

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791649

研究課題名(和文)膀胱機能再生を目指すiPS細胞由来細胞と細胞シート工学に関する基盤研究

研究課題名(英文)Basic research for voiding dysfunction using iPS cells

研究代表者

佐々木 克己(SASAKI, KATSUMI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80467745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト、マウスiPS細胞に対して、レチノイン酸を添加し、平滑筋細胞への分化誘導を行った。これらの分化誘導された細胞を免疫染色を行い、平滑筋細胞へ分化されたことを確認した。さらに、iPS細胞から大量、かつ純度の高い尿路平滑筋細胞の作成を目指すため、SGEプラスミド(岡山大学特許取得)を用いて、平滑筋分化誘導を促す遺伝子を強力に発現させるための予備実験を行った。マーカー遺伝子GFPを用いて、プラスミド-SGE-GFPを作成、これを用いてiPS細胞にGFPを強力に発現させるための実験系を確立した。また、異なるSGEシステムを用いて、同様の実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Human or mouse iPS cells were cultured with retinoic acid and induced to smooth muscle cells. Immunohistochemical staining was performed to confirm the smooth muscle differentiation. Besides, preliminary experiments to establish efficient induction systems from iPS cells to the smooth muscle cells were performed. GFP (marker gene) was integrated to the plural SGE-plasmid system (Okayama Univ. original license). The hyper-GFP gene expression systems to iPS cells were established using these SEG-GFP-plasmid systems.

研究分野：排尿障害

キーワード：iPS細胞 平滑筋細胞 SGEプラスミド

1. 研究開始当初の背景

排尿機能障害は QOL を大きく低下させ、さらに膀胱収縮力の低下を伴うものは、尿路感染症などの 2 次的疾患も誘発する。このような病態に対しては、自己導尿や尿道留置カテーテル、膀胱瘻などが選択されるが、通院や感染、医療コストなど種々の問題をかかえ、理想的な治療法とは言い難い。近年、さまざまな臓器をターゲットとして再生医療研究が精力的にすすめられており、膀胱においても、種々の方法を用いた膀胱再生基礎研究が報告されているが、まだ実用化されたものはない。近年、人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞の作製方法が確立され、iPS 細胞を用いることにより、これまで困難であった膀胱平滑筋や尿路上皮再生を目的とした、膀胱収縮力低下による神経因性排尿障害に対する細胞治療が可能になると考え、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

近年、排尿機能障害が生活の質 (QOL) を大きく低下させることがクローズアップされている。排尿障害は幅広い病態を含むが、そのうち、膀胱収縮力低下に由来し、多量の残尿を伴う症例の原因は様々 (脊髄疾患、糖尿病など) であり、QOL の低下とともに、尿路感染症、腎機能低下など他疾患も誘発する。このような病態に対しては、自己導尿や尿道留置カテーテル、膀胱瘻などが選択されるが、通院や感染、医療コストなど種々の問題をかかえ、理想的な治療法とは言い難い。そこで、2006 年に京都大学、山中伸弥教授らによって発見、同定された多分化能を有する人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞に注目し、本申請課題において、臨床応用を目指す観点から、傷害を受けた膀胱組織へ iPS 細胞またはそれに派生する細胞を直接移植する研究を当初立案した。その後、臨床応用を目指す観点からは、iPS 細胞から分化誘導して得られる細胞の量、純度ともに向上させる必要があると考え、iPS 細胞から効率的、かつ多量に移植のための細胞を分化誘導するための基盤的研究を立案した。具体的には、iPS 細胞から平滑筋細胞に分化するための遺伝子発現をより高率に行うための実験を立案した。

3. 研究の方法

1) マウスおよびヒトの種々の細胞から iPS 細胞を作製・調整する。iPS 細胞作製のための、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターを用いる以下の実験系をまず遂行する。

ラット Slc7a1 遺伝子を発現するレンチウイルスの作製

mSlc7a1 発現用レンチウイルスベクター (Addgene 社) と Virapower Packaging Mix

(Invitrogen 社) を HEK293FT 細胞にトランスフェクションし、細胞の上清を回収、当該レンチウイルスを精製する。

レトロウイルス用の遺伝子プラスミドの増幅

レトロウイルス用発現ベクター pMXs に OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC 遺伝子をクローニングしたプラスミド (Addgene 社) 4 種類を大腸菌へ導入して、増幅させる。

初期化因子を発現するレトロウイルスベクターの作製、ヒトまたはラット由来細胞への感染

上記 pMXs プラスミドをそれぞれ PLAT-E パッケージング細胞にトランスフェクションする。細胞の上清を回収、精製して初期化因子を発現する 4 種類のレトロウイルスを得る。ウイルス液を等量ずつ混合して、ヒトまたはラット由来細胞に加え、形質転換をはかり、iPS 前駆細胞を得る。

iPS 細胞コロニーの単離

ヒトまたはラット由来細胞をフィダー細胞である SNL 細胞上にまきなおして、iPS 細胞のコロニーが出来るまで培養し、単離する。

2) 上記のウイルスベクターを用いた iPS 細胞の作製に加え、山中 4 因子をコードしたプラスミドベクター (Reprogramming Minicircle DNA, Ready-to-Transfect, システムバイオサイエンス SBI, SRM100PA-1) による iPS 細胞樹立系を確立する。

3) 我々が独自開発した遺伝子強力発現システム (SGE プラスミド) を、上記 a) および b) の iPS 細胞誘導系に応用するための遺伝子コンストラクトを作製し、実際に iPS 細胞を誘導することにより、当該遺伝子発現システムの再生・細胞治療への有用性を検証する。

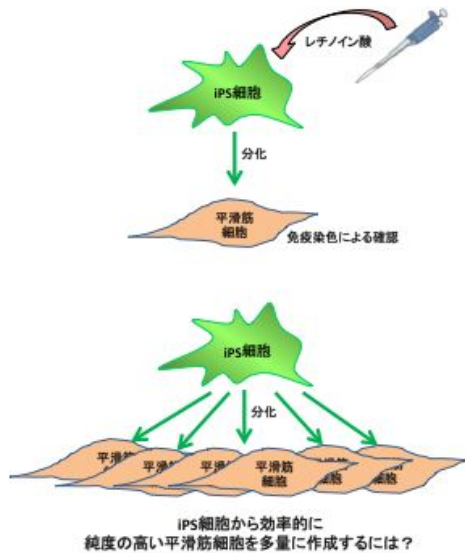
4) 上記 1) ~ 3) によって得られた iPS 細胞にレチノイン酸を導入し、尿路平滑筋細胞などの機能細胞の作成をはかる。これらの細胞への分化は、それぞれの細胞に固有の細胞表面マーカー (SMA, Calponin1, MY-HC, Desmin) の染色により検証を行う。

4. 研究成果

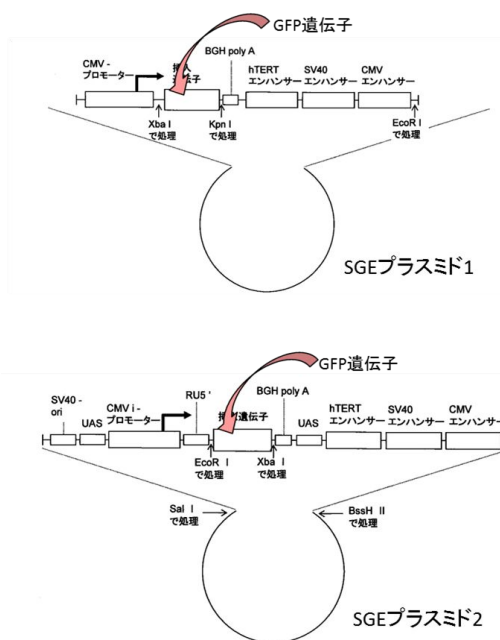
当該申請研究は、iPS 細胞から分化させた細胞やそれらを用いて作成した組織を膀胱組織に移植し、膀胱機能障害に対する新規治療法を開発するための基板となる実験を行うことを目的とした。

平成 24 年、25 年度は、ヒト、マウス iPS 細胞から平滑筋細胞への分化誘導実験を試みた。具体的には、iPS 細胞に対して、レチノイン酸を添加し、平滑筋細胞への分化誘導を行った。これらの分化誘導された細胞を SMA, Calponin1, MY-HC, Desmin による免疫染色を行い、実際に平滑筋細胞へ分化されたことを確認した。このなかで、臨床応用を目

指す観点から、細胞やそれに由来する組織を効率的に移植するためには、上記 iPS 細胞から分化誘導して得られた細胞の量や純度をさらに向上させる必要があると考えた。



そこで平成26年度は、iPS細胞から大量、かつ純度の高い尿路平滑筋細胞の作成を目指すため、Super Gene Expression (SGE) プラセミド(岡山大学特許取得)を用いて、平滑筋分化誘導を促す遺伝子を強力に発現させるための予備実験を行った。具体的には、マーカー遺伝子として GFP を用いて、プラスミド - SGE - GFP を作成、これを用いて iPS 細胞に GFP を強力に発現させるための実験系を確立した。また、異なる SGE システムを用いて、同様に iPS 細胞に GFP を強力に発現させるための実験系を確立した。



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 1件)

1. Kumon H, Sasaki K, Ariyoshi Y, Sadahira T, Ebara S, Hiraki T, Kanazawa S, Yanai H, Watanabe M, Nasu Y. Ad-REIC Gene Therapy: Promising Results in a Patient with Metastatic CRPC Following Chemotherapy. Clin Med Insights Oncol. 2015 Mar 23;9:31-8. doi: 10.4137/CMO.S23252 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

1. Ariyoshi Y, Hirata T, Watanabe M, Tanimoto R, Sasaki K, Kaku H, Ebara S, Watanabe T, Yanai H, Hiraki T, Kanazawa S, Nasu Y, Kumon H. A case report showing promising results with Ad-Reic leading the future to a new cancer vaccine. The 20th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy 2014. Aug. 7 2014. Jikei University School of Medicine (Daigaku Ichigou-Kan), Tokyo.

〔図書〕(計 0件)

〔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 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 克己 (Sasaki Katsumi)
岡山大学病院 泌尿器科 助教
研究者番号：80467745

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：