

機関番号：84420

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度

課題番号：20200076

研究課題名（和文） 安全性の高い人工多能性幹細胞の作製とその再生医療への応用

研究課題名（英文） Production of the safer induced pluripotent stem cells and their application for regenerative medicine

研究代表者

（川端 健二）

研究者番号：50356234

研究成果の概要（和文）：レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターの 3 種類のベクターを用いて、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。その結果、レンチウイルスベクターを利用した場合の作製効率が最も高く、その作製効率は各ベクターの遺伝子導入効率を反映しているものと推測された。次に、マウス iPS 細胞から血液前駆細胞・脂肪細胞・骨芽細胞への高効率分化誘導を試みた。CA プロモーターを有する Ad ベクターを用いて HoxB4 遺伝子、PPAR γ 遺伝子、Runx2 遺伝子を導入したところ、従来の液性因子のみを用いる分化誘導法よりも効率良く血液前駆細胞、脂肪細胞、骨芽細胞に分化することが明らかとなり、さらに得られた細胞は各々機能的にも最終分化した細胞であることが確認された。これらの結果から、我々の Ad ベクターによる遺伝子導入システムは、iPS 細胞を含む幹細胞の効率的な分化誘導に有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Induced pluripotent stem (iPS) cells were produced by three transduction systems, retroviral vectors, lentiviral vectors, and adenoviral vectors. The highest production efficiency was obtained when lentiviral vectors were used. This is because lentiviral vectors could show the highest transduction efficiency. When HoxB4 gene, PPAR γ gene, and Runx2 gene were transduced with adenoviral vectors with the CA promoter, hematopoietic progenitor cells, adipocytes, and osteoblasts were efficiently induced, respectively, in comparison with conventional differentiation methods. These results demonstrate that adenoviral vectors could be a useful tool for efficient differentiation from iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2009 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2010 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
年度			
総計	23,900,000	7,170,000	31,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：発生生物学、再生医学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

マウス iPS 細胞は 2006 年に京都大学・山中教授によって樹立された (Takahashi et al., Cell, 126, 663-676, 2006)。また、ヒト iPS 細胞は山中教授およびウィスコンシン大学 Thomson 教授らによって 2007 年に樹立された (Takahashi K et al., Cell, 131, 861-872, 2007; Yu J et al., Science, 318, 1917-1920, 2007)。ES 細胞とは異なり、iPS 細胞は生命の萌芽である胚を破壊する必要がないことから、再生医療への応用や薬物スクリーニング用細胞の作製などに利用できる多能性幹細胞として大きく期待されている。一方で、iPS 細胞はその作製時にレトロウイルスベクターによる遺伝子導入が必要なことから、癌化 (形質転換) といった問題も指摘されている。したがって、今後は癌化 (形質転換) しにくい安全な iPS 細胞を作製する技術を開発することが再生医療への応用には必須である。また、ヒト ES 細胞が樹立されてから約 10 年経つが未だに再生医療へは応用されていない。この原因は倫理的な問題もあるが、目的の細胞へ効率良く分化させる技術の開発が十分でないことも挙げられる。分化誘導技術が不十分であれば、仮に安全な iPS 細胞が作製されたとしても、それを医療や薬物スクリーニングに活かさない可能性も考えられる。したがって、iPS 細胞を人類の健康や福祉に役立てるためには、安全な iPS 細胞を作製する技術の開発と iPS 細胞の効率良い分化誘導技術の開発の両方が強く求められている。

2. 研究の目的

本研究課題では、アデノウイルスベクターを用いた、より安全な iPS 細胞の作製技術の開発およびアデノウイルスベクターによる iPS 細胞の高効率分化誘導法の開発を目指す。アデノウイルスベクターは高効率かつ一過性に外来遺伝子を発現させることができるベクター系であり、遺伝子導入された細胞が癌化する危険性はレトロウイルスベクターと比較し極めて小さいと考えられる。

ES 細胞を目的の細胞に分化させる場合、胚葉体 (EB; embryoid body) を形成させ、その後目的の細胞分化に合致した液性因子を作用させるといった手法がとられてきた。しかしながら、この方法では分化効率が十分ではなく、再生医療へ応用するための十分量の治療用細胞は得られない。分化効率を増加させるため、細胞分化に重要なマスター遺伝子を ES 細胞や iPS 細胞に導入する手法が考えられるが、これまでは ES 細胞や iPS 細胞に効率良く遺伝子導入する技術がほとんど開発されてこなかったため、遺伝子導入による細胞分化制御は困難であった。本研究課題

では、iPS 細胞を目的の細胞 (骨芽細胞、血液細胞、肝細胞など) に分化させる場合においても、ファイバー領域を遺伝子工学的に改良した改良型アデノウイルスベクターを用いることにより従来の手法と比較しより効率良く目的の細胞を作製できるものと期待される。

3. 研究の方法

(1)アデノウイルスベクターを用いたヒト iPS 細胞の作製

アデノウイルスベクターを用いて 4 種の転写因子 (Oct-3/4, Klf4, Sox2, c-myc) あるいは 3 種の転写因子 (Oct-3/4, Klf4, Sox2) の cDNA を導入することによりヒト iPS 細胞を作製し、作製された細胞の未分化性および多能性を各種マーカーの発現確認やテラトマ作製などにより評価する。また、対照として、汎用されているレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを用いた iPS 細胞の作製も行う。

(2)体細胞および iPS 細胞への遺伝子導入に最適なアデノウイルスベクターの確立

ヒト線維芽細胞、ヒト iPS 細胞、および iPS 細胞由来胚様体に対し、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子あるいはホタルルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子を発現可能な種々の改良型アデノウイルスベクターを作用させ、これらの細胞への遺伝子導入に最適なアデノウイルスベクターを決定する。

(3)アデノウイルスベクターを用いた iPS 細胞の分化誘導

上記 (2) で最適化されたアデノウイルスベクターを用いて、血液前駆細胞・脂肪細胞・骨芽細胞の分化に重要な遺伝子を導入し、液性因子のみを用いた従来の分化誘導法と比較し誘導効率の向上が得られるかどうかを評価する。

4. 研究成果

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよびアデノウイルスベクターの 3 種類のベクターを用いて、ヒト iPS 細胞の作製を試みた。その結果、レンチウイルスベクターを利用した場合の作製効率が最も高く、その作製効率は各ベクターの遺伝子導入効率を反映しているものと推測された。特に、アデノウイルスベクターを利用した場合には、遺伝子発現を維持する為の改良が必要であることが示唆された。次に、マウス iPS 細胞から血液前駆細胞・脂肪細胞・骨芽細胞への高効率分化誘導を試みた。CA プロモーターを有するアデノウイルスベクターを用いて HoxB4 遺伝子、PPAR γ 遺伝子、Runx2 遺伝子

を導入したところ、従来の液性因子のみを用いる分化誘導法よりも効率良く血液前駆細胞、脂肪細胞、骨芽細胞に分化することが明らかとなり、さらに得られた細胞は各々機能的にも最終分化した細胞であることが確認された。これらの結果から、我々のアデノウイルスベクターによる遺伝子導入システムは、iPS 細胞を含む幹細胞の効率的な分化誘導に有用であることが示された。

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 8 件)

- 1) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, **19**, 400-407 (2011)
- 2) Yamaguchi T., Kawabata K., Kouyama E., Ishii K.J., Katayama K., Suzuki T., Kurachi S., Sakurai F., Akira S., Mizuguchi H. Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 17286-17291 (2010)
- 3) Kawabata K., Tashiro K., Mizuguchi H. Differentiation of functional cells from iPS cells by efficient gene transfer. *Yakugaku Zasshi.*, **130**, 1527-1534 (2010)
- 4) Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram.*, **12**, 501-507 (2010)
- 5) Tashiro K., Inamura M., Kawabata K., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells*, **27**, 102-1811 (2009)
- 6) Tashiro K., Kondo A., Kawabata K., Sakurai H., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 127-132 (2009)
- 7) Sakurai H., Tashiro K., Kawabata K., Yamaguchi T., Sakurai F., Nakagawa S., Mizuguchi H. Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune responses. *J. Immunol.*, **180**, 4931-4938 (2008)
- 8) Tashiro K., Kawabata K., Sakurai H., Kurachi S., Sakurai F., Yamanishi K., Mizuguchi H. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J. Gene Med.*, **10**, 498-507 (2008)

[学会発表] (計 9 件)

- 1) 川端健二、水口裕之、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日 (招待講演)
- 2) 野中昭希、田代克久、山口朋子、西川恵三、水口裕之、川端健二; 生体内 VEGF 過剰発現による造血幹細胞の動員効果、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日
- 3) 田代克久、大森美幸、櫻井文教、山口朋子、西川恵三、川端健二、水口裕之、HoxB4 遺伝子の一過性発現によるマウス ES/iPS 細胞から血液細胞への分化誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日
- 4) 山口朋子、番匠谷研吾、田代克久、大森美幸、田中智之、西川恵三、水口裕之、川端健二、iPS 細胞からマスト細胞への分化誘導法の確立、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日
- 5) Katsuhisa Tashiro, Miyuki Omori, Tomoko Yamaguchi, , Keizo Nishikawa, Fuminori Sakurai, Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi, Induction of hematopoietic differentiation

from mouse embryonic and induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、2010 年 12 月 7-10 日

- 6) 大森美幸、田代克久、形山和史、櫻井文教、高木智、川端健二、水口裕之、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入法を用いたマウス iPS 細胞から造血幹細胞・血液前駆細胞への分化誘導、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸、2010 年 12 月 7-10 日
- 7) 川端健二、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の高効率分化誘導法、遺伝子デリバリー研究会第 10 回夏期セミナー、大津、2010 年 9 月 2 日
- 8) 川端健二、田代克久、水口裕之、iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、日本薬学会第 130 年会シンポジウム、岡山、2010 年 3 月 28-30 日 (招待講演)
- 9) 川端健二、田代克久、水口裕之、アデノウイルスベクターを用いた iPS 細胞への遺伝子導入の最適化と分化誘導、第 82 回日本生化学会大会シンポジウム、神戸、2009 年 10 月 21-24 日 (招待講演)

〔図書〕 (計 1 件)

Kawabata K., Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. Liver Stem Cells: Methods and Protocols, Humana Press, USA (part of the Springer publishing group)., in press.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：幹細胞から肝細胞への分化誘導方法
発明者：水口裕之、川端健二、古江美保、稲村充

権利者：ヒューマンサイエンス振興財団
種類：特許
番号：特願 2010-121282
取得年月日：2010 年 5 月 27 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.nibio.go.jp/Proj3HP/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 (川端健二)

研究者番号：50356234

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：