

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 26 日現在

機関番号：92101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010 年度～2011 年度  
 課題番号：22700501  
 研究課題名（和文）  
 時限型発現ベクターを用いた iPS 細胞から神経細胞への高効率分化誘導と増殖の制御  
 研究課題名（英文）  
 Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells by temperature-sensitive Sendai virus vectors  
 研究代表者  
 佐伯 晃一（SAEKI KOICHI）  
 ディナベック株式会社・技術開発室・研究員  
 研究者番号：40360052

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、センダイウイルス（SeV）ベクターを用いて誘導した iPS 細胞に、時限型 SeV ベクターを用いて複数ベクターの連続的感染が可能なことを確認した。さらに、神経細胞分化誘導に関わる遺伝子を搭載した SeV ベクターを感染させることで、ドーパミン産生神経細胞の分化誘導効率を上昇させることに成功した。SeV ベクターは分化誘導用のツールとしても有効であることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Sendai virus (SeV) vectors can efficiently introduce foreign genes without genomic insertion of transgenes into various organs and are expected to be clinically applicable. We improved the SeV vectors by introducing temperature-sensitive mutations into the SeV backbone so that the vectors could be easily removed at nonpermissive temperatures. We obtained dopamine-producing neurons by geneX expression in induced pluripotent stem cells (iPSCs). These vectors enabled the efficient generation of differentiated cells from iPSCs.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医学、細胞・組織、発生・分化、バイオテクノロジー、脳神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

細胞質増幅型のRNAウイルスであるSeV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特徴を有する優れたベクターである。研究代表者らはこのSeVベクターに*OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC*を搭載することで、ヒトの成人皮膚細胞および小児包皮細胞（BJ細胞）より、高効率でiPS細胞を誘導することに成功した。2005年より研究代表者は霊長類のES細胞を用いて中胚葉の分化誘導を開始しており、分化誘導における転写因子発現調節、および一般的な細胞と比べて効率の悪い多能性幹細胞への遺伝子導入技術が求められていることを認識していた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らはヒトの成人皮膚細胞およびBJ細胞よりセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いて染色体への遺伝子挿入のないiPS細胞の誘導に成功している。本研究ではこのiPS細胞にSeVベクターおよび時限型等（細胞質から除去可能な一過的発現が可能な一連のSeVベクター）のSeVベクターを用いて神経細胞の分化誘導を行う。特に機能的に高度に分化したドーパミン産生神経細胞の分化誘導方法の確立および増殖の制御を行う。

## 3. 研究の方法

SeVゲノムRNAには3'端から順にヌクレオカプシドタンパク質（N）、RNAポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化タンパク質（P）、ウイルス粒子構造を内部から維持するマトリックスタンパク質（M）、宿主細胞への侵入に関わる膜融合タンパク質（F）、結合に関わる赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ（HN）、RNAポリメラーゼの大サブユニットである巨大（ラージ）タンパク質（L）等の構造タンパク質が並んでいる。それぞれ遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し、単独のmRNAとして転写され、それぞれ一個のタンパク質が翻訳される。標的細胞に感染したF欠失型SeVベクターはF遺伝子を欠損しているため、細胞質での転写翻訳は進行するが二次感染能が無く、高い遺伝子導入効率と高い遺伝子発現能に加え、高い安全性を有している。研究代表者らのグループはこのSeVベクターに様々な変異を加えることで、温度変化によって遺伝子発現を制御可能な複数のSeVベクターを開発している。これらの温度感受性SeVベクターの一例としては、35度では遺伝子発現が確認できるが、37度では発現消失するというベクターである。この温度感受性SeVベクターにGFP（緑色蛍光タンパク）およびBFP（青色蛍光タンパク）を搭載し、連

続的な感染試験を行った。また、神経細胞への分化に関わる分子をSeVベクターに搭載し、ドーパミン産生神経細胞への分化誘導をbeta-III tubulin (TUBB3) と tyrosine hydroxylase (TH) によって確認した。さらに、マウスでの移植試験用にマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) より iPS 細胞の樹立を行った。

## 4. 研究成果

温度感受性SeVベクターによりGFPを発現したBJ細胞において、GFP消失後にBFPを搭載したSeVベクター感染によるBFPの発現を確認した。この試験結果は温度感受性ベクターを用いることにより、連続的に複数の遺伝子発現が可能であることを示している。また、iPS細胞にこれらの蛍光タンパク発現SeVベクターを感染させることで、90%以上という高効率な感染性を確認した。カチオン性脂質（一般的な遺伝子導入試薬）を用いたプラスミド遺伝子導入やレンチウイルスベクターなどではiPS細胞に対する遺伝子導入効率が悪いが、SeVベクターはこの点においても優れたベクターである。神経細胞への分化誘導に関与する遺伝子Xを搭載したSeVベクターを感染させたiPS細胞では未感染のiPS細胞に比べてTH陽性率の高いドーパミン産生神経細胞の誘導に成功した。この試験結果はSeVベクターが分化誘導においても、重要な分化誘導促進ツールとして機能することを示している。マウスを用いた機能評価試験を行うためにC57BL/6Nマウス由来のMEFより温度感受性SeVベクターを用いてiPS細胞の樹立を行った。ヒトと同様、簡便にiPS細胞が誘導され、得られたiPS細胞のSeVゲノムは数回の継代で消失した。これらのiPS細胞をC57BL/6Nマウスの皮下に移植したところ、1ヶ月程度でテラトーマが確認され、三胚葉へ分化していることを確認した。このように温度感受性SeVベクターが本研究の目的達成手段として相応しいものであることが確認された。現在、より機動的かつ短時間の発現制御が可能な実用的な時限型ベクターの開発を進めている。

## 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2件）

- ① Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. Proc Natl Acad Sci U S A. 108,

14234-14239, 2011 (査読有り)  
DOI: 10.1073/pnas.1103509108

- ② Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A. Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes, and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. (Epub 2012 Mar 2.) Cell Reprogram. 14, 171-185, 2012 (査読有り) DOI: 10.1089/cell.2011.0064.

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① Saeki K, Nakamura N, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, A Feeder-free and Serum-free Production of Multi-Functional Mature Hepatocytes with Electron Microscopically Valid Morphologies: Towards an Establishment of the Global Standard for Human ES/iPS-based Drug Discovery Tools. ISSCR 9th Annual Meeting, (2011/6/15-18) Toronto, Canada
- ② Saeki K, Nishio M, Yuo A, Saeki K, Hasegawa M, Endothel-Mediated Vascular Smooth Muscle Growth Suppression is Deteriorated by Senescence-Associated Degeneration via an Induction of Gene X: Toward Establishment of Innovative Therapeutics for Angiostenosis. 6th Annual Frontiers of Clinical Investigation Symposium, (2011/10/13-15) San Diego, USA
- ③ Saeki K, Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A, A Novel System for the Evaluation of Vascular Endothel-Mediated Smooth Muscle Growth Inhibition: Towards Development of Novel Therapeutics for Arteriosclerosis. BIT's 4th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2011, (2011/11/11-13) Beijing, China

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐伯 晃一 (SAEKI KOICHI)  
ダイナベック株式会社・技術開発室・研究員

研究者番号：40360052