

論文内容要旨

センダイウイルスを用いたインテグレーションフリー・
フィーダー細胞フリー・無血清培養系での末梢血単核球
由来人工多能性幹細胞の樹立に関する研究

主指導教員：岡本 哲治 教授

(応用生命科学部門分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：兼松 隆 教授

(基礎生命科学部門細胞分子薬理学)

副指導教員：武知 正晃 准教授

(応用生命科学部門口腔外科学)

赤木 恵理

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

論文内容要旨

論文題目 センダイウイルスを用いたインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での末梢血単核球由来人工多能性幹細胞の樹立に関する研究

学位申請者 赤木 恵理

【目的】

一般に胚性幹細胞や人工多能性幹細胞(iPSC)は、不活化したマウス線維芽細胞などのフィーダー細胞上で血清添加培地を用いて培養・維持されている。血清やフィーダー細胞由来因子には、多くの成分不明蛋白や非蛋白が含まれており、細胞の機能維持に必要な栄養・蛋白因子要求性などをマスクおよび阻害するため、細胞の増殖・分化を制御する各種因子を正確に検討することは困難である。また、血清既知や未知の病原因子が含まれている危険性も高い。

著者の研究室の先行研究で、iPSC の増殖・分化に関わる蛋白・接着因子などを明らかにするために、成分の明らかな蛋白や脂質のみを含む hESF9 無血清培地を用いて、フィーダー細胞を用いずにヒト線維芽細胞や歯髄細胞からレトロウイルスベクター(RvV)を用いて初期化4因子を導入し、iPSC 誘導および未分化性と分化多能性の長期培養が可能であることを報告した。

一方、RvV は染色体に初期化遺伝子や RvV が残存するため腫瘍化のリスクが高いことから、宿主遺伝子への遺伝子挿入の無い誘導法を用いた無血清・無フィーダー培養系を確立することが必要不可欠である。また、疾患特異的 iPSC を樹立するためには、より少ない患者侵襲で簡便に採取可能な末梢血由来単核球(PBMC)からの iPSC 誘導法を早急に確立する必要がある。

そこで本研究では、成分の明らかな hESF9 を用いた無血清・無フィーダー培養系で、宿主遺伝子への初期化遺伝子やウイルス遺伝子挿入のないセンダイウイルスベクターを用いて、PBMC からの iPSC 誘導法および長期培養系を確立することを目指した。

【方法】

センダイウイルスベクター(SvV)として、吉田らが分離した毒性の低い持続感染変異センダイウイルス Clone151 株から、ウイルス複製能を欠失させ、同一ベクター上に初期化4遺伝子(*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*)を搭載可能な SeVdp (KOSM 302L) を用いた。健常人由来末梢血から Ficoll-Hypaque 比重遠心法を用いて PBMC を分離し、IL-2 を含む無血清培地 RD6F (RD 基礎培地に insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite および oleic acid の6因子を添加)を用いて6日間培養を行った。培養後、SeVdp (KOSM 302L) を、MOI=3 あるいは6の条件で感染させ、6 well プレート 1 well あたり 1.0×10^5 、 2.0×10^5 、 5.0×10^5 の細胞密度で細胞を播種した。細胞外マトリックス(ECM)として、laminin-E8, fibronectin, type I collagen、および gelatin を検討した。無血清培地として hESF 基礎培地に insulin, transferrin, 2-aminoethanol, 2-mercaptoethanol, sodium selenite, oleic acid (遺伝子組換えヒトアルブミン結合)、L-Ascorbic acid 2-phosphate, FGF-2 およびヘパリンを加えた hESF9 無血清培地を用いて iPSC の誘導を行った。対照細胞として、PBMC からフィーダー細胞上で血清添加培地を用いて誘導・維持した iPSC を用いた。

各 MOI 条件、細胞密度、ECM などの各条件での iPSC の誘導効率は、播種細胞あたりの alkaline phosphatase (ALP) 陽性コロニー数の比率を指標に検討した。誘導した iPSC の未分化能および分化多能性は、各種未分化マーカー遺伝子(*Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*)の発現を RT-PCR 法で、未分化蛋白(*Oct3/4*, *Nanog*, *SSEA4*, *Tra-1-81*)を蛍光免疫染色法にて検討した。また、分化多能性は、胚様体形成後、gelatin 上で 3 週間培養後に蛍光免疫染色法にて、神経系マーカー(*Nestin*, *MAP-2*)、中胚葉マーカー(α -smooth muscle actin: α -SMA)、内胚葉マーカー(α -fetoprotein: AFP)の発現を検討した。さらに、免疫不全(SCID)マウス背部皮下移植系での、iPSC の teratoma 形成能および 3 胚葉への分化能を、種々の染色法を用いて組織学的に検討した。また、iPSC の染色体解析および short tandem repeats (STR) 解析を行った。(広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認研究計画：第ヒ 58 号)

【結果】

SeVdp を用いて PBMC に初期化 4 遺伝子を導入後、約 2 週間で iPSC コロニーの出現を認めた。ALP 陽性コロニー数を指標に誘導効率を検討したところ、無血清・無フィーダー条件と血清添加及びフィーダー細胞上での培養条件のいずれの条件においても MOI=6 および細胞播種密度 1.0×10^5 /well の条件で最も高い誘導効率を示した。この条件下で各種 ECM の誘導効率に及ぼす影響を、4 名の健康人由来 PBMC で比較検討した結果、laminin-E8 では平均 0.065% (0.008%-0.16%)、fibronectin、0.013% (0%-0.06%)、type I collagen、0.027% (0%-0.078%)、gelatin、0.003% (0%-0.012%)で、laminin-E8 上で最も高い誘導効率を示した。

コロニーより pick up した iPSC は hESF9 培地を用いてフィーダー細胞を用いずに laminin-E8 上で長期間継代培養が可能であった。

iPSC は、未分化マーカー遺伝子(*Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*) および未分化マーカー蛋白(*Oct3/4*, *Nanog*, *SSEA4*, *Tra-1-81*)を発現していた。一方、SeVdp 遺伝子および蛋白の発現は認めなかった。iPSC の分化多能性を蛍光免疫染色にて解析した結果、神経系マーカー(β -III tubulin, *MAP-2*)、中胚葉マーカー(α -SMA)、および内胚葉マーカー(AFP)の発現を認めた。さらに、iPSC は SCID マウス背部皮下に teratoma を形成し 3 胚葉への分化能を有していた。STR および染色体解析の結果、iPSC は PBMC 由来で、正常 karyotype を示した。

【結論】

SeVdp を用いて、フィーダー細胞を用いることなく、成分の明らかな無血清培地を用いて健康人 PBMC から iPSC の誘導および長期継代培養に成功した。少ない侵襲で容易に細胞採取ができる PBMC から、本 SeVdp・無血清・無フィーダー培養系を用いてヒト iPSC の誘導が可能となったことから、ヒト iPSC 樹立・培養の標準化や、増殖・分化を促進・制御する各種因子の正確な検討がさらに推進されと考えられた。また、細胞採取が困難な患者や希少遺伝子疾患患者からの疾患特異的 iPSC の樹立による、疾患発症機構の解明さらには診断および治療への貢献が期待された。