

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700474

研究課題名(和文)自動除去ベクターを用いた遺伝子導入による高効率かつ安全な分化誘導法の検討

研究課題名(英文) Establishment of safe and efficient differentiation system using automatic removal vector

研究代表者

西村 健(Nishimura, Ken)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80500610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞等を分化誘導して分化組織を得る際に、残存未分化細胞によるガン化等のリスクを減らして安全性を向上させた系を構築することを試みた。我々独自の遺伝子導入系であるSeVdpベクターに、神経細胞特異的miRNAの標的配列を搭載し、そのベクターを感染させた多能性幹細胞を神経細胞へ分化誘導した。その結果、分化していない残存未分化細胞にはベクターが持続感染し、分化細胞からはベクターが自動的に除去されていた。その後、ベクターに搭載した自殺遺伝子によって分化細胞の選択を試みたが、未分化細胞のみならず分化細胞も死滅してしまった。今後は薬剤や分化誘導方法を検討して未分化細胞の選択的除去を可能にしたい。

研究成果の概要(英文)：When we induce differentiated cells from pluripotent stem cells, the risks of tumor formation by remained undifferentiated cells must be concerned. To reduce such a risk, we tried to establish a system for elimination of undifferentiated cells in the differentiated tissue using our SeVdp vector system. The SeVdp vector which has the target sequence of neuron-specific miRNA was infected to mouse iPSC cells, and then they were differentiated to neuron. As a result, the vector were automatically removed from neuron while it was persistently infected in undifferentiated cells. But when we tried to select differentiated cells using negative selection gene from the vector, not only undifferentiated cells but also differentiated cells were killed by the treatment. We plan to investigate other method of differentiation and negative selection to selectively eliminate the undifferentiated cells.

研究分野：幹細胞工学、幹細胞生物学

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：分化 多能性幹細胞 残存未分化細胞 SeVdpベクター miRNA

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を様々な組織に分化誘導することが試みられているが、高い分化効率が実現できない場合が多い。分化効率が低い組織を移植等に用いた場合、残存未分化細胞による腫瘍形成等のリスクが高くなる。そのため、iPS 細胞等を用いた再生医療の実用化のためには、効率良く安全な分化組織を得る方法を確立することが必要である。

私はこれまでに、幹細胞工学に非常に有用な特長を多く持つ、「細胞質持続発現型 RNA ベクター (SeVdp ベクター)」の開発研究を行ってきた。このベクターは RNA ウイルスであるセンダイウイルスの持続感染株 Cl.151 株から開発したものであり、この Cl.151 株は野生型センダイウイルスとは異なり、細胞質内で長期間にわたり持続感染するという特長を持つ (K. Nishimura, et al. 2007 *J. Biol. Chem.*)。このユニークな特長を持つ Cl.151 株の複数のウイルス遺伝子を外来遺伝子に置き換えることによって開発した SeVdp ベクターは、細胞障害無く細胞質内で持続感染し、さらにセンダイウイルスの L 遺伝子に対する siRNA で持続感染細胞を処理することによってベクターの転写複製を抑制し、最終的にベクターを人為的に除去することが可能である (K. Nishimura, et al. 2011 *J. Biol. Chem.*)。

このようなベクターの性質を利用し、Oct4、Sox2、Klf4 および c-myc の 4 つの初期化誘導遺伝子を同一のゲノムに搭載した SeVdp ベクターを作製し、iPS 細胞誘導に用いた結果、従来の誘導方法よりも効率良く、しかもベクターゲノムを含まない iPS 細胞が誘導できることを明らかにした。また、数時間感染させるのみで造血幹細胞に非常に効率良く (>90%) 遺伝子導入が可能であり、その後の分化にも影響を与えないという知見も得ている (K. Nishimura, et al. 2011 *J. Biol. Chem.*)。さらに、より簡便にベクターを除去できるようにするため、ES 細胞特異的な miRNA である miR-302a の標的配列を L 遺伝子の 3'-UTR に挿入したベクターを用いて iPS 細胞を誘導したところ、初期化に伴って発現した ES 細胞特異的な miR-302a が L 遺伝子の発現を抑制

し、継代のみで自動的にベクターが除去された iPS 細胞を得ることに成功した。

2. 研究の目的

SeVdp ベクターの持つ、幹細胞の分化能に影響を与えずに持続的に効率良く遺伝子を導入することが可能である、という特長を生かして、安全性の高い分化組織を得るために、残存未分化細胞を除去できる系を構築する。具体的には、分化組織特異的に発現している miRNA の標的配列をベクターの L 遺伝子の 3'-UTR に挿入することによって、分化細胞からはベクターゲノムが自動的に除去されるようにする。それに対し、残存未分化細胞にはベクターが持続感染することから、ベクターに negative 選択用遺伝子をあらかじめ挿入しておくことによって、ベクターが感染している未分化細胞を negative 選択で死滅させることを可能にする。

このように SeVdp ベクターの特長を生かして、残存未分化細胞による腫瘍原性等のリスクが少ない分化組織誘導系を確立する。そしてそれにより、実用的な分化組織を用いた再生医療の実現を目指す。

3. 研究の方法

- (1) negative 選択のための P450 遺伝子と、positive 選択のための Blastocidin 耐性遺伝子を搭載した SeVdp ベクターを構築する。
- (2) (1) で構築した positive-negative 選択ベクターをマウス ES 細胞もしくは iPS 細胞に感染させ、positive 選択による非感染細胞の除去、negative 選択による感染細胞の除去、そして分化能への影響の有無を確認する。
- (3) 神経細胞特異的 miRNA である miR-124 の標的配列を、(2) のベクターの L 遺伝子 3'-UTR に挿入し、そのベクターをマウス ES 細胞もしくは iPS 細胞に感染させた後、positive 選択によって、すべての ES 細胞にベクターを感染させる。
- (4) (3) の細胞を培養条件変換によって神経細胞に分化誘導した際に、誘導された神経

細胞からベクターが自動除去され、残存未分化細胞にはベクターが感染していることを確認する。

(5)negative 選択によって、(4)の細胞集団から未分化細胞を除去できるか確認する。

4. 研究成果

(1)神経分化への SeVdp ベクター感染の影響

プラストサイジン耐性遺伝子と P450 遺伝子を同時に発現する SeVdp ベクターを用意し、それをマウス iPS 細胞に感染させた。ベクター感染細胞を選択するためにプラストサイジンを培地に加えて positive 選択を行ったところ、ベクター非感染細胞の除去に成功した。また、ベクター感染によるマウス iPS 細胞の生育阻害等は観察されなかった。このようにして用意した、すべての細胞にベクターが感染している細胞群に対して、次に、P450 遺伝子の基質である cyclophosphamide を培地に加え、negative 選択の可否を検討した。その結果、数日ですべての細胞が死滅したことから、1つの SeVdp ベクターを用いて、positive-negative 選択が可能であることを明らかにした。

次に、上記の SeVdp ベクターを持続感染させたマウス iPS 細胞の神経分化を試みた。胚葉体形成を経て神経細胞への分化を誘導したところ、胚葉体形成から 2 週間ほどすると、ベクター感染、非感染の iPS 細胞ともに、神経分化が観察された。以上の結果から、マウス iPS 細胞からの神経細胞の誘導を、SeVdp ベクターは阻害しないということを明らかにした。

(2)ベクター自動除去の確認と分化細胞の選択

神経細胞特異的 miRNA である miR-124 の標的配列を L 遺伝子の 3'-UTR に挿入し、さらにプラストサイジン耐性遺伝子と P450 遺伝子、EGFP を発現する SeVdp ベクターを構築した。

次にこのベクターをマウス iPS 細胞に持続感染させ、(1)と同様に神経細胞に分化誘導した。その結果、EGFP の蛍光観察から、miR-124 標的配列挿入ベクターの場合、神経

細胞には持続感染していないことが確認された。標的配列を挿入していないベクターを用いた場合は、分化誘導後もベクターが持続感染していたことから、神経細胞特異的な miRNA の機能によって、分化細胞からベクターが自動除去された可能性が高いことが確認された。

さらに、この分化誘導組織からの残存未分化細胞の除去を、cyclophosphamide を培地に加えることによって試みた。その結果、未分化細胞が死滅して培地中に浮遊したが、分化した神経細胞も浮遊してしまい、分化細胞のみを選択することはできなかった。その理由としては、神経細胞が未分化細胞の塊である胚葉体から派生してきたため、胚葉体が P450-cyclophosphamide によって死滅した影響を、神経細胞も受けてしまい、そのために両方の細胞が死滅してしまったと考えられた。

以上の研究結果から、我々独自の SeVdp ベクターの特長を生かして、iPS 細胞等から分化誘導を行った際に、未分化細胞にはベクターが持続感染するのに対し、分化細胞からはベクターを自動除去させることが可能であることが明らかになった。今後は、negative 選択を成功させるために、薬剤の選択や分化誘導方法の再検討を行い、このような分化細胞選択系を確立し、未分化細胞を含まない、安全な分化組織を容易に得ることができる系の構築したいと考えている。

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5件)

A. Fukuda, M. Shimada, T. Nakadai, K. Nishimura, K. Hisatake: Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein R Cooperates with Mediator to Facilitate Transcription Reinitiation on the c-Fos Gene. *PLOS ONE*, Vol. 8, doi: 10.1371/journal.pone.0072496, 2013、査読有

Y. Shiromoto, S. Kuramochi-Miyagawa, A. Daiba, S. Chuma, A. Katanaya, A.

Katsumata, K. Nishimura, M. Ohtaka, M. Nakanishi, T. Nakamura, K. Yoshinaga, N. Asada, S. Nakamura, T. Yasunaga, K. Kojima-Kita, D. Itou, T. Kimura, T. Nakano: GPAT2, a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells. *RNA*, Vol. 19, 803-810, 2013、査読有

H. Wakao, K. Yoshikiyo, U. Koshimizu, T. Furukawa, K. Enomoto, T. Matsunaga, T. Tanaka, Y. Yasutomi, T. Yamada, H. Minakami, J. Tanaka, A. Oda, T. Sasaki, R. Wakao, O. Lantz, T. Udagawa, Y. Sekiya, K. Higuchi, N. Harada, K. Nishimura, M. Ohtaka, M. Nakanishi, H. Fujita: Expansion of Functional Human Mucosal-Associated Invariant T Cells via Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Cell Stem Cells*, Vol. 12, 546-558, 2013、査読有

T. Nishimura, S. Kaneko, A. Kawana-Tachikawa, Y. Tajima, H. Goto, D. Zhu, K. Nakayama-Hosoya, S. Iriguchi, Y. Uemura, T. Shimizu, N. Takayama, D. Yamada, K. Nishimura, M. Ohtaka, N. Watanabe, S. Takahashi, A. Iwamoto, H. Koseki, M. Nakanishi, K. Eto, H. Nakauchi: Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cells*, Vol. 12, 114-126, 2013、査読有

H. Tateno, A. Matsushima, K. Hiemori, Y. Onuma, Y. Ito, K. Hasehira, K. Nishimura, M. Ohtaka, S. Takayasu, M. Nakanishi, Y. Ikehara, M. Nakanishi, K. Ohnuma, T. Chan, M. Toyoda, H. Akutsu, A. Umezawa, M. Asashima, J. Hirabayashi: Podocalyxin is a Glycoprotein Ligand of the Human Pluripotent Stem Cell-Specific Probe rBC2LCN. *Stem Cells Trans. Med.*, Vol. 2, 265-273, 2013、査読有

[学会発表](計7件)

西村健：初期化が途中で停止した細胞を用いた iPS 細胞誘導過程の解析、第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 5 日、京都国際会議場、京都

西村健：Klf4 遺伝子発現量調節による初期化が途中で停止した細胞の誘導、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際展示場、神戸

K. Nishimura : Manipulation of Klf4

expression produces snap shots of iPSC induction、CSHA/ISSCR Joint Meeting on Stem Cells in Science and Medicine、2013 年 10 月 16 日、Suzhou Dushu Lake Conference Center、Suzhou、China

K. Nishimura : Taking snap shots during iPSC production by SeVdp vectors、International Society of Stem Cell Research 11th Annual Meeting、2013 年 6 月 14 日、The Boston Convention Center、Boston、USA

西村健：SeVdp ベクターを用いた iPS 細胞の品質調節メカニズムの解析、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜、横浜

K. Nishimura: Application of Cytoplasmic RNA vector Developed from Noncytopathic RNA Viruses to Stem Cell Engineering、The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-Asia Study、2013 年 1 月 9 日、ホテルレオパレス福岡、福岡

K. Nishimura : QUALITY CONTROL OF IPS CELLS BY UNIQUE GENE TRANSFER SYSTEM、International Society of Stem Cell Research 10th Annual Meeting、2012 年 6 月 14 日、パシフィコ横浜、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 健 (NISHIMURA KEN)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：80500610

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：