

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791754

研究課題名(和文)

マウス成体間葉系幹細胞由来の新規高品質 i P S 細胞の樹立

研究課題名(英文)

Generation of iPS cells from purified adult murine mesenchymal stem cells

研究代表者

河村 佳見 (KAWAMURA YOSHIMI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20505044

研究成果の概要(和文):

iPS 細胞を用いた再生医療の実現のためには、様々な年齢及び遺伝的バックグラウンドを持つ患者から効率よく iPS 細胞を樹立することが求められる。我々は成体マウス間葉系幹細胞(MSCs)を細胞源として iPS 細胞を作製したところ、すでに分化した骨前駆細胞(OP)や尾線維芽細胞(TTF)を用いた場合と比較して、高効率に ES 細胞と同等の性質を持つ iPS 細胞が樹立できた。以上のことから、成体組織であっても MSCs から iPS 細胞を樹立すれば、質の良い iPS 細胞を効率よく作製できることが示唆された。

研究成果の概要(英文):

Although iPS cells could be generated from most somatic cells, the poor efficiency of cell reprogramming and the uneven quality of iPS cells are still important problems. Here, we generated iPS cells from adult mouse mesenchymal stem cells (MSCs), osteo progenitors (OP cells) and Tail Tip Fibroblasts (TTFs), and compared the induction efficiency and quality of individual iPS clones. MSCs had a higher reprogramming efficiency compared with OP cells and TTFs. The iPS cells induced from MSCs appeared to be the closest equivalent to ES cells. Our findings suggest that a purified source of undifferentiated cells from adult tissue can produce high quality iPS cells. In this context, prospectively enriched MSCs are a promising candidate for the efficient generation of high quality iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：iPS 細胞、再生医学

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を用いた再生医療の実現のためには、様々な年齢及び遺伝的バックグラウンドを持つ患者から効率よく iPS 細胞を樹立することが求められる。これまでに様々な細胞から iPS 細胞が樹立されてきたが、マウス及びヒトにおいて高効率に iPS 細胞を樹立できるのは、胎児の細胞を用いた場合が主流であっ

た。また、iPS 細胞の樹立効率は低く、元となった細胞が均一でない細胞集団から樹立されていることが多いため、実際にどのような性質の細胞が iPS 細胞に誘導されているかは不明であった。

これらのことから細胞集団中にごく少量含まれる体性幹細胞が、遺伝子導入により優先的に多分化能を獲得するという可能性が

十分に考えられ、このような体性幹細胞を純化し、そこから iPS 細胞を樹立することによって成体から効率よく質の良い iPS 細胞が樹立できるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が高度に純化することに成功したマウス骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) を用いて iPS 細胞を樹立することにより、成体マウスから高品質な iPS 細胞を高効率かつ安全性の高い手法で樹立すること、さらに未分化状態を維持した体性幹細胞の方が分化した細胞より初期化しやすいという可能性の検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

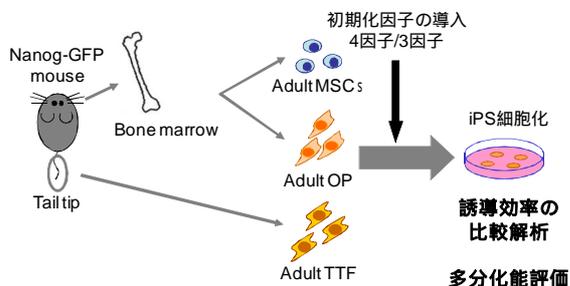


図1 本研究計画の概要図

(1) 4 因子および 3 因子を導入した成体 MSCs, OP, TTF 由来 iPS 細胞の樹立効率と多分化能評価

iPS 細胞の樹立

実験には、細胞が多分化能を獲得した時、GFP が発現するとともにピューロマイシンでセレクションをかけられる Nanog-GFP-IRES-Puro mouse を使用した。このマウス骨髄をコラゲナーゼ処理した後、細胞を回収した。抗体染色を行った後、フローサイトメトリーにて CD45 陰性、Ter119 陰性細胞中 PDGFR 及び Sca-1 共陽性画分を MSCs 濃縮画分 (P S)、共陰性画分を骨前駆細胞 (OP) として分取した。同時にマウス尾線維芽細胞も採取した。

これらの細胞について、感染効率及びサイレンシングの指標となる DsRed と初期化因子 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 因子あるいは c-Myc を除いた 3 因子をレトロウイルスを用いて導入し、iPS 細胞を樹立した。出現したコロニーを解析し、初期化効率を 3 種の細胞種間で比較した。

iPS 細胞の多分化能評価

樹立した iPS クローンについて、RT-PCR による多分化能マーカーの発現、外来遺伝子のサイレンシングを解析した。また、ES 細胞において脱メチル化状態にある Nanog プロモ-

ーターのメチル化状態を Bisulfite genomic sequence 法にて解析した。作製した iPS 細胞の遺伝子発現パターンが ES 細胞と近いものであるかを DNA microarray によって検討した。これらの iPS クローンをヌードマウスの皮下に移植してテラトーマ形成試験を行い、3 胚葉系への分化能を解析、さらに iPS 細胞をマウス胚盤胞に注入することによりキメラマウスを作製し、組織への寄与率、germline transmission を検討した。また、キメラマウスおよびその子孫における腫瘍化の有無も解析し、安全性の検証を行った。

(2) 外来遺伝子の挿入の無い iPS 細胞の樹立

ゲノムに外来遺伝子が挿入されると、内在性の遺伝子が破壊される可能性や、外来遺伝子が再活性化する危険性があるため、外来遺伝子がゲノムに挿入されないセンダイウイルスを用いて iPS 細胞を樹立した。細胞源としては P S、TTF を用い、上記方法にならって樹立効率を解析し、多分化能を評価した。

4. 研究成果

(1) 4 因子および 3 因子を導入した成体 P S, OP, TTF 由来 iPS 細胞の樹立効率と多分化能評価

iPS の樹立

フローサイトメトリーを用いて成体骨髄から P S、OP を分取した。これらの細胞を分化培地にて分化させたところ、P S は MSCs の特徴である骨、脂肪、軟骨に分化した。一方、OP は骨のみに分化した (図 2)。

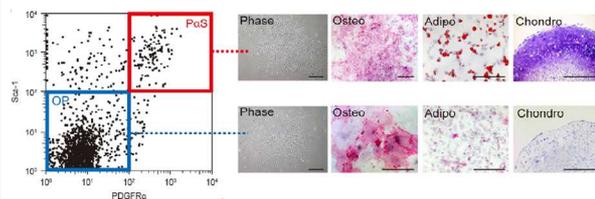


図2 PaS及びOP細胞の分取とその分化能

次に P S、OP、TTF に初期化 4 因子あるいは 3 因子をレトロウイルスを用いて導入した。

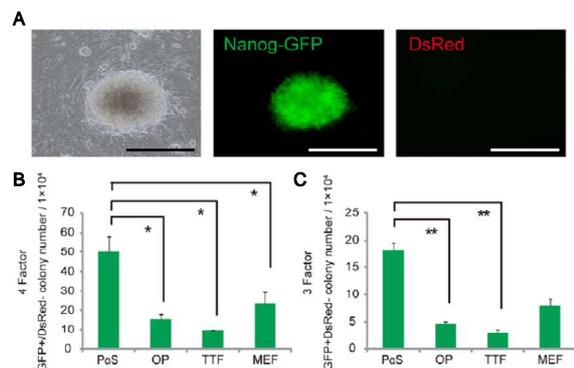


図3 PaS由来GFP+/DsRed+ iPS細胞(A)と各細胞種におけるGFP+/DsRed+コロニー数(B,C)

未分化性の指標となる Nanog -GFP が発現し、DsRed がサイレンシングを受けている、つまり正常に初期化されたと考えられるコロニーを計数した(図 3A)。その結果、4 因子、3 因子導入どちらの場合でも P S で最も多くの ES 細胞様コロニーが得られた(図 3B、C)。

iPS 細胞の多分化能評価

3 種の細胞源由来 Nanog -GFP 陽性、DsRed 陰性コロニーからそれぞれ 5 クローンをランダムに選び、多分化能の評価を行った。多分化能マーカー遺伝子について RT -PCR を行ったところ、OP 由来 iPS 細胞と TTF 由来 iPS 細胞では発現が認められない遺伝子があったのに対し、P S 由来 iPS 細胞では、全てのクローンで、調べたマーカー遺伝子全てが発現していた(図 4)。

次に、導入した初期化因子のサイレンシングを解析した。その結果、P S -iPS 細胞では全てのトランスジーンでサイレンシングが起こっていたのに対し、OP、TTF -iPS 細胞では不完全であった(図 4)。4 因子誘導でも 3 因子誘導 iPS 細胞でも同様の結果であった。

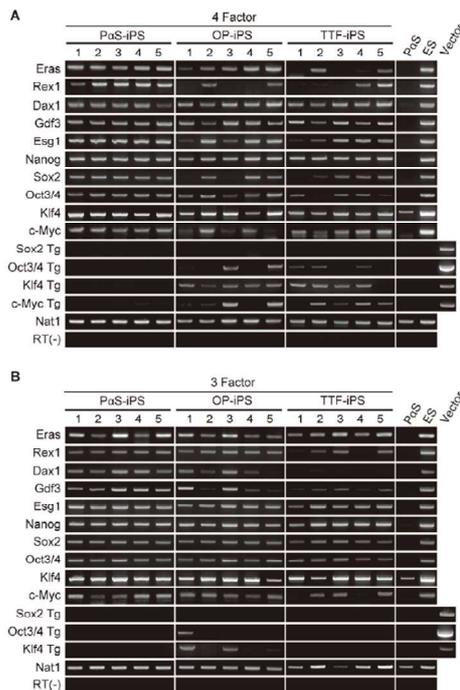


図4 各iPS細胞における多能性マーカーとトランスジーン発現

テラトーマ作製試験を行った結果、OP、TTF -iPS 細胞は一部分化していないクローンがあったのに対し、P S -iPS 細胞は全てのクローンが三胚葉への分化能を示した。

また、Nanog プロモーター領域のメチル化を解析したところ、P S -iPS 細胞は元細胞と異なり脱メチル化が起こっていたのに対し、OP、TTF -iPS 細胞では脱メチル化の程度が低かった(図 5)。

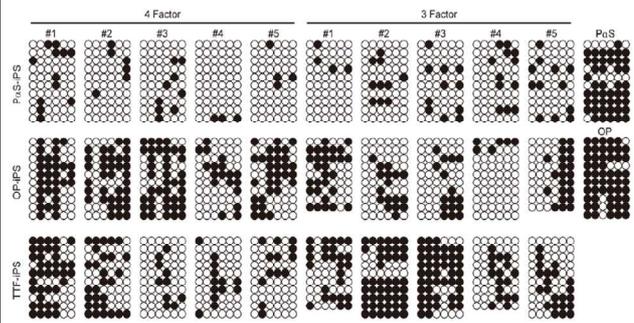


図5 各iPS細胞におけるNanogプロモーター領域のメチル化

DNA microarray により、ES 細胞と各 iPS 細胞間で global gene expression を比較解析した。その結果、P S -iPS 細胞は OP、TTF -iPS 細胞に比べてより ES 細胞に近い遺伝子発現パターンであることが分かった。

キメラマウスの作製

次にこれらの iPS 細胞がキメラマウスを作る能力があるかを解析した。その結果、OP、TTF -iPS 細胞からはキメラマウスが生まれてこなかった。P S -iPS 細胞では興味深いことに 4 因子導入 iPS 細胞より 3 因子導入 iPS 細胞からキメラ率の高い個体が生まれてきた(図 6A)。さらに germline transmission も高率で認められた(図 6B)。

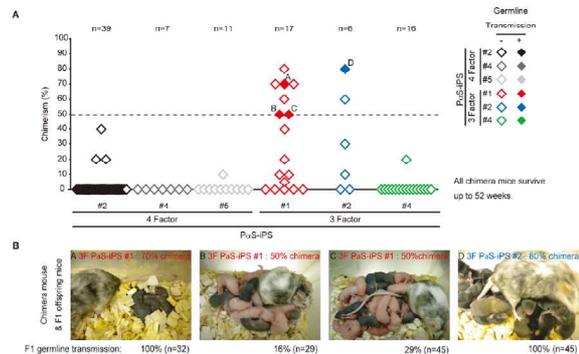


図6 PaS-iPS細胞由来キメラマウスのキメラ率(A)及びキメラマウスとF1産仔(B)

これらの 4 因子及び 3 因子導入 P S -iPS 細胞由来キメラマウスはどちらも腫瘍化などが見られず、現在まで生存している。生まれた F1 についても同様である。

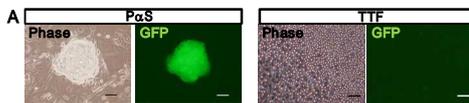
P S 細胞はもともと c -Myc や Klf4、近年 germline transmission に関係していることが報告された Tbx3 などを ES 細胞と同程度に発現していた。対して OP や TTF での発現は低かった。3 因子誘導 P S -iPS 細胞で germline transmission が高率で生じたことは、c -Myc の発現量が内在性のものだけで初期化に十分であった可能性がある。また、Tbx3 を c -Myc の代わりに導入しても germline transmission する iPS 細胞が樹立できたという報告から、内在性の Tbx3 発現量

が高いことが寄与していることも考えられる。

以上のことから、MSCs 濃縮画分である P S 細胞は同系譜の分化が進んだ細胞と比較して、初期化されやすいことが分かった。また、癌遺伝子 c-Myc を除いた 3 因子で、germline transmission が起こるほど十分に初期化された iPS 細胞が得られた。以上のことから MSCs は iPS 細胞樹立において優れた細胞供給源になると考えられた。

(2) 外来遺伝子の挿入の無い iPS 細胞の樹立

外来遺伝子がゲノムに挿入されないセンダイウイルスを用いて P S、TTF から iPS 細胞の樹立を試みた。その結果、TTF からは ES 細胞様コロニーが得られず、P S のみから Nanog-GFP 陽性 ES 細胞様コロニーが得られた (図 7A、B)。このことから、センダイウイルスを用いた樹立法においても P S 細胞が TTF より初期化されやすいことが分かった。



Cell (x10 ⁴)	Exp.01				Exp.02				Exp.03					
	PaS		TTF		PaS		TTF		PaS		TTF			
	0.99 (1/12well plate)				5 (6cm dish)				2 (1/6well plate)					
MOI	3	5	3	5	3	5	3	5	3	5	10	3	5	10
Colony Number	20	36	0	0	53	0	0	0	3	9	7	1*	0	0
GFP+ Colony number	2	21	0	0	7	0	0	0	1	1	1	0	0	0

*; cell aggregation

図7 センダイウイルスを用いたPaS、TTFからのiPS細胞との樹立

上記成果のうち、(1)について論文を 2011 年 3 月 PLoS One 誌に発表し (PLoS One. 2011 Mar 11;6(3):e17610)、国内外で一定の評価を得ている。

当研究室ではヒト細胞においても、FACS を用いての MSCs 濃縮に成功している。本研究は、ヒト MSCs を細胞供給源とした高品質な iPS 細胞作製のベースとなり、臨床応用において患者の年齢によらず効率よく高品質な iPS 細胞株を樹立することが可能になると考えられる。また、幹細胞の供給源として骨髄だけでなく、脂肪組織・臍帯血・胎盤からの MSCs を用いることで、より低侵襲な細胞治療の実現を可能にする。

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 1 件)

新部邦透、河村佳見、荒木大輔、以下 10 名 Purified Mesenchymal Stem Cells Are an Efficient Source for iPS Cell Induction、PLoS One、査読有、6(3)、2011、e17610

[学会発表] (計 5 件)

河村佳見、A simple evaluation method for iPS cells quality、第 7 回 宮崎サイエンスキャンプ、2011 年 2 月 25 日、ワールドコンベンションセンターサミット(宮崎)

河村佳見、Generation of iPS cells from purified mesenchymal stem cells (MSCs) and simple evaluation of iPS cells quality、Advanced Course in Stem Cell Biology in Lund Univ.、2010 年 10 月 22 日、Lund Univ. Sweden

河村佳見、Purified mesenchymal stem cells: An efficient cell source for the iPS cells induction、The 8th Stem Cell Research Symposium、2010 年 5 月 13 -15 日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫)

[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

<http://www.okano-lab.com/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河村 佳見 (KAWAMURA YOSHIMI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 20505044

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし