OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	遺伝子導入技術を利用したES細胞等幹細胞の高効率分化誘導法の開発
Author(s)	田代, 克久
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49651
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【16】

氏名	田代克久（たしろかつひさ）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第　２２８８５　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	**遺伝子導入技術を利用したES細胞等幹細胞の高効率分化誘導法の開発**
論文審査委員	（主査） 教授　山西　弘一 （副査） 教授　八木　清仁　　教授　中川　晋作　　教授　岡部　勝

論文内容の要旨

人体を構成している細胞数は60兆個にも達し、その種類は約250になるといわれている。生体内の多くの組織や臓器では毎日膨大な数の細胞が死滅する一方で、ほぼ同数の細胞が新しく生まれている。この過程は再生とよばれており、これにより生体はほぼ一定の細胞数を維持し、組織や臓器の機能を正常に保つことができている。新しい細胞を次々と生み出しているのは幹細胞とよばれる特殊な細胞である。幹細胞が種々の細胞を枯渇させることなく供給し続けることができ

るのは、多分化能と自己複製能という二つの性質を有しているためである。この幹細胞の性質を利用し、損傷した細胞・組織を人工的に再生させ、医療へ応用することが再生医療とよばれている。再生医療への応用が期待されている幹細胞は、受精卵（胚）から樹立された胚性幹（ES）細胞や、骨髄や皮膚などの組織に存在する体性幹細胞、そして近年体細胞から樹立された人工多能性幹（iPS）細胞である。これらの幹細胞を医療へ応用するには、幹細胞を特定の細胞へ分化させる技術の確立が必須である。これまでは主に液性因子単独による分化誘導法が行われてきたが、その分化効率は十分ではない。細胞分化は種々の遺伝子の活性化（または抑制化、あるいはその両方）により誘導されるため、細胞分化に関与する遺伝子の発現量を人工的に操作することにより、細胞分化を制御できる可能性がある。そこで本研究では、アデノウイルス（Ad）ベクターを用いた各種幹細胞への高効率遺伝子導入法の確立および幹細胞から目的細胞への高効率分化誘導法の確立を試みた。

発生初期胚の胚盤胞から分離されたES細胞は、生体を構成するほぼ全ての細胞への分化能力を有しているため、再生医療への応用が期待されている。そこでマウスES細胞およびES細胞由来胚葉体（ES cell-derived embryoid body ;ES-EB）への遺伝子導入法の確立を行った。プロモーターの異なる4種類（RSV、CMV、CMV CA、EF-1α）のAdベクターを用いてマウスES細胞およびマウスES-EBへの遺伝子導入効率を検討したところ、CAプロモーターを有する従来型Adベクターを用いることによりマウスES細胞・ES-EBへ効率良く遺伝子導入できることが明らかとなった。さらに、このベクターを用いてそれぞれ脂肪細胞分化または骨芽細胞分化のマスター遺伝子であるPPARγ遺伝子、Runx2遺伝子をマウスES細胞、マウスES-EBへ導入することにより、従来の液性因子を単独で使用する分化誘導法よりも効率良く脂肪細胞、骨芽細胞へ分化することが示され、マウスES細胞から脂肪細胞・骨芽細胞への高効率分化誘導に成功した。これらのことから、Adベクターによるマウス ES細胞・ES-EBへの遺伝子導入はES細胞を用いた再生医療研究に有用であることが示された。

生体骨髄に存在している間葉系幹細胞を含む細胞画分である骨髄間質細胞（BMSC）は培養シャーレ上で比較的高い増殖能を有するだけでなく、種々の細胞への分化能力を有していることが示されていることから、医療への応用が期待されている。そこで、Adベクターを用いてBMSCへの遺伝子導入法の確立と骨芽細胞への高効率分化誘導を試みた。まず、BMSCへ効率良く遺伝子導入可能なAdベクターを改良型を含む種々のAdベクターの中から探索したところ、Adベクターのファイバー領域にポリリジン配列を付与したK7型Adベクターを用いることにより極めて効率良くマウスBMSCへ遺伝子導入できることが明らかとなった。さらに、K7型Adベクターを用いてRunx2遺伝子を導入したBMSCは、従来の誘導法の分化効率と比較し、極めて効率良く骨芽細胞へ分化することが示された。今後、K7型Adベクターを用いたBMSCへ遺伝子導入により、BMSCからその他の細胞種への高効率分化誘導法の確立にも応用できると考えられる。

2006年、京都大学の山中らは、体細胞に4種類に遺伝子を導入することによりES細胞様の多能性幹細胞であるiPS細胞の樹立に成功し、世界を驚かせた。iPS細胞は患者本人から作製することが可能であるため、倫理的な問題や免疫拒絶の問題もないため再生医療における細胞供給源として大きな期待が寄せられている。そこでマウスおよびヒトiPS細胞への遺伝子導入効率の検討を行った。その結果、マウスES細胞と同様に、CAプロモーターを有する従来型Adベクターを用いることにより、マウスiPS細胞への効率の良い遺伝子導入に成功した。さらに、Adベクターによる遺伝子導入を介した脂肪細胞または骨芽細胞への分化誘導実験も行った。その結果、マウスiPS細胞ならびにマウスiPS-EBへAdベクターを用いてPPARγ遺伝子またはRunx2遺伝子を導入することにより、脂肪細胞、骨芽細胞への高効率分化誘導にも成功した。したがって、Adベクターによる遺伝子導入は、マウスES細胞だけでなく、マウスiPS細胞から目的の細胞への分化誘導にも有用であることが示された。またヒトiPS細胞に関してはEF-1αプロモーターを有するAdベクターが効率的な遺伝子導入に適していることが判明した。特に、ヒトiPS細胞の生存率を上昇させる化合物であるROCK阻害剤を用いて培養後にAdベクターを作用させることにより、70-80%のヒトiPS細胞で外来遺伝子を発現させることに成功した。なお、ヒトiPS細胞をある程度分化させた中・内胚葉系の細胞に対してもAdベクターによる高効率遺伝子導入が達成されたため、遺伝子導入技術を利用したヒトiPS細胞から目的の細胞への効率的な分化誘導も可能であると考えられる。今後、Adベクターを用いたヒトiPS細胞への遺伝子導入法が分化誘導のための基盤技術として汎用されることを期待したい。

本研究ではAdベクターを用いることにより再生医療への応用が期待されている各幹細胞へ高効率遺伝子導入に成功しただけでなく、最適化したAdベクターを利用することで液性因子のみを使用する従来の誘導法の分化効率を飛躍的に上昇させることに成功し、遺伝子導入技術を介した分化誘導法は幹細胞の高効率分化誘導に極めて有用であることが示された。本研究の成果が再生医療実現のための足がかりとなることを期待する。

論文審査の結果の要旨

幹細胞は自己複製能と多分化能という二つの特徴を有するため、再生医療への応用が期待されている。特に、発生初期胚から作製された胚性幹（ES）細胞、生体骨髄由来の骨髄間質細胞（BMSC；間葉系幹細胞を含む細胞画分）、および体細胞から樹立された人工多能性幹（iPS）細胞が持つ特性は、再生医療を実現する上で極めて有用であるため、注目を集めている。これらの幹細胞を用いて医療へ応用するには、これら幹細胞を特定の細胞へ分化させる技術の確立が必須である。これまでは主に液性因子単独による分化誘導法が行われてきたが、その分化効率は十分ではない。細胞分化は種々の遺伝子の活性化（または抑制化、あるいはその両方）により誘導されるため、細胞分化に関与する遺伝子の発現量を人工的に操作することにより、細胞分化を制御できる可能性がある。そこで本研究では、既存の遺伝子導入用ベクターの中で最も高い遺伝子発現効率を示すアデノウイルス（Ad）ベクターを用いて各種幹細胞への高効率遺伝子導入法の確立および幹細胞から目的の細胞への高効率分化誘導法の確立に取り組み、以下の結論を得た。

1．マウスES細胞そしてマウスおよびヒトiPS細胞への高効率遺伝子導入には、プロモーターの選択が重要であることを明らかにした。特に、マウスES細胞・マウスiPS細胞にはCAまたはEF-1αを有する従来型Adベクター、そしてヒトiPS細胞にはEF-1αプロモーターを有する従来型Adベクターを用いることにより極めて効率良く遺伝子導入できることを見出した。

2．Adのファイバー領域にポリリジン配列を付与したK7型Adベクターを用いることにより、極めて効率良くマウスBMSCへ遺伝子導入できることを明らかにした。

3．各幹細胞に適したAdベクターを用いて分化関連遺伝子（PPARγ遺伝子、Runx2遺伝子）を幹細胞へ導入することにより、液性因子のみを使用する従来の誘導法よりも極めて効率良く脂肪細胞・骨芽細胞への分化誘導できることが判明した。

以上、本研究では遺伝子導入技術を駆使した幹細胞の高効率分化誘導法の開発に取り組み、プロモーター置換型Adベクターやファイバー改変型Adベクターを用いることにより再生医療への応用が期待されている各幹細胞への高効率遺伝子導入法の確立に成功した。さらに、最適化したAdベクターを用いて機能遺伝子を幹細胞に発現させることで目的細胞への高効率分化誘導も達成されることを明らかにし、遺伝子導入法が幹細胞の高効率分化誘導に有用であることを実証した。本研究で確立した各種幹細胞への遺伝子導入法と幹細胞からの目的細胞への高効率分化誘導法は、再生医療実現のための基盤技術となるだけでなく、幹細胞を用いた基礎研究に対しても有用であるため、極めて意義深く、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考える。