

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893253

研究課題名(和文) ヒトナイーブPS細胞とアデノウイルスを利用した高効率遺伝子ターゲティング法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method for highly efficient gene targeting by adenovirus vector on human naive pluripotent stem cells

研究代表者

太田 尚志 (ohta, naoyuki)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：00714255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトナイーブ多能性幹(PS)細胞の誘導をおこない、誘導したヒトナイーブPS細胞にヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いて遺伝子ターゲティング(GT)をおこなった。しかしながら、GT効率の有意な改善は見られなかった。ヒトナイーブPS細胞におけるGT効率を律速する原因のひとつにフィーダー細胞の混入が考えられたため、ヒトナイーブPS細胞をフィーダー細胞無しで培養する方法の開発に取り組み、その培養法を確立した。今後、フィーダー細胞無し条件で培養したヒトナイーブPS細胞にヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いて遺伝子ターゲティングをおこなう。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a method for highly efficient gene targeting. To achieve the goal, in this study, human naive pluripotent stem cells were infected with a helper dependent adenovirus vector (HDAV). A method to induce human naive pluripotent stem (PS) cells from primed induced pluripotent stem (iPS) cells has been previously reported (Chan et al., Cell Stem Cell, 2013). Using this method, we performed the induction of human naive pluripotent stem cells. Gene targeting was performed to these cells using HDAV. However, efficiency of gene targeting in naive PS cells has not been higher than that in primed iPS cells. In order to improve the method, we tried to develop a method for feeder-free culture of naive PS cells. In the future, we perform gene targeting in feeder-free naive PS cells using HDAV.

研究分野：gene therapy

キーワード：gene therapy naive PS cells HDAV

1. 研究開始当初の背景

<ヒトナイーブ多能性幹細胞に関して>

マウスおよびヒトにおいて特定の転写調節因子遺伝子を外部から導入することで、成熟した体細胞から未分化な人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が樹立された (Takahashi and Yamanaka, Cell, 2006; Takahashi et al., Cell, 2007)。誘導に用いられる4つの転写調節因子は共通であったが、作製されたマウス iPS 細胞とヒト iPS 細胞は、初期化された細胞の発生段階に違いがあった。つまり、キメラ形成能や増殖に必要な因子など、マウス iPS 細胞とヒト iPS 細胞では性質が異なっていた。例えば、マウス iPS 細胞は LIF (Leukemia inhibitory factor) に依存して増殖する一方で、ヒト iPS 細胞は FGF (Fibroblast growth factor) に依存して増殖する。

近年、iPS 細胞の利用は爆発的に増加してきており、特に、ヒト iPS 細胞は再生医療の原材料として、ヒト胚性幹 (Embryonic stem:ES) 細胞にはない利点を持っており、医療応用が期待されていた。また、研究目的で遺伝子導入や遺伝子欠損を起こした iPS 細胞の作製、利用も進んでいた。

しかしながら、ヒト iPS 細胞では細胞への遺伝子導入や遺伝子ターゲティングの効率が、マウス iPS 細胞に比べて著しく低く、ヒト iPS 細胞を用いた研究のひとつの足かせになっていた。この原因のひとつは、ヒトとマウスの iPS 細胞の発生段階の違いに起因すると考えられていた。マウス iPS 細胞と同様の状態のヒトの PS 細胞 (以下ではナイーブ hPS 細胞と記す) を作製するために、各種増殖因子や阻害剤の組み合わせによる誘導法が試され、いくつかの成功例が報告されていた (Gafni et al., 2013, Nature; Chan et al., 2013, Cell Stem Cell)。従来のヒト iPS 細胞 (以下ではプライムド hiPS 細胞と記す) は FGF に依存して増殖する一方で、ナイーブ hPS 細胞は、マウス iPS 細胞と同様に LIF に依存して増殖する。誘導したナイーブ hPS 細胞にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子ターゲティングをおこなった研究では、ナイーブ hPS 細胞はプライムド hiPS 細胞に比べて遺伝子ターゲティング効率が高いことが報告された (Gafni et al., 2013, Nature)。

<HDAdV に関して>

ヒト iPS 細胞への遺伝子ターゲティング効率は著しく低く、遺伝子欠損 hiPS 細胞や遺伝子導入 hiPS 細胞の作製は困難であった。しかし、ヘルパーウイルスを用いた「ヘルパー依存型アデノウイルスベクター (HDAdV)」を利用することで、ヒト iPS 細胞への遺伝子ターゲティング効率が大きく改善された (Aizawa et al., 2012, Molecular Therapy)。HDAdV ではベクターの作製の際に必要なアデノウイルス遺伝

子はヘルパーウイルスから導入されるため、HDAdV 内には、直鎖状 DNA の両端の反復配列とベクターDNA をウイルス粒子に梱包する際のパッケージングシグナル配列のみがあればよい。そのため、HDAdV には最大 36kb 程度の長い配列の DNA が導入でき、CRISPR や TALEN などの人工制限酵素により染色体 DNA に二本鎖切断を導入しなくても、相同組み換えによる高効率な遺伝子ターゲティングが可能であった。

他にも HDAdV を利用する利点には、

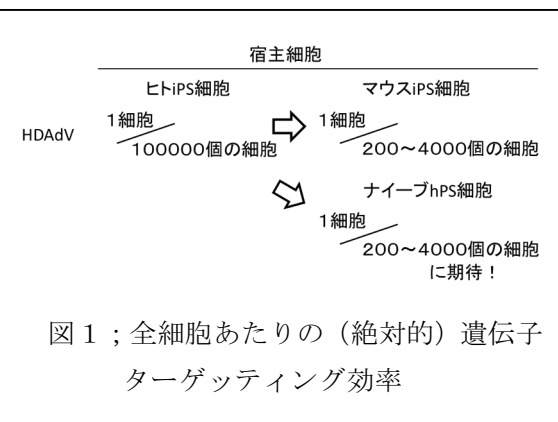
1. 細胞への HDAdV の添加量を一定にすることで、複数細胞検体間での導入効率の比較および評価が可能である。

2. DNA 二本鎖切断を導入しないため、DNA 損傷などの細胞への損傷が少なく、細胞損傷による実験結果のブレを最小限にできる。

3. 遺伝子ターゲティング効率が非常に高いため、実験に必要な細胞が少数で済む。などがあげられる。そのため、研究だけでなく、臨床応用を考える上でも、HDAdV は有用であると考えられる。

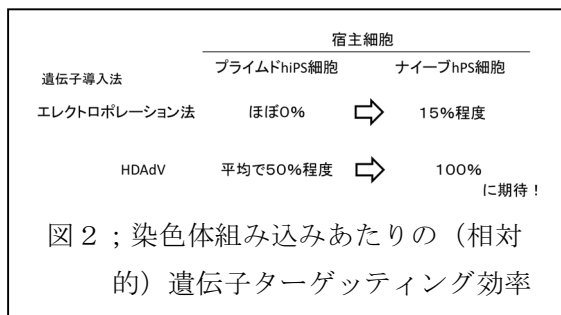
<遺伝子ターゲティング効率に関して>

遺伝子ターゲティング効率には、実験の開始時に用意した全細胞あたりの (絶対的) 効率と染色体組み込みあたりの (相対的) 効率がある。臨床応用の際には、少しでも多くの遺伝子ターゲティング細胞クローンを得ることが望ましいため、患者由来の細胞数あたりの (絶対的) 遺伝子修復効率が重要になる。全細胞あたりの遺伝子ターゲティング効率はエレクトロポレーション法では圧倒的に低く、HDAdV を用いて高効率になったとはいえ、ヒト iPS 細胞では 100000 個に 1 個の割合でしか遺伝子ターゲティングが起きない。一方で、マウスの iPS 細胞に HDAdV を用いた場合には 400~2000 個に 1 個の割合で遺伝子ターゲティングが可能である (図 1) (Ohbayashi et al., 2005, PNAS)。



ナイーブ hPS 細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入をおこなうと染色体組み込みあたり 15%程度の効率で遺伝子ターゲティングが可能になった (Gafni

et al., 2013, Nature)。一方で、プライムド hiPS 細胞に HDAdV を用いて遺伝子導入をおこなうと、染色体組み込みあたり平均 50% 程度の効率で遺伝子ターゲッティングが可能である (Aizawa et al., 2012, Molecular Therapy)。そこで、ナイーブ hPS 細胞へ HDAdV を利用した遺伝子導入法を利用すれば、さらなる遺伝子ターゲッティング効率の上昇が期待された (図 1、図 2)。



<アデノウイルスのファイバーに関して>

アデノウイルスは宿主細胞への感染の際に、ウイルス粒子表面に存在するファイバーを利用して、宿主細胞の細胞表面上に存在する受容体に結合する。ウイルス血清型ごとにウイルス粒子上に存在するファイバーの構造は異なっており、ウイルス血清型ごとに結合する受容体は異なる。例えば、アデノウイルス血清型 5 型は細胞受容体として CAR を利用し、アデノウイルス血清型 35 型は細胞受容体として CD46 を利用する。そのため、宿主細胞に発現している受容体の種類およびその発現量の違いにより各ウイルス血清型の宿主細胞への感染効率に差が生じる。つまり、ヒト iPS 細胞へのウイルス感染を効率化するためには、それに適したファイバー血清型を持つ HDAdV を利用することが重要である。従って、利用するファイバーを最適化することで、ヒト iPS 細胞への感染効率および遺伝子導入効率を高めることで、最終的には遺伝子ターゲッティング効率を高めることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を用いてヒトナイーブ多能性幹細胞に遺伝子導入をおこなうことで、ヒト細胞に対する高効率な遺伝子ターゲッティング法の開発を目指す。

3. 研究の方法

実験 1. ナイーブ hPS 細胞とプライムド hiPS 細胞間での遺伝子ターゲッティング効率の比較

ナイーブ hPS 細胞へ HDAdV を利用した遺伝子導入をおこなうことで、遺伝子ターゲッティング効率の改善を目指す。同一細胞由来で遺伝的背景が等しいナイーブ hPS 細

胞とプライムド hiPS 細胞を利用して、同じ遺伝子座に対して遺伝子ターゲッティングをおこない、各細胞における遺伝子ターゲッティング効率を正確に比較する。

まずは、プライムド hiPS 細胞から遺伝的背景が等しいナイーブ hPS 細胞を誘導する。本研究では、外来遺伝子の強制発現を伴わずに、阻害剤と増殖因子の添加のみでナイーブ hPS 細胞が誘導可能な 3iL 法 (Chan et al., 2013, Cell Stem Cell) を用いてナイーブ hPS 細胞を作製する。

ナイーブ hPS 細胞への誘導の確認は、*XIST* 遺伝子のメチル化状態および未分化マーカー遺伝子の発現量や、細胞の各種阻害剤への耐性により確認する。

用意したナイーブ hPS 細胞とプライムド hiPS 細胞の 2 種類の細胞に、HDAdV を用いて、遺伝子導入をおこなう。2 種類の細胞間で、遺伝子ターゲッティング効率を比較する。遺伝子ターゲッティングされた細胞は HDAdV に搭載されたネオマイシン耐性遺伝子によるポジティブ選択が可能である。また、HDAdV の両端に搭載されたチミジンキナーゼ遺伝子により、相同組み換えによる挿入とランダムな挿入を区別するネガティブ選択も可能である。生じた hiPS 細胞コロニーからゲノム DNA を抽出し、相同組み換えによる遺伝子ターゲッティングが起きていることを PCR 法により確認する。これらから、全細胞あたりの遺伝子ターゲッティング効率および遺伝子導入された細胞あたりの遺伝子ターゲッティング効率を算出する。

実験 2. ナイーブ hPS 細胞への感染に最適な HDAdV のファイバーの探索

遺伝子ターゲッティング効率をさらに上げる一つの方法として、細胞への遺伝子導入効率そのものの改善を目指す。そのために、ナイーブ hPS 細胞への HDAdV の感染に最適なウイルスファイバー血清型を探索する。ファイバーの 5 型を 3 型および 35 型に組み替えた HDAdV を利用して、ナイーブ hPS 細胞に対する HDAdV の感染効率を比較する。

HDAdV では、ベクター作製の際に遺伝子構造を改変したヘルパーウイルスを用いることで、ファイバーを組み換えて異なる受容体を利用して遺伝子を導入する HDAdV を作製することが容易である。アデノウイルスベクターとして頻りに利用されているファイバー 5 型のウイルスゲノムを基に、ファイバーをコードする遺伝子を置き換えてファイバー 3 型および 35 型を発現させるヘルパーウイルスを準備した。これらのヘルパーウイルスを用いて、5 型、3 型、35 型の計 3 つの異なるファイバーを持つ HDAdV を作製する。

これらの 3 種それぞれのファイバーを持ち、レポーター遺伝子を搭載した HDAdV をナイーブ hPS 細胞に感染させ、その感染効率を比較する。

4. 研究成果

本研究では、ヒト細胞に対する高効率な遺伝子ターゲティング法を開発することを目的として、ヒトのナীব多能性幹細胞に HDAV を用いた遺伝子導入を試みた。

実験 1. ナীব hPS 細胞とプライムド hiPS 細胞間での遺伝子ターゲティング効率の比較

先行研究で報告された 3iL 法 (Chan et al., 2013, Cell Stem Cell) を用いて、ナীব hPS 細胞の誘導をおこなった。

プライムド hiPS 細胞から、3iL 法により誘導した細胞は、マウス ES 細胞様の小さいドーム上のコロニー形態をとるようになった (図 3)。

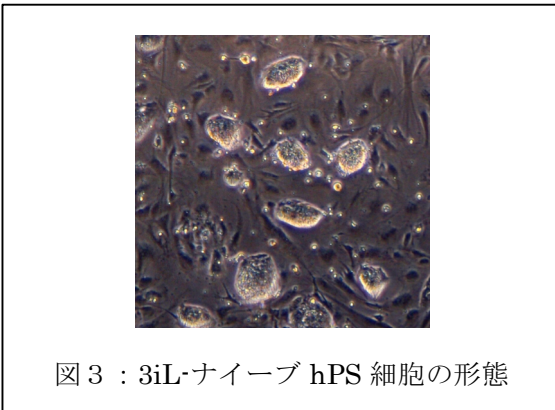


図 3 : 3iL-ナীব hPS 細胞の形態

ナীব hPS 細胞は、プライムド hiPS 細胞と異なり、FGF ではなく LIF に依存して細胞増殖をする。誘導した細胞が LIF に依存した細胞増殖をおこなっているかどうかを調べるために、LIF が活性化するシグナル経路である JAK シグナル経路を選択的に阻害する阻害剤の添加実験をおこなった。その結果、ヒト未分化マーカーを発現する細胞は、未処理の細胞集団と比べて半分程度に減少した (図 4)。ここから、本研究で 3iL 法により誘導した細胞の半数程度は LIF に依存した細胞増殖をおこなっていることが示された。

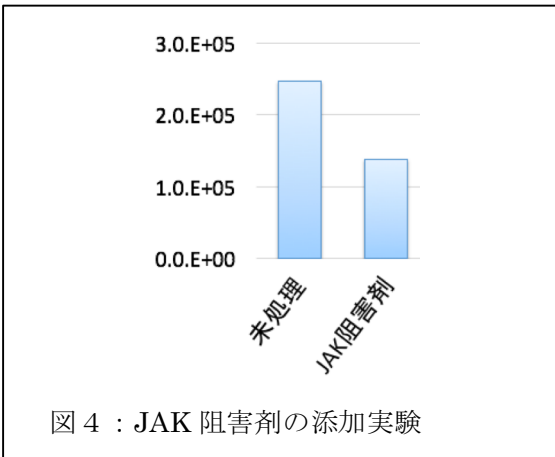


図 4 : JAK 阻害剤の添加実験

マウス iPS 細胞および ES 細胞では、*Xist* 遺伝子座は脱メチル化されており、ナীব hPS 細胞においても *XIST* 遺伝子座の脱メ

チル化が、ナীব状態を示す指標として利用される。本研究でも、3iL 法により誘導した細胞からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイトシーケンスにより、*NANOG* 遺伝子座および *XIST* 遺伝子座のメチル化状態を調べた (図 5)。本研究で 3iL 法により誘導した細胞ではプライムド hiPS 細胞と同様に *NANOG* 遺伝子座は脱メチル化されていたものの、期待された *XIST* 遺伝子座の脱メチル化は起きていなかった。3iL 法を報告した論文 (Chan et al., 2013, Cell Stem Cell) 中では、*XIST* 遺伝子座のメチル化状態を報告していなかった。一方で、近年報告された 3iL 法によりナীব PS 細胞を誘導した研究では、*XIST* 遺伝子座の脱メチル化が起こることを報告していた (Ware et al., PNAS, 2014)。今回誘導したナীব hPS 細胞では、*XIST* 遺伝子座の脱メチル化は起こっておらず、先行研究通りの結果は得られなかった。

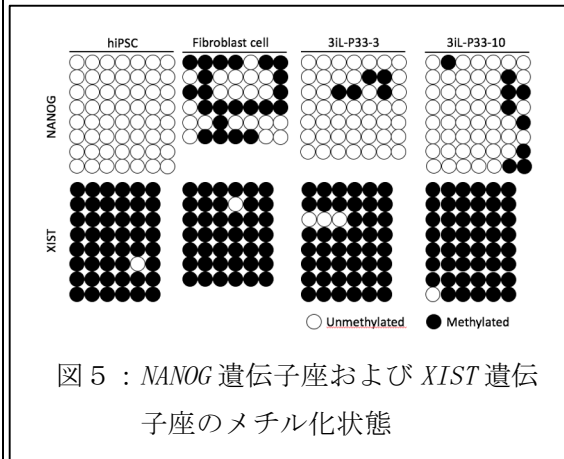


図 5 : *NANOG* 遺伝子座および *XIST* 遺伝子座のメチル化状態

本研究で誘導したナীব hPS 細胞における未分化マーカー遺伝子の発現を調べた。プライムド hiPS 細胞と 3iL 法により誘導したナীব hPS 細胞からそれぞれ RNA を抽出し、それを逆転写した cDNA を用いてリアルタイム定量 PCR をおこない、未分化マーカー遺伝子の発現を調べた。本研究で 3iL 法により誘導したナীব hPS 細胞は、プ

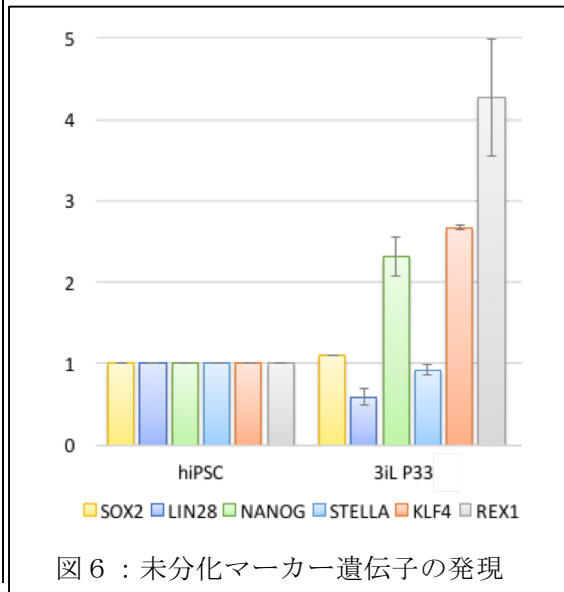


図 6 : 未分化マーカー遺伝子の発現

プライムド hiPS 細胞と比較して、未分化マーカー遺伝子である *NANOG* と *KLF4* の発現が 2 倍以上に増加しており、3iL 法 (Chan et al., 2013, Cell Stem Cell) を報告した先行研究とほぼ同様の発現様式を示していた。また、未分化マーカー遺伝子である *REX1* 遺伝子の発現も 4 倍程度に増加していた (図 6)。

次に、本研究で 3iL 法により誘導したナイーブ hPS 細胞を用いて遺伝子ターゲティング実験をおこなった。

X 連鎖重症複合免疫不全症の原因遺伝子であるインターロイキン 2 受容体 γ 鎖 (*IL2RG*) 遺伝子座を対象遺伝子座として遺伝子ターゲティング実験をおこなった。

IL2RG 遺伝子の 4 番目のエキソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、*IL2RG* 遺伝子の 4 番目のエキソン周辺の計 2 0 kb 程度のゲノム配列を含む HDAdV (HDAdV-IL2RG-neo) を用いた。

HDAdV-IL2RG-neo を利用し、本研究で 3iL 法により誘導したナイーブ hPS 細胞およびプライムド hiPS 細胞に対して遺伝子ターゲティング実験をおこなった。本研究では、計 3 回の実験をおこなったが、ナイーブ hPS 細胞に対する遺伝子ターゲティングでは、プライムド hiPS 細胞に対する遺伝子ターゲティングと同程度の薬剤 (G418) 耐性コロニーしか観察されなかった (図 7)。

Exp.	Cell	MOI	
		of HDAdV	G418R /cell
Exp. 1	3iL	3	2.0.E-06
	3iL	10	8.0.E-06
	3iL	30	0
Exp. 2	3iL	10	0
	3iL	30	2.0.E-06
Exp. 3	3iL	10	3.8.E-06
	3iL	30	8.9.E-06
Exp. C1	hiPSC	30	4.0.E-06
Exp. C2	hiPSC	10	9.0.E-06
	hiPSC	30	8.0.E-06
Exp. C3	hiPSC	10	0
	hiPSC	30	2.0.E-06

図 7 : ウイルス感染細胞あたりの G418 耐性コロニーの数

当初は、薬剤耐性コロニーからゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって、ネオマイシン耐性遺伝子が期待通りの遺伝子座 (今回の場合は *IL2RG* 遺伝子の 4 番目のエキソン) に挿入されているかを調べ、コロニーあたりの遺伝子ターゲティング効率を算出する予定をしていた。しかし、ナイーブ hPS 細胞に対する遺伝子ターゲティング効率が、プライムド hiPS 細胞に対する遺伝子ターゲティング効率と同程度しかないと予想されたため、PCR による解析をおこなわなかった。

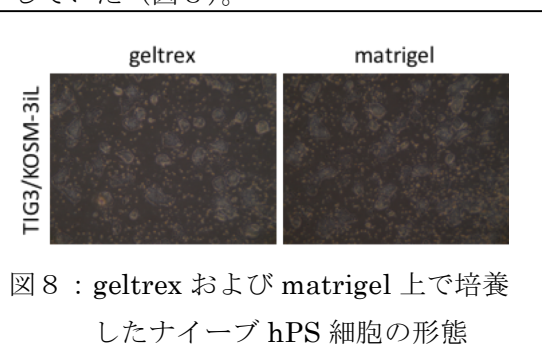
ここで、当初の予定を変更し、別の実験をおこなった。

本研究で用いたナイーブ hPS 細胞誘導法では細胞培養にフィーダー細胞を必要としたが、HDAdV を標的細胞に感染させる際には、フィーダー細胞の混入は、標的細胞への感染効率を下げるため望ましくない。上記の遺伝子ターゲティング実験で遺伝子ターゲティング効率の有意な改善が見られなかった一つの原因がフィーダー細胞の混入にあると考え、ナイーブ hPS 細胞をフィーダー細胞無しで誘導する培養方法の開発に取り組んだ。

先行研究で報告された 3iL 法 (Chan et al., 2013, Cell Stem Cell) ではフィーダー細胞として、マウス胎仔由来線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast; MEF) を利用していたため、本研究ではこれに倣い MEF を利用した。ここではフィーダー細胞無しの培養条件を確立するために geltrex および matrigel の利用を検討した。

従来の 3iL 誘導法通りにナイーブ hPS 細胞を誘導した後に、それを geltrex および matrigel でコートしたディッシュに継代した。

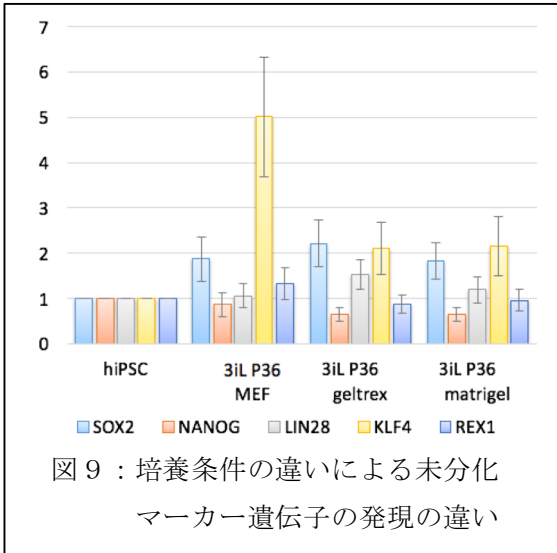
継代後 4 日目までは、細胞の形態に大きな変化は見られず、いずれもマウス ES 細胞様の小さいドーム上のコロニー形態を維持していた (図 8)。



また、これらの培養条件の異なる細胞における未分化マーカー遺伝子の発現を調べるために、MEF, geltrex および matrigel 上のナイーブ hPS 細胞からそれぞれ RNA を抽出し、それを逆転写した cDNA を用いてリアルタイム定量 PCR をおこない、未分化マーカー遺伝子の発現を調べた。MEF 上で培養したナイーブ hPS 細胞と比較して、geltrex および matrigel 上で培養したナイーブ hPS 細胞では、未分化マーカー遺伝子である *KLF4* の発現が減少したものの、プライムド hiPS 細胞に比べて 2 倍程度の発現を維持していた。ここでは、geltrex と matrigel のコートによる大きな違いは見られなかった (図 9)。

今後、フィーダー細胞無しの培養条件で誘導したナイーブ hPS 細胞に、HDAdV を用いて遺伝子ターゲティング実験をおこな

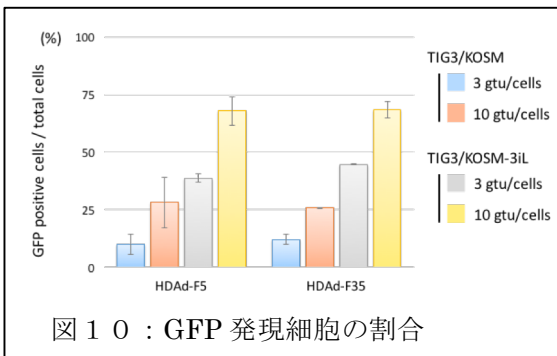
う予定である。



実験 2. ナイーブ hPS 細胞への感染に最適な HDAdV のファイバーの探索

遺伝子ターゲティング効率をさらに上げるために、ナイーブ hPS 細胞への HDAdV の感染効率および遺伝子導入効率の改善を目指す。そのために、ナイーブ hPS 細胞への HDAdV の感染に最適なウイルスファイバー血清型を探索する。

レポーター遺伝子である GFP 遺伝子を搭載した HDAdV をもとに、ファイバーを 5 型および 35 型のファイバーに組み替えた HDAdV を準備した。この HDAdV を本研究で作製したナイーブ hPS 細胞に感染させ、GFP を発現する細胞の割合から HDAdV の感染効率を比較した。準備した各 HDAdV は、その GFP 発現タイター (gtu) を 293 細胞を基準に算出した。5 型 (F5) および 35 型 (F35) ファイバーをもつ HDAdV を、ウイルス対細胞の数の比が 3 および 10 になるように (3gtu/cell および 10gtu/cell)、プライムド hiPS 細胞およびナイーブ hPS 細胞に感染させた。ウイルス感染 2 日後に細胞を回収し、GFP を発現している細胞の割合をフローサイトメーターにより解析した。



その結果、5 型および 35 型ファイバーをもつ HDAd ウイルスの両方において、ナイーブ hPS 細胞では、プライムド hiPS 細胞よりも、それぞれのウイルス濃度において 3 倍程度高い GFP 発現効率を示した (図 10)。ここ

から、ナイーブ hPS 細胞では、プライムド hiPS 細胞よりも細胞へのウイルス感染効率が 3 倍程度高くなることがわかった。一方で、ナイーブ hPS 細胞においてもプライムド hiPS 細胞においてもウイルス感染時に使用するファイバーによる遺伝子導入効率の差異は観察されなかったため、ナイーブ hPS 細胞においても、アデノウイルスベクターに広く利用されている血清型 5 型のファイバーを利用するのが最適であると考えられた。

本研究では、その目的であるヒト細胞に対する高効率な遺伝子ターゲティング法の開発にまではいたらなかった。今後、本研究で確立したフィーダー細胞無しの培養条件で誘導したナイーブ hPS 細胞に HDAdV を用いて引き続き遺伝子ターゲティングをおこなう。

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 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 尚志 (OHTA NAOYUKI)
 埼玉医科大学 医学部 助教
 研究者番号 : 00714255