



平成 23 年 8 月 2 日

各 位

会 社 名	デ ィ ナ ベ ッ ク 株 式 会 社
代 表 者 氏 名	代 表 取 締 役 社 長 長 谷 川 護
本 社 所 在 地	茨 城 県 つ く ば 市 大 久 保 6 番
問 合 せ 先	取 締 役 管 理 部 長 谷 田 洋 平
電 話 番 号	029-877-5155 (代 表)

細胞に使用痕跡を残さない遺伝子発現期間制御型ベクターの開発とそれを用いた臍帯血からの iPS 細胞の作製

ディナベック株式会社（本社：茨城県つくば市、代表取締役社長：長谷川護）は、必要な間だけ遺伝子を発現させ、最後はその遺伝子を急速に細胞から排除できる新しい細胞操作用ベクターの開発に成功しました。またこの成果は 8 月第一週の「米国科学アカデミー紀要」電子版にその応用例とともに掲載されることになりました。掲載論文には、この新しい温度感受性センダイウイルス (SeV) ベクターにより高効率でヒト iPS 細胞が作製でき、その後わずか 1-2 度の培養温度変更により細胞内の活性のあるベクターを搭載遺伝子とともに数日内に検出限界以下にすることに成功したこと、さらには財団法人先端医療振興財団先端医療センターの川真田伸グループリーダーらにより、このベクターを用いてヒト臍帯血から高効率に外来遺伝子やベクターが残存しない iPS 細胞の作製に成功したことが報告されています。

この新しい技術は、個人の移植手術の場合に問題になる拒絶反応を避けるため、組織適合抗原が合致した臍帯血由来造血幹細胞を選び、それから染色体が無傷で外来遺伝子も残存しないより安全な iPS 細胞を作製することを可能にしました。その意義は、紫外線や老化などによって遺伝子変異が起きている恐れのある皮膚細胞などではなく、若い臍帯血細胞を iPS 細胞作製に用いることを可能にしたことにあります。従って、この成果は将来の医療技術として期待されている再生医療の実現を大きく近づけるものと考えられます。今回開発された温度感受性 SeV ベクターを用いると、僅かな培養温度操作によって自由に外来遺伝子の発現期間を制御し、最後にはそれを除去すること、細胞には用いたベクターや外来遺伝子の痕跡が残らないため、分化など、より一般的な細胞操作用ベクターとしての有用性も示唆されます。

【論文名】

Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. (温度感受性センダイウイルスベクターによる外

来遺伝子フリーヒト iPS 細胞の高効率作製法)

Hiroshi Ban^{1)a}, Naoki Nishishita^{2a)}, *Noemi Fusaki¹⁾³⁾, Toshiaki Tabata¹⁾, Koichi Saeki¹⁾, Masayuki Shikamura²⁾, Nozomi Takada²⁾, Makoto Inoue¹⁾, Mamoru Hasegawa¹⁾,*Shin Kawamata²⁾, and Shin-Ichi Nishikawa²⁾

*corresponding authors, ^a equal contribution, ¹⁾ ディナベック株式会社、²⁾先端医療センター、³⁾ JST さきがけ

【当社の本研究成果の概要】

(研究の背景)

2007年に京都大学・山中伸弥教授らにより発表されたヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、ヒトの体細胞に初期化因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC) を導入することにより作製され、従来のヒト ES 細胞の胚破壊といった倫理的問題や移植抗原の問題を解決し、各個人の組織細胞から作製可能であることから、将来の再生医療や個別化医療、薬剤スクリーニング、疾患の解析研究などに非常に有用であると考えられています。従来の iPS 細胞作製法では、初期化因子の導入にレトロ/レンチウイルスベクターを用いており、染色体に外来遺伝子が組み込まれ、がん化などのおそれがありましたが、当社は、染色体を決して傷つけない細胞質増殖型 RNA ベクターであるセンダイウイルス (SeV) ベクターを使って高効率に iPS 細胞を作製することを既に報告しています (Fusaki et al., Proc. Jpn. Acad. Ser.B, 2009 年)。しかしながらベクターの除去には、樹立された iPS 細胞増殖によるベクターの希釈を待つか、SeV ベクターに感染した細胞表面に発現する HN 抗原に対する抗体を使ってスクリーニングしなければなりません。この点を改良するため私たちは次のような研究開発を行いました。

(研究の内容)

容易に除去可能なベクターを作製するため、SeV ベクターのポリメラーゼ関連遺伝子 (P, L) に温度感受性 (TS) 変異を複数導入し、その組合せによって新規に、低温 (32°C から 36°C あるいは 37°C まで) では発現するが、それ以上の高温、38~39°C では殆ど外来遺伝子を発現することが出来ない TS ベクターを作製することが出来ました。この TS ベクターに (i) c-MYC だけを搭載し、他の 3 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) は従来のベクターを使用した場合、あるいは (ii) 4 因子すべてをそれぞれ TS ベクターに搭載した場合、新生児および成人由来線維芽細胞から iPS 細胞を誘導すると、従来のベクターに比較し、37°C で培養するだけで、速やかに iPS 細胞からベクターが除去されることが明らかになりました。温度感受性の強い TS15 あるいは TS13 ベクターを使用した場合、各々の iPS 細胞を調べると、継代数 4 で 80%、継代数 10 でほぼ 100% がベクター陰性になりました。温度感受性のやや弱い TS7 ベクターが残存している iPS 細胞でも、1~2°C の温度シフト処理を 3 日から 1 週間行くと、iPS 細胞の未分化マーカーはそのまま、ベクターだけが消失していました。(ii) による方法で作製した iPS 細胞を、39°C で 5 日間処理しても、核型はすべて正常で、多分化能を示しました。またベクターが再び活性化することは

なく、細胞を長期培養してもベクターは陰性でした。

先端医療センターの川真田らのグループは、この TS ベクターを用いて、臍帯血からの iPS 細胞を樹立しました。臍帯血は、紫外線や老化による遺伝子変異の影響を受けていない唯一のヒトの細胞であり、すでに HLA(主要組織適合抗原)の型別に冷凍保存としてバンク化され、骨髄移植にも利用されている貴重な治療用細胞源です。現在臍帯血は、貴重な資源であるため、研究用と臨床用に選別されて保存されています。

今回の成果は、研究用臍帯血細胞から TS ベクターを使うことで、すでに報告された方法（レンチウイルスやエピゾーマルベクター）より遙かに効率よく iPS 細胞を作製することが可能となり、外来因子フリーの iPS 細胞コロニーを 10 個得るためには、僅か 10,000 個の細胞数でベクター量も少なく済みました(MOI=2)。これは、SeV ベクターの CD34+造血幹細胞への感染効率が非常に高いためと考えられます。このことは、限られた貴重な資源を有効に使用することが可能になることを示唆しています。臨床用に使われる臍帯血から iPS 細胞を作るためには、臍帯血提供時の同意書などの改定などが必要となりますが、今回の研究成果により種々の HLA 型別の臍帯血から、外来因子フリーの安全な HLA 型別の iPS 細胞バンクが作成できれば、将来の再生医療にとって大きなステップになることが期待されます。

本研究成果は、以下の事業・研究プロジェクトの支援を受けました。

- ・ 科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 個人型研究（さきがけ）「iPS 細胞と生命機能」領域（研究総括：西川伸一 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター グループディレクター・副センター長）における研究課題「センダイウイルスベクターを用いた安全な iPS 細胞作製と分化誘導」（研究者：房木ノエミ、研究期間：2009 年～2014 年度）
- ・ 科学技術振興機構（JST）戦略的イノベーション推進事業「細胞移植による網膜機能再生」（研究期間：2010 年～2014 年）
- ・ 科学技術戦略推進費「健康研究成果の実用化加速のための研究・開発システム関連の隘路解消を支援するプログラム」の採択課題「多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究」（研究者：川真田 伸、研究期間：2010年～2014年）
- ・ 日本学術振興会（JSPS）平成22年度 科学研究費補助金「人工細胞外マトリックスを利用した安全で効率的な臍帯血由来iPS細胞の培養法の確立」（研究者：西下直希、研究期間 2010 年～2011年）

（補足）

なお、本研究で最も除去の効率の良いTS15のc-MYCベクターは、現在販売中のCytoTune™-iPS キットに組み込まれております。

会社概要

ダイナベック株式会社

設立：2003年9月5日

資本金：20億円

代表者：代表取締役社長 長谷川 護（はせがわ まもる）

本社所在地：〒300-2611 茨城県つくば市大久保6番 テクノパーク大穂

従業員数：25名（2011年5月31日現在）

事業内容：遺伝子医薬品、抗体医薬、細胞・再生医療、バイオ製品の研究開発と販売等

URL：<http://www.dnavec.co.jp/>