

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790235
研究課題名(和文)：野生型マウス由来体細胞からの誘導性多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立
研究課題名(英文)：The establishment of the induced pluripotent stem cells (iPS cells) from wild type mouse somatic cells
研究代表者
三井 薫(MITSUI KAORU)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号：40324975

研究成果の概要(和文)：

染色体非組込み型ウイルスベクターを用いた安全性の高いiPS細胞誘導方法について検討を行った。二種類の染色体非組込み型ウイルスベクターを用いて、マウス胎仔線維芽細胞やヒト線維芽細胞からのiPS細胞誘導条件を検討したが、iPS細胞を誘導するまでに到らなかった。また、iPS細胞の未分化状態をモニターするためのベクターの作製を試み、これまでにTERTまたはREX1のプロモータ下に蛍光タンパク質と薬剤耐性遺伝子を挿入したアデノウイルスベクターを作製し、未分化細胞特異的に蛍光タンパク質の発現することを確認した。

研究成果の概要(英文)：

In order to generate safety induced pluripotent stem cells (iPS cells), two chromosome non-integration viral vectors infected to murine embryonic fibroblasts or human fibroblasts. However, I did not demonstrated successful reprogramming of any fibroblasts under culture conditions necessary for induction of iPS cells. In addition, I attempted to generate adenoviral vectors, which specifically expressed in undifferentiated state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度			
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：1, iPS細胞, 2, ウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

研究申請時(2007年秋)には、マウス iPS 細胞の樹立について以下のような報告がされていた。

(1) iPS 細胞に誘導される細胞(ドナー細胞)は、*Nanog*・*Oct3/4* 等の未分化マーカー遺伝子のプロモータで誘導される薬剤耐性遺伝子をもつ、遺伝子改変マウス由来の体細胞であることが必要であった。

(2) ウイルスを介した染色体への遺伝子の組込みが必要であり、ゲノムの挿入場所近傍の無関係な遺伝子を発現させてしまう可能性があった。

(1)については、未分化マーカー遺伝子の発現を指標とした iPS 細胞の樹立は iPS 細胞の品質を見定める上で、また誘導後の迅速な iPS 細胞の判別に必要不可欠である。しかし、臨床応用において遺伝子改変体由来の体細胞を得ることは不可能であり、まずマウスにおいて遺伝子組換え体でない野生型マウスの体細胞を宿主細胞として iPS 細胞を誘導できることが必要であった。また(2)(3)についても、臨床応用の面においてより安全性を求めるためには、4 因子の一過的な発現でリプログラミングを実現させることが必要であった。

研究開始当初(2008年春)までに、野生型由来マウス体細胞より iPS 細胞の樹立が報告され、またマウスだけでなくヒト体細胞からも iPS 細胞樹立が報告されていた。しかしながら、リプログラミング因子の一過的な発現による iPS 細胞誘導方法については、まだ報告がなく、より安全性の高い iPS 細胞樹立方法が求められていた。

2. 研究の目的

本研究の申請時までの報告では、iPS 細胞樹立の際にはレトロウイルスベクターを用いて 4 因子を導入し、リプログラミングされた体細胞を薬剤で選択するために、遺伝子改変マウス由来の体細胞が必要とされていた。そのため、(1)「野生型マウスの体細胞からの iPS 細胞の誘導」、(2)「より安全性の高い、4 因子の一過的な発現による体細胞のリプログラミング」を研究の目的と

した。

しかしながら、申請後に野生型マウス由来の iPS 細胞が樹立可能であることが報告されていたため、(2)「より安全性の高い iPS 細胞の樹立」を研究の目的とした。また、ヘルパー依存型アデノウイルスベクター等を用いて、リプログラミング状態をモニターおよび薬剤選択できるウイルスベクターを作製し、iPS 細胞の樹立効率化を目指す。

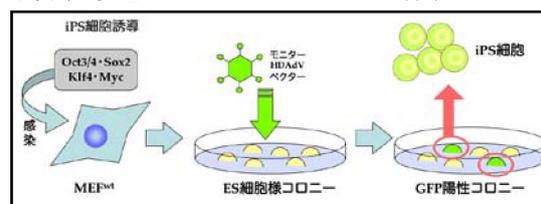
3. 研究の方法

染色体非組込み型ウイルスベクター(アデノウイルスベクター・インテグラーゼ変異型レンチウイルスベクター)を用いた効率の良い iPS 細胞樹立方法の検討

(1) リプログラミング因子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を発現するウイルスベクターの産生。それぞれの遺伝子が単独で入っているベクターの他、*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* を Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) 由来の 2A ペプチドでつなぎ、一つのプロモータから 3 因子が共発現するウイルスベクターを産生した。

(2) 染色体組み込み型ウイルスベクター(レトロウイルスベクター・レンチウイルスベクター)と染色体非組込み型ウイルスベクターとそれぞれをヒト胎児肺線維芽細胞株 MRC9・IMR90、初代ヒト皮膚線維芽細胞、およびマウス胎仔線維芽細胞に感染させ、樹立効率を検討した。後者のウイルスベクターについては、遺伝子発現量を維持するために細胞へ複数回ウイルスベクターを感染させる必要があるため、その回数等についても検討した。

未分化状態モニターベクターの作製



ヘルパー依存型または E1 欠損型アデノウイルスベクターを用いて、未分化特異的に発現する遺伝子のプロモータを利

用して、iPS 細胞がリプログラミングされ、未分化な状態に変化した状態を可視化または薬剤選択できるウイルスベクターを作製した。

4. 研究成果

染色体非組込み型ウイルスベクターを用いた効率の良い iPS 細胞樹立方法の検討

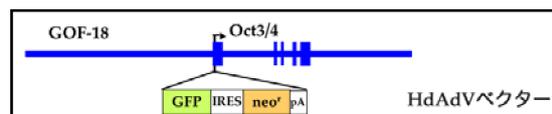
- ・ リプログラミング 4 因子をインテグラーゼ変異型レンチウイルスベクターで発現させたところ、レトロウイルスベクターや変異型でないレンチウイルスベクターと比較して同ウイルス量で著しく発現量が低かったため、同等の発現量を維持するのが難しく、iPS 細胞誘導ができなかつた。また 3 因子を一つのプロモータで同時に発現させたウイルスベクター(LV-OKS)のみ、または Myc を発現するウイルスベクターと二種類同時に感染させた細胞については、レトロウイルスベクターとほぼ同程度と思われる発現量が得られたが iPS 細胞を誘導するのに到らなかつた。
- ・ アデノウイルスベクターを用いて、リプログラミング 4 因子をそれぞれ単独に(AdV-factors)、もしくは 3 因子を一つのベクター(AdV-OKS)で発現させ、複数回細胞に感染させ iPS 細胞誘導を試みた。4 種類もしくは *c-Myc* を除いた 3 種類のアデノウイルスベクターをさせたところ、1 回の感染で細胞へのダメージが強くなり、iPS 細胞誘導できなかつた。ウイルス量については、iPS 細胞をレトロウイルスベクターにより誘導した際の遺伝子発現量を指標とした。また研究期間中にマウス由来細胞およびヒト由来細胞よりアデノウイルスベクターを用いて iPS 細胞が樹立できた報告がでたため、その論文も参考とした。AdV-OKS を用いると、感染させるウイルス総量は少なく済むために細胞へのダメージは観察されなかつた。コントロールのレトロウイルスベクターを用いた誘導方法で iPS 細胞が出現する条件下において、複数回感染後、iPS 細胞誘導を試みたが、コント

ロールのレトロウイルスベクターを用いた誘導方法で iPS 細胞が出現する条件下において、樹立には到らなかつた。

- ・ アデノウイルスベクターによるヒト iPS 細胞樹立では、樹立効率が極端に低い(0.0002%)ことが報告されているため、樹立効率を促進させる HDAC 阻害剤(バルプロ酸;VPA)や、Mek/Erk 経路および GSK3 経路の阻害剤(PD0325901 と CHIR99021)等を用いて iPS 細胞の誘導を試みたが、樹立には到らなかつた。ウイルス感染方法(感染回数・感染量等)の検討、また *Nanog* や *UTF1*、p53siRNA といったリプログラミング補助因子の共発現等の検討を行い、iPS 細胞の誘導方法を検討していく必要があると考える。

未分化状態モニターベクターの作製

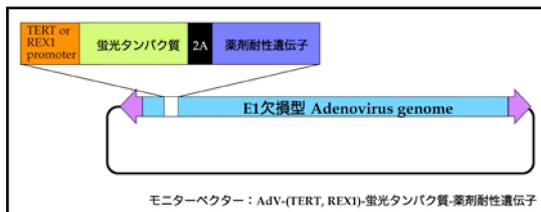
- ・ ヘルパー依存型アデノウイルスベクターは従来のアデノウイルスベクター上から全てのウイルス遺伝子を除いた改良型ベクターで、細胞毒性が低く、挿入可能な DNA のサイズが 36kb と大きいのが特長である。このベクターは従来の E1 欠損型アデノウイルスベクターにくらべ、ウイルスの調整が技術的に難しいことが問題点であるが、研究開始時に所属していた研究室(埼玉医科大学)では、調整のノウハウが蓄積されており、作製時のトラブルに対応できると考え、このベクターの特長を生かせる未分化状態モニターベクターの作製を試みた。これまでに内在性 *Oct3/4* の発現を反映することが報告されている、*Oct3/4* の遺伝子座を含む約 18kb のマウスゲノム領域(GOF-18)を改変し、*Oct3/4* 遺伝子座に緑色蛍光タンパク質(GFP)を挿入したゲノム断片 GOF-18-GFP を挿入したヘルパー依存型アデノウイルスベクタープラスミドの作製を試みた。



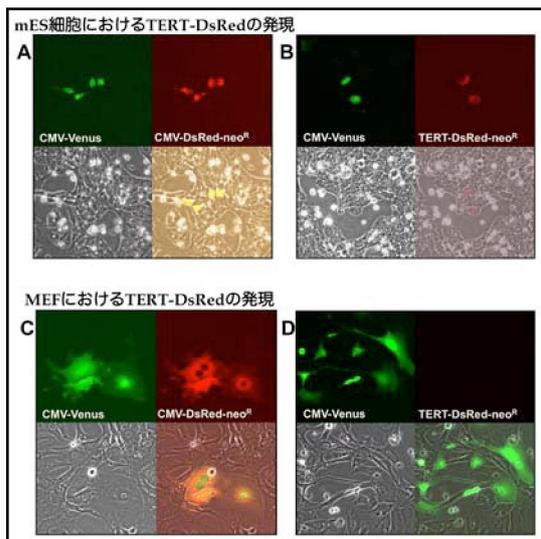
- ・ しかしながら、ベクタープラスミドの構築が難しく、また研究機関途中で所属が変わったために、ヘルパー依存型アデノ

ウイルスベクターを用いたモニターベクター作製の計画を変更した。

- 異動後の鹿児島大学では、E1 欠損型アデノウイルスベクターを用いたモニターベクターの構築を試みた。このベクターは挿入可能な DNA サイズが 8kb であるため、GOF-18-GFPは挿入できない。そこで、ES/iPS 細胞や癌幹細胞で高発現しているテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) のプロモータ下に蛍光タンパク質と薬剤耐性遺伝子を挿入したベクタープラスミドの作製を行った。



- TERT プロモータ下に挿入した DsRed の発現を未分化細胞 (図 A, B) および分化細胞 (図 C, D) で観察し、未分化細胞特異的



に DsRed が発現していることを確認した。

- 2009 年 11 月に Chan らにより、TERT は iPS 細胞の識別マーカーとしては不十分であること、マーカーとして適しているのは *TRA-1-60*, *DNMT3B*, *REX1* の発現や導入遺伝子のサイレンシングであることが報告された (Nature Biotech. 27, 1033-1037) ため、REX1 プロモータ下に蛍光タンパク質と薬剤耐性遺伝子を挿入したベクタープラスミドを作製し、未分化細胞での GFP の発現を確認した。

- これらの未分化状態モニターベクターは iPS 細胞のリプログラミング状態をモニターするだけでなく、分化後の iPS/ES 細胞に残存する未分化細胞をモニターすることが可能である。ヒト ES/iPS 細胞を *in vitro* で分化誘導した際の未分化細胞の混入は奇形腫の発生は大きな問題となっている。この染色体組込みを伴わない未分化状態モニターベクターは iPS 細胞樹立時のみならず、これらの問題を解決するためにも有用なツールとなると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Mitsui K, Suzuki K, Aizawa E, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. (2009) Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors. *Biochem Biophys Res Commun* **388**, 711-717 (査読有)

② Kawasaki T, Saito K, Mitsui K, Ikawa M, Yamashita M, Taniguchi Y, Takeda S, Mitani K, Sakai N. (2009) Introduction of a foreign gene into zebrafish and medaka cells using adenoviral vectors. *Zebrafish* **6**, 253-258 (査読有)

③ Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E, Hasegawa K, Kawase E, Yamagishi T, Shimizu Y, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. (2008) Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 13781-13786 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

① Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E,

Hasegawa K, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N and Mitani K (2009年7月8日) Highly efficient transient gene expression and gene targeting in human embryonic and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *International Society for Stem Cell Research*

② Suzuki Ki, Kishimoto A, Mitsui K, Mitani K (2009年7月11日) DEVELOPMENT OF ZINC-FINGER NUCLEASES TARGETING THE HUMAN HPRT LOCUS **第15回日本遺伝子治療学会**

③ Aizawa E, Mitsui K, Suzuki K, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K (2008年6月14日) OPTIMAZATION OF ENVELOPE AND PROMOTER FOR LINTIVIRAL GENE TRANSFER INTO HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS **第14回日本遺伝子治療学会**

④ Aizawa E, Mitsui K, Suzuki K, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K (2008

年6月14日) HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN CYNOMOLGUS MONKEY EMBRYONIC STEM CELLS WITH AN INTEGRASE-DEFECTIVE LENTIVIRAL VECTOR **第14回日本遺伝子治療学会**

⑤ 三井薫、鈴木啓一郎、相澤絵美、椎葉晴香、川瀬栄八郎、長谷川光一、末盛博文、中辻憲夫、三谷幸之介 (2008年5月16日) ウイルスベクターを用いたヒトES細胞への遺伝子導入法と相同組換え法の至適化 **第6回幹細胞シンポジウム**

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 薫 (MITSUI KAORU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40324975