat 症候群 1 例、Cockayne 症候群疑い 1 例、脊髄小脳変性症（多系統萎縮症）1 例、新生児ヘモクロマトーシス（生体肝移植）1 例、SMON1 例、Multiple system atrophy 1 例、家族性アミロイドポリニューロパチー 1 例の合計 47 例であった。

局所麻酔薬を用いて麻酔後 4mm パンチ（直径 4mm）にて皮膚を採取後縫合した。採取した皮膚から皮下脂肪織を剥離後、培養液（Eagle's MEM）にて数回洗浄後、

清潔条件でクリーンベンチに運搬後 0.5mm 角程度に細切除し、再切除した皮膚を間隔をあけながら真皮側をプラスチックシャーレに張り付けていく。Eagle's MEM に 10%FCS および抗生物質、抗真菌剤添加を加えたものを培養液として 37℃にてインキュベーターにて培養を行った。

### D. 結果

顕微鏡にて観察したところ数日にてヒト皮膚線維芽細胞がプラスチックシャーレ上に遊走・増殖し 2-3 週間後にはヒト皮膚線維芽細胞がプラスチックシャーレ上に confluent に増殖した。トリプシン処理にてプラスチックシャーレよりヒト皮膚線維芽細胞を分離し、1:5 の割合でプラスチックシャーレに播種し、ひと皮膚線維芽細胞を増殖する事ができた。また形態学的に 100%ヒト皮膚線維芽細胞である事も確認できた。

### E. 結論

皮膚生検サンプルから作製した線維芽細胞はiPS細胞作製に使用するにあたり有用である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Kawashita Y, Jinnin M, Makino T, Kajihara I, Makino K, Honda N, Masuguchi S, Fukushima S, Inoue Y, Ihn H. Circulating miR-29a levels in patients with scleroderma spectrum disorder. *J Dermatol Sci*, 61: 67-69, 2011.
2. Asano Y, Ihn H, Jinnin M, Tamaki K. Altered dynamics of TGF- $\beta$  receptors in

- scleroderma fibroblasts. *Ann Rheum Dis*, 70: 384-387, 2011.
3. Moriya C, Jinnin M, Yamane K, Maruo K, Muchemwa FC, Igata T, Makino T, Fukushima S, Ihn H. Expression of matrix metalloproteinase-13 is controlled by IL-13 via PI3K/Akt3 and PKC- $\delta$  in normal dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 131: 655-661, 2011.
4. Kanemura H, Fukushima S, Yamashita J, Honda N, Oyama R, Kakimoto A, Masuguchi S, Ishihara T, Inoue Y, Jinnin M, Ihn H. Circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. *J Dermatol Sci*, 61: 187-193, 2011.
5. Oyama R, Jinnin M, Kakimoto A, Kanemura H, Ichihara A, Fujisawa A, Honda N, Masuguchi S, Fukushima S, Maruo K, Ihn H. Circulating microRNA associated with TNF signaling pathway in patients with plaque psoriasis. *J Dermatol Sci*, 61: 209-211, 2011.
6. Yamada M, Sakai K, Hayashi M, Hozumi Y, Abe Y, Kawaguchi M, Ihn H, Suzuki T. Oculocutaneous Albinism Type 3: A Japanese girl with novel mutations in TYRP1 gene. *J Dermatol Sci*, 64: 217-222, 2011.
7. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, Ito T, Hirakawa S, Ihn H, Oike Y. The chronic inflammatory mediator angiopoietin-like protein 2 contributes to carcinogenesis and cancer cell metastasis. *Cancer Res*, 71 : 7502-7512, 2011.
8. Namikawa K, Yamazaki N, Nakai Y, Ihn H, Tomita Y, Uhara H, Takenouchi T, Kiyohara Y, Moroi Y, Yamamoto Y, Otsuka F, Kamiya H, Iizuka H, Hatta N, Kadono T. Prediction of additional lymph node positivity and clinical outcome of micrometastases in sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma: A multi-institutional study of 450 patients in Japan. *J Dermatol*, in press.
9. Kajihara I, Jinnin M, Makino T, Honda N, Igata T, Masuguchi S, Fukushima S, Okamoto Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ihn H. Increased accumulation of thrombospondin-2 due to low degradation activity stimulates type I collagen expression in scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol*, in press.
2. 学会発表
1. Ihn H. “Mechanisms of Fibrosis” 2011. 5. 24-29 22 nd World Congress of Dermatology (Seoul, Korea) Invited lecture
2. Fukushima S, Hayano S, Jinnin M, Ihn H. “Increased serum levels of SPARC in patients with localized scleroderma” 2011.
5. 24-29 22 nd World Congress of Dermatology (Seoul, Korea)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 遺伝子挿入のない iPS 細胞を用いた分化誘導法の開発

分担研究者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究所 教授

### 研究要旨

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の開発によって、難治性疾患の患者から iPS 細胞を樹立し、分化誘導すれば、疾患の発症機構の解明や治療に極めて有益な知見を得ることができる可能性が生まれてきた。そこで、本計画は難治性疾患由来の iPS 細胞の作製とバンク化を目的としている。特にセンダイウイルス (SeV) ベクターを使って、外来因子の遺伝子挿入を持たない iPS 細胞を作成、保存するのが特徴である。本分担研究では、バンク化された iPS 細胞を一般の研究者が利用しやすい様な分化誘導の技術開発を行い、情報を提供することを目指した。

#### A. 研究目的

人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の開発によって、難治性疾患の患者からiPS細胞を樹立し、分化誘導すれば、疾患の発症機構の解明や治療に極めて有益な知見を得ることができる可能性が生まれてきた。そこで、本計画は難治性疾患由来のiPS細胞の作製とバンク化を目的とする。特にセンダイウイルス (SeV) ベクターを使って、外来因子の遺伝子挿入を持たないiPS細胞を作成、保存するのが特徴である。

この分担研究では、バンク化されたiPS細胞を一般の研究者が利用しやすい様な技術開発を行い、情報を提供することを目的とした。難治疾患由来のiPS細胞はバンク化してそれぞれの研究者に役立ててもらおうのが本研究の基本であり、分化誘導もそれぞれで行うことになる。しかし難治疾患治療に携わる大多数の研究者は

iPS細胞の取り扱いには慣れていない。iPS細胞を分化させる際にはフィーダー細胞の混入を除く必要があり、さらに分化誘導法自体がそれぞれの目的細胞によって異なるため試行錯誤が要求される。そこで、正常人由来のiPS細胞をモデルケースとして分化誘導実験を行った。

#### B. 研究方法

ゼラチンコートした培養皿にマイトマイシン C 処理したマウス繊維芽細胞をまき( $5 \times 10^5$ /6cm プレート)、その上で iPS 細胞を培養した。共同研究者の房木ノエミ博士がセンダイウイルスベクターによって樹立した外来因子フリー iPS 細胞を使用した。培養液は ReproCell 社の Primate ES cell culture medium に bFGF を添加して用いた。フィーダーのない条件としては、ReproCell FF(あるいは FF2) 培地に bFGF

を添加した。

iPS 細胞を 10 $\mu$ M の Rho kinase 阻害剤 Y27632 で 1 - 2 時間処理した後、ReproCell 社の細胞解離液で処理し、適当な大きさの塊に解離したのち、非接着性の丸底 96 穴プレート (Lipidure coat) で 1 週間浮遊培養して胚様体 (Embryoid body) を形成させた。あるいは 0.25% のトリプシン-EDTA 溶液で単一細胞に解離し、10000 個/well で同様に胚様体を形成させた。この間、中胚葉誘導因子であるアクチビンの他、レチノイン酸などを加えて比較した。その後、ゼラチンあるいはファイブロネクチンでコートした培養皿に接着させてさらに 1 週間培養した。

(倫理面への配慮)

難治性疾患患者由来の iPS 細胞ではなく、正常人由来のものを共同研究者の房木ノエミ博士から譲渡された。学内の倫理委員会での承認済みである。

### C. 研究結果

非接着性丸底 96 穴プレートを使うことによって、胚様体の大きさのコントロールが可能になった。iPS 細胞を Y27632 で前処理した後、細胞塊に解離し、さらに Y27632 存在下で胚様体を形成させた場合が、最も再現率が高かった。単一細胞への解離や、解離後遠心 (1500 rpm, 5 分) する方法 (spin EB 法) も試みたがそれを上回る効果はなかった。アクチビンを添加したものは、全く因子を加えない場合に比較して、胚様体の発育がよく、内腔形成も良好であった。さらにアクチビンと Wnt3a を添加することによって、

PDGFR $\alpha$ 陽性の沿軸中胚葉細胞を誘導することができた。

一方、2次元での平面培養による分化誘導法も試みたが、フィーダーに依存して維持されている iPS 細胞を直接細胞外マトリクス上で分化させようとしても、接着性及び生存率が悪い。フィーダー細胞の混入の影響も無視できないため、フィーダーフリーで短期間培養してから分化誘導を試みたが、この間に分化能が障害されていることが示唆された。Thompson らがわずか 8 種類の化合物からなる単純な組成の培地 (E8) を発表した (Chen et al. Nat Methods, 2011)、これと ReproCell 社の FF 及び新世代の FF2 培地との比較を進めた。その結果、我々の使用しているセンダイウイルスベクターによって樹立した iPS 細胞株は、ラミニンコートプレート上で FF2 によって最もよく維持されることが判明した。

現在までのところ、フィーダー上で維持している iPS 細胞を、ラミニンコートプレート上で FF2 培地で数日培養することによってフィーダー細胞を除去し、Y37632 で前処理したあと、細胞塊にして胚様体を形成させ、アクチビンと Wnt3a を作用させることが、中胚葉誘導に最も適していることが明らかになった。

### D. 考察

山中らが樹立した第一世代の iPS 細胞には外来性因子が残存するのに対し、センダイウイルスベクターによる iPS 細胞は、外来因子フリーのためより高い分化能を期待できる。今後さらに条件を検討したい。難治疾患由来の iPS 細胞は個人

情報保全等の法的整備が完了していないため、本分担研究では正常人由来のものを先行させた。もちろん計画全体としては難治疾患由来 iPS 細胞の使用整備を迅速に進めた。

ReproCell 社の培地には Invitrogen 社の Knockout Serum Replacement (KSR) が用いられているが、KSR には血清由来のアルブミン分画が含まれるため、完全な無血清培地ではない。これに対して E8 は iPS/ES 細胞の培養で必須とされる $\beta$ -メルカプトエタノールを敢えて除くことでアルブミンも不要になっており、ロット差に影響されないことが期待されたが、少なくとも我々の使用する iPS 細胞株では良好な結果は得られなかった。

ES細胞やiPS細胞は、株によってばらつきがあることが知られており、分化条件が株によって異なることが予測される。本計画では各疾患から最低3株のiPS細胞を作ること为目标にしているが、これですべての分化誘導のニーズを満たすのは難しい可能性がある。貴重なiPS細胞株がそれぞれ同等に未分化状態を維持し、分化能をもつのが望ましい。マウスのES細胞やiPS細胞では、そのようないわゆる ground stateの条件が報告されているが、ヒトES/iPS細胞では確立されていない。JaenischらによってマウスES/iPS細胞のような形態とシグナル経路をもつヒト naïve iPSが報告されている (PNAS, 2010)。外来因子なしでの自己複製維持が10-15世代と一過性である欠点をもつものの、その間は単一細胞から継代でき、分化誘導には有益と考えられる。この方法も試してみたが、一旦確立されたiPS細胞をnativeな状

態に持ち込むことはできなかった。ブタの naïve iPSとされる細胞も学会レベルでは発表されているが、キメラ作成能に劣り、さらなる技術開発が必要である。

## E. 結論

外来因子フリーiPS細胞の、簡便な中胚葉分化誘導条件を確立した。さらに改善を重ね、早期に科学コミュニティーに還元したいと考えている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fujimura S, Jiang Q, Kobayashi C, and Nishinakamura R. Notch2 activation in the embryonic kidney depletes nephron progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21(5): 803-810, 2010.

2. Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K, Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka SS, and Nishinakamura R. Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(20): 9240-9245, 2010.

### 2. 学会発表

Nishinakamura R. Progenitor cell populations in the metanephros (oral presentation). 11<sup>th</sup> International Workshop on Developmental Nephrology (organizing committee member). Aug 25, 2010, New Paltz, NY, USA.

Nishinakamura R. Renal stem cells: Roles in the embryonic kidney (invited oral presentation). 15<sup>th</sup> congress of the international pediatric nephrology association. Aug 31, 2010. NY, USA.

Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney (invited oral presentation) The16<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation. From Stem Cells to Organisms. Nov 17, 2010, Nara, Japan.

Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney (invited lecture) The11<sup>th</sup> Asian Congress of Pediatric Nephrology. Jun 2, 2011, Fukuoka, Japan.

西中村隆一 発生期におけるネフロン前駆細胞維持機構（口演）第54回日本腎臓学会 2011年6月15日、横浜

Nishinakamura R. Nephron progenitors in the embryonic kidney (シンポジウムオーガナイザー及び口演) 第34回分子生物学会年会 2011年12月13日、横浜

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし



センダイウイルスベクターを用いた遺伝子挿入のない疾患由来  
iPS 細胞株の樹立

研究分担者 房木ノエミ ディナベック株式会社  
細胞工学グループ・リーダー

### 研究要旨

本研究は難治性疾患患者由来体細胞から、染色体非組込み・細胞質増殖型センダイウイルス(SeV)ベクターを用いて外来因子フリーの iPS 細胞を作製し、バンク化を行い、疾患発症機序の解明と治療法の開発研究に広く役立てることを目的とする。本研究の遂行のため、研究分担者は熊本大学に初期化 SeV ベクターを3年間で合計215セットの提供を行った。その中には非侵襲的に患者検体を採取できる血液細胞用の初期化ベクターも含まれる。また糖原病患者、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)患者、および筋ジストロフィー（ディシュエンヌ型およびベッカー型）患者皮膚細胞由来線維芽細胞から、SeV ベクターを用いて外来因子フリーiPS細胞株を複数株樹立した。樹立した iPS 細胞は無限増殖し、ヒト ES マーカーを発現し、SeV 陰性とソースの確認後に凍結保存した。各 iPS 細胞株の4因子の発現を比較すると、株間での発現は極めて均一であり、非染色体組込みベクターによる初期化法の優位性が示唆された。また3因子搭載新型温度感受性ベクターを開発し、誘導と除去の効率が大幅に向上した。本ベクターを用いる事で、外来因子組込みノイズのない、均質な大量の疾患 iPS 細胞作製が可能となった。

#### A. 研究目的

難治性疾患の生体試料は、希少性が高く有限であり、要求に応じて幅広く供給することは困難な部分が多い。そこで、この問題点を克服するために、難治性疾患由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)の委託作製と、作製したiPS細胞のバンク化に向けての基盤研究を遂行した。本研究では、国内で開発された最新のセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いた。この方法

では、遺伝的背景が均一で外来因子フリーの細胞が簡便に、かつ、最も効率よく樹立され、従来法のもつ外来因子の遺伝子挿入という欠点を無くした画期的な方法である。本研究分担者は、難治性疾患細胞由来iPS細胞バンクのための、SeVベクターの熊本大学への提供、および新型ベクターの開発、それを用いた4疾患8患者由来外来遺伝子フリーのiPS細胞の樹立を分担した。

## B. 研究方法

熊本大学にて樹立された糖原病由来線維芽細胞 (A000001)、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)3患者由来線維芽細胞(A000002, 3, 4)、筋ジストロフィー患者 (ディッシュエンヌ型2例:DMDおよびベッカー型 1 例:BMD) 由来線維芽細胞 A000015, 17, 18を用い、それぞれ山中四因子 (ヒトOCT3/4, KLF4, SOX2, c-MYC遺伝子) 搭載SeVベクターにてiPS細胞の誘導を行った。SeVベクターは4因子搭載ベクターカクテルの他に、新型3因子同時搭載型SeVベクターを用いた (図1下)。3因子同時搭載型SeVベクターは、PM位にKLF4, OCT3/4, SOX2の順に介在配列を挟み配置した(KOS)。同ベクター骨格は従来のTS ΔFの他、温度感受性のTS12 ΔFを用い、組み合わせるc-MYC搭載ベクターはTS12 ΔF、もしくはより温度感受性の高いTS15 ΔFにした。iPS細胞の誘導方法は従来通り、4因子カクテルの場合は、MOI=3で、新型ベクターの場合はMOI=30で行った。誘導6日後に、感染細胞をMEF細胞上に移し、翌日霊長類ES培地にbFGFを加え培養を行った。iPS細胞の誘導効率は、コロニーのヒトES細胞様形態と、アルカリホスファターゼ陽性を基準として判断し、播種した線維芽細胞数に対する陽性コロニー数にて誘導効率を算出した。得られたiPS細胞からRNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを作製してRT-PCRを行い、SeVベクターの残存およびヒトES細胞マーカーの発現を確認した。SeVベクターの残存は、RT-PCRの他に、抗SeV抗体による免疫染色も行い、確実に除去されてい

ることを再確認した。外来遺伝子フリーを確認したiPS細胞株は、ELISA法にてマイコプラズマ陰性確認後、液体窒素タンクにて冷凍保管を行っており、一部細胞バンクへ委託を行った。

(倫理面への配慮)

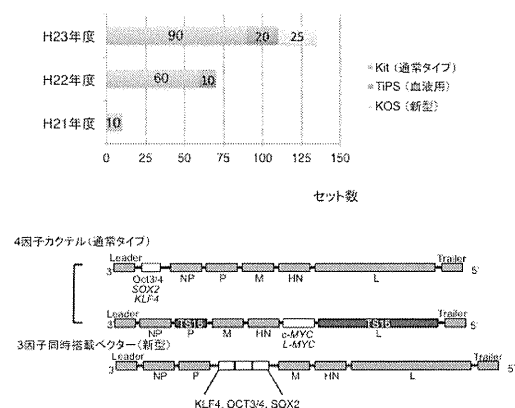
熊本大学にて樹立した患者由来初代培養線維芽細胞株は、匿名化され、社内倫理委員会を通し倫理面に問題がないことを確認してから受け入れを行った。

## C. 研究結果

### 1. ベクターの生産および提供

熊本大学へ3年間を通じ、初期化SeVベクターを合計215セット送っている (図1)。研究分担者らは、非侵襲的に患者検体を採取できる血液細胞からSeVベクターを用いてiPS細胞を高効率に樹立出来る事を報告しているが、送付ベクターも、患者負担軽減のため、通常ベクターの他、血液用高濃度ベクターのリクエストが増加している。最終年度は樹立細胞株数の増加によりベクター提供も増加し、省力化のため3因子搭載新型ベクターも送っている (図1上)。

図1. 熊本大学へのベクター提供



### 2. 難治性疾患患者由来iPS細胞の作製

糖原病患者由来線維芽細胞A000001からは10株、家族性アミロイドポリニューロパチー患者由来線維芽細胞3株：A000002, A000003, A000004からは2年度に渡り、それぞれ30, 36, 33株のiPS細胞を樹立した。同時並行のiPS細胞誘導実験では、誘導効率の平均はA00001では0.016%、A000002では0.054%、A000003では0.40%、A000004では0.12%となり、誘導元の線維芽細胞株により誘導効率が異なったが、すべての細胞でiPS細胞を誘導することに成功した(図2)。RT-PCRおよび抗SeV抗体による免疫染色により、継代数7~12(誘導後約2~3ヶ月)で調査した74株すべてに於いてSeVベクターおよび導入遺伝子陰性を確認した。これらの外来因子フリー・難治性疾患由来iPS細胞株のヒトESマーカの発現を、RT-PCRで解析し、すべての株でNANOGおよびTERT遺伝子が発現していることを確認した(図3, 4)。FAP-iPS細胞はフィンガープリントでソースを確認後(図5)、2株ずつを熊本大に移送し、分化と病態の再現が得られている。

図2 誘導効率(%)

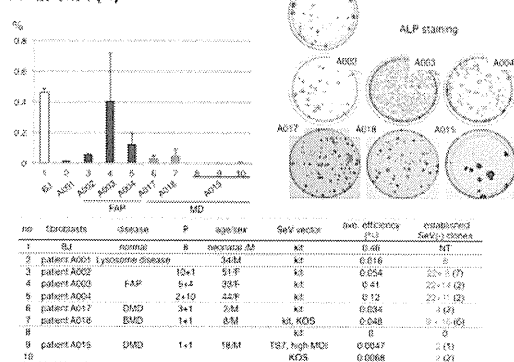


図3 RT-PCRによる糖原病患者由来iPS細胞株の遺伝子発現の解析

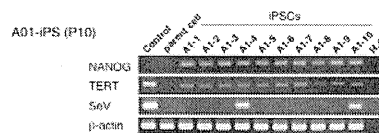


図4 RT-PCRによるFAP患者細胞由来iPS細胞株の遺伝子発現の解析

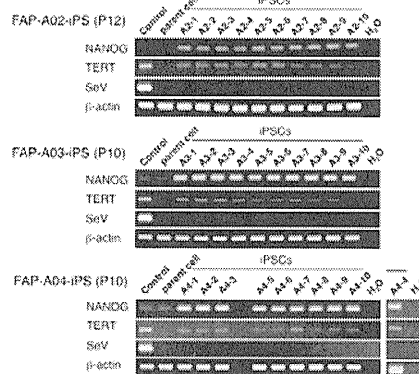
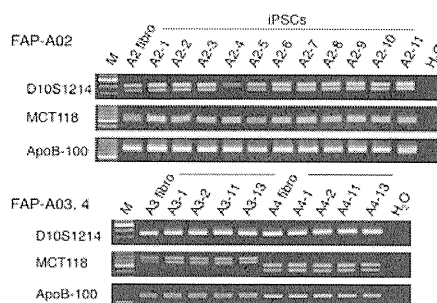


図5 FAP患者細胞由来iPS細胞株のソース同一性の証明(Fingerprinting)



また筋ジストロフィー患者由来線維芽細胞(ディッシュエンヌ型: DMD, A000015, 17およびベッカー型: BMD, A000018)から複数株のiPS細胞を樹立した。誘導効率および樹立株数を昨年度実績の糖原病およびFAP患者由来細胞からのものを合わせ図に示している(図2)。誘導の元となる線維芽細胞株により誘導効率が異なり、年齢・性別・疾患・継代数と相関はなかった。A000015は通常のSeVベクター(kit)では誘導が難しかったが、新規に開発した温度感受性株(TS7)を高MOI(通常3のところを30)で使用した場合および、高効率3因子(OCT3/4, SOX2, KLF4)同時搭載

SeVベクター(KOS)を使用することでiPS細胞の樹立に成功した。これらの外来因子フリー・難治性疾患由来iPS細胞株のヒトESマーカの発現を、RT-PCRで解析し、すべての株でNANOGおよびTERT遺伝子が発現しており、SeVベクター陰性であることを確認した(図6、継代数8以降(誘導後約2~3ヶ月))。免疫染色でもOCT3/4, NANOG, Tra-1-60, -81, SSEA4陽性であった(図7)。以上のiPS細胞株はすべてバンク化に備え凍結保管し、一部を熊本大学へ提供した。

図6 筋ジストロフィー-BMD患者由来iPS細胞株のESマーカ発現(RT-PCR)

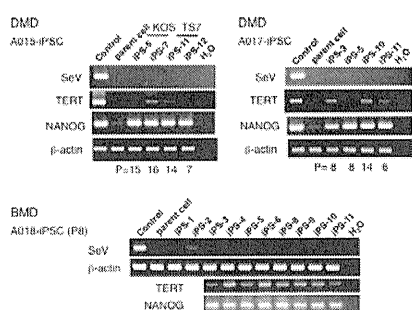
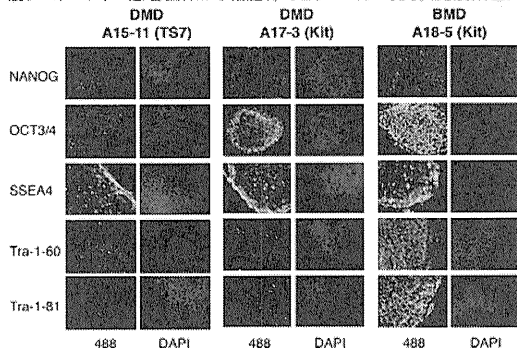


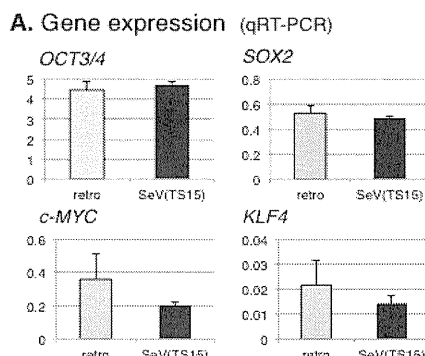
図7 筋ジストロフィー患者由来iPS細胞株のESマーカ発現(免疫染色)



なお樹立されたiPS細胞の均一性を確認するため、BJからレトロウイルスベクターを用いて誘導したiPS細胞6株と、SeVベクターを用いて誘導した15株を比較すると、四因子の発現がSeVベクターを用い

たiPS細胞では均一であることが示唆されている(図8)。

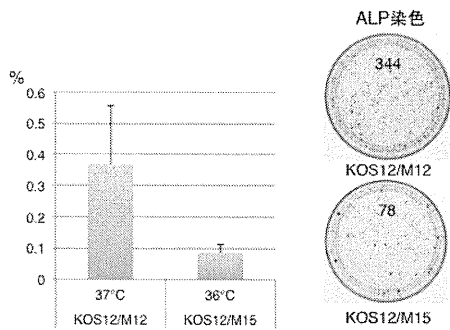
図8



### 3. 3因子同時搭載型ベクターの誘導効率およびBMD患者由来iPS細胞の作製

3因子同時搭載型ベクターとc-MYC搭載ベクターの組み合わせは、ヒト新生児包皮由来細胞BJを用いた予備実験により、従来の4因子を用いた場合より高いことを我々は明らかにしている。また温度感受性でない3因子搭載ベクター(KOS)を用いて、ディシュエンヌ型筋ジストロフィー患者由来iPS細胞の樹立に成功している。最終年度はこのベクターに温度感受性を導入し、それを用いて、震災被害によりストックが失われたBMD患者由来iPS細胞の再作製を行った。その結果、誘導効率はc-MYC/TS12ベクターを含む37°C誘導ベクターセットでは従来の10倍、c-MYC/TS15ベクターを含む36°C誘導ベクターセットでは2倍であった。

図9 新型ベクターによるiPS細胞誘導効率(A018)



37°C誘導のベクターセットでは39°C、1週間の処理でベクター除去が可能であり、36°C誘導のベクターセットでは37°Cで培養する事で自然にベクターが除去された。樹立したiPS細胞は無限増殖し、すべての株でNANOGおよびTERT遺伝子が発現していることを確認した(図10)。樹立した細胞株は、フィンガープリントにより親株との同一性が証明され(図11)、マイコプラズマ陰性を確認し、凍結ストックを作製した。

本ベクターを用いる事で、誘導効率のアップとベクター除去の時間が短縮され、省力化が可能となった。

図10 筋ジストロフィーBMD患者(A018)由来iPS細胞株のESマーカー発現(RT-PCR)

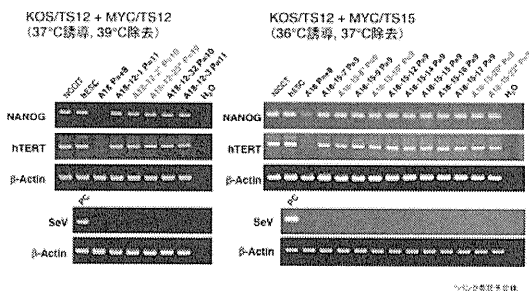
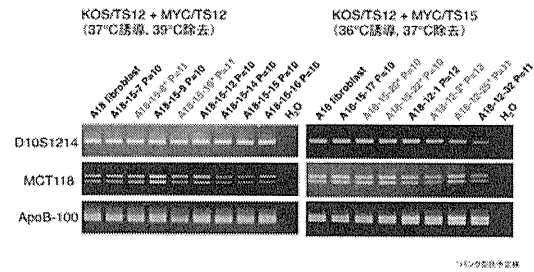


図11 BMD患者細胞(A018)由来iPS細胞株のソース同一性の証明(Fingerprinting)



#### 4. 樹立iPS細胞の熊本大学への移送とバンク委託

分担研究者が作製した難病疾患iPS細胞のうち、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)3患者由来線維芽細胞A000002, A000003, A000004から樹立したiPS細胞11株、筋ジストロフィー患者(DMDおよびBMD)由来線維芽細胞A000015, A000017, A000018から樹立したiPS細胞11株は熊本大学に移送し、年度内にバンクに委託する。

#### D. 考察

細胞質増殖型・RNAウイルス由来の高発現SeVベクターを用いて、難治性疾患患者由来線維芽細胞から短期間で効率よく外来因子フリーのiPS細胞を誘導することに成功した。これらのiPS細胞株は染色体にランダムに外来遺伝子が組み込まれる恐れもなく、本来の親細胞の遺伝的形質を維持しているものと考えられ、その後の難治性疾患の発症機序や病態解析、薬効スクリーニングなどの応用研究に、外来因子挿入のノイズのない材料提供が可能となったと考えられる。また本年度開発した温度感受性3因子同時搭載型SeVベクターは、疾患患者由来iPS細胞を効率よく大量に作製し、ベクターが従来

のものより容易に除去できることから、作製作業の大幅な効率化が可能になった。

## E. 結論

熊本大学にiPS作製キット（通常品・血液用・新型ベクター）を提供し、熊本大学に於ける大量の疾患由来iPS細胞作製に貢献した。また新型ベクターを開発し、iPS細胞の効率的な作製と省力化に成功した。研究分担者が作製したiPS細胞株（FAP, DMD, BMD患者由来）は、ヒトESマーカー：NANOG, TERTの発現と、外来遺伝子フリー、フィンガープリントでソースの確認を行い、すべての株の凍結保管を行い、一部をバンクに委託した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1-1.** K. Yusa, S. T. Rashid, H. S-Marchand, I. Varela, P-Q. Liu, D. E. Paschon, E. Miranda, A. Ordóñez, N. Hannan, F. Rouhani, S. Darche, G. Alexander, S. J. Marciniak, **N. Fusaki**, M. Hasegawa, M. C. Holmes, J. P. Di Santo, D. A. Lomas, A. Bradley and L. Vallier, Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 Oct 12;478(7369):391-4.
- 1-2.** Takahashi S, **Fusaki N**, Ohta S, Iwahori Y, Iizuka Y, Inagawa K, Kawakami Y, Yoshida K, Toda M.: Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation. *J Neurooncol*. 2011 Sep 9.
- 1-3.** H. Ban, N. Nishishita, **N. Fusaki\***, T. Tabata, K. Saeki, M. Shikamura, N. Takada, M. Inoue, M. Hasegawa, S. Kawamata, and S.

Nishikawa: Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.*, 2011 Aug 23;108(34):14234-9. Epub 2011 Aug 5. \*Corresponding author

**1-4.** N. Nishishita, **N. Fusaki**, S. Kawamata: "Generation of ICM-type human iPS cell from CD34+ cord blood cells." Book Title: Embryonic Stem cells / Book1, 2011. ISBN: 978-953-307-412-2.

**1-5.** N. Nishishita, C. Takenaka, **N. Fusaki**, S. Kawamata : "Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood Cells." Book Title: Pluripotent Stem Cells, Nova Science Publishers, Inc. 2011. ISBN: 978-1-60876-738-0

**1-6.** Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, **Fusaki N**, Hasegawa M, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010, 7:11-14.

**1-7.** **Fusaki, N.\***, Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *ProcJpnAcadSer B PhysBiol Sci*. 2009; 85(8):348-62. (\*Corresponding author)

**1-8.** 房木ノエミ : 「センダイウイルスベクターによるiPS細胞の樹立法」

Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.11, 2011, p28-31.

**1-9.** 房木ノエミ : 「センダイウイルスベクターによる血液からのiPS細胞の誘導」  
BIO Clinica (北隆館) Vol.26, No.9, 2011, p48-50.

**1-10.** 房木ノエミ : 「センダイウイルスベクターによるiPS細胞作製法」

Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.1, 2011, p7-9.

**1-11.** 房木ノエミ、長谷川護: 「センダイウイルスベクターを用いた新しいiPS細胞作製技術」

Medical Science Digest, vol.35, No. 12, 2009, p505-508

## 2. 学会発表

**2-1.** N. Fusaki, H. Ban, N. Nishishita, T. Tabata, M. Shikamura, N. Takada, M. Hasegawa, S. Kawamata and S.-I.

Nishikawa: “Temperature-sensitive Sendai virus vectors to generate ‘immaculate’ induced pluripotent stem cells (iPSCs).”  
Cell Symposia (Lisbon, Portugal), 2011/12.10

**2-2.** A. Sugasaki, K. Isono, Y. Oya, H. Jono, N. Shiraki, T. Era, N. Fusaki, M. Tasaki, M. Ueda, S. Shinriki, M. Shono, K. Obayashi, Y. Inomata, S. Kume and Y. Ando. “Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells.”

VIII International Symposium on Familial Amyloidotic Polyneuropathy. (Kumamoto, Japan), 2011/11.21

**2-3.**房木ノエミ、伴浩志、長谷川護 「センダイウイルスを用いた染色体を傷つけない安全なiPS細胞の作製」染色体学会第62回(2011年度)年会公開シンポジウム2

「iPS細胞がもたらす未来:染色体・体細胞リプログラミング技術の新展開」

(神奈川県・平塚) (招待講演) 2011/11.13

**2-4.** H. Ban, N. Fusaki, Y. Ueda, A. Iida, M. Inoue and M. Hasegawa. “Development of an artificial controllable Sendai virus-based gene expression system and its application to the field of regenerative medicine.”

IUMS2011, XV International Congress of Virology, (Sapporo, Hokkaido, Japan), 2011/9.13

**2-5.** Nishishita, N., Takenaka, C., Shikamura, M., Matsushima, K., Fusaki, N., Kawamata, S. “GENERATION OF ICM-TYPE HUMAN IPS CELL FROM CD34+ CORD BLOOD CELLS.”

ISSCR (Toronto, Canada), 2011/6.17

**2-6.** N. Fusaki, H. Ban, T. Tabata, A. Iida, M. Hasegawa, H. Ihn and T. Era: “Efficient generation of patient-specific iPSCs using temperature-sensitive Sendai virus vectors.”

ISSCR (Toronto, Canada), 2011/6.16

**2-7.**N. Fusaki, H. Ban, T. Tabata, A. Iida, M. Hasegawa, H. Ihn and T. Era: “Efficient generation of vector/transgene free human induced pluripotent stem cells from intractable disease patients using non-integrating Sendai virus vectors.”

ASGCT (アメリカ遺伝子・細胞治療学会:Seattle, WA, USA), 2011/5.18

**2-8.** 江良択実、房木ノエミ : 「難治性疾患由来からのiPS細胞の樹立」

日本再生医療学会 2011/3.1 (招待講演)  
**2-9. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Mamoru Hasegawa, Hironobu Ihn and Takumi Era** : Comprehensive generation of intractable disease patient-specific induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors for cell banking using non-integrating Sendai virus vectors.

Keystone symposium 2011/2.1

**2-10. 藤城修平、増田茂夫、西村崇史、房木ノエミ、上田泰次、長谷川護、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、花園豊**:「サルおよびブタ線維芽細胞由来のiPS細胞樹立」

日本分子生物学会 (神戸) 2010/12/10 (T, P)

**2-11. 伴 浩志、房木ノエミ、上田泰次、飯田章博、弘中孝史、井上 誠、長谷川護**

「染色体を傷つけない、各種哺乳細胞分化・脱分化誘導用高効率ベクターの開発」

日本分子生物学会 (神戸) 2010/12/7 (P)

**2-12. 伴 浩志、飯田章博、房木ノエミ、弘中孝史、上田泰次、井上 誠、長谷川護**:「温度感受性変異の利用によるセンダイウイルスベクターの導入細胞からの除去技術の開発」

日本ウイルス学会 (徳島) 2010/11.8 (P)

**2-13. 藤城修平、増田茂夫、西村崇史、房木ノエミ、上田泰次、長谷川護、高橋和利、沖田圭介、山中伸弥、花園豊**:

「GENERATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FROM MONKEY AND PIG FIBROBLAST-サルおよびブタ線維芽細胞由来のiPS細胞樹立」  
日本血液学会(横浜) 2010/9/24

**2-14.Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Mamoru Hasegawa**: 「Non-integrationSeV vector for iPS cell technology」 (招待講演)

2010 Korea-Canada (Ontario) Bio Networking Forum (Seoul) 2010/9.27

**2-15. Shuh-heiFujishiro, Shigeo Masuda, Takashi Nishimura, Noemi Fusaki, Yasuji Ueda, Mamoru Hasegawa, Kazutoshi Takahashi, Keisuke Okita, Shinya Yamanaka**, Yutaka Hanazono:

「GENERATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FROM MONKEY AND PIG FIBROBLASTS」  
日本遺伝子治療学会(宇都宮)2010/7.1, Plenary

**2-16.Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa**: SIMPLE AND EFFICIENT GENERATION OF FOREIGN-GENE-FREE HUMAN iPS CELLS WITHOUT CHROMOSOMAL DAMAGE USING SENDAI VIRUS RNA VECTORS. 日本遺伝子治療学会(宇都宮) 2010/7.1, Plenary

**2-17.Hiroshi Ban, Noemi Fusaki, Akihiro Iida, Yasuji Ueda, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa**: AN ERASABLE (HIT-AND-RUN) VECTOR BASED ON RNA REPLICON VIRUSES MAY BE USEFUL IN CELL-PROGRAMING/REPROGRAMING WITHOUT CHROMOSOMAL DAMAGES.

日本遺伝子治療学会(宇都宮)2010/7.1

**2-18.房木ノエミ、長谷川護**: Highly efficient generation of transgene-free iPS cells using temperature sensitive Sendai virus RNA



vectors. 発生物学会（京都）2010/6.21  
（招待講演）

**2-19.Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Koichi Saeki and Mamoru Hasegawa:**  
TEMPERATURE SENSITIVE SENDAI  
VIRUS VECTORS ENABLE TO  
GENERATE COMPLETELY  
TRANSGENE-FREE HUMAN IPS CELLS  
EFFICIENTLY. ISSCR 8th Annual Meeting,  
San Francisco, USA 2010/6.18

**2-20.Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa.:** Simple and Efficient  
Preparation of Immaculate Human iPS Cells  
with Transgene-Free and No Chromosomal  
Damages Using an Extranuclear Manipulation  
System of Genetic Information, PlasmEx™.  
13th ASGCT annual meeting, Washington  
DC, USA 2010/5.22

**2-21.Hiroshi Ban, Noemi Fusaki, Toshiaki Tabata, Koichi Saeki, Akihiro Iida, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa.:** Erasable  
Non-Integrating RNA Replicon Vectors for  
Generation of Immaculate iPS Cells Free  
from Transgenes and Sequence-Interference.  
13th ASGCT annual meeting, Washington  
DC, USA 2010/5.21

**2-22. 長谷川護、房木ノエミ、伴浩志:**「核  
外遺伝情報操作法による核初期化と細胞  
分化」生化学九州支部会シンポジウム,  
（鹿児島）（招待講演）2010/5.22

**2-23.房木ノエミ、伴浩志、長谷川護**  
「ゲノムを傷つけないiPS細胞の高効率作  
製法：センダイウイルスベクターの利用」  
日本再生医療学会、広島（招待講演）  
2010/3.18

**2-24.伴浩志、房木ノエミ、佐伯晃一、長  
谷川護**「安全で効率的なiPS細胞誘導：セ  
ンダイウイルスベクター(SeV)の優位性」  
日本再生医療学会、広島、2010/3.18

**2-25.Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa**  
Efficient induction of transgene-free human  
pluripotent stem cells using Sendai virus  
vectors, the RNA virus vectors that do not  
integrate into the host genome.

Keystone Symposium(Colorado, USA),  
2010/2.16

**2-26. Chiemi Takenaka, Naoki Nishishita, Ken-Ichirou Kobayashi, Noemi Fusaki, Mamoru Hasegawa, Shin Kawamata and Shin-Ichi Nishikawa:**「Effective generation of  
iPS cells from cord blood cells with Sendai  
virus」 Keystone Symposium (Colorado,  
USA) 2010/2/16 (P)

**2-27.房木ノエミ、伴浩志、佐伯晃一、田  
畑寿晃、長谷川護**「細胞質型センダイウイ  
ルスベクターによる染色体を傷つけない  
外来因子フリーヒトiPS細胞の作製」（日  
本分子生物学会、横浜、2009/12.10）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定  
を含む。）

1. 特許取得  
該当なし

2. 実用新案登録  
該当なし

3. その他  
特になし

### III 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T, Yamada Y	Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis.	Development	139(4)	667-677	2012
Yusa, S. T. Rashid, H. S-Marchand, I. Varela, P-Q. Liu, D. E. Paschon, E. Miranda, A. Ordóñez, N. Hannan, F. Rouhani, S. Darce, G. Alexander, S. J. Marciniak, N. Fusaki, M. Hasegawa, M. C. Holmes, J. P. Di Santo, D. A. Lomas, A. Bradley and L. Vallier	Targeted gene correction of $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells.	Nature	478(7369)	391-394	2011
H. Ban, N. Nishishita, N. Fusaki*, T. Tabata, K. Saeki, M. Shikamura, N. Takada, M. Inoue, M. Hasegawa, S. Kawamata, and S. Nishikawa:	Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors.	Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.	108(34)	14234-14239	2011
房木 ノエミ	センダイウイルスベクターによる iPS 細胞作製法	Medical Science Digest.	37	7-9	2011
Era, T	Mesoderm cell development from ES cells	Methods Mol Biol.	636	87-103	2010
Kitagawa, M Era, T	Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells.	Int. J. Hematol.	91	373-383	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujimura S, Jiang Q, Kobayashi C, and Nishinakamura R	Notch2 activation in the embryonic kidney depletes nephron progenitors.	J. Am. Soc. Nephrol.	21(5)	803-810	2010
Uchiyama Y, Sakaguchi M, Terabayashi T, Inenaga T, Inoue S, Kobayashi C, Oshima N, Kiyonari H, Nakagata N, Sato Y, Sekiguchi K, Miki H, Araki E, Fujimura S, Tanaka SS, and Nishinakamura R	Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	107(20)	9240-9245	2010
Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K.	Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells.	Cell Stem Cell	7	11-14	2010

#### IV 研究成果の刊行物・別冊