

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19590890
研究課題名（和文） 幹細胞誘導遺伝子導入による線維芽細胞由来幹細胞を用いた肺再生医療の構築
研究課題名（英文） Lung regenerative medicine using fibroblasts-derived stem cell line with stem cell inducing factors
研究代表者
橋本 直純（Hashimoto Naozumi）
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30378020

研究成果の概要：

根治的な治療方法が確立されていない慢性閉塞性肺疾患(COPD)を始めとする多くの呼吸器疾患に対して肺構成細胞の再生治療は『既存の肺構造の破壊』に対する治療ストラテジーの一つとして重要な課題である。我々は線維芽細胞株と薬剤誘導遺伝子発現システムを組み合わせ、induced pluripotent stem (iPS)細胞の樹立を試み安定した細胞株の樹立と肺構成細胞の分化機序を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学・再生医療

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、疾患動向予測において対策が急務な疾患であると認識されているが、COPDに対する根治的な治療方法は確立されておらず、肺構成細胞の再生治療は『既存の肺構造の破壊』に対する治療ストラテジーの一つとして重要な課題であるとされる。幹細胞、特に胚性幹細胞(ES細胞)、の多様性分化能に注目が集まり動物実験モデルおよびヒトにおいてさまざまな臓器細

胞に分化・再生する報告が集積されているが、倫理的・政治的・財政的背景からES細胞を用いた再生医療の研究には多くの制約が生じている。そうした中、四つの遺伝子導入により、成体マウス線維芽細胞から、幹細胞の特徴を有する induced pluripotent stem (iPS) cells の誘導に成功し、三胚葉由来の組織形成を誘導したとする画期的な報告がなされた。この知見は、自己の線維芽細胞を用いることにより、(a) 幹細胞を用いた再生

医療が直面する倫理的ジレンマを打開する可能性を示唆するだけでなく、(b) 移植医療で直面する拒絶反応という課題を回避できる可能性を示唆することも合わせて画期的であると考えられた。以上の背景を踏まえて、線維芽細胞株を用いた幹細胞誘導遺伝子導入 iPS 細胞を樹立して、肺構成細胞への分化誘導機序を解明することが最重要課題であると考えた。

2. 研究の目的

(1) 線維芽細胞への四遺伝子導入による幹細胞の特徴を有する iPS cells の樹立

(2) 樹立可能であった iPS cells の肺構成細胞への分化誘導因子の同定

(3) 線維化病変におけるさまざまな起源由来の線維芽細胞を用いた iPS cells 樹立の評価

(4) iPS cells を用いた肺再生治療モデルの確立

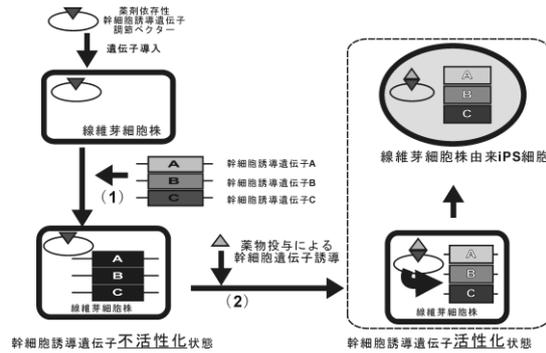
を行う。これらによりヒト線維芽細胞を用いた肺再生医療への臨床応用に向けた基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子導入効率の改善、癌化への回避操作、線維芽細胞以外の成体細胞の利用など、次々に改良が進んでいるが、1) ウイルスベクターによる外因性の幹細胞誘導遺伝子の一時的な発現を利用して樹立されていて、外因性幹細胞誘導遺伝子の発現消失後の幹細胞の性質を維持するための培養条件の維持が煩雑であること、2) 成体細胞を利用しているために iPS cells の樹立細胞間ごとの表現型のばらつきがあることが課題とされていた。

幹細胞誘導遺伝子導入による幹細胞の樹立には、一定期間の幹細胞誘導遺伝子の発現の維持が必要である一方、成熟細胞への分化にはその幹細胞誘導遺伝子の発現抑制が必須となる。この原理を達成し肺構成細胞の誘導を確立させるために、薬物誘導遺伝子発現システムを用いて幹細胞誘導遺伝子の発現

調節を試みることに着目した。



幹細胞誘導遺伝子不活性化状態

幹細胞誘導遺伝子活性化状態

(1) 薬物誘導遺伝子発現システムの構築

①上記の目的を達成するために、まず、Tet-on advanced vector の遺伝子導入効率を評価するために、肺癌細胞株 H1299 細胞株を利用した。G418 において single colony を選択し樹立した。また、reporter gene として green fluorescence protein (GFP) を用いて pTRE-Tight vector に挿入したコンストラクト (pTRE-GFP) を作成した。pTRE-GFP をまず一時的遺伝子導入を行った。48 時間後 doxycycline (Dox) を投与して、GFP の蛋白発現が誘導されるかどうかを評価した (Figure1)。

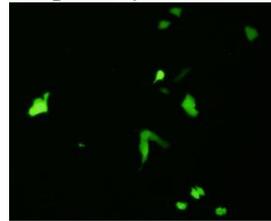


Figure1

②Tet-on system により、Dox により目的遺伝子が誘導されることを確認された後、線維芽細胞株 NIH3T3 を用いて同様に Tet-on advanced vector 導入細胞株を樹立した。その細胞株に pTRE-GFP を一時的遺伝子導入し Dox による GFP 誘導を確認した (Figure2)。

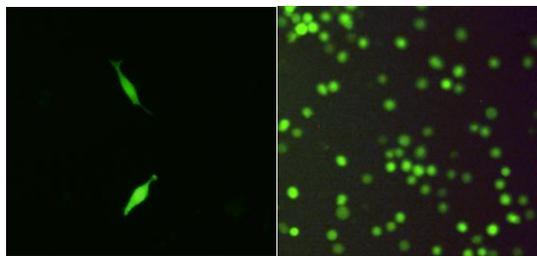


Figure2

Figure3

また、iPS 細胞の形質誘導および維持が最適となるのは Dox の投与による目的遺伝子の発現誘導 (Tet-On) もしくは発現抑制 (Tet-Off) のいずれかであるかを検討するために、

Tet-off vector を遺伝子導入された MEF3T3 細胞株に対して pTRE-GFP を Hygromycin 耐性遺伝子 vector と共に導入して、pTRE-GFP 発現細胞株を樹立した。この細胞は、Doxycycline 投与がない状態 (Tet-Off) で GFP の発現が認められた (Figure3)。

(2) Dox 調節幹細胞誘導遺伝子 vector の作成
iPS 誘導遺伝子とされる 4 遺伝子のうち Oct3/4, Sox2, Klf4 を pTRE-Tight vector に挿入したコンストラクトである pTRE-Oct3/4, pTRE-Sox2, pTRE-Klf4 を作成した。近年の報告で iPS 誘導遺伝子のもうひとつの遺伝子 c-myc なしでも iPS 細胞の樹立が可能であるという報告があった。シーケンスを確認して、pTRE-Tight vector, Oct3/4, Sox2, Klf4 に特異的な primers を設計した。

(3) Dox 調節幹細胞誘導遺伝子の細胞株への遺伝子導入

iPS 誘導遺伝子の中で、Sox2 や Klf4 は成体細胞においても発現が報告されている。一方、Oct3/4 は Nanog 遺伝子などのように幹細胞特異的は遺伝子と考えられている。一方、iPS 細胞の誘導には、単一細胞にこれら iPS 誘導遺伝子が同時に導入されていることが必要であると考えられる。そこで、まず、pTRE-Oct3/4 と hygromycin 耐性遺伝子を同時に electroporation にて遺伝子導入を行った。そこで、pTRE-Oct3/4 導入細胞株を樹立した。その細胞株に対して、pTRE-Sox2, pTRE-Klf4, そして pTRE-Oct3/4 を同時に electroporation にて繰り返し遺伝子導入を行い、単一細胞にすべての目的遺伝子が導入されている細胞株を樹立することを試みた。この electroporation の導入条件を検討するために、GFP 発現 vector を用いて指摘条件を検討した (Figure 4)。この electroporation の条件において 90%以上の遺伝子導入効率を確認できた。

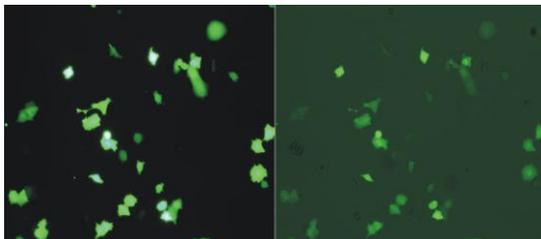


Figure 4

この electroporation の条件を元に pTRE-Oct3/4 導入細胞株を樹立した後、3つ

の iPS 誘導遺伝子 vector を繰り返し遺伝子導入した細胞株を樹立した。その細胞株から DNA を抽出して pTRE-Tight vector, Oct3/4, Sox2, Klf4 に特異的な primers を用いて細胞への導入を確認した。選択された細胞の No17 は、pTRE-3genes の検出を認めた。



Figure 5

4. 研究成果

以上より、Doxycycline 調節 iPS 誘導遺伝子導入細胞株を Tet-On 導入 H1299 細胞株、Tet-On 導入 NIH3T3 細胞株、Tet-Off 導入 MEF3T3 細胞株において樹立した。今後 Doxycycline において iPS 誘導遺伝子発現の調節を行い、iPS 細胞への分化誘導を試みる予定である。この条件が適正に設定されることにより、均一な iPS 細胞株を提供することができると思定される。また、この細胞株は一旦分化した状態となっても Dox を新たに投与することによる iPS 誘導遺伝子発現が可能となることが利点となり得て、再現性が保たれると思定される。これにより、肺構成細胞への誘導をもたらす条件設定が一旦設定された際、繰り返し肺構成細胞を誘導することが可能となり、肺組織の再生医療の基礎となりうると思定された。

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 7 件)

1. Shibasaki M, Hashimoto K, Okamoto M, Hayashi Y, Imaizumi K, Hashimoto N, Ozaki N, Yokoi T, Takagi K, Hasegawa Y, Shimokata K, Kawabe T. Up-regulation of

Surfactant Protein Production in a Mouse Model of Secondary Pulmonary Alveolar Proteinosis.

Am J Respir Cell Mol Biol 2008 *In press* 査読有

2. Shindo Y, Shinji Sato S, Maruyama E, Ohashi T, Ogawa M, Hashimoto N, Imaizumi K, Sato T, Hasegawa Y. Healthcare-associated pneumonia among hospitalized patients in a Japanese community hospital. *Chest* 2008 *In press* 査読有

3. Sumida A, Hasegawa Y, Okamoto M, Hashimoto N, Imaizumi K, Yatsuya H, Yokoi T, Takagi K, Shimokata K, Kawabe T. TH1/TH2 immune response in lung fibroblasts in interstitial lung disease. *Arch Med Res* 2008 39:503-510. 査読有

4. Yokoyama T, Osada H, Murakami H, Tatematsu Y, Taniguchi T, Kondo Y, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Horio Y, Hida T, Sekido Y. YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation.

Carcinogenesis 2008 *In press* 査読有

5. Matsuno T, Ito Y, Ohashi T, Morise M, Takeda N, Shimokata K, Imaizumi K, Kume H, Hasegawa Y. Dual pathway activated by tert-butyl hydroperoxide in human airway anion secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 *In press* 査読有

6. Ito S, Kume H, Shiraki A, Kondo M, Makino Y, Kamiya K, Hasegawa Y. Inhibition by the cold receptor agonists menthol and icilin of airway smooth muscle contraction. *Pulm Pharmacol Ther* 2008 21:812-817. 査読有

7. Suzuki R, Yamamoto M, Saka H, Taniguchi H, Shindoh J, Tanikawa Y, Nomura F, Gonda H, Imaizumi K, Hasegawa Y, Shimokata K. A phase II study of carboplatin and paclitacel with meloxicam. *Lung Cancer* 2008 *In press* 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 直純 (Hashimoto Naozumi)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30378020

(2) 研究分担者

長谷川 好規 (Hasegawa Yoshinori)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20270986