

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09155

研究課題名（和文）mRNAを用いた高効率患者由来iPS細胞誘導法の確立

研究課題名（英文）Development of high efficacy human iPS generating using mRNA

研究代表者

千本松 孝明（Senbonmatsu, Takaaki）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70216563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：山中因子RNAが挿入されたSelf-replicative RNA vectorからRNA合成テンプレートを切り出し、5'-キャップやポリアデニル化処置を行い、高濃度RNAを精製することに成功した。得られた山中因子mRNAは巨大mRNAであるため、導入時宿主細胞からインターフェロンが放出され細胞死が生じる。この問題点に対し、培養液に高濃度 recombinant B18-R（抗インターフェロン剤）を維持することで宿主細胞死はほぼ抑制可能となった。このように導入環境を構築し、山中因子mRNA及びhuman Tet-1 mRNAを体細胞にリポフェクタミン法を用いて安定したヒトiPS細胞誘導は成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞技術最大のハイライトは、その再生技術が必要な患者の組織（体細胞）から誘導可能であることである。その為、心臓外科治療より得られる患者残余検体よりヒトiPS細胞誘導が当初の目的であった。しかし研究を進めて行く過程で、標準的ヒトiPS細胞誘導法は汎用性に乏しく、患者組織から高効率に誘導することは不可能であることに気づいた。今回、山中因子mRNAをリポフェクタミン法を用いて、極力宿主細胞に遺伝子導入によるゲノムDNA損傷やゲノム変異生じさせず、且つ安定したヒトiPS細胞導入法を完成させた。今後は、この方法を用いて安定したiPS由来心筋細胞の誘導を確立し、次の実験へステップアップの予定である。

研究成果の概要（英文）：We had succeeded in purifying high-concentration RNA by cutting out an RNA synthesis template from a self-replicative RNA vector into which Yamanaka factor RNA had been inserted, and then using that template to perform 5'-capping and polyadenylation treatments. Because the resulting Yamanaka factor mRNA is a large mRNA, interferon is released from the host cell upon introduction, causing cell death. To address this issue, we had maintained a high concentration of recombinant B18-R (an anti-interferon drug) in the culture medium, which made it possible to almost completely suppress host cell death. By creating an introduction environment in this way, we were able to successfully induce stable human iPS cells by injecting Yamanaka factor mRNA and human Tet-1 mRNA into somatic cells using the lipofectamine method.

研究分野：循環器、再生、心不全

キーワード：ヒトiPS細胞 山中因子 mRNA インターフェロン

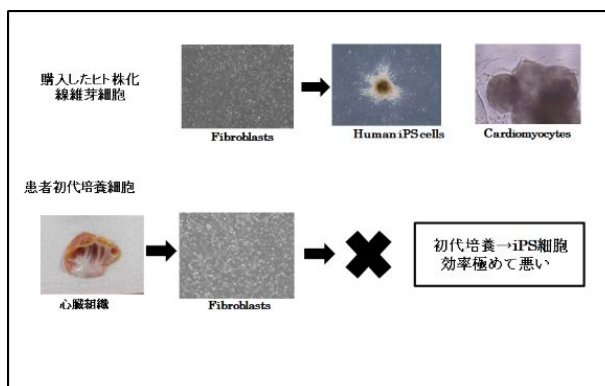
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当初は心臓血管外科の患者より得られた手術残余検体を活用して 多くの患者検体からヒト iPS 細胞をいかに誘導するかが目的であった。しかし研究を進めて行く過程で、ヒト iPS 細胞の標準的誘導法は汎用性が極めて低く、その技術を必要とする患者さんの組織を用いたヒト iPS 細胞の誘導効率は極めて低く、臨床的汎用性の観点からは使い物にならないことが判明した。またヒト iPS 細胞誘導は細胞培養技術を用いるため、ゲノムの様々な領域に点突然変異や遺伝子コピー変異が確率的にある程度生じてしまう。これらの諸問題の解決法は、高効率で汎用性の高く、加えて遺伝子導入の際 宿主細胞等に極力ダメージを生じさせない誘導法を確立し、安定して得られた多くの iPS 細胞から品質の高い iPS 細胞を選択可能とする方法の確立が重要である。

2. 研究の目的

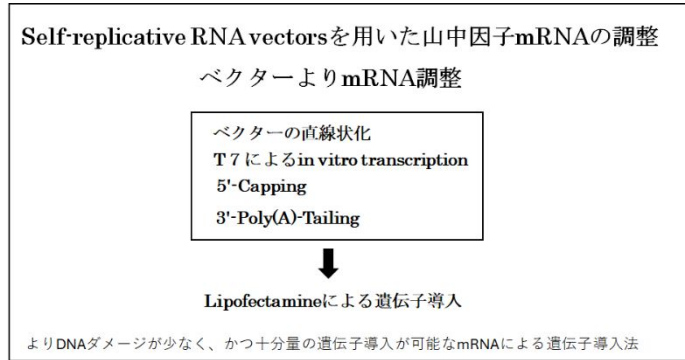
京都 iPS 研究所が公開しているヒト iPS 細胞誘導プロトコルでは、遺伝子導入された山中因子の宿主細胞ゲノムへの挿入を防ぐため、episomal vector による non-integration method が用いられている。しかし、このプロトコルでは市販の株化された品質の高いヒト線維芽細胞を用いた場合には誘導されるが、患者組織由来の初代培養細胞では誘導されず、細胞は老化し死に至ってしまう(右図)。ヒト iPS 細胞誘導には山中因子の十分量の導入が必須であるが、遺伝子導入効率と導入後の細胞死はトレードオフの関係にあり、患者由来初代培養細胞という極めて crude な細胞集団では、電気負荷量と導入遺伝子量の至適条件が極めて狭いことが一因であることは判明している。更に、高齢患者の手術残余検体の多くは病的性質を有する筋線維芽細胞が主体なることがままあり、誘導効率の低下に大きく影響している。この研究プロジェクト以前にこれまでの研究で最適値と思われる電気穿孔法による導入法を見出し、加えて遺伝子導入に伴う宿主細胞の遺伝子変化に沿った培養液の最適化も極めて重要であることを見出し、標準プロトコルに比して高効率なヒト iPS 細胞誘導法を確立している (Tanaka N, et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21(18), 6764)。しかし、上述したように episomal vector による電気穿孔法では、十分量の DNA 量と高負荷電気穿孔法が必須であり、遺伝子導入によるゲノム DNA 損傷やゲノム変異は無視出来ず、誘導時に生じるゲノム点突然変異や遺伝子コピー変異等の混入という視点では明らかに不利な方法である。そこで現在 non-integration method 法の内、導入すべき遺伝子の選択、量、方法等研究環境内での自由度の高さから山中因子 mRNA を作製し、それによる iPS 細胞誘導法を検討する。山中因子を組み込んだ self-replicative RNA vector を作製し、これより山中因子 mRNA を調整し、この mRNA を用いてゲノム DNA 損傷が少ないと考えられるリポフェクタミン法による導入にてより宿主細胞等のダメージを最小化し安定した誘導法の確立を目指す。



3. 研究の方法

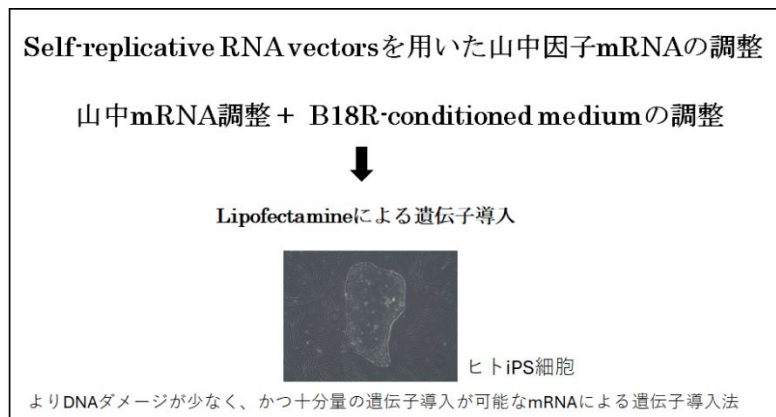
山中因子の mRNA テンプレートが挿入された Self-replicative RNA vector (T7-VEE-OKS-iG, T7・VEE-OKS-iM, SP6-VEE-OKS-iM SP6-VEE-OKS-iG, Human OKSG- c Myc Tag RFP

Simplicon)より直鎖状にして mRNA テンプレートを切り出し、これらに 5' - Capping や 3' - Poly (A) -Tailing を施し山中因子 mRNA を調整した (下図)。さらに同様の手法で GLIS1、Tet-1 遺伝子を Self-replicative RNA vector に組み込み、episomal vector と同様の遺伝子導入環境を構築した。mRNA であれば核に入り込むことはなく non-integration method として理想に近いが、siRNA 導入とは異なり巨大 mRNA が細胞内に導入されるため、異物と認識され細胞内インターフェロン放出による細胞死が十分考えられる。そこでインターフェロン抑制剤の 1 つである recombinant B18-R を用いて mRNA 導入に耐えうる培養環境を構築することを主たる目的とした。



4 . 研究成果

Self-replicative RNA vector からの山中因子 mRNA の調整は特に大きな問題点は生じなかった。ただし、遺伝子導入の際には高濃度 mRNA (1 ug/ml) が必要となり、比較的ランニングコストは高くかかることが判明した。当初はまずは遺伝子導入のみを試みたが、予想した通り導入の際宿主細胞のインターフェロン放出によると考えられる細胞死により宿主細胞は iPS 細胞誘導されることなく細胞死に至った。そこで第一弾として抗インターフェロン剤の 1 つである Recombinant Viral B18R を購入し、遺伝子導入時の培養液に添加して試みたが確かに細胞死は減弱したが十分ではなく結果として iPS 細胞は誘導されなかった。ここで問題となったのは十分量の Recombinant Viral B18R はコストがかかり、繰り返し実験が極めて困難であった。そこで B18R mRNA-E3L を購入し、B18R-conditioned medium の作製を行った。これはヒト線維芽細胞に B18R の mRNA(他の RNA 同様に B18R RNA テンプレートが挿入された Self-replicative RNA vector より B18R mRNA を調整する。)を導入することにより、培養液中に高濃度 B18R が分泌され、その培養液を用いた山中因子 mRNA 遺伝子導入を行うものである。この方法を取ることにインターフェロンによる細胞死はほとんど抑制可能となり、この手法にて山中因子 mRNA によるヒト iPS 細胞誘導は可能となった (右図)。iPS 細胞



誘導効率も安定しており、山中因子 DNA の episomal vector による方法に比して遜色ない誘導効率である。加えて episomal vector を用いて誘導する際の電気穿孔法に比して、明らかに宿主細胞ダメージは少ないことが予想された。ただし、山中 mRNA 調整や B18R-conditioned medium の調整など実験工程とコストは明らかに mRNA 法の方が時間や手間そして constable であることは十分考慮すべき事案である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中嶋 博之 (Nakajima Hiroyuki) (40393235)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究分担者	吉武 明弘 (Yoshitake Akihiro) (70327550)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究分担者	井口 篤志 (Atsushi Iguchi) (90222851)	埼玉医科大学・医学部・客員教授 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関