

添付資料⑥

NEDO公開シンポジウム Abstracts

NEDO公開シンポジウム 研究用モデル細胞の創製技術開発

**多能性幹細胞株の遺伝子改変・分化誘導・ケミカルスクリーニングによる
正常/疾患モデル細胞作成と創薬産業応用**

Abstracts

開催日：平成22年5月18日(火)

会場：京都大学 東京オフィス

主催：独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)

NEDO公開シンポジウム
研究用モデル細胞の創製技術開発

多能性幹細胞株の遺伝子改変・分化誘導・ケミカルスクリーニングによる
正常／疾患モデル細胞作成と創薬産業応用

CONTENTS

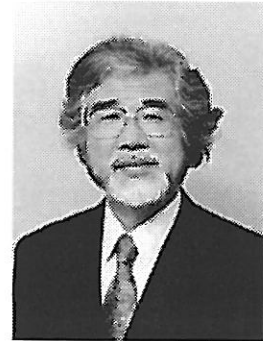
タイムスケジュール	2
中辻 憲夫 要旨 (京大iCeMS/京大再生研)	3
関口 清俊 要旨 (阪大)	7
櫻井 健二 要旨 (SCDI)	11
三谷 幸之介 要旨 (埼玉医大)	15
饗庭 一博 要旨 (SCDI/京大iCeMS)	19
尾辻 智美 要旨 (SCDI/京大再生研)	23
糸 昭苑 要旨 (熊大)	27
川瀬 栄八郎 要旨 (京大再生研)	31
浅井 康行 要旨 (SCDI/ReproCELL)	35

Time schedule

- 14:00～14:05 主催開催挨拶
森田 弘一 (NEDO)
- 14:05～14:10 来賓挨拶 (METI)
- 14:10～14:30 プロジェクトリーダーによる概要説明：
ES細胞やiPS細胞など多能性幹細胞株の遺伝子改変、分化誘導、
ケミカルスクリーニングによる正常/疾患モデル細胞作成と創薬産業応用
中辻 憲夫 (京大iCeMS/京大再生研)
- 14:30～14:50 多能性幹細胞の培養と分化誘導制御のための完全合成型人工基底膜の開発
関口 清俊 (阪大)
- 14:50～15:20 ヒトES細胞に対する新たな遺伝子改変技術の開発
櫻井 健二 (SCDI)
ヒト多能性幹細胞における遺伝子改変技術の開発 ～ウイルスベクターを用いて～
三谷 幸之介 (埼玉医大)
- 15:20～15:50 ヒトES細胞からの神経分化誘導法の確立と神経変性疾患モデル細胞の作製
饗庭 一博 (SCDI/京大iCeMS)
- 15:50～16:20 休憩
- 16:20～16:40 心筋分化誘導と心筋毒性検定への応用
尾辻 智美 (SCDI/京大再生研)
- 16:40～17:00 肝細胞への分化誘導技術の開発
糸 昭苑 (熊大)
- 17:00～17:20 ヒトES細胞からの肝細胞分化誘導系の開発
川瀬 栄八郎 (京大再生研)
- 17:20～17:50 多能性幹細胞を用いた低分子化合物ハイコンテンツスクリーニング系の構築
浅井 康行 (SCDI/ReproCELL)
- 17:50～17:55 閉会の挨拶
森田 弘一 (NEDO)
- 17:55～18:40 意見交換会

中辻 憲夫

京都大学物質-細胞統合システム拠点長／再生医科学研究所教授



[略歴]

- | | |
|------------|-----------------------------------|
| 1972年 | 京都大学理学部卒業 |
| 1974年 | 京都大学大学院理学研究科修士課程 修了 |
| 1977年 | 京都大学大学院理学研究科博士課程 修了（理学博士） |
| 1978年 | スウェーデン ウメオ大学 助手 |
| 1978年 | 米国 マサチューセッツ工科大学 ポストドク研究員 |
| 1980年 | 米国 ジョージワシントン大学医学部 研究員 |
| 1983年 | 英国 ロンドン大学MRC哺乳類発生学部門 客員研究員 |
| 1984年 | 明治乳業ヘルスサイエンス研究所 主任研究員のち研究室長 |
| 1991年 | 国立遺伝学研究所 教授 |
| 1999年 | 京都大学再生医科学研究所 教授 |
| 2003-2007年 | 京都大学再生医科学研究所 所長 |
| 2007 | 京都大学物質-細胞統合システム拠点長(再生医科学研究所教授兼務)。 |

プロジェクトリーダーによる概要説明：

「ES細胞やiPS細胞など多能性幹細胞株の遺伝子改変、分化誘導、ケミカルスクリーニングによる正常／疾患モデル細胞作成と創薬産業応用」

中辻 憲夫

創薬プロセスにおいては、早い段階から効率的に医薬品候補分子を絞り込むことが、開発期間と費用の効率化にとって非常に重要であるが、従来用いられてきたヒト株化細胞や動物細胞では、生体内反応を高い精度で予測することは困難である。このような創薬プロセスにおけるボトルネックを解消するためには、無限に増殖できるとともに、あらゆる生体組織の細胞に分化できる多能性幹細胞株（ヒトES細胞やiPS細胞など）由来のモデル細胞の利用が極めて有効である。NEDO「研究用モデル細胞の創製技術開発プロジェクト」（平成17－21年度）では、難病発症機構の解明や新薬の安全性評価及び創薬研究の効率化に有用な、研究開発用モデル細胞の創製技術を開発するため、ヒトES細胞株などを用いて遺伝子改変、分化誘導制御、細胞を用いたケミカルスクリーニング、正常および疾患モデル細胞の作成を目指した研究を展開してきた。

今回、5年間のプロジェクトで得られた研究開発成果を広く紹介するため公開シンポジウムを開催して、以下の項目などについて発表する。

- 1) ヒトES/iPS細胞株の培養系に関する新規技術開発
- 2) ヒトES/iPS細胞株に適用可能な新規遺伝子改変技術の開発
- 3) ヒトES細胞株の遺伝子改変による神経変性疾患モデル細胞の作成と解析
- 4) 多能性幹細胞株を用いた心筋分化誘導と心筋毒性検定への応用
- 5) 多能性幹細胞株を用いた肝細胞分化誘導系の開発
- 6) ES/iPS細胞などを用いた低分子化合物のスクリーニング系の構築

幹細胞の種類と特徴

多能性幹細胞 Pluripotent Stem Cell

- ・ES細胞(胚性幹細胞)Embryonic Stem Cell
初期胚由来 分化能:高 増殖能:無制限
- ・EG細胞 Embryonic Germ Cell
胎児生殖細胞由来 分化能:高 増殖能:無制限
- ・mGS細胞 Multipotent Germ Stem Cell
新生児精巣内生殖細胞由来 分化能:高 増殖能:高 or 無制限
- ・iPS細胞(体細胞を遺伝子導入で再プログラム化した細胞株)

組織幹細胞 Tissue Stem Cell(体性幹細胞 Somatic Stem Cell)

造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞など

- ・(胎児)組織幹細胞
中絶胎児由来 分化能:中 増殖能:中
 - ・(成体)組織幹細胞(成体幹細胞 Adult Stem Cell)
成人由来(一部は生体から採取可能)
分化能:低~中 増殖能:低~中
- 多能性に近い特性をもつ成体組織幹細胞?
成人由来 分化能:高? 増殖能:高?(再現性確認が困難)

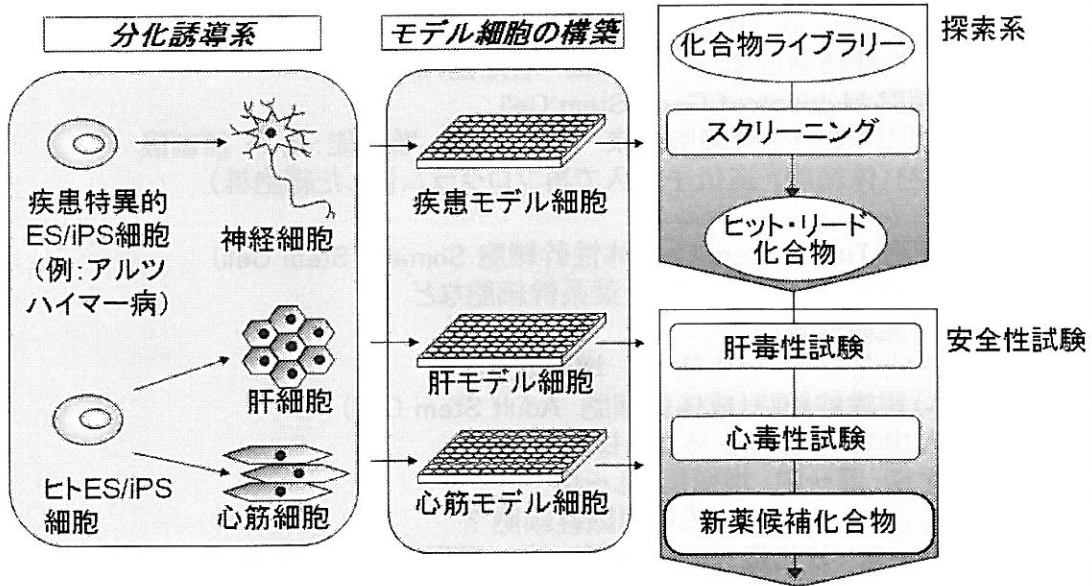
ヒト多能性幹細胞株の 創薬研究における重要性

創薬研究に必要な多種類ヒト組織細胞の大量供給

- ・均一な特性(ゲノム)をもつヒト細胞
- ・外来遺伝子ベクターを組み込んだヒト細胞
- ・内在遺伝子を改変したヒト細胞(疾患モデルヒト細胞)
- ・各種細胞内活性を検出するレポーター遺伝子導入ヒト細胞
- ・各種ヒトモデル細胞への薬物効果と生理活性のアッセイ系
- ・ヒト細胞(肝細胞や心筋細胞)を使った安全性試験
- ・各種神経細胞、心筋、網膜細胞、皮膚、軟骨、脂肪細胞
- ・肝細胞、膵島細胞

創薬研究のためのヒトES/iPS細胞由来のモデル細胞の開発

- ・ 探索系 (疾患モデル細胞を用いたハイスループットスクリーニング)
- ・ 安全性試験 (肝モデル細胞、心筋モデル細胞を用いた試験)



ヒト多能性幹細胞株の遺伝子改変による疾患モデル細胞と患者由来iPS細胞株による疾患モデル細胞の利点比較

既存ヒトES (またはiPS) 細胞株の遺伝子改変

有利な点

- 1) 同じ遺伝的背景をもった細胞株で病因遺伝子保有と健常型遺伝子保有細胞の厳密な比較対照が可能
- 2) 発現誘導型プロモーターを用いた病因遺伝子の発現制御が可能 → 病因遺伝子発現の影響を厳密な時間軸で解析可能
- 3) 異常蛋白質などの過剰発現により疾患関連異常の発症を早めることが出来る可能性

不利な点

- 1) 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にはモデル作成が困難

患者の体細胞由来iPS細胞株の作成

有利な点

- 1) 病因遺伝子が不明または多数遺伝子関与の場合にも患者のゲノムをもつ細胞株樹立が可能 → 疾患モデルとして使える可能性

不利な点

- 1) 患者と健常者からのiPS細胞株は異なる遺伝的背景をもつ → 厳密な比較対照が困難
- 2) 不完全な再プログラム化 (初期化) によるエピジェネティクスの異常が細胞表現型の解析を乱す可能性
- 3) 慢性疾患や加齢疾患などでは実験可能期間内に細胞の異常発生が確認できない可能性



関口 清俊

大阪大学蛋白質研究所 細胞外マトリックス研究室 教授

[略歴]

- 昭和48年 3月 東京工業大学理学部化学科卒業
昭和53年 3月 大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻博士後期課程修了（理学博士）
昭和54年 3月 米国フレッドハッチンソン癌研究所 博士研究員
昭和59年 1月 米国ワシントン大学病態生物学科 助教授（併任）
昭和61年 5月 藤田保健衛生大学医学部 講師
平成 2年 6月 藤田保健衛生大学医学部 助教授
平成 3年 4月 大阪大学微生物病研究所 助教授
平成 3年 7月 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 部長
平成 4年 4月 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 所長
平成 6年 4月 大阪大学大学院医学研究科（連携大学院）客員教授
平成10年 4月 大阪大学蛋白質研究所 教授
平成12年10月 科学技術振興機構創造科学技術推進事業（ERATO）
関口細胞外環境プロジェクト 総括責任者（兼任、～平成18年3月）
平成18年 4月 大阪大学バイオ関連多目的研究施設 施設長（併任）

[受賞歴]

- ・1997年 日本生化学会 JB論文賞

[主な所属学会と活動状況]

日本生化学会（評議員）、日本細胞生物学会、日本結合組織学会（評議員）、日本癌学会、日本再生医療学会、米国生化学分子生物学会、米国細胞生物学会

[研究テーマ・領域]

- ・細胞外マトリックスの構造と機能、再構成マトリックスによる幹細胞の増殖・分化の制御

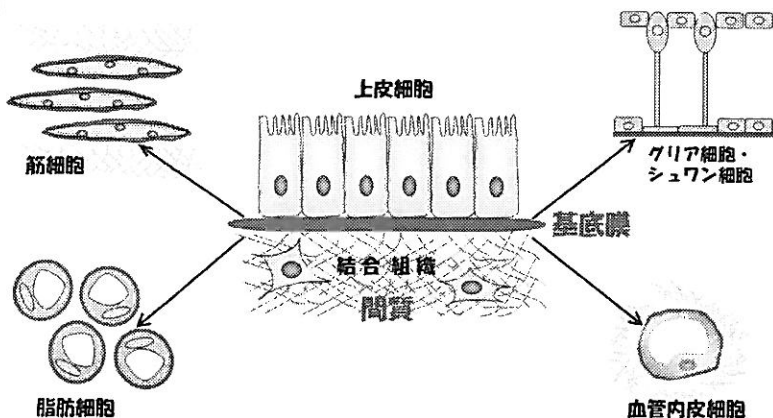
多能性幹細胞の培養と分化誘導制御のための完全合成型人工基底膜の開発

関口 清俊

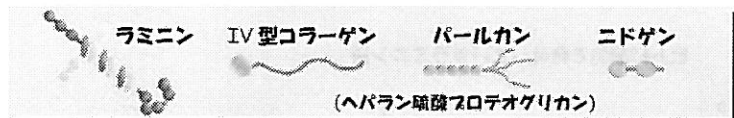
生体組織における細胞の増殖と分化は、周囲の環境から提供される様々な情報に基づいて制御されている。この情報の主たる担い手は、周囲の細胞から分泌される液性因子と細胞の足場となる細胞外マトリックスである。細胞外マトリックスは、細胞表面の受容体と結合することにより、それ自身がシグナル分子として機能するだけでなく、様々な液性因子を結合することにより、それらの組織内での分布や濃度勾配の形成に深く関わっている。細胞外マトリックスの分子構成は、細胞ごとに異なっており、同じ細胞であっても発生や分化段階の違いによって変化することが知られている。このような細胞ごとに最適化された細胞外マトリックスの分子実体を解明し、生体外で再構築することは、ES細胞のフィーダーフリー培養技術および選択的分化誘導技術の開発に不可欠である。本研究開発では、多くの臓器実質細胞の直近の足場となっている基底膜に着目し、細胞ごとに分子構成をカスタマイズした完全合成型人工基底膜の構築技術の開発を行った。

基底膜を構築する蛋白質は、これまで約50種が知られている。なかでも強い細胞接着活性をもつラミニンと自己会合能を有するIV型コラーゲンは、基底膜の機能的・構造的な中核を担うと考えられている。本研究開発では、ラミニンとIV型コラーゲンを組み合わせた2成分コンポジットゲルを人工基底膜の基本骨格とし、これにニドゲンやヘパラン硫酸プロテオグリカンを組み込んだ多成分人工基底膜の構築を目指した。具体的には、これまでに知られている12種のラミニンアイソフォーム、2種のニドゲン、2種のヘパラン硫酸プロテオグリカンの組換え蛋白質の発現・精製法を確立するとともに、IV型コラーゲンの生物活性とI型コラーゲンの物理的強度を併せ持つ改良型IV型コラーゲンを開発し（日本皮革研究所との共同研究）、分子組成をカスタマイズしたラミニン—IV型コラーゲン—ニドゲン—ヘパラン硫酸プロテオグリカンからなる完全合成型多成分人工基底膜の構築に世界ではじめて成功した。また、京都大学再生医科学研究所と共同して、組換え基底膜蛋白質を利用したヒトES細胞用のフィーダーフリー培養基質の開発を進め、組換えラミニン-511およびラミニン-332を固相化した基質上でヒトES細胞が未分化性を維持したまま増殖することを明らかにした。これらの組換えラミニン上では、ヒトiPS細胞の培養と継代も可能であり、ヒト多能性幹細胞用のフィーダーフリー・ゼノフリー培養基質として今後の実用化が期待される。一方、分子組成をカスタマイズした多成分人工基底膜の評価を熊本大学と共同して進めており、ES細胞から肝臓や膵臓への選択的分化誘導においてそれぞれ異なる分子組成の人工基底膜が有効であることが明らかとなりつつある。これらの結果は、本研究開発が目指す完全合成型人工基底膜がヒトES細胞/iPS細胞の培養と分化誘導制御に有効であることを強く支持している。

基底膜は多くの細胞が必要とするユニークな細胞外微小環境



基底膜の構成分子

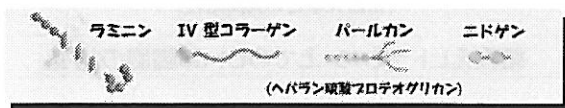


ラミニン	コラーゲン	プロテオグリカン	その他の糖蛋白質
Laminin-111	collagen α 1(IV)	perlecan	nidogen-1
Laminin-121	collagen α 2(IV)	agrin	nidogen-2
Laminin-211	collagen α 3(IV)		SMOC-1
Laminin-221	collagen α 4(IV)		nephronectin
Laminin-311	collagen α 5(IV)		netrin-1
Laminin-321	collagen α 6(IV)		netrin-4
Laminin-332	collagen α 1(VI)		usherin
Laminin-411	collagen α 2(VI)		amelogenin
Laminin-421	collagen α 3(VI)		endoglyx-1
Laminin-511	collagen α 1(XV)		papilin
Laminin-521	collagen α 1(XVIII)		TIN-Ag
			AMACO
			amelotin
			Fras1
			Frem2
			Frem3
			MAEG
			QBRICK
			ECM392
			ECM306
			ECM270
			ECM866
			ECM290
			ECM742

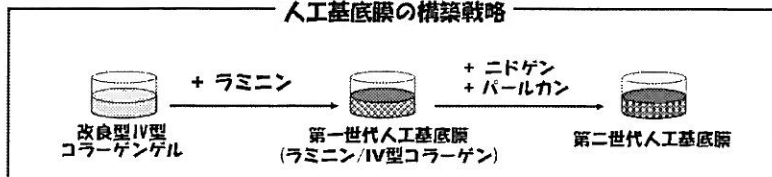
48種類

赤字：本研究開発で調製法を確立した基底膜蛋白質

分子組成をカスタマイズした人工基底膜の構築



人工基底膜の構築戦略



- * IV型コラーゲンゲル：ゲル化に非常に時間がかかる。やわらかく取り扱いが難しい。
- * I型コラーゲンゲル：すぐ固まる。適度な硬さを持つ。しかし、ラミニンに対する結合活性が弱い。ES細胞の接着が弱い。

I型コラーゲンとIV型コラーゲンの両者の長所をもつI型/IV型混成コラーゲンゲルの作製に成功

- > I型コラーゲンと同様、速やかにゲル化する
- > IV型コラーゲンの強いラミニン結合活性を保持している

品質の安定したヒトES細胞の培養・増殖法の開発
(京都大学との共同研究)

従来のヒトES細胞の培養方法の問題点

- マウス線維芽細胞をフィーダー細胞として用いる。
 - フィーダー細胞の安定な供給が常に課題となる
 - 異種成分を排除することができない
- コロニーを維持した状態で継代培養する必要がある。
 - スプリット比率が1:2~1.6
 - 操作の標準化が難しい



フィーダーフリーかつゼノフリーの培養方法が求められている！

これまでのフィーダーフリーの培養方法

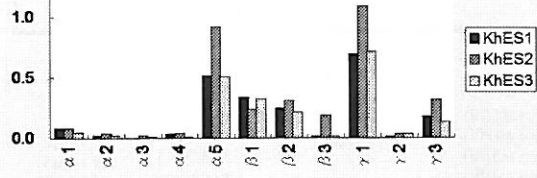
- マトリゲル (Matrigel: マウス腫瘍抽出物を基質とする培養方法
(Xu et al. Nature Biotech, 2001, Ludwig et al., Nature Methods, 2006))
 - 異種成分の持込み(ゼノフリーにはならない)
 - 化学的組成が完全には解明されていない
 - 主成分はラミニン-111 ($\alpha 1, \beta 1, \gamma 1$)



マウスEHS標準

品質の安定したヒトES細胞の培養・増殖法の開発
(京都大学との共同研究)

ヒトES細胞で発現しているラミニン鎖

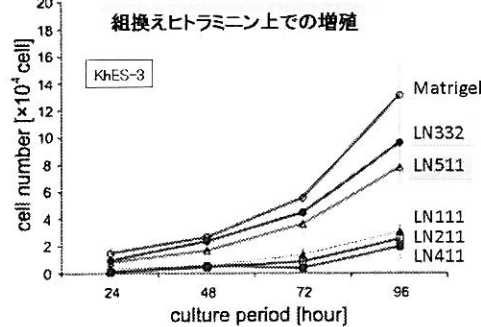


ヒトES細胞は、 $\alpha 5$ 鎖ラミニンを主に発現している

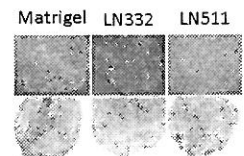


品質の安定したヒトES細胞の培養・増殖法の開発
(京都大学との共同研究)

組換えヒトラミニン上でのヒトES細胞の培養



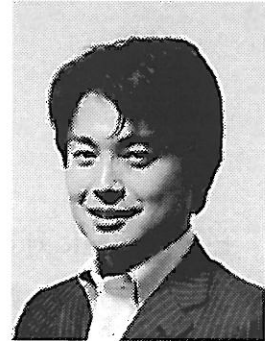
受容体結合特異性が類似している



(Miyazaki et al., Biochem Biophys Res Commun, 2008)

櫻井 健二

特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所



[略歴]

- | | |
|-------|---------------------------------|
| 2003年 | 東京大学大学院理学系研究科卒業
キリンビール株式会社入社 |
| 2006年 | 特定非営利活動法人幹細胞創薬研究所 |
| 2008年 | 京都大学大学院医学研究科 |

ヒトES細胞に対する 新たな遺伝子改変技術の開発

櫻井 健二

ヒトES細胞に対して遺伝子改変を行なう場合、越えなくてはならない最大の課題は、サイレンシングの克服である。サイレンシングとは、導入した遺伝子が宿主の染色体に組み込まれているにもかかわらず、機能しないという現象のことである。ヒトES細胞では、原因は不明だがサイレンシングが起きやすく、それによって研究効率の大きなロスが生じている。

この現状を打破するため、我々は新たな遺伝子改変方法を開発した。その方法とは、まず、遺伝子相同組み換えを用い、ハウスキーピング遺伝子のひとつであるHPRTの遺伝子座にドッキングサイトを組み込む。次いで、その株のドッキングサイトに対して、Cre/LoxPによる組み換えを応用した遺伝子置換を行なう、というものである。この方法で遺伝子改変を行なうと、得られたクローンの全てが導入遺伝子を発現しており、サイレンシングを回避することに成功した。さらに、この方法を応用することで、HPRT遺伝子座単独でのTet-On誘導発現システムを構築することにも成功した。

本技術を用いて得られたクローンは理論上、みな同じ遺伝的バックグラウンドとなる。そのため、従来の遺伝子改変方法に比べ、クローニングの負担を大幅に軽減できるという利点を併せ持つ。これらのことから、創薬スクリーニングへの応用のみならず、多能性幹細胞研究のスピードが飛躍的に加速されると期待される。

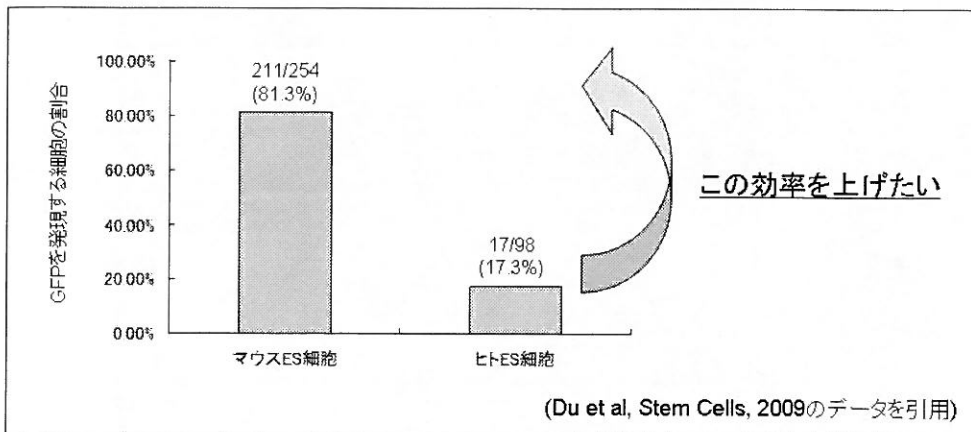
【参考文献】

Sakurai et al, Nucleic Acids Research, April 2010; 38: e96

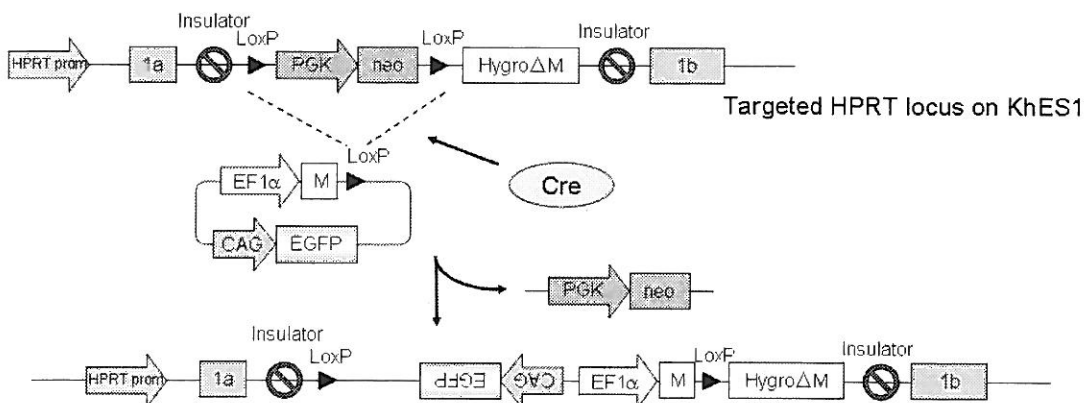
Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells

1. ヒトES細胞への遺伝子導入

- ◆ ヒトES細胞で遺伝子導入すると、何故かサイレンシングが起きやすい。
- ◆ GFP発現カセットを遺伝子導入しても、GFPを発現する細胞はわずか17.3%。
(マウスES細胞では8割以上の細胞がGFPを発現する)
- ◆ サイレンシングを回避できれば、研究スピードが加速される。

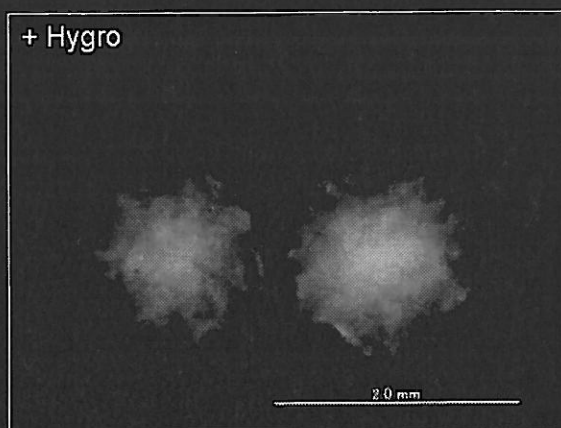


2. HPRT遺伝子座をターゲットとした遺伝子導入



HPRT遺伝子座にドッキングサイトを組み込んだヒトES細胞を作り、そのサイトに好みの遺伝子を高効率で入れるシステムを構築した。HPRT遺伝子はハウスキーピング遺伝子なので、この遺伝子座に入った遺伝子はサイレンシングを受けないはず。ポジティブコントロールとしてEGFP発現カセットを用いた。

3. サイレンシングを回避した遺伝子導入法の確立



Hygro ^r	EGFP ⁺	Efficiency
186	186	100%

全ての薬剤耐性クローンでEGFPの発現が確認された。

三谷 幸之介

埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門 部門長／教授



[略歴]

- 1984年 東京大学 医学部 保健学科 卒業
- 1986年 東京大学大学院 医学系研究科 保健学専門 修士課程 修了
- 1989年 東京大学大学院 医学系研究科 保健学専門 博士課程 修了
- 1989年 国立予防衛生研究所 エイズ研究センター リサーチレジデント
- 1990年 米国ベイラー医科大学 ハワードヒューズ医学研究所 リサーチアソシエイト
- 1994年 東京大学医学部 疾患遺伝子制御（サンド）講座 寄付講座教員
- 1996年 米国 カリフォルニア大学 ロサンゼルス校 微生物学免疫学講座 Assistant Professor
- 2003年 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門 部門長／助教授
- 2007年 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門 部門長／教授

[受賞歴]

- 1989年 Research Resident Fellowship from the Japanese Foundation for AIDS Prevention
- 1997年 The Frontiers of Science Faculty Research Development Awards of the UCLA School of Medicine
- 2000年 Stein-Oppenheimer Endowment Award for the Health Sciences at UCLA

[主な所属学会と活動状況]

- 米国遺伝子治療学会
- 日本遺伝子治療学会 （監事）
- 日本ウイルス学会
- 日本分子生物学会
- 日本人類遺伝学会

[研究テーマ・領域等]

- アデノウイルスを基盤とした新規ベクターの開発
- ヒト幹細胞における高効率相同組換え法の開発

ヒト多能性幹細胞における遺伝子改変技術の開発 -ウイルスベクターを用いて-

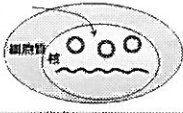
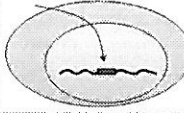
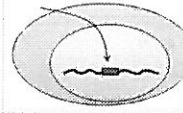
三谷 幸之介

ヒトES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞は、創薬や再生医療等への多様な応用の可能性が注目されているが、遺伝子導入や遺伝子改変が困難であることが研究上の大きなハードルの一つとなっている。私達は、これらの問題を解決し、ヒトES/iPS細胞での高効率な遺伝子操作技術を確立する目的で、種々のウイルスベクターの比較・検討を行った。

まず、ヘルパー依存型アデノウイルスベクター(HDAdV)を用いて KhES-1 subline 1における一過性遺伝子発現効率を検討したところ、98%のベクター感染細胞で遺伝子発現を確認した。さらに、ヒトES細胞KhES-3株やヒトiPS細胞株においても同様の高効率での遺伝子導入を達成した。また、GFPをコードする9種類の血清型由来のアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)について一過性遺伝子発現効率を比較し、KhES-1 subline 1では80%の感染細胞で、KhES-3では23%の細胞で遺伝子発現を確認した。ヒトiPS細胞株での効率は、その中間程度であった。さらに、レンチウイルスベクター(LV)を用いた安定な遺伝子導入を最適化する目的で、KhES-1 subline 1において、異なる受容体を利用して感染する10種類のエンベロープを比較して最適エンベロープを決定し、さらに4種類のプロモーターについて発現強度の比較を行い、それらを組み合わせることによって75%以上の感染細胞で安定に遺伝子発現を得ることに成功した。ヒトiPS細胞での効率は、90-95%に達した。これらのベクター感染細胞では、ヒトES/iPS細胞の未分化性は維持されていた。

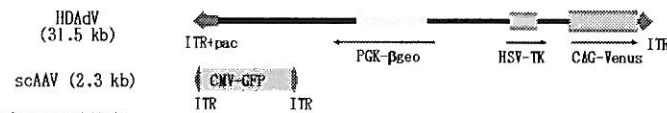
また、最適な相同組換え法を確立する目的で、ヒトES細胞株 (KhES-1 subline 1、KhES-3) の *HPRT* 遺伝子座における相同組換えによる遺伝子ノックアウトの頻度を、HDAdV、AAV、インテグラゼ欠損型LVの3種類のベクターを用いて比較した。その結果、AAVを用いた場合は非ウイルス法と同様に染色体組込みの0.5-1%が相同組換えであり、LVでは相同組換え体が得られなかった。その一方、HDAdVを用いた場合に10%以上の頻度で相同組換え体が得られた。そこで、HDAdVを利用した相同組換え法の汎用性を確認するために、分化細胞特異的に発現する2つの遺伝子座への蛍光遺伝子のノックインと、4つのハウスキーピング遺伝子座のノックアウトを試みた。その結果、いずれの場合も染色体組込みの10-50%が、ネガティブ選択法を組み合わせると薬剤耐性コロニーの30-80%が相同組換え体であった。一方、ヒトES/iPS細胞で強く発現している *NANOG* 遺伝子座でAAVを用いた遺伝子ノックインを試みたところ、プロモータートラップを利用することによって20-40%の効率で相同組換え体を得られた。このように、目的に応じて最適なウイルスベクターを用いることによって、ヒト多能性幹細胞における遺伝子ノックアウト、遺伝子ノックイン、遺伝子修復などが、高い効率で実現可能であり、本研究で開発した技術がヒトES/iPS細胞を用いた基礎・応用研究の重要な技術的基盤となりうることを示された。

遺伝子導入の種類と達成目標

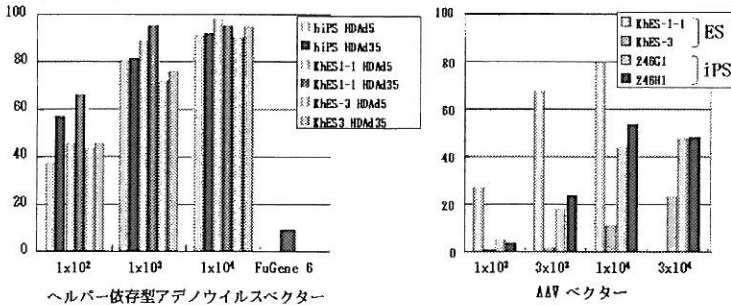
導入法	一時的	安定	相同組換え
			
遺伝子の場所	染色体外	染色体上のランダムな部位	染色体上の特定の部位
遺伝子発現	一時的	細胞分裂後も持続	組込み部位特異的
ES細胞での応用例	・分化誘導遺伝子の強発現	・疾患遺伝子の導入によるモデル細胞	・マーカー遺伝子の分化依存的発現 ・遺伝子ノックアウト
発足当時 (平成17年)	数%	$10^{-6} \sim 10^{-7}$	非常に困難、論文2報のみ
中間目標 (平成19年)	数十%	$10^{-5} \sim 10^{-6}$	カニクイザルES細胞を用いて相同組換えの実現化 ヒトES細胞での相同組換え法を確立、分化特異的可視化ヒトES細胞や疾患モデル細胞の創製
最終目標 (平成21年)	~100%	~100%	

ヒトES・iPS細胞における100%近い遺伝子発現の達成

1. ベクターの構造



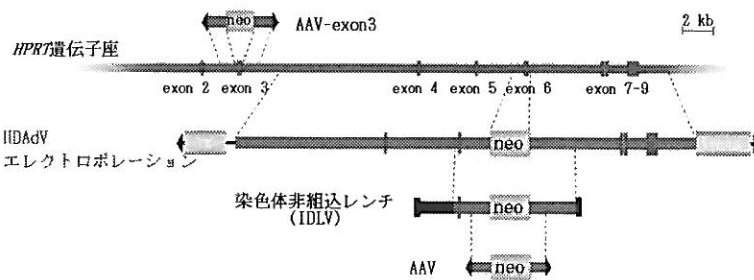
2. 遺伝子発現効率



- ・ アデノで~100%、AAVで~80%の遺伝子導入効率 (未分化性は維持されている)
- ・ ES細胞で至適化した条件は iPS細胞に適用可

ヒトES細胞においてはHDAdVによる相同組換えが最も高効率

(HPR遺伝子座のノックアウト)

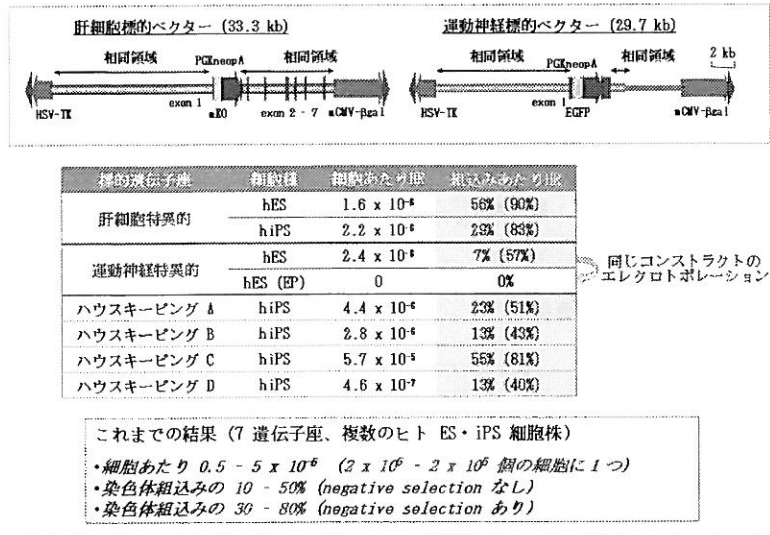


細胞株	遺伝子導入法	導入細胞数	検出数	効率%	組換えあたり検出数	組込みあたり検出率
KhES-1 Subline (IX)	HDAdV	5.1×10^6	136	31	14	10% (45%)
	AAV-exon3	5.8×10^6	207	NA	1	0.5%
KhES-3 (XY)	エレクトロポレーション	1.1×10^6	172	98	1	0.6% (1.0%)
	HDAdV	1.9×10^6	14	6	2	14% (33%)
	IDLV	3.6×10^6	29	NA	0	0%
	AAV	3.6×10^6	353	NA	0	0%
	AAV-exon3	3.5×10^6	800	NA	8	1%

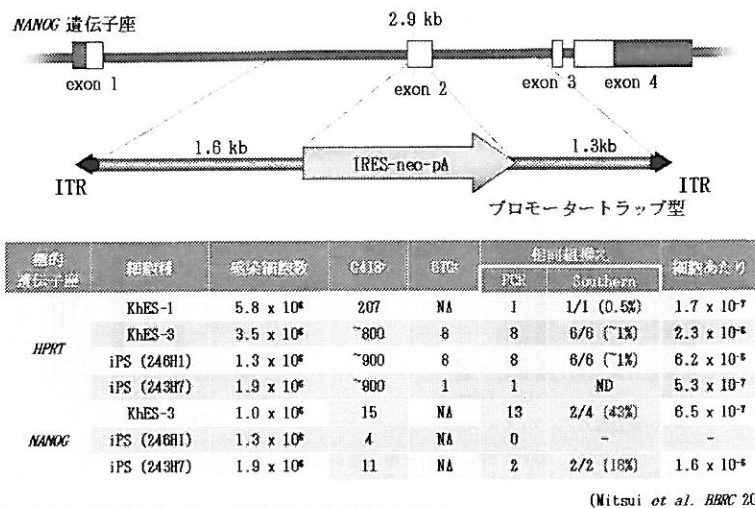
同じコンストラクトのエレクトロポレーション

[Suzuki et al. PNAS 2008, Watanai et al. EBRC 2009, 未発表]

転写されていない遺伝子座における高効率な相同組換えの達成



転写活性の高い遺伝子座では AAV を用いた相同組換えも有用



成果：ヒト ES・iPS 細胞における遺伝子導入法の確立

	ヘルパー依存型アデノ	AAV	レンチ	非ウイルス法
一過性遺伝子発現	~100%	~80%	?	30~60%
安定な遺伝子発現	0.001~0.01%	0.01~0.1%	~8% (安定)	?
相同組換え	10~50% (33~90%)	~1%	~1%	~1%
発現していない遺伝子座での相同組換え	high	low	low	low
大きなカセットの挿入	yes	no	no	yes
ベクター調製の容易さ	-	++	++	+++

ヒトES細胞から

- 分化細胞を高効率に誘導する
- 疾患モデル細胞を高効率で樹立する

ための基礎技術を確立した

ヒトiPS細胞にも適用可能であった

目標を達成