厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
分担研究報告書

劇症患者由来 iPS 細胞の作製

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　再生医療センター長

研究要旨
小児劇症肝炎患者から iPS 細胞を樹立し､特異的な遺伝的多型を有する iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を作製するとともに、その性質を精査する

A. 研究目的

本研究は、小児劇症肝炎患者から iPS 細胞を樹立し、特異的な遺伝子多型を有する iPS 細胞由来肝細胞を作製するとともに、その性質を精査し、毒性評価研究に利用するための材料の提供を行うことを目的とする。

B. 研究方法

劇症肝炎患者由来の iPS 細胞の作製を行った。また、樹立した iPS 細胞を用いて多分化能（胚葉体形成、奇形腫形成）、ゲノム（核型、CGH 等）、未分化性（免疫組織化学、RT-PCR、Transcriptome 等）、形態、エピジェネティクス（Bisulfite sequence 法、Illumina assay 等）、純度（細菌、マイコプラズマ、ウイルス、エンドトキシン等）の解析項目を決定し、評価を行った。

（倫理面への配慮）

組織については、平成 22 年 11 月 1 日施行された「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針（平成 22 年厚生労働省告示第 380 号）」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。さらに、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るため、「厚生労働科学研究に関する指針」に準拠する。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

劇症肝炎患者由来組織より得られた繊維芽細胞より 2 株の iPS 細胞の樹立に成功した。具体的には、センダイウイルスベクターを用いて KLF4, OCT3/4, SOX2, c-MYC の 4 遺伝子を導入した。その結果、ウイルス感染後 10 日ほどでドーム状の形態をもった細胞集団のコロニーが現れた。このコロニーを継代培養すると iPS 様のコロニーが形成された。センダイウイルスが除去されたことを確認し、SSEA-4,NANOG 等の未分化マーカーによる免疫化学染色を行った結果、いずれも陽性であった。また、マウスへの移植による奇形種形成で、三胚葉への分化が確認された。

D. 考察

本研究では樹立実験を 2 回行ったが、1 回目と 2 回目で樹立効率に顕著な差が見られた。このことから、iPS 細胞を樹立する際に重要な条件として様々なことが示唆された。1 細胞あたりに感染させるウイルス量の違い、遺伝子導入細胞の若さおよび増殖能の違い、ピックアップするコロニーの形態学的違い、

継代を行うタイミングなどが挙げられる。これらのことから、樹立効率を向上させるには、遺伝子を導入する細胞に応じて適切な条件を選択することが必要であると考えられた。これらの iPS 細胞を用いて､特異的遺伝子多型の SNP を同定することとなる。

E. 結論

劇症肝炎由来の iPS 細胞の樹立に成功した。また、iPS 細胞から肝細胞分化に向けた検討を行い、プロトコールを確定した。それぞれのクローンについて、特性解析を継続し、毒性評価研究の材料としての信頼性の向上を目指す。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし