

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659061

研究課題名（和文）ワンステップ iPS 細胞誘導・相同組換え法の開発

研究課題名（英文）ONE STEP HUMAN iPS CELL INDUCTION AND GENE TARGETING USING VIRAL VECTORS

研究代表者

三谷 幸之介 (MITANI KOHNOSUKE)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10270901

研究成果の概要（和文）：ヒト iPS 細胞を利用した遺伝子修復治療において、染色体変異の蓄積を最低限にするために、iPS 細胞の誘導と相同組換え体の樹立とを同一ディッシュ上で可能にする方法論の確立を目的として研究を行った。ヒト線維芽細胞株に、山中 4 因子をコードしたセンダイウイルスベクターを感染させて、iPS 細胞を誘導した。そして、iPS 細胞様コロニーをまとめて継代した後に、*HPRT* 遺伝子座ノックアウト用アデノウイルスベクターを感染させ、3-5%の高頻度で相同組換えが得られていることを確認した。全過程を約 6 週間で達成可能であった。

研究成果の概要（英文）：In order to minimize cell culture for iPSC induction and gene repair, thus reducing the risk of introducing new mutations, we examined a strategy of simultaneous iPSC induction and gene targeting. TIG3 human fibroblasts were subjected to iPSC induction by using the Sendai virus vector, SeVp (KOSM). iPSC-like colonies were grown as a cell population without cloning, and were subsequently transduced with a HDAdV targeting the *HPRT* locus. The gene targeting frequencies were 3 - 5% of chromosomal integration, which were equivalent to those with authentic human iPSCs. From the start of iPSC induction to isolation of drug-resistant colonies, it took only 6 weeks.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

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：相同組換え、iPS 細胞、ウイルスベクター、再生医療

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES/iPS 細胞における相同組換えは、マウス ES 細胞と異なり極めて困難であり、これらの細胞を用いた研究の発展の大きな妨

げになっている。ヒト ES 細胞の樹立が最初に報告されてから 10 年経つにもかかわらず、相同組換えによる遺伝子ターゲティングの報告例はいまだに限られており、成功例

においても通常用いられるエレクトロポレーション法での効率は $10^7 \sim 10^8$ 個の細胞に 1 個と極めて低い。私達が世界に先駆けて開発したヘルパー依存型アデノウイルスベクター (helper-dependent adenoviral vector (HDAdV)) は、従来型 (E1 欠損型) の AdV 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 30 kb と大きい (従来型では 8 kb) という特長を持つ (PNAS, 1995, 1996)。HDAdV を利用して長い相同配列を導入すると、マウス ES 細胞ならびにヒト ES/iPS 細胞において、染色体組込みの 30-90% (従来法では 0~1%) という高頻度で相同組換え体が得られた。即ち、ヒト ES/iPS 細胞における相同組換えの効率が従来よりも 1~2 桁高くなり、人工制限酵素による染色体切断などの操作を加えずにマウス ES 細胞と同様な自由な染色体操作を初めて可能にした。しかしながら、ヒト線維芽細胞からスタートして相同組換えで染色体操作したヒト iPS 細胞を樹立するには、iPS 細胞誘導と相同組換え体の選別の両方の過程で細胞のクローニングが必要であり、また各過程の効率が低いために樹立に時間を要し、患者由来の iPS 細胞を用いた遺伝子修復治療等の実現に向けて大きなハードルとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞における HDAdV を用いた高頻度相同組換え法を用いて、ヒト iPS 細胞の誘導と誘導された iPS 細胞からの相同組換え体の樹立を同一ディッシュ上で可能にする方法論を確立して、全体に必要な日数と過程をこれまでの半分以下に短縮する。これにより、今後ますます増加すると考えられる患者由来 iPS 細胞を用いた基礎・臨床研究の大幅な高速化・効率化が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 先ずマウスの系で条件の至適化等を行う。 1×10^5 個のオス Nanog-GFP マウス由来胎児線維芽細胞 (MEF) に山中 4 因子をコードしたレトロウイルスベクターを感染させ、標準法に従い、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個 (4 因子の場合) もしくは 1×10^5 個 (3 因子の場合) の感染細胞を ST0 フィーダー上に蒔き直す。蒔いた直後 (day 4) もしくは iPS 様コロニーが出現してきた時点 (day 7)、最終的に GFP 陽性の iPS コロニーが出現した直後 (day 14) コロニーがある程度大きくなった直後 (day 20) に Hprt ノックアウト HDAdV を感染させ、G418 耐性 (ベクターの染色体組込み) と 6 チオグアニン (6-TG) 耐性 (HPRT 欠失) の 2 重選択を開始する。Hprt 遺伝子座は X 染色体上なの

で、オス細胞では相同組換えは G418/6-TG 耐性として容易に選別出来る。最終的に、G418/6-TG 耐性で GFP 陽性の iPS コロニーの出現を観察し、生じたコロニーに対して未分化マーカーの発現の確認、多分化能の確認 (胚葉体での分化マーカーの検出、SCID マウスに移植しての奇形腫形成)、レトロウイルスベクターのサイレンシングの解析等を行い、iPS 細胞が誘導されたことを確認する。ベクター添加のタイミングやベクターの量を変えることによって、Hprt ノックアウト iPS 細胞が最も効率よくできる条件を検討する。

(2) ヒト線維芽細胞からの iPS 細胞の誘導効率は、レトロウイルスベクターを用いる山中研究室の方法では 4 因子で 0.01 - 0.05%、3 因子で 0.002% である。また、ヒト iPS 細胞において HDAdV を用いた相同組換えで HPR1 遺伝子座をノックアウトする効率は、エレクトロポレーションよりも 10 - 100 倍高いが、~0.001% (ベクター導入細胞- 10^5 個に 1 つ) である。iPS 誘導と相同組換えを合わせるとマウスよりも 2~3 桁低いので、「目的 1」で至適化した条件を基にヒトで再検討する。

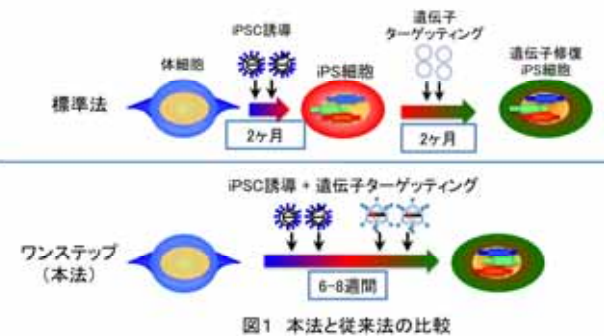


図1 本法と従来法の比較

10^6 個の正常男性由来ヒト線維芽細胞 TIG3 に山中 4 因子をコードしたレトロウイルスベクターを感染させ、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 個の感染細胞を ST0 フィーダー上に蒔き直す。蒔いた直後、iPS 様コロニーが出現してきた時点、もしくはコロニーがある程度大きくなった時点で HPR1 ノックアウト HDAdV を感染させ、G418 耐性と 6-TG 耐性の 2 重選択を開始する。最終的に、G418/6-TG 耐性でヒト ES 細胞様のコロニーの出現を観察し、もし生じたら、DNA 解析により正確な相同組換えが起きたことを確認する。また、定法に従い未分化マーカーの発現の確認、多分化性の確認、レトロウイルスベクターのサイレンシングの解析、等を行い、iPS 細胞が誘導されたことを確認する。(図 1)

4. 研究成果

(1) Nanog-GFP マウス由来胎児線維芽細胞 (MEF) 並びにIL2受容体 鎖 (mIL2RG) 遺伝子欠損マウス由来のMEFに山中4因子または3因子をコードしたレトロウイルスベクターを感染させ、標準法に従い、iPS細胞クローンを複数クローン得た。これらのクローンに関しては、未分化細胞特異的細胞表面マーカーによる免疫染色、bisulfite sequencingによる*Oct3/4*遺伝子プロモーター部位の脱メチル化、レトロウイルスベクターのサイレンシングなどを調べることにより、iPS細胞であることを確認した。次に、マウスiPS細胞における相同組換え法を至適化するために、ウイルスの量を変えて、正常なmIL2RGをコードした遺伝子修復HDAdVを感染させた。ウイルスの量は、細胞あたり 10^4 ウイルスゲノムコピーが至適で、それより高いと細胞に対して強い毒性が見られた。その結果、blasticidin耐性/ガンシクロビル耐性の二重耐性細胞コロニーの4因子では15.4%、3因子では13.0%において、相同組換えによって*IL2RG*座が修復されていることが明らかとなった。

(2) ヒト線維芽細胞 TIG-3株に産業技術総合研究所 (AIST) の中西真人博士より分与された、山中4因子をコードしたセンダイウイルスベクターを感染させて、iPS細胞を誘導した。そして、iPS細胞様コロニーの出現に伴い、個々のコロニーをクローニングすることなくまとめて継代を繰り返した後に、 $6-17 \times 10^6$ 個の細胞に対してヒトHPRT遺伝子座ノックアウト用アデノウイルスベクターを感染させ、ベクターが染色体に組み込まれた細胞クローンをG418選択によりクローニングした。さらにこれらクローンで、相同組換えが得られるかどうかをPCR法により検討した。その結果、iPS細胞様クローンの出現後、13日目、26日目、44日目の細胞を感染した場合に、コロニー19個中1個、46個中3個、129個中4個で相同組換えが得られていた。すなわち、細胞当たりの遺伝子ターゲティング効率は、3-5%であった。また、ウイルス感染細胞当たりの遺伝子ターゲティング効率は、 $3.2-5.5 \times 10^6$ 個に1個であった。これらの効率は、通常のiPS細胞を用いた場合の効率（それぞれ、3-12%と、 $3.2-5.5 \times 10^6$ 個に1個）と同等である（図2）。さらにこれらの細胞クローンについて、bisulfite sequencingによってNANOG遺伝子座プロモーター領域の脱メチル化を調べたところ、ヒトiPS細胞と同様に脱メチル化されていることが確認された。

これらすべての過程は、6週間で達成可能であった。すなわち、センダイウイルスを用いた効率の良いiPS細胞誘導法と、アデノウイルスベクターを用いた効率の良い相同組換え法を用いることによって、ヒトiPS細胞を誘導しながら同時に相同組換えによる遺伝子ノックアウトが可能であることを示すことができた。

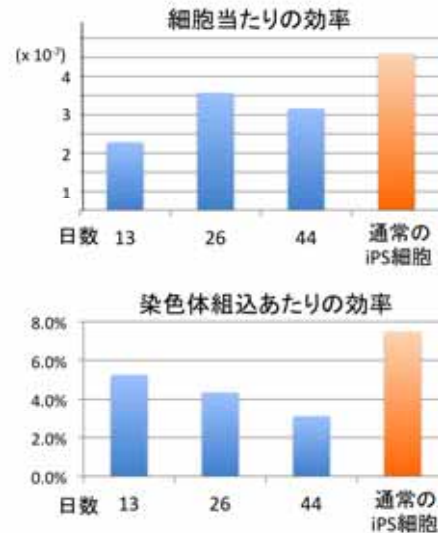


図2 遺伝子ターゲティング効率

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0件)

[学会発表](計2件)

ONE STEP HUMAN iPS CELL INDUCTION AND GENE TARGETING USING VIRAL VECTORS
Ko Mitani, Emi Aizawa, ManamiOhtaka, Ken Nishimura, Mahito Nakanishi
日本遺伝子治療学会 2012年6月21-23日
熊本

One Step Human iPS Cell Induction And Enhanced Gene Targeting Using Viral Vectors And TALE Nucleases

Ko Mitani, Emi Aizawa, Claudio Mussolino, ManamiOhtaka, Ken Nishimura, Toni Cathomen, Mahito Nakanishi
米国遺伝子細胞治療学会 2012年5月16-19日
米国ペンシルバニア州

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 幸之介 (MITANI KOHNOSUKE)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10270901

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：