

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン症候群患者 からの iPS 細胞の樹立

研究分担者 江良 択実 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)は、皮膚由来の線維芽細胞に4つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで解析に必要な細胞を作り出し研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。皮膚生検サンプルから作製できるので、多くの疾患から作製可能である。iPS細胞樹立には、国内で開発されたセンダイウイルスベクター(SeVベクター)を用いる。この方法では、iPS細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないために、疾患研究により有用なiPS細胞を作製できる。本研究班の協力のもと、三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病4症例の皮膚生検サンプルを現在までに提供していただき、そのうちの3例から皮膚由来線維芽細胞を樹立した。このうちの2症例からiPS細胞を樹立した。

A.研究目的

人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、皮膚由来の線維芽細胞や末梢血液細胞に4つの初期化因子(Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc)を発現させ作製した多能性幹細胞である。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。そこで患者由来のiPS細胞を樹立し、その細胞から病気の標的細胞を作り出して研究することで、病気の発症機序や治療法の開発へ利用できると期待されている。今回、難治性疾患の1つである三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病患者からiPS細胞の樹立を行った。

B.研究方法

1. iPS細胞樹立のための皮膚線維芽細胞の樹立

三重県南部に多発する家族性認知症-パーキンソン病患者の皮膚生検から、皮膚由来初代線維芽細胞

を樹立する。

2. SeVベクターを使ったiPS細胞の確立

SeVベクターによって患者由来線維芽細胞へ初期因子(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc)を一過性に発現させiPS細胞の樹立を行う。

樹立したiPS細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60の免疫染色によるiPS細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現をPCRにて確認する。

(倫理面への配慮)

1) 倫理審査

疾患由来のiPS細胞作製とその解析については倫理委員会ですでに承認済みである。また患者サンプルの提供については、提供機関の倫理審査委員会の承認があることを確認した後、研究を行う。

2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。作製した iPS 細胞等を用いた病因解析・治療薬開発研究は本研究では行わない。また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報公表されることはない。本研究のために特別に用意した番号によって管理し、人種・性別・年齢・診断名以外の患者情報はサンプル提供を行う臨床機関にて管理を行う。作製した iPS 細胞は所属機関において施錠できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、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(必要であれば代表申請者も同席して)同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

皮膚由来線維芽細胞を得るための皮膚生検は通常の医学診療の範囲で行われている方法に準じて行う。痛みは、局所麻酔注射の時のみである。瘢痕は普通のけがの場合と同じである。以上より、危険性はほとんどない。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

C. 研究結果

1. 皮膚由来線維芽細胞の樹立

患者からの同意が得られた 4 例の症例において皮膚生検を行い、うち 3 例から iPS 細胞作成に必要な皮膚由来の線維芽細胞を樹立した。残り 1 例は培養中に汚染があり破棄した。

2. iPS 細胞の樹立

症例から樹立した皮膚由来線維芽細胞を用いて iPS 細胞の作製を行った。線維芽細胞に初期化因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を持つセンダイ・ウイルスを感染させ、感染後 1 週間目にマイトマイシンで処理したマウス胎仔初代線維芽細胞(MEF)上へまきなおした。

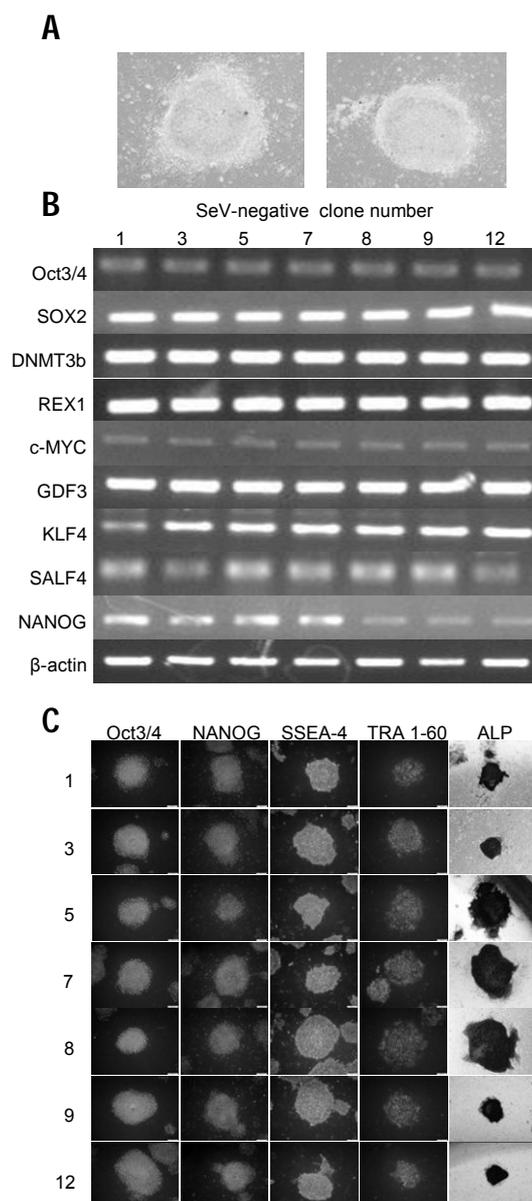


図1 樹立したiPS細胞

- A. iPS細胞のコロニー(明視野)、
- B. 未分化マーカーの発現(RT-PCR)、
- C. 未分化マーカーの発現(免疫染色)と
- D. アルカリフォスファターゼ染色(ALP)

感染から 14 日後ぐらいからコロニーが出現した。感染から 25 日目にコロニーを顕微鏡下にてピックアップしそれぞれのクローンを培養、増幅した。その後、ウイルス除去のために培養の温度を 38 度へシフトさせた。用いたセンダイウイルスベクターは温度感受性株のために 38 度では増殖が停止し、結果としてウイルスベクターフリーの iPS 細胞を得ることができる。PCR にてウイルス除去を確認した後、未分化マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR にて調べ、iPS 細胞であることを確認した。この研究で計 2 症例から 10 数株のウイルスベクターフリーの iPS 細胞株を樹立した(図 1)。

D. 考察

患者 2 例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、その細胞を使って iPS 細胞樹立を行った。iPS 細胞樹立の効率には特に健常者と変わりはない。この結果より、この疾患の異常は iPS 細胞誘導や細胞のリプログラミングには影響を与えないことが示唆された。線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり、樹立まで 1 ヶ月かかる。そこで、血液細胞あるいは血液細胞由来の細胞を iPS 細胞作製のソースとすることで、生検を行わずに末梢血の採血で iPS 細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

今後、作製した iPS 細胞から神経細胞、特に運動神経を分化誘導し疾患の病態解析を行うで進めている。

E. 結論

患者 3 例より皮膚由来の線維芽細胞を樹立し、そのうち 2 例から iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でも iPS 細胞に矛盾することがなかった。したがって、iPS 細胞が樹立されたと言える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

1. 江良 択実 ES/iPS 細胞の分化と臨床への応用 第 115 回 日本小児科学会学術集会 総合シンポジウム 2 iPS 細胞を利用した研究の展開 福岡 2012 年 4 月 20 日
2. 江良 択実 iPS 細胞研究の進展 第 28 回 日本臨床皮膚科医会総会・臨床学術大会 特別講演 福岡 2012 年 4 月 21 日
3. 江良 択実 初心者でも簡単。センダイウイルスベクターを使った外来因子フリー疾患由来 iPS 細胞の樹立とその応用 第 11 回 日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー 横浜 2012 年 6 月 13 日
4. Era, T. Study for iPS cells derived from intractable diseases 第 18 回日本遺伝子治療学会、Corporate Seminer II、熊本、2012 年 6 月 28 日
5. Era, T. Studying the intractable diseases using pluripotent stem cells 第 18 回日本遺伝子治療学会、Symposium III、熊本、2012 年 6 月 29 日

H. 知的所有権の取得状況 (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。