

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：92101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461030

研究課題名(和文) 発現制御型センダイウイルスベクターを用いたインスリン産生細胞の誘導と機能解析

研究課題名(英文) Differentiation of human iPS cells into insulin producing-cells using Sendai virus vectors

研究代表者

佐伯 晃一 (SAEKI, KOICHI)

株式会社IDファーマ・DNAVECセンター・基礎研究部・研究員

研究者番号：40360052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では糖尿病モデルマウスを作製し、インスリン産生細胞株を移植することで血糖値が低下する系を開発した。センダイウイルス(SeV)ベクターを用いて誘導したiPS細胞からインスリン産生細胞の分化誘導に成功した。また、一過性発現が可能なSeVベクターの開発を行い、速やかなベクター除去が可能であった。SeVベクターは分化誘導用のツールとしても有効である。

研究成果の概要(英文)：Sendai virus (SeV) vectors can efficiently introduce foreign genes into various organs without genomic insertion of transgenes and are expected to be clinically applicable. We improved SeV vectors for transient expression so that the vectors can be easily removed from the cells at nonpermissive temperatures. We obtained insulin producing-cells from induced pluripotent stem cells (iPSCs) using SeV vectors. These vectors enabled an efficient production of differentiated cells from iPSCs.

研究分野：細胞工学

キーワード：糖尿病 細胞移植 iPS細胞 センダイウイルスベクター

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質増幅型の RNA ウイルスを基にした SeV ベクターは原理的に染色体に取り込まれることはなく、遺伝毒性がないという点で極めて優れたベクターである。我々はこの SeV ベクターに *OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC* を搭載することで、ヒトの線維芽細胞、血管内皮細胞、肝細胞などを初期化し、高効率で iPS 細胞を得ることに成功した。さらに iPS 細胞からインスリン産生細胞の分化誘導を検討してきた。これまで温度感受性 SeV ベクターを開発してきたが、効果的な分化誘導には、発現が速やかに制御される SeV ベクターの開発を必要としていた。

### 2. 研究の目的

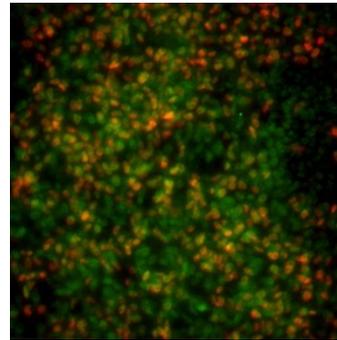
本研究の目的は iPS 細胞からインスリン産生細胞を分化誘導し、糖尿病モデルマウスを用いて、その機能解析を行うことである。これまで液性因子によるインスリン産生細胞の分化誘導を行っているが、SeV ベクターに転写因子を搭載することで分化の促進を試みる。

### 3. 研究の方法

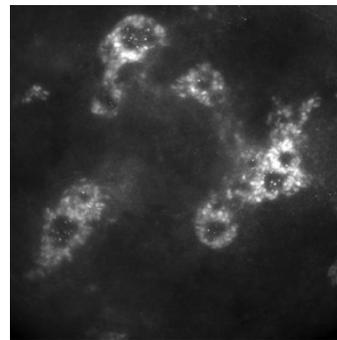
インスリン産生細胞の分化誘導は液性因子のみ、又は途中から SeV ベクターに搭載した転写因子を発現させることで分化を行った。転写因子は *PDX1*、*NeuroD*、*MafA* を用いた。分化細胞の同定には SOX17、FOXA2、PDX1、インスリン、C ペプチドの免疫染色用抗体を用いた。培養上清中へのインスリン分泌は森永生化学研究所の測定キット、C ペプチドの分泌測定には Mercodia の測定キットを用いた。糖尿病モデルマウスは NOD-scid マウスにストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内投与し、STZ 誘発性の糖尿病モデルを作製した。STZ の投与検討には C57BL/6J マウスを用いた。血糖値の測定はグルコカードを用いた。インスリン産生細胞株として、マウスインスリンノーマの NIT-1 細胞を用いた。細胞移植は腎被膜下と脾内を検討した。温度感受性を強化した SeV ベクターおよび CytoTune-iPS 2.0 を用いて BJ 細胞より iPS 細胞の作製を行った。

### 4. 研究成果

1) インスリン産生細胞の分化を行った。  
iPS細胞から液性因子を用いて分化誘導を開始し、day3~6でSOX17およびFOXA2陽性細胞を免疫染色により観察した。次にday11においてPDX-1陽性細胞を免疫染色により観察した。Day30でインスリンELISAを行ったところ、培養上清中へのインスリン分泌を観察した。この細胞に温度感受性のSeVベクターを用いて *PDX1*、*NeuroD*、*MafA* を感染させたところ、トルブタミドに反応してインスリンを分泌する細胞が得られた。

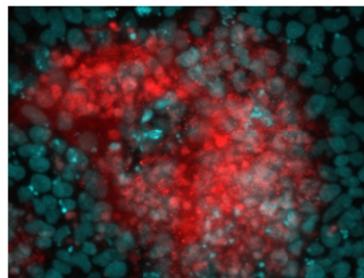


SOX17 (緑) / FOXA2 (赤) 陽性細胞

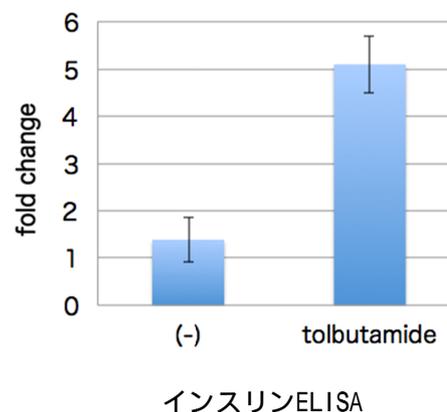


PDX1陽性細胞

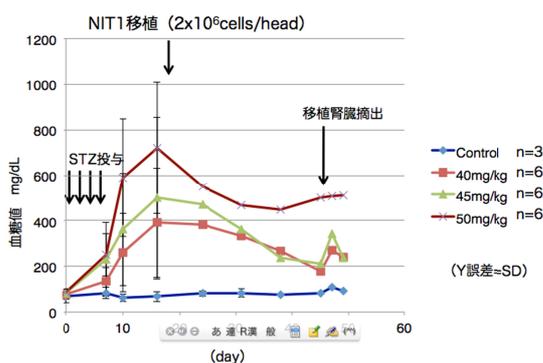
インスリン抗体/DAPI



インスリン産生細胞



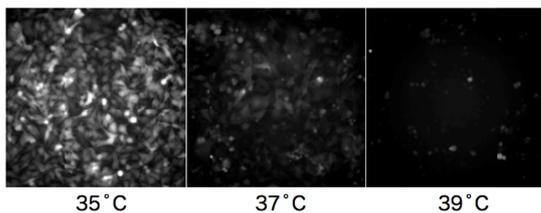
2) 糖尿病モデルマウスの作製を行った。手技の検討にはC57BL/6Jマウスを用いた。日本チャールズリバーの公開している情報に従い、C57BL/6Jマウスに250mg/kgのSTZを腹腔内投与し、血糖値の上昇を観察した。腎被膜下にNIT-1細胞を移植後、血糖値の上昇抑制が観察され、移植腎を取り除くことで血糖値の上昇が観察された。NOD-scidマウスへのSTZ投与は文献情報(PNAS, 103, 17438-17443 (2006))を参考に25~50mg/kg×4回の投与を検討した。その結果、40~45mg/kg×4回の投与が適当であった。35mg/kgでは十分な血糖値上昇が得られず、50mg/kgでは血糖値の上昇が強すぎた。



糖尿病モデルマウスの血糖値測定

Day17にNIT-1を腎被膜下移植することで血糖値の上昇が抑制され、移植腎を取り除くことで血糖値の上昇が観察された。iPS細胞より分化したインスリン産生細胞を移植したところ、腎被膜下には生着せず、脾内に生着していることが観察された。現在、移植方法を検討中である。

3) 温度感受性を強化した SeV ベクターを用いて iPS 細胞の作製を行った。これまで開発した温度感受性ベクターは、SeV のポリメラーゼに温度感受性変異を導入している。例えば P2、L1361C、L1558I の変異を導入した SeV/TS15 骨格は 35 度では発現が維持されるが、37 度では発現が維持できなくなるというベクターである (PNAS, 108, 14234-14239, (2011))。



温度感受性ベクターの温度シフト発現制御

本研究では温度感受性を強化した SeV ベクターを用いた。iPS 細胞作製システムの既製品 (SeV ベクター) である CytoTune-iPS 2.0 の *c-MYC* 搭載ベクターをこの温度感受性強化ベクターに置き換えて iPS 細胞の作製を行ったところ、従来と同様に iPS 細胞様のアルカリホスファターゼ陽性コロニーが得られた。PCR を行ったところ、*NANOG* と *TERT* の発現が観察された。得られたコロニーをバルクで継代し、TaqMan probe を用いて SeV の定量 PCR を行ったところ、2 継代目で温度感受性強化ベクターを用いた細胞の値は従来の 1/90 以下であり、3 継代目には検出限界以下になった。SeV 抗体を用いた免疫染色においても SeV 陰性であった。NOD-scid マウス皮下に移植を行い、テラトーマの形成と 3 肺葉への分化により多能性を観察した。一過性発現が可能で染色体に取り込まれない SeV ベクターは、細胞の分化誘導時など、転写因子の発現を短期間に制御したい場合において、有用なツールになるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Miwako Nishio, Masako Nakahara, Koichi Saeki, Katsuhito Fujiu, Hiroshi Iwata, Ichiro Manabe, Akira Yuo, Kumiko Saeki: Pro- vs anti-stenotic capacities of type-I vs type-II human induced pluripotent-derived endothelial cells. 査読有, World J Transl Med 4(3):113-122. Published online Dec 12, 2015. doi: 10.5528/wjtm.v4.i3.113

Masako Nakahara, Miwako Nishio, Koichi Saeki, Akira Yuo, Kumiko Saeki: p38 mitogen-activated protein kinase regulates type-I vs type-II phenotyping of human vascular endothelial cells. 査読有, World J Transl Med 4(3):101-112. Published online Dec 12, 2015. doi: 10.5528/wjtm.v4.i3.101

Miwako Nishio, Masako Nakahara, Chikako Sato, Koichi Saeki, Hidenori Akutsu, Akihiro Umezawa, Kazuyuki Tobe, Kazuki Yasuda, Akira Yuo, Kumiko Saeki: New categorization of human vascular endothelial cells by pro- vs anti-proliferative phenotypes. 査読有, World J Transl Med World J Transl Med 4(3):88-100. Published online Dec 12, 2015. doi: 10.5528/wjtm.v4.i3.88

川口実太郎、佐伯晃一、幹細胞と再生医療、センダイウイルスベクターを用いた体細胞リプログラミング法の改良と臨床用キットの開発、BIO Clinica、Vol.30 no.5、453-454、2015 年 5 月号

川口実太郎、伴浩志、佐伯晃一、より進

歩した体細胞リプログラミング法：センダイウイルスベクター (CytoTune- iPS) による進歩、細胞、46、229-230 (2014)

〔学会発表〕(計 3 件)

佐伯晃一、川口実太郎、草野好司、井上誠：一過性発現 SeV ベクターを用いた iPS 細胞の誘導、第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月、大阪

川口実太郎、弘中孝史、上田泰次、佐伯晃一、草野好司、井上誠、朱亜峰：臨床用 iPS 細胞作製センダイベクターセット GMP-CytoTune-iPS の開発、第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月、大阪

佐伯晃一、川口実太郎、草野好司、井上誠：SeV ベクターの改良：in vitro での一過性発現、BMB2015、2015 年 12 月、神戸

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：血管平滑筋細胞の増殖を抑制する血管内皮細胞の検出方法

発明者：佐伯久美子、湯尾明、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護

権利者：独立行政法人国立国際医療研究センター、株式会社 ID ファーマ

種類：特許

番号：特許願 2013-115325

出願年月日：平成 25 年 5 月 31 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dnavec.co.jp/press/20110801.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 晃一 (SAEKI KOICHI)

株式会社 ID ファーマ・DNAVEC センター・基礎研究部・研究員

研究者番号：40360052