

201406020A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

iPS細胞を用いた再生医療における  
造腫瘍性の対策に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成27（2015）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
(再生医療関係研究分野)

iPS細胞を用いた再生医療における  
造腫瘍性の対策に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小澤 敬也

平成27(2015)年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

iPS細胞を用いた再生医療における 造腫瘍性の対策に関する研究 小澤 敬也	-----	1
---	-------	---

### II. 分担研究報告

1. iPS細胞の遺伝子操作に関する研究 小澤 敬也、卜部 匡司	-----	7
2. iPS細胞のエピジェネティクス解析に 関する研究 古川 雄祐	-----	12
3. iPS細胞の移植後の体内動態の解析に 関する研究 阿部 朋行	-----	14

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	18
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	20
-----------------	-------	----

# I . 総括研究報告

総括研究報告書

iPS細胞を用いた再生医療における造腫瘍性の対策に関する研究

研究代表者 小澤敬也 自治医科大学医学部 客員教授

**研究要旨** iPS細胞は再生医療において様々な応用が期待されているが、その造腫瘍性が懸念されており臨床研究推進の妨げとなっている。その解決策の一つとしてiPS細胞に予め自殺遺伝子を搭載しておくことが挙げられる。もし細胞が制御不能となった場合には細胞死作働薬を投与することにより選択的に自殺遺伝子発現細胞を生体から排除できる。本研究では自殺遺伝子としてヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子もしくは、FKBP12とcaspase 9とのキメラ蛋白質 inducible caspase9 (iCasp9) 遺伝子を、アデノ随伴ウイルスが第19番染色体のAAVS1領域に組み込まれる機構を利用し、同領域にピンポイントで導入する。この方法は挿入変異発癌を来さないため特にiPS細胞遺伝子操作には適している。本研究では1) 自殺遺伝子をAAVS1領域に組み込んだiPS細胞を樹立し、2) エピジェネティクス解析によりその発現プロファイルを自殺遺伝子非搭載iPS細胞と比較する、3) マウス、ブタ、ヒツジ胎仔に移植し細胞死作働薬投与により細胞死を誘導できるか検証する、4) 動物に移植後長期観察することにより造腫瘍性を検討する、を研究の柱とする。本年度はiCasp9遺伝子をAAVS1領域に組み込ませるため、EF1 $\alpha$ プロモーターによりiCasp9を発現するカセットとPGKプロモーター下にpuromycin N-acetyltransferase (Puro) を発現するカセットをタンデムにつなぎ、iCasp9カセットの上流に向き合うようp5プロモーターでRepを発現するカセットを配した。iPS細胞にこのプラスミドを導入後、puromycinの存在下で培養を行い、単一iPS細胞由来のクローンを選別した。プラスミド側のプライマーとAAVS1プライマーを用いPCRを行い、増幅産物の塩基配列を解析したところ、87個のクローンのうち、5クローン(5.7%)でiCasp9遺伝子のAAVS1領域への組み込みが確認できた。iCasp9遺伝子もGFP遺伝子と同程度のAAVS1領域への組み込み効率と考えられる。5クローンの内、AAVS1の大きな欠失のない4クローンを解析したところ、Oct4、Nanog、SSEA4、Tra1-60、アルカリホスファターゼなど未分化マーカーが発現していた。iCasp9搭載iPS細胞を自殺遺伝子作働薬AP20187で処理すると30 pM以下の極めて低い濃度で死滅した。以上のことはiCasp9が自殺遺伝子としてiPS細胞で確実に機能することを示している。今後はマウス、ヒツジに移植し*in vivo*でAP20187投与により移植細胞が死滅するか検討する予定である。iPS細胞のエピジェネティクス解析では、自殺遺伝子を組み込んだiPS細胞における遺伝子発現パターンとDNAメチル化状態を次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組み込みによっておこる変化の有無を明らかにする。捉えられた変化と分化能・造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS細胞の機能・安全性に関与する分子を同定するとともにその制御法を開発する。今年度は樹立した1株におけるゲノムのDNAメチル化状態を網羅的に解析し、親株との比較を行った。その結果、導入遺伝子の発現調節領域を含め、異常なメチル化は観察されなかった。モデル動物への移植研究では、ヒツジ胎仔への異種移植系を用いてヒトiPS細胞由来のグラフトを持つヒツジの作製を試みた。また、SLA合致ブタを用いた同種移植系により、iPS細胞の免疫原性の評価を行ったところ、移植したブタiPS細胞は免疫拒絶された。自殺遺伝子搭載iPS細胞に由来する分化細胞を生着した大型動物モデルの作製を目指して、引き続きレシピエント動物の解析を進め、自殺遺伝子の有効性および安全性を評価する予定である。

分担研究者

卜部 匡司

自治医科大学医学部 講師

古川 雄祐

自治医科大学医学部 教授

阿部 朋行

自治医科大学医学部 助教

## A. 研究目的

iPS細胞を特定の細胞や臓器に分化誘導し生体に移植する再生医療は、難治性疾患に対する画期的治療法として開発が期待されている。しかし、人為的にゲノム操作を加えたiPS細胞の造腫瘍性が、安全性の点で解決すべき問題として残されている。その解決策として確実に移植細胞を排除できる仕組みを予めiPS細胞に搭載しておけば、癌化など制御不能の状態となった場合に対応できる。本研究では、挿入変異発癌の可能性のない部位特異的遺伝子挿入法で自殺遺伝子を組み込み、細胞死を誘導できるfail safe システムを確立する。部位特異的遺伝子組み込みは、非病原性のアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) がヒト第19番染色体のAAVS1領域に特異的に組み込まれる性質を利用する。自殺遺伝子としては、ガンシクロビル (GCV) によって細胞死を誘導できる自殺遺伝子チミジンキナーゼ (TK) と、非分裂細胞でも速やかに合成化合物AP1903もしくはAP20187でアポトーシスを誘導できるFKBP12とcaspase 9とのキメラ蛋白質inducible caspase 9 (iCasp9) (N Engl J Med. 365: 1673-83, 2011) を用いる。これら自殺遺伝子をピンポイントで安全なAAVS1領域に組み込ませておけば、挿入変異発癌を起こしにくい自殺遺伝子搭載iPS細胞を得ることができる。樹立したiPS細胞は細胞死誘導薬での応答性を評価するとともに、エピゲノム解析、マイクロアレイ解析を網羅的に行い、外来性遺伝子の組み込み、及び組み込み部位による差がないか解析する。また、ヒツジ胎仔にiPS細胞を移植し腫瘍形成の有無、導入遺伝子産物の免疫原性を長期間観察する。もしこれらの移植実験において腫瘍が形成された場合は、ゲノムやエピゲノムの解析を追加し、その発生機序の解明を試みる。

## B. 研究方法

研究全期間を通して以下のことを実施す

る。1) 安全な遺伝子操作技術を駆使しiPS細胞の遺伝子操作技術を確立 (小澤、卜部)、2) 自殺遺伝子を搭載したiPS細胞を樹立、及び*in vitro*、*in vivo*での細胞死誘導の評価(小澤、卜部)、3) 遺伝子操作iPS細胞の品質解析 (古川)、4) モデル動物への移植による動態解析 (阿部) である。

### 1) iPS細胞の遺伝子操作

AAVS1領域への組み込みは、AAVのRep蛋白質がAAVゲノムの両末端のITR (Inverted Terminal Repeat)もしくはRep蛋白質の発現を制御するp5プロモーター内のRBS (Rep binding site) と、AAVS1上のRBS相同配列に結合することにより起こる。p5プロモーター配列を組み込みに使うとAAVS1領域における外来遺伝子の挿入の向きを規定できるため、本研究ではp5プロモーター配列を用いた。EF1 $\alpha$ プロモーターでiCasp9を発現するカセットとPGKプロモーターでpuromycin N-acetyl transferase (ピューロマイシン耐性遺伝子、Puro) を発現するカセットをタンデムに配し、またp5プロモーターでRepを発現するカセットをiCasp9/Puroカセットに向き合うように挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドを細胞に導入するとp5プロモーターによりRepが発現し、同時にRepによりp5プロモーター内で切断されiCasp9/PuroカセットがAAVS1領域に組み込まれる。またp5プロモーターが破壊されるため、Repの発現がトランスフェクション後早期に停止するメリットもある。iCasp9発現細胞では、合成化合物AP1903もしくはAP20187により細胞死を誘導できる。

昨年度実施したGFPプラスミドのAAVS1領域への組み込み実験の結果を基に、リンパ球より樹立されたiPS細胞でiCasp9遺伝子の組み込み実験を行った。iCasp9/Puro発現プラスミドをiPS細胞にトランスフェクション後、puromycin存在下で培養しsingle cell clonesを得た。クローンよりゲノムDNAを抽出し、プラスミド側プライマーとAAVS1用プライマーでPCRを行い、増幅産物の塩基配列を読みAAVS1に組み込まれているか解析した。クローン化されたiPS細胞がiCasp9を発現していることを確認するためウエスタン解析を行った。自殺遺伝子作動薬を培養上清に加え、iPS細胞が死滅する最小濃度を求めた(小澤、卜部)。またiCasp9発現iPS細胞が親株iPS細胞と同様の未分化状態を維持しているか検討するため、Oct4、Sox2、Klf4、Nanog、SSEA1、Tra1-60

などの発現をRT-PCR法、免疫蛍光染色にて解析した。(小澤、卜部、阿部)。

## 2) iPS細胞のエピジェネティクス解析

自殺遺伝子を組み込んだiPS細胞における遺伝子発現パターンとDNAメチル化状態を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組み込みによっておこる変化の有無を明らかにする。このようにして捉えられた変化と分化能や造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS細胞の機能や安全性に関与する分子変化を同定するとともにその制御法を開発する。(古川)。

## 3) iPS細胞の移植後の体内動態の解析

### ・ ヒツジ胎仔を用いた移植実験

ヒツジ体内にヒトiPS細胞由来のグラフトを生着させて長期観察するために、以下の手順でヒツジ胎仔に移植した。自殺遺伝子搭載あるいは非搭載ヒトiPS細胞を、未分化状態あるいは造血系へと分化させた状態で、免疫寛容状態である妊娠45-65日齢のヒツジ胎仔の皮下、筋肉内あるいは肝臓内に移植した(宇都宮大学農学部附属農場で実施)。妊娠満期(147日齢)で自然分娩、あるいは帝王切開によりヒツジ産仔を得て、ヒトiPS細胞由来のグラフトの有無を解析した。ヒツジ胎仔への移植手術および管理は、宇都宮大学農学部教授の長尾慶和博士(獣医師)にご協力頂き、宇都宮大学農学部附属農場内で実施した。

### ・ SLA合致ブタを用いた移植実験

平成26年度は、平成25年度に引き続いて、自殺遺伝子を搭載していないクラウン系ミニブタiPS細胞を用いて、SLAを合致させたブタ間で同種移植を行った。レトロウイルスベクターを用いて、クラウン系ミニブタ線維芽細胞から作製したブタiPS細胞を、SLAを合致させたブタの精巣または卵巣内に移植し、グラフトまたは腫瘍形成の有無を評価した。移植手術ならびにブタの管理は、自治医科大学先端治療技術開発センター(ピッグセンター)内で実施した。

### (倫理面への配慮)

本研究はヒトiPS細胞を用いるが、その由来となるリンパ球の提供者からはインフォームドコンセントを取得している。また研究実施機関において組換えDNA実験委員会と、倫理委員会の承認を得ている。

マウス、ヒツジ、ブタへの移植実験に関しても、実施機関の動物実験委員会の承認を得ている。実験に当たっては動物福祉または動物実験倫理への十分に配慮、かつ動物愛護には最大限の配慮を払いながら遂行する。

## C. 研究結果

### 1) iPS細胞の遺伝子操作

iPS細胞にiCasp/Puroプラスミドをトランスフェクションしてpuromycinの存在下に培養を行いsingle cell clonesを選択した。クローンよりゲノムDNAを抽出しAAVS1への組込みの有無をPCRにて検討した。解析した87クローンのうち、5クローン(5.7%)でiCasp9遺伝子のAAVS1領域への組込みが確認できた。PCR増幅産物の塩基配列を解析し、iCasp9プラスミドとAAVS1の配列が繋がっていることを確認し、昨年度実施したGFPプラスミドでの検討と同様、プラスミドとAAVS1での組込み必須配列近傍に切断され両者が繋がっていることが明らかとなった。

また、樹立したiPS細胞クローンのウエスタン解析を行い、iCasp9が発現していることが確認できた。樹立クローンが自殺遺伝子作動薬AP20187にて死滅するか検討したところ、AP20187が30 pM以下でほぼ完全に死滅した。一方親株、GFP発現iPS細胞ではAP20187の濃度が100 nMであっても生存し、増殖能に影響はなかった。更にiCasp9発現iPS細胞が未分化状態を維持しているかRT-PCRで検証したところ、Oct4、Sox2、Klf4、Nanogなどの未分化マーカーが親株と同様iCasp9-iPS細胞でも検出された。また免疫蛍光染色でSSEA4、Tra1-60、が親株と同様陽性であった。

### 2) iPS細胞のエピジェネティクス解析

ヒト線維芽細胞およびリンパ球にOct4・Sox2・N-myc・KLF4・DNp53を導入し、iPS細胞を樹立した。それらのAAVS1領域に自殺遺伝子(HSV-TK、inducible caspase-9)を組込み、必要に応じて細胞死を誘導することができるiPS細胞を4株樹立した。その中の1株におけるゲノムのDNAメチル化状態を、NOMe-Seqによって網羅的に解析し、親株との比較を行った。その結果、導入遺伝子の発現調節領域を含め、異常なメチル化は観察されなかった。

### 3) iPS細胞の移植後の体内動態の解析

#### ・ ヒトiPS細胞のヒツジ胎仔への移植実験

造血系に分化誘導した自殺遺伝子非搭載ヒトiPS細胞を、肝臓内に移植し産仔を得た。体表面に腫瘍等の形成は認められず、骨髄塗抹標本では白血病のような所見は認められなかった。これらの産仔の骨髄細胞を用いて、ヒト特異的なプライマーを用いたPCRを行った結果、ヒトiPS細胞の生着が認められた。しかしながら、ヒトCD45抗体を用いたFACS解析では、ヒト細胞を検出できなかった。これらの産仔ではヒトiPS細胞由来のグラフトが微量と考えられるため、自殺遺伝子の発現を評価するのは困難と考えた。したがって平成26年度から、未分化iPS細胞をヒツジ胎仔に移植することで、肉眼的な奇形腫（テラトーマ）を形成・生着させることを試みた。自殺遺伝子搭載iPS細胞由来のテラトーマを肉眼的に形成・生着できれば、自殺遺伝子が三胚葉由来の様々な分化段階の細胞で長期間にわたって発現するか検証することができる。

自殺遺伝子搭載あるいは非搭載ヒトiPS細胞を計6頭のヒツジ胎仔に移植したが、いずれも移植後に流産した。次に、ヒトiPS細胞株を変更して移植実験を試みており、このヒトiPS細胞株では妊娠維持個体3例が得られている。

#### ・ SLA合致ブタを用いた移植実験

ブタiPS細胞をSLAが合致したブタの精巣または卵巣へ移植した結果、奇形腫は形成されず、移植部位において炎症細胞の浸潤が観られた。また、移植個体からブタiPS細胞に対する抗体が検出された。さらに、*in vitro*においてブタiPS細胞は、SLA合致ブタのNK細胞や補体などの自然免疫反応によって障害されることが明らかとなった。以上のことから、未分化なiPS細胞の残存による奇形腫形成の可能性は低いことが示された。一方で、ブタ同種移植実験系では、iPS細胞の生着および長期評価は出来なかった。

## D. 考察

1) iPS細胞の遺伝子操作  
iCasp9発現プラスミドをヒトiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試みたところ、解析したクローンの5.7%でAAVS1領域への組込みが認められた。組込み部位の詳細な解析でiCasp9プラスミドの

AAVS1特異的組込み効率が5.7%であったことは、GFPプラスミドでの5%と同程度であ

るが、その他の細胞では10-40%と報告されていることから更に諸条件を検討し効率を上げることが望ましい。昨年度のGFPプラスミドを用いた実験では、GFPの一過性発現が約30%の細胞で認められたことから、さらに導入効率を上げればAAVS1への組込み効率も上昇すると考えられる。他のトランスフェクション方法も検討し、高い遺伝子導入効率を達成できる方法を見つける必要がある。

AAVS1にiCasp9が組み込まれたiPS細胞の解析から、得られたクローンすべてiCasp9を発現していた。またiCasp9作動薬AP20187を加えると30 pMという低濃度でiPS細胞は死滅しており、iPS細胞がAP20187に対して極めて感受性が高いことが分かった。今後はiPS細胞を*in vitro*で分化させたり、マウスに移植しテラトーマを形成させ同様に作動薬で処理しiPS細胞由来の分化細胞が死滅するか検証する予定である。

iCasp9搭載iPS細胞が未分化状態を維持しているかRT-PCR法、免疫蛍光染色にて検討したところ、親株と同様未分化状態が保たれていることが確認できた。このことはAAVS1にiCasp9が組み込まれてもiPS細胞に大きな影響を与えていないということの傍証となる。

### 2) iPS細胞のエピジェネティクス解析

今回得られた結果から、自殺遺伝子はメチル化による機能阻害等を受けないと推察される。また、自殺遺伝子の組込みは、iPS細胞の増殖・分化能に影響を与えないことが期待される。

### 3) iPS細胞の移植後の体内動態の解析

#### ・ ヒトiPS細胞のヒツジ胎仔への移植実験

肉眼的にグラフトを生着した大型動物を作製するために、未分化状態でヒトiPS細胞をヒツジ胎仔に移植することで、テラトーマの形成を試みた。すなわち、自殺遺伝子搭載あるいは非搭載ヒトiPS細胞を計6頭のヒツジ胎仔に移植した。その結果は、移植後に6例全て流産した。これに対し、ヒトiPS細胞株（線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて作製したヒトiPS細胞株）を変更したところ、移植直後に流産せずに妊娠維持できた個体が3例得られた。いずれのiPS細胞においても、免疫不全マウスで成熟したテラトーマを形成することを確認している。それぞれの細胞株では、由来細胞やiPS細胞樹立用の遺伝子を導入する方法が異なる。移植後の流産の



直接的な原因の解明を試みながら、妊娠が維持できるヒトiPS細胞株を用いて、ヒツジ胎仔への移植実験を続ける予定である。

#### ・ SLA合致ブタを用いた移植実験

当初、ブタiPS細胞をSLA（ヒトのMHCに相当）合致ブタに移植して奇形腫を作らせることを計画していたが、予想に反してSLAを合致させるだけではiPS細胞はブタに生着せず、奇形腫を形成しなかった(Mizukami Y, Abe T, et al. *PLOS ONE* 2014; 9:e98319)。このことから、ブタiPS細胞へ自殺遺伝子の搭載とSLA合致ブタへの移植実験は今後、本研究から除くこととした。

### E. 結論

自殺遺伝子の一つであるinducible caspase 9をヒトiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試み、5.7%の効率でAAVS1へ組み込ませることができた。自殺遺伝子搭載iPS細胞は極めて低濃度の自殺遺伝子作動薬にて死滅することが確認できた。今後マウスに移植し*in vivo*でiPS細胞由来の細胞が作動薬の投与により死滅するか検討する予定である。

エピジェネティクス解析ではゲノムのメチル化パターンを自殺遺伝子搭載iPS細胞と親株と比較し変化がないことが分かった。

ヒトiPS細胞を用いたヒツジ胎仔への移植実験を引き続き進行中である。自殺遺伝子搭載iPS細胞に由来する分化細胞を生着した大型動物モデルの作製を進め、自殺遺伝子の有効性および安全性の評価をしていく予定である。

### F. 健康危険情報

本研究では、特に有害事象や不都合は観察されていない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Ayuso, E., Blouin, V., Lock, M., McGorray, S., Leon, X., Alvira, M. R., Auricchio, A., Bucher, S., Chtarto, A., Clark, K. R., Darmon, C., Doria, M., Fountain, W., Gao, G., Gao, K., Giacca, M., Kleinschmidt, J., Leuchs, B., Melas, C., Mizukami, H., Muller, M., Noordman, Y., Bockstael, O., Ozawa, K., Pythoud, C., Sumaroka, M., Surosky, R., Tenenbaum, L., van der Linden, I., Weins, B., Wright, J. F., Zhang, X., Zentilin, L., Bosch, F., Snyder, R. O., Moullier, P.: Manufacturing and characterization

of a recombinant adeno-associated virus type 8 reference standard material. **Hum Gene Ther** 25: 977-987, 2014.

2. Tsukahara, T., Iwase, N., Kawakami, K., Iwasaki, M., Yamamoto, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Teruya, T., Ido, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Brentjens, R., Ozawa, K.: The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. **Gene Ther** 22: 209-215, 2015.
3. Uehara, T., Kanazawa, T., Mizukami, H., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Misawa, K., Carey, T. E., Suzuki, M., Ichimura, K., Ozawa, K.: Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Cancer Sci** 105: 72-80, 2014.
4. Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda S, and Furukawa Y: Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem/progenitor cells for malignant transformation. **Blood**, published online on April 22; doi:10.1182/blood-2014-11-610907, 2015.
5. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, and Yanagisawa K: Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. **Oncogene** 34: 310-318, 2015.
6. Koyama D, Kikuchi J, Hiraoka N, Wada T, Kurosawa H, Chiba S, and Furukawa Y: Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 28: 1216-1226, 2014.
7. Hiraoka N, Kikuchi J, Koyama D, Uesawa M, Akutsu M, Wada T, Abe M, Mori S, Nakamura Y, Kano Y, and Furukawa Y: Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies. **PLoS One** 9: e90675, 2014.
8. Kikuchi J, Koyama D, Mukai HY, and Furukawa Y:. Suitable drug combination with bortezomib for multiple myeloma under stroma-free conditions and in contact with fibronectin or bone marrow stroma. **Int. J. Hematol.** 99: 726-736, 2014.
9. Sripayap P, Nagai T, Hatano K, Kikuchi J, Furukawa Y, and Ozawa K: Romidepsin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cells. **Acta Hematol.** 132: 1-4, 2014.
10. Abe T, Hanazono Y, Nagao Y. A long-term follow-up study on the engraftment of human

- hematopoietic stem cells in sheep. *Exp Anim.* 2014;63(4):475-481.
11. Mizukami Y, Abe T, Shibata H, Makimura Y, Fujishiro SH, Yanase K, Hishikawa S, Kobayashi E, and Hanazono Y. MHC-matched induced pluripotent stem cells can attenuate cellular and humoral immune responses but are still susceptible to innate immunity. *PLoS One.* 2014;13;9(6):e98319.
2. 学会発表
    1. Urabe, M.: Transgene insertion into the AAVS1 site, a safe harbor in the human genome by adeno-associated virus integration machinery. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Aug. 6-8, 2014, Tokyo. (Abstracts p108)
    2. Urabe, M.: Gene manipulation of iPS cells and mesenchymal stem cells. 第75回日本血液学会学術集会 2014年10月31日-11月2日, 大阪. (臨床血液 第55巻 9号 p227)
    3. Urabe, M., Miyata, S., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Genetic engineering in iPS cells by adeno-associated virus Rep protein. 第37回日本分子生物学会年会2014年11月25-27日, 横浜.
    4. 古川雄祐: 形態から学ぶ顆粒球系細胞分化とその異常-白血病・MDS早期発見のポイント。第15回日本検査血液学会学術集会、仙台、2014年7月20日。
    5. 古川雄祐: 多発性骨髄腫に対する薬物療法の基礎。第52回日本癌治療学会学術集会、臓器別シンポジウム16「多発性骨髄腫治療戦略のUp to Date」、横浜、2014年8月29日。
    6. 古川雄祐: 腫瘍特異的ヒストン修飾を標的とする新規抗がん療法。第73回日本癌学会学術集会、ランチョンセミナー15、横浜、2014年9月26日。
    7. 古川雄祐: Purine analog-like properties of bendamustine underlie its unique anti-tumor activity。第76回日本血液学会総会、Oral Session 28 "Myeloma Therapy - Transplantation Ineligible Patients"、大阪、2014年10月31日。
    5. 古川雄祐: 長期生存を目指す骨髄腫治療戦略。第76回日本血液学会総会、コーポレートセミナー15、大阪、2014年10月31日。
    6. 阿部朋行 サイエンティスト・クエスト～あなたと考えるあたらしい科学とくらし～(日本科学未来館)、2015年3月22日
    7. 阿部朋行、長尾慶和、原明日香、スブド・ビャンパー、柳瀬公秀、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、福森理加、花園豊 ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着促進・増幅技術の開発 第17回日本異種移植研究会 下野市 2015年3月14日、抄録集p.16
  8. 阿部朋行 大動物を用いた再生医療研究～ヒト血液細胞をもつヒツジの作出 第18回予防衛生協会セミナー、つくば市、2015年2月14日 (抄録集 p.5)
  9. 水上喜久、阿部朋行、柴田宏昭、牧村幸敏、藤城修平、柳瀬公秀、菱川修司、小林英司、花園豊 Transplantation-related Immunity of Porcine Induced Pluripotent Stem Cells in the MHC-matched Allogeneic Setting. 第2回日本先進医工学ブタ研究会 (静岡県三島市) 2014年10月24-25日
  10. Tomoyuki Abe, Suvd Byambaa, Kimihide Yanase, Asuka Hara, Yoshikazu Nagao and Yutaka Hanazono. Hematopoietic Engraftment of Human iPS Cells in Sheep after in Utero Transplantation. 第13回 自治医科大学シンポジウム (下野市) 2014年9月5日、講演要旨集p.64
  11. 水上喜久、阿部朋行、柴田宏昭、牧村幸敏、藤城修平、柳瀬公秀、菱川修司、小林英司、花園豊 Transplantation-related Immunity of Porcine Induced Pluripotent Stem Cells in the MHC-matched Allogeneic Setting. 第13回 自治医科大学シンポジウム (下野市) 2014年9月5日、講演要旨集p.47
  12. 柳瀬公秀、阿部朋行、Suvd Byambaa, 原明日香、長尾慶和、花園豊 ヒツジにおけるヒト造血の生着促進技術の開発 第13回 自治医科大学シンポジウム (下野市) 2014年9月5日、講演要旨集p.25
  13. Yoshikazu Nagao, Tomoyuki Abe, Asuka Hara, Kazuko Ogata, Mio Yamaguchi, Borjigin Sarentonglaga, Rika Fukumori and Yutaka Hanazono. Human hematopoietic re-constitution in ovine fetuses after in utero transplantation of human iPS cells. 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver, July 29-August2, 2014. (Reproduction in Domestic Animals, Vol.47, s4, 589.)
  14. Mizukami Y, Abe T, Shibata H, Makimura Y, Fujishiro SH, Yanase K, Hishikawa S, Kobayashi E, and Hanazono Y. Immune responses against induced pluripotent stem cells in porcine <MHC-matched allogeneic setting. Swine in Biomedical Research Conference. Raleigh, United States of America, July 6-8, 2014.
  15. 阿部朋行、長尾慶和、柳瀬公秀、原明日香、ボラジギン・サラントラガ、緒方和子、山口美緒、花園豊 ヒツジ子宮内移植系におけるヒト造血細胞の生着・増幅技術の開発 第61回日本実験動物学会総会 札幌 2014年5月15-17日 (抄録集 153)

## Ⅱ. 分担研究報告

分担研究報告書

iPS細胞の遺伝子操作

研究代表者 小澤敬也 自治医科大学医学部 客員教授  
研究分担者 卜部匡司 自治医科大学医学部 講師

**研究要旨** 非病原性のアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV) の AAVS1 領域特異的組込み機構を利用し、同部位へ自殺遺伝子を組み込ませるシステムを iPS 細胞で樹立することを旨とした。inducible caspase 9 (iCasp9) 遺伝子を AAVS1 領域に組み込ませるため、プラスミドとして、EF1 $\alpha$  プロモーターにより iCasp9 を発現するカセットと PGK プロモーター下に puromycin N-acetyltransferase (Puro) を発現するカセットをタンデムにつなぎ、iCasp9 カセットの上流に向き合うよう p5 プロモーターで Rep を発現するカセットを配した。iPS 細胞にこのプラスミドを導入後、puromycin の存在下で培養を行い、単一 iPS 細胞由来のクローンを選別した。プラスミド側のプライマーと AAVS1 プライマーを用い PCR を行い、増幅産物の塩基配列を解析したところ、87 個のクローンのうち、5 クローン(5.7%) で iCasp9 遺伝子の AAVS1 領域への組込みが確認できた。昨年度実施の GFP 遺伝子では 5.0% の AAVS1 への組込み効率であったことから iCasp9 遺伝子も同程度の AAVS1 領域への組込み効率と考えられる。5 クローンの内、AAVS1 の大きな欠失のない 4 クローンを RT-PCR で解析したところ、Oct4、Nanog など未分化細胞で検出されるマーカーが親株と同様に発現していた。また SSEA4、Tra1-60 の細胞表面マーカーおよびアルカリホスファターゼも陽性であった。iCasp9 搭載 iPS 細胞を自殺遺伝子作動薬 AP20187 で処理すると 30 pM 以下の低濃度で死滅した。今後はマウス、ヒツジに移植し *in vivo* で AP20187 投与により移植細胞が死滅するか検討する予定である。

## A. 研究目的

iPS細胞は再生医療等における様々な応用が期待されている。しかしながら、人為的に体細胞から未分化多能性幹細胞状態に強制変換されていること、場合により初期化遺伝子がゲノムに組み込まれていること、iPS細胞が増殖旺盛であることなどのため、iPS細胞由来の細胞を生体に移植した場合のがん化の危惧が払拭されていない。実際動物実験では移植後の腫瘍の発生が報告されている。

非病原性のアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus: AAV)は第19番染色体のAAVS1領域(19q13.42)に特異的に組み込まれる性質を有する。この部位特異的組込みメカニズムは明らかにされており、その機構を利用し任意の遺伝子を同領域に特異的に組み込ませることができる。AAVS1領域はMyosin Binding Subunit 85 (MBS85) の第一エクソン、イントロンに含まれるが、AAVS1へ外来遺伝子を組み込むとMBS85の発現は消失する。し

かしながらAAVS1へ外来遺伝子を導入した正常表現型のトランスジェニックマウスの作出が可能であることから、少なくともMBS85の一アレルの破壊は許容できると考えられる。またAAVS1領域に外来性遺伝子を組み込んでもがん化を来す事例は報告されておらず、挿入変異発がんを引き起こさない安全な部位と考えられる。

iPS細胞に前もって自殺遺伝子を組み込ませておけば、iPS細胞もしくはそれ由来の細胞ががん化など制御不能となった場合に、この自殺遺伝子を作動させることにより細胞死を起こさせることができる。本研究ではiPS細胞のAAVS1領域に自殺遺伝子を組込み、不測の事態が発生した場合は速やかにiPS細胞もしくは分化細胞を死滅させることができる。またAAVのゲノム組込み機構を用いたAAVS1特異的組込み法では挿入変異発癌が起きず、二重に安全性が高い。昨年度はiPS細胞のAAVS1領域特異的組込み法を確立するため、

GFP遺伝子/ピューロマイシン耐性遺伝子(Puro)を搭載したプラスミドを用い予備的検討を行い、取得した119クローンのうち、6クローン(5.0%)でGFP遺伝子がAAVS1領域へ組み込まれていた。本年度は、自殺遺伝子の一つであるinducible caspase 9 (iCasp9)をAAVS1領域に組み込ませたクローンの樹立を試みた。

## B. 研究方法

### 1. AAVS1組み込み用プラスミド

AAVS1領域への組み込みは、AAVのRep蛋白質がAAVゲノムの両末端のITR (Inverted Terminal Repeat)もしくはRep蛋白質の発現をドライブするp5プロモーター内のRBS (Rep binding site) と、AAVS1上のRBS相同配列に結合することにより起こる (図1)。またITR

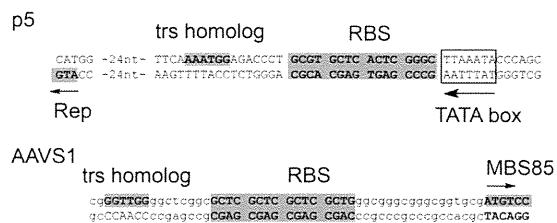
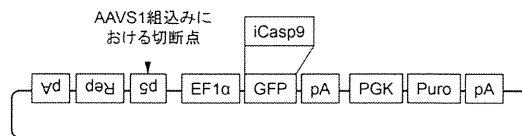


図1. p5プロモーターとAAVS1領域。  
RBS, Rep binding site; trs, terminal resolution site.

上のterminal resolution site (trs) のhomologも組み込みには必須の配列とされている。p5プロモーター配列をAAVS1への組み込みに使うと外来遺伝子の挿入の向きを規定できることから、本研究ではp5プロモーター配列を用いた。GFPカセットをiCasp9で置き換えEF1αプロモーターでiCasp9を発現するカセットとPGKプロモーターでpuromycin N-acetyl transferase (ピューロマイシン耐性遺伝子、Puro)を発現するカセットをタンデムに配し、また、p5プロモーターでRepを発現するカセットをiCasp/Puroカセットに向き合うように挿入した (図2)。このプラスミドではp5プロモーターはRepの発現をドライブすると同時に、GFP/PuroカセットがAAVS1領域に組み込まれる。自殺遺伝子として単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子もしくはinducible Caspase 9 (FKBP12とcaspase 9とのキメラ蛋白質)を用いる。前者は抗ヘルペスウイルス薬であるガンシクロビルにより、後者は合成化合物AP1903もしくはAP20187により細胞死を誘導できる。

A.



B.

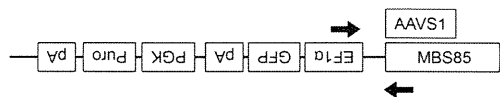


図2. iCasp9プラスミドとAAVS1領域への組み込み検出法。

(A) AAVS1への組み込みプラスミドの模式図。GFPもしくはinducible caspase 9を発現するカセット、ピューロマイシン耐性遺伝子Puro発現カセットとp5プロモーターはRepを発現させると同時にAAVS1への組み込み必須配列である。(B) AAVS1への組み込まれ方とその検出のためのPCR用プライマーの位置。

### 2. iCasp9遺伝子のAAVS1への組み込み

ヒトリンパ球より樹立されたiPS細胞(自治医科大学再生医学研究部花園教授より分与)にiCasp9/Puro発現プラスミド(図2A)をiPS細胞に導入しpuromycin存在下で培養しsingle cell clonesを得た。クローンよりゲノムDNAを抽出し、図2Bのプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物の塩基配列を読みAAVS1に組み込まれているか解析した。iCasp9が発現しているかどうか検討するためFKBP12に対する抗体でウェスタン解析を行った。

### 3. iCasp9発現iPS細胞のAP20187に対する応答性の検討

AAVS1にiCasp9が組み込まれたiPS細胞クローンを96穴プレートに播き、自殺遺伝子作動薬AP20187を0.001~100 nMの濃度で加え2日間培養し、クリスタルバイオレットでの染色により残存細胞を可視化した。

### 4. iCasp9発現細胞の未分化維持の検証

total RNAをiPS細胞から抽出後、未分化マーカーをRT-PCRで検出した。検出マーカーはOct4、Sox2、Klf4、Nanog、Prdm14、Rex1、Stella、Utf1、Cdh1である。またiPS細胞の免疫蛍光染色を行い、SSEA1、SSEA4、Tra1-60、Nanog、Oct4、Sox2の発現の有無を解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究ではヒトiPS細胞を用いるが、その由来となるリンパ球の提供者からはインフォームドコンセントを取っている。また研究実

施機関において組換えDNA実験委員会と、倫理委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

#### 1. iCasp9遺伝子のAAVS1への組込み

iPS細胞の遺伝子導入にはNucleofector (Lonza)を使用した。標準プロトコールに従いiCasp9発現プラスミドを導入後、puromycinの存在下に培養を行いsingle cell clonesを選択した。クローンからゲノムDNAを抽出しAAVS1への組込みの有無をPCRにて解析した。解析した87クローンのうち、5クローン(5.7%)でiCasp9遺伝子のAAVS1領域への組込みが確認できた。PCR産物の解析によるiCasp9/PuroプラスミドのAAVS1領域への挿入部位を図3に示す。我々が間葉系幹細胞 (Mesenchymal

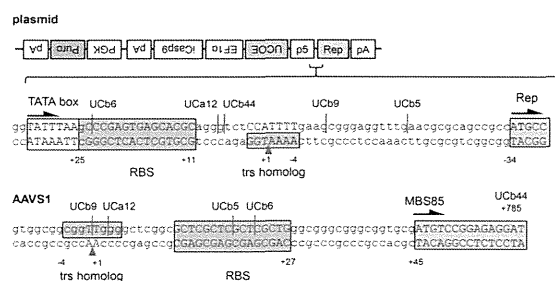


図3. iCasp9/Puro プラスミドの AAVS1 での挿入部位の解析結果。

AAVS1 に組み込まれていた 5 クローンの解析結果。それぞれの配列の下に、理論上の切断点 (矢頭) から下流に向かう方を + に、上流に向かって - の数値で表示。クローン Ucb44 では AAVS1 での断端は MBS85 のコード領域 (+785) にあった。

stem cells: MSC)、HeLa細胞等でAAVS1特異的組込みを行った場合と同様、プラスミドと AAVS1 での組込み必須配列近傍に切断され両者がつながっていることが確認できた。

#### 2. iCasp9組込みiPS細胞株の解析

樹立したiCasp9プラスミド組込みiPS細胞がiCasp9を発現しているか確認するためウエスタン解析を行った(図4)。iCasp9はFKBP12とcaspase9のキメラタンパク質であるため、FKBP12に対する抗体で解析した。iCasp9は46 kDaでFKBP12は12 kDaでiCasp9発現細胞 (UCa12、UCb5、UCb6、UCb9、UCb44) は期待通り46 kDaのバンドが検出できた。

樹立クローンが自殺遺伝子作動薬AP20187

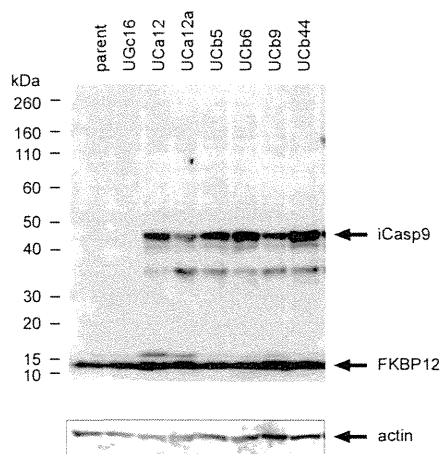


図4. 樹立 iCasp 発現 iPS 細胞のウエスタン解析。

AAVS1 に iCasp9 が組み込まれた組み込まれたクローン UCa12、UCb5、UCb6、UCb9、UCb44 の解析結果。UCa12a は UCa12 のサブクローン。parent, iPS 細胞親株; UGc16, GFP が AAVS1 に組み込まれた iPS 細胞。

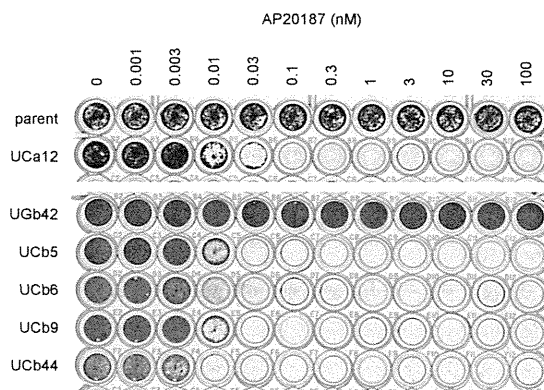


図5. iCasp 発現 iPS 細胞の AP20187 による細胞死。

AAVS1 に iCasp9 が組み込まれた組み込まれたクローン UCa12、UCb5、UCb6、UCb9、UCb44 は AP20187 が 30 pM 以下で死滅した。親株、GFP が組み込まれた Ucb42 クローンは 100 nM で処理しても生存している。

にて死滅するか検討するため、個々のiPSクローンを96穴プレートに播きAP20187を0.001~100 nMの濃度で加え2日間培養し残存細胞を染色したところ(図5)、AP20187が0.03 nM以下でほぼ完全に死滅した。一方親株、GFP発現iPS細胞ではAP20187の濃度が100 nMであっても増殖能に影響を及ぼさなかった。

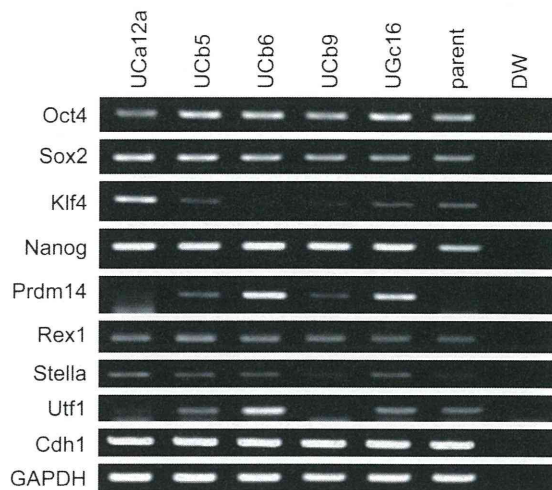


図 6. iCasp 発現 iPS 細胞での RT-PCR による未分化マーカーの検出。

iCasp9 クローン 4 株 (UCa12a, UCb5, UCb6, UCb6, UCb9)、GFP クローン 1 株 (UGc16)、親株 (parent) を解析した。DW, no RNA。

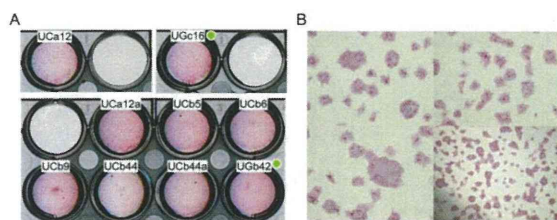


図 7. アルカリホスファターゼ染色。

(A) iCasp9 クローン 5 株 (UCa12a, UCb5, UCb6, UCb6, UCb9, UCb44)、GFP クローン 2 株 (UGb42, UGc16)、親株 (parent) を解析した。UCa12a, UCb44a はそれぞれ UCa12, UCb44 のサブクローン。DW, no RNA。(B) UCb5 コロニーの強拡大写真。

iCasp9-iPS細胞が未分化状態を維持しているかRT-PCRでOct4、Sox2、Klf4、Nanog、Prdm14、Rex1、Stella、Utf1、Cdh1の発現を解析したところ、親株と同様これらのマーカーがiCasp9-iPS細胞で検出され(図6)、AAVS1に外来遺伝子が組み込まれても未分化状態を維持できていることが分かった。iPS細胞で発現しているアルカリホスファターゼの染色を行ったところ、どのiCasp-iPS細胞でも活性が検出できた(図7)。

また、免疫蛍光染色で表面抗原であるSSEA4、SSEA1、Tra1-60、細胞内抗原であるNanog、Oct4、Sox2の検出を行った。表面抗原ではすべてのiPSクローンで親株と同様SSEA4陽性、SSEA1陰性、Tra1-60陽性であった。図8にUCb5クローンの染色結果を示す。またNanog、Oct4、Sox2は親株を含め樹立し

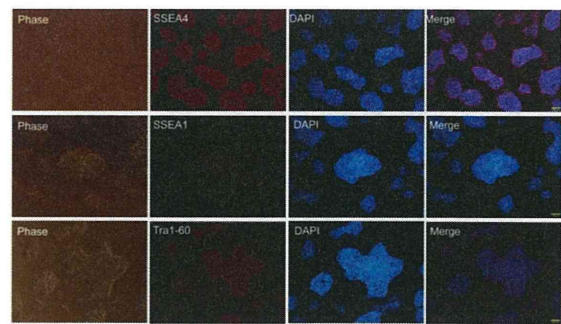


図 8. 未分化表面マーカーの免疫蛍光染色像。

UCb5 クローンの染色像。SSEA4、Tra1-60 が陽性で、SSEA1 は陰性であった。

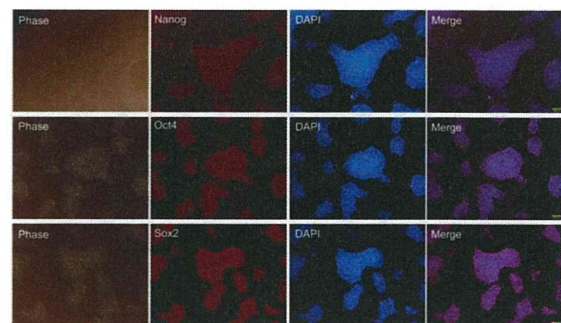


図 9. 未分化マーカーの免疫蛍光染色像。

UCb5 クローンの染色像。Nanog、Oct4、Sox2 すべてが検出された。

たいずれのクローンでも検出された。図9にUCb5クローンの免疫蛍光染色像を示す。

#### D. 考察

iCasp9発現プラスミドをヒトiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試みたところ、解析したクローンの5.7%でAAVS1領域への組込みが認められた。AAVS1組込みクローンの詳細な解析でiCasp9プラスミドのtrs/RBS近傍で切断され、またAAVS1領域のtrs/RBS近傍に組み込まれていることが分かった。組込み部位は昨年度実施したGFPプラスミドの組込み部位と同様であった。

AAVS1特異的組込み効率が5.7%であったことは、GFPプラスミドでの5%と同程度であるが、その他の細胞では10-40%と報告されていることから更に諸条件を検討し効率を上げることが望ましい。昨年度のGFPプラスミドを用いた実験では、GFPの一過性発現が約10%の細胞で認められたことから、さらに導入効率を上げればAAVS1への組込み効率も上昇すると考えられる。他のトランスフェクション方法も検討し、高い遺伝子導入効率を達成できる方法を見つける必要がある。

AAVS1にiCasp9が組み込まれたiPS細胞の解析から、得られたクローンはどれもiCasp9を発現していた(図4)。またiCasp9作動薬AP20187を加えると30 pMという低濃度でiPS細胞は死滅した(図5)。このことはiPS細胞がAP20187に対して極めて感受性が高いことを示している。今後はiPS細胞をin vitroで分化させたり、マウスに移植しテラトーマを形成させ同様にAP20187で処理しiPS細胞由来の分化細胞が死滅するか検証する予定である。

AAVのAAVS1特異的組込み機構を利用し外来遺伝子を第19番染色体のAAVS1領域にピンポイントで挿入することができる。AAVS1にiCasp9が組み込まれたiPS細胞の解析より、親株と同様未分化状態が保たれていることが確認できた(図6-9)。このことはAAVS1にiCasp9が組み込まれてもiPS細胞に大きな影響を与えていないということの傍証となる。

## E. 結論

自殺遺伝子の一つであるinducible caspase 9をヒトiPS細胞のAAVS1領域への挿入を試み、5.7%の効率でAAVS1へ組み込ませることができた。自殺遺伝子搭載iPS細胞は極めて低濃度の自殺遺伝子作動薬にて死滅することが確認できた。今後マウスに移植しin vivoでiPS細胞由来の細胞が作動薬の投与により死滅するか検討する予定である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ayuso, E., Blouin, V., Lock, M., McGorray, S., Leon, X., Alvira, M. R., Auricchio, A., Bucher, S., Chtarto, A., Clark, K. R., Darmon, C., Doria, M., Fountain, W., Gao, G., Gao, K., Giacca, M., Kleinschmidt, J., Leuchs, B., Melas, C., Mizukami, H., Muller, M., Noordman, Y., Bockstael, O., Ozawa, K., Pythoud, C.,

Sumaroka, M., Surosky, R., Tenenbaum, L., van der Linden, I., Weins, B., Wright, J. F., Zhang, X., Zentilin, L., Bosch, F., Snyder, R. O., and Moullier, P.: Manufacturing and characterization of a recombinant adeno-associated virus type 8 reference standard material. *Hum Gene Ther* **25**: 977-987, 2014.

2. Tsukahara, T., Iwase, N., Kawakami, K., Iwasaki, M., Yamamoto, C., Ohmine, K., Uchibori, R., Teruya, T., Ido, H., Saga, Y., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Nakamura, M., Brentjens, R., and Ozawa, K.: The Tol2 transposon system mediates the genetic engineering of T-cells with CD19-specific chimeric antigen receptors for B-cell malignancies. *Gene Ther* **22**: 209-215, 2015.
3. Uehara, T., Kanazawa, T., Mizukami, H., Uchibori, R., Tsukahara, T., Urabe, M., Kume, A., Misawa, K., Carey, T. E., Suzuki, M., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Novel anti-tumor mechanism of galanin receptor type 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* **105**: 72-80, 2014.

### 2. 学会発表

1. Urabe, M.: Transgene insertion into the AAVS1 site, a safe harbor in the human genome by adeno-associated virus integration machinery. The 20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, Aug. 6-8, 2014, Tokyo. (Abstracts p108)
2. Urabe, M.: Gene manipulation of iPS cells and mesenchymal stem cells. 第75回日本血液学会学術集会 2014年10月31日-11月2日, 大阪. (臨床血液 第55巻 9号 p227)
3. Urabe, M., Miyata, S., Tshukahara, T., Mizukami, H., Kume, A., Ozawa, K.: Genetic engineering in iPS cells by adeno-associated virus Rep protein. 第37回日本分子生物学会年会2014年11月25-27日, 横浜.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。



iPS細胞のエピジェネティクス解析

研究分担者 古川雄祐 自治医科大学 教授

研究要旨

自殺遺伝子を組み込んだ iPS 細胞における遺伝子発現パターンと DNA メチル化状態を次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組み込みによっておこる変化の有無を明らかにする。捉えられた変化と分化能・造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS 細胞の機能・安全性に関与する分子を同定するとともにその制御法を開発する。今年度は AAVS1 領域に HSV-TK 遺伝子を組み込んだ iPS 細胞のゲノムのメチル化状態を次世代シーケンシングにて網羅的に解析し、導入遺伝子の発現調節領域を含め、異常なメチル化が見られないことを確認した。

A. 研究目的

遺伝子操作に伴う iPS細胞のゲノムのメチル化および遺伝子発現パターンを網羅的に解析する。動物移植後、導入遺伝子の発現抑制や腫瘍形成が認められた場合、ゲノム及びエピゲノム解析を行って、その原因を明らかにする。

B. 研究方法

自殺遺伝子を組み込んだ iPS細胞における遺伝子発現パターンと DNA メチル化状態を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、親株との比較で自殺遺伝子の組み込みによっておこる変化の有無を明らかにする。このようにして捉えられた変化と分化能や造腫瘍性との関連を移植実験によって確認し、iPS細胞の機能や安全性に関与する分子変化を同定するとともにその制御法を開発する。

（倫理面への配慮）

iPS細胞は健常人ボランティアの末梢血リンパ球より樹立されたもので、血液の提供に関する同意手続き（インフォームド・コンセント）や個人情報保護の方法などを含めて、自治医科大学倫理委員会の承認を受け、その規程に従って樹立されたものである。組換え DNA 実験は、自治医科大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に従って実施する（承認取得済み）。

C. 研究結果

ヒト線維芽細胞およびリンパ球に Oct4・Sox2・N-myc・KLF4・DNp53 を導入し、iPS細胞を樹立した。それらの AAVS1 領域に自殺遺伝子（HSV-TK、inducible caspase-9）を組み込み、必要に応じて細胞死を誘導することができる

iPS細胞を 4 株樹立した。その中の 1 株におけるゲノムの DNA メチル化状態を、NOMe-Seq によって網羅的に解析し、親株との比較を行った。その結果、導入遺伝子の発現調節領域を含め、異常なメチル化は観察されなかった。

D. 考察

今回得られた結果から、自殺遺伝子はメチル化による機能阻害等を受けないと推察される。また、自殺遺伝子の組込みは、iPS細胞の増殖・分化能に影響を与えないことが期待される。

E. 結論

AAVS1 領域への自殺遺伝子の組込みは、iPS細胞の安全性確保に有力な手段と考えられる。

F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wada T, Koyama D, Kikuchi J, Honda S, and Furukawa Y: Overexpression of the shortest isoform of histone demethylase LSD1 primes hematopoietic stem/progenitor cells for malignant transformation. **Blood**, published online on April 22; doi:10.1182/blood-2014-11-610907, 2015.
2. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, and Yanagisawa K: Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. **Oncogene** 34: 310-318, 2015.
3. Koyama D, Kikuchi J, Hiraoka N, Wada T,

- Kurosawa H, Chiba S, and Furukawa Y: Proteasome inhibitors exert cytotoxicity and increase chemosensitivity via transcriptional repression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia** 28: 1216-1226, 2014.
4. Hiraoka N, Kikuchi J, Koyama D, Uesawa M, Akutsu M, Wada T, Abe M, Mori S, Nakamura Y, Kano Y, and Furukawa Y: Purine analog-like properties of bendamustine underlie rapid activation of DNA damage response and synergic effects with pyrimidine analogues in lymphoid malignancies. **PLoS One** 9: e90675, 2014.
  5. Kikuchi J, Koyama D, Mukai HY, and Furukawa Y:. Suitable drug combination with bortezomib for multiple myeloma under stroma-free conditions and in contact with fibronectin or bone marrow stroma. **Int. J. Hematol.** 99: 726-736, 2014.
  6. Sripayap P, Nagai T, Hatano K, Kikuchi J, Furukawa Y, and Ozawa K: Romidepsin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cells. **Acta Hematol.** 132: 1-4, 2014.
2. 学会発表
1. 古川雄祐: 形態から学ぶ顆粒球系細胞分化とその異常-白血病・MDS 早期発見のポ  
イント-。第15回日本検査血液学会学術集  
会、仙台、2014年7月20日。
  2. 古川雄祐: 多発性骨髄腫に対する薬物療法  
の基礎。第52回日本癌治療学会学術集会、  
臓器別シンポジウム16「多発性骨髄腫治療  
戦略のUp to Date」、横浜、2014年8月29  
日。
  3. 古川雄祐: 腫瘍特異的ヒストン修飾を標的  
とする新規抗がん療法。第73回日本癌学会  
学術集会、ランチョンセミナー15、横浜、  
2014年9月26日。
  4. 古川雄祐: Purine analog-like properties  
of bendamustine underlie its unique  
anti-tumor activity。第76回日本血液学  
会総会、Oral Session 28 “Myeloma Therapy  
- Transplantation Ineligible Patients”、  
大阪、2014年10月31日。
  5. 古川雄祐: 長期生存を目指す骨髄腫治療戦  
略。第76回日本血液学会総会、コーポーレ  
トセミナー15、大阪、2014年10月31日。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

iPS細胞の移植後の体内動態の解析

研究分担者 阿部朋行 自治医科大学医学部 助教

研究要旨

本研究では、大型動物への移植モデルを用いて、自殺遺伝子搭載ヒトiPS細胞の動物体内における有効性と安全性を検証する。すなわち、自殺遺伝子搭載ヒトiPS細胞由来のグラフトを大型動物体内に生着させ、グラフト中の分化細胞における自殺遺伝子の発現やそれに起因する造腫瘍性について、長期的に評価を行う。平成26年度は、昨年度に引き続き、iPS細胞由来グラフトを生着する大型動物の作製を試みた。

A. 研究目的

iPS細胞を移植治療へ応用するには、正確な分化誘導方法だけでなく、癌化を防ぐ工夫が必須である。癌化を防ぐ試みとして、未分化細胞の除去や、免疫不全マウスを用いての安全な細胞株の選別などが提案されている。しかしながら、これらのほとんどは、移植する前に行う実施する対策であり、iPS細胞を移植した後で万が一腫瘍ができてしまった場合の解決方法は、いまだ確立していない。したがって、iPS細胞を移植後に癌化などの制御不能な状態となった場合を想定して、確実に移植細胞を排除できる仕組みを予め搭載しておくことは、安全性確保の観点から極めて重要である。また、ゲノムを操作したiPS細胞では、挿入変異発癌などの導入遺伝子のゲノム内挿入による癌化が懸念されており、この造腫瘍性を完璧に排除することは困難であることから、その対策が喫緊の課題となっている。以上のことから、本研究では、ゲノム上の安全な遺伝子座にピンポイントで自殺遺伝子を組み込むのに加えて、自殺遺伝子搭載iPS細胞を大型動物へ移植し長期間観察することで、有効性および安全性の評価を行う。

ヒトiPS細胞を免疫寛容状態のヒツジ胎仔へ移植する実験(異種移植)は、免疫不全マウスへの移植実験の大型動物版に相当すると考えられ、マウスのような短命・小型動物ゆえの観察期間の短さ・サイズの小ささを克服できる(Abe et al., *Exp Anim.* 2014)。この系を用いて、部位特異的に自殺遺伝子が組み込まれたヒトiPS細胞をヒツジ胎仔体内に移植し、出生後の体内動態を長期的に観察することができる。また、ブタiPS細胞をSLA(ブタMHC)既知のミニブタへ移植する実験(同種移植)は、ヒト臨床に近いモデルである。これまでに我々は、SLAを合致させられるクラウン系ミニブタ由来iPS細胞を樹立している(Fujishiro SH et al., *Stem Cells Dev* 2013)。本研究では、これらの大型動物の移植系を用いて、自殺遺伝子の長期的な発現解析

(有効性) および自殺遺伝子搭載iPS細胞の腫瘍形成の有無(安全性)について評価を行う。

B. 研究方法

●ヒツジ胎仔を用いた移植実験

ヒツジ体内にヒトiPS細胞由来のグラフトを生着させて長期観察するために、以下の手順でヒツジ胎仔に移植した。自殺遺伝子搭載あるいは非搭載ヒトiPS細胞を、未分化状態あるいは造血系へと分化させた状態で、免疫寛容状態である妊娠45-65日齢のヒツジ胎仔の皮下、筋肉内あるいは肝臓内に移植した(図1, 宇都宮大学農学部附属農場で実施)。妊娠満期(147日齢)で自然分娩、あるいは帝王切開によりヒツジ産仔を得て、

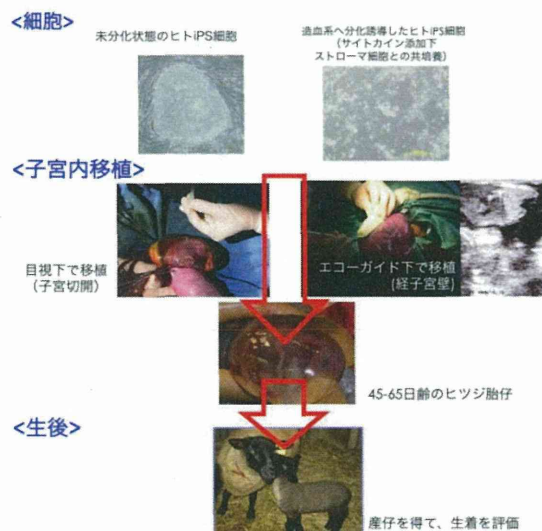


図.1 ヒトiPS細胞由来グラフトをもつヒツジの作製手順

目視下あるいはエコーガイド下で、ヒツジ胎仔の皮下、筋肉内あるいは肝臓内に細胞を移植する

ヒトiPS細胞由来のグラフトの有無を解析

した。ヒツジ胎仔への移植手術および管理は、宇都宮大学農学部教授の長尾慶和博士（獣医師）にご協力頂き、宇都宮大学農学部附属農場内で実施した。

#### ●SLA合致ブタを用いた移植実験

平成26年度は、平成25年度に引き続いて、自殺遺伝子を搭載していないクラウン系ミニブタiPS細胞を用いて、SLAを合致させたブタ間で同種移植を行った。レトロウイルスベクターを用いて、クラウン系ミニブタ線維芽細胞から作製したブタiPS細胞を、SLAが合致したブタの精巣または卵巣内に移植し、グラフトまたは腫瘍形成の有無を評価した。移植手術ならびにブタの管理は、自治医科大学先端治療技術開発センター（ピッグセンター）内で実施した。

（倫理面への配慮）

①組換え DNA 実験：本研究で行われる組換え DNA 実験は、以下の通り承認を得た。ヒツジの管理は、宇都宮大学農学部附属農場 (P1A)で行った。ブタの管理は、自治医科大学で行った(施設は P2A に対応可能だが、P1A で実施可能)。

#### ●阿部朋行申請 「大型動物を利用する幹細胞操作技術の開発」

平成 27 年 2 月 5 日承認、許可番号 14-94(平成 25 年 12 月 20 日承認、許可番号 13-133 の改訂版)

#### ●花園豊申請 「幹細胞を利用する再生医療技術の開発」

平成 27 年 2 月 5 日承認、許可番号 14-95(平成 25 年 8 月 27 日承認、許可番号 13-100 の改訂版)

#### ●長尾慶和申請 「HoxB4 導入ヒト臍帯血幹細胞に由来する造血系を有するキメラヒツジのキメラ解析」

平成 25 年 4 月 24 日承認、許可番号 D09-0007

②生命倫理：本研究はヒト iPS 細胞を用いるが、iPS 細胞の由来は健常人ボランティアの末梢血リンパ球である。血液の提供に関する同意手続き（インフォームド・コンセント）や個人情報保護の方法などを含めて、自治医科大学倫理委員会の承認を受け、その規程にしたがって樹立されている。ヒト iPS 細胞の作製・使用についての承認は、以下の通りである。

#### ●花園豊申請「iPS 細胞の作製」

平成 26 年 6 月 24 日承認、許可番号 臨 14-03 (臨 11-08 変更)

- 長尾慶和申請 「ヒツジ胎仔内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」  
平成 25 年 4 月 26 日承認、許可番号 H13-0012

③動物実験倫理：本研究ではヒツジ・ブタへの外科的処置が必須となることから、動物福祉または動物実験倫理への最大限の配慮が必要である。また、動物愛護には最大限の配慮を払う。本学ピッグセンターは、国際実験動物管理公認協会（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC）の認証を受けている。動物を用いた実験プロトコールは、以下の通り承認を受けた。

- 花園豊申請 「ヒツジを利用する幹細胞研究」  
平成 26 年 3 月 26 日承認、許可番号 14045

- 花園豊申請 「ブタを利用する幹細胞研究」  
平成 26 年 3 月 26 日承認、許可番号 14172

- 長尾慶和申請 「ヒツジ胎仔内微小環境を利用した霊長類幹細胞の分化誘導法の確立」  
平成 24 年 5 月 15 日承認（5 年間有効）、許可番号 A12-0015

### C. 研究結果

#### ●ヒトiPS細胞のヒツジ胎仔への移植実験

造血系に分化誘導した自殺遺伝子非搭載ヒトiPS細胞を、肝臓内に移植し産仔を得た。体表面に腫瘍等の形成は認められず、骨髄塗抹標本では白血病のような所見は認められなかった。これらの産仔の骨髄細胞を用いて、ヒト特異的なプライマーを用いたPCRを行った結果、ヒトiPS細胞の生着が認められた。しかしながら、ヒトCD45抗体を用いたFACS解析では、ヒト細胞を検出できなかった。これらの産仔ではヒトiPS細胞由来のグラフトが微量と考えられるため、自殺遺伝子の発現を評価するのは困難と考えた。したがって平成26年度から、未分化iPS細胞をヒツジ胎仔に移植することで、肉眼的な奇形腫（テラトーマ）を形成・生着させることを試みた。ヒツジ胎仔に霊長類ES細胞を移植すると肉眼的なテラトーマを形成できている（Tanaka, Abe et al., *Stem Cells Dev.* 2008）。自殺遺伝子搭載iPS細胞由来のテラトーマを肉眼的に形成・生着できれば、自殺遺伝子が三胚葉由来の様々な分化段階の細胞で長期間にわたって発現するか検証することができる。

自殺遺伝子搭載あるいは非搭載ヒトiPS細胞を計6頭のヒツジ胎仔に移植したが、いずれも移植後に流産した。次に、ヒトiPS細胞株を変更して移植実験を試みており、このヒトiPS細胞株では妊娠維持個体3例が得られている。

#### ●SLA合致ブタを用いた移植実験

ブタiPS細胞をSLAが合致したブタの精巣または卵巣へ移植した結果、奇形腫は形成さ