

脱分化脂肪細胞からの iPS 細胞
(induced pluripotent stem cell) の樹立
(要約)

日本大学大学院医学部研究科博士課程

生理系機能生理学専攻

橋本 真

修了年 2016 年

指導教員 越永 従道

【諸言】

2006年にTakahashiらは、マウスの繊維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて4種類の遺伝子Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc（山中4因子）を導入することにより、多能性と自己増殖能を持った細胞である人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell；iPS細胞）の作製に成功した¹⁾。iPS細胞は、胚性幹細胞がもつ倫理的問題を回避でき、さらに再現性のとれる作製方法であるため、iPS細胞を利用した再生医療、難病の病態解明、創薬開発などへの貢献が期待されている。しかし、治療用iPS細胞も課題を有しており、造腫瘍性、誘導効率の低さ、適切な細胞源や培養条件などについて研究が進められている。iPS細胞を作製する元となる細胞としては、2006年に最初に報告されたマウスiPS細胞ではマウス胎仔繊維芽細胞および成体の皮膚繊維芽細胞が用いられた¹⁾。2007年に報告されたヒトiPS細胞には胎児、新生児、成人の皮膚繊維芽細胞が用いられた²⁾。その後、胎児付属物である羊膜細胞や臍帯血細胞、成体から採取可能な末梢血、ケラチノサイト、骨髄細胞、脂肪間葉系幹細胞、歯髄幹細胞、神経幹細胞、臍帯静脈内皮細胞など、多様な細胞種から樹立できることが明らかにされている。iPS細胞にはその供給源となる体細胞が持つエピジェネティックメモリーというゲノム領域の記憶が残るため、作製したiPS細胞の腫瘍原性や分化志向性に影響を与えることが報告されている³⁾。従って、適切な細胞源を選択することは、誘導したヒトiPS細胞の高い安全性や多能性を期待する上で重要な事項である。

Matsumotoらは、ヒトを含む哺乳類脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することで、生じる線維芽細胞様の形態をした細胞群（脱分化脂肪細胞、dedifferentiated fat cell：DFAT）が、高い自己増殖能と多分化能を獲得していることを明らかにした⁴⁾。DFATは生体から採取した少

量の皮下脂肪組織吸引脂肪（1-2 g）から大量に純度の高い細胞を調製することができ、全身状態の不良な患者や小児、高齢者からも低侵襲でかつ容易に作製できる利点がある。また、作製過程で抗体選別操作やウイルスベクターの導入などを行わず、簡便な方法で短期間に調整可能な細胞である点も、再生医療用細胞源としての利点である。さらには、外科手術時に廃棄される脂肪組織を利用すれば、バンキングシステムの構築も容易であると考えられる。このような利点から DFAT は再生医療用ドナー細胞として有用であると考えられる。

【目的】

本研究では、成熟脂肪細胞に由来するヒト DFAT にセンダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子（KLF4、OCT3/4、c-MYC、SOX2）を遺伝子導入し、細胞をリプログラミングすることで iPS 細胞の作製を試み、その形質と多分化能を評価した。さらに、ヒト皮膚繊維芽細胞とヒト DFAT から同時に iPS 細胞を誘導し、その誘導効率について比較検討した。

【対象と方法】

1. 実験細胞

ヒト脂肪組織を用いたすべての実験は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認を受け実施した（承認番号：RK-121012-3）。DFAT の作製は既報⁴⁾の調製方法に準拠して調製した。

2. iPS 細胞の作製方法

iPS 細胞の誘導には、iPS 細胞作製用センダイウイルスベクターキット CytoTune®-iPS を使用した。作製手順に関しては、同製品のプロトコールに従った。遺伝子組換え実験は日本大学遺伝子組換え安全委員会の承認（承認番号：2013 医 3）を得て行った。ヒト DFAT は 2 歳児の皮下脂肪組織から調製し、第 4

継代 (P4) の細胞を用いた。細胞は 10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 DMEM に 5.0×10^5 / well となるように播種し、翌日山中 4 因子 (KLF4, OCT3/4, c-MYC, SOX2) を遺伝子導入した。毎日培地交換しながら培養を継続し、7 日後にマウス胎児線維芽細胞をフィーダー細胞とする 35mm ディッシュ上に再播種した。翌日、培地を 5ng / ml FGF2 含有 ES 細胞用培地 (Primate ES cell medium) に交換しコロニー形成を誘導した。遺伝子導入 17 日後頃より形成されたコロニーを顕微鏡下にピックアップし、事前にフィーダー細胞を播種した 35mm ディッシュに再播種し、iPS 細胞コロニーを誘導した。iPS 細胞コロニーは、幹細胞マーカーに対する免疫組織学検討と mRNA 発現解析 (RT-PCR) および *in vitro* の三胚葉分化能を評価した。コントロール細胞として、ヒト皮膚繊維芽細胞 (HDF)、ヒト新生児包皮由来繊維芽細胞 (BJ) を用いて同様の方法で iPS 細胞を誘導した。

3. Alkaline Phosphatase (ALP) 染色

DFAT、HDF、BJ に山中 4 因子を導入し、7 日後にフィーダー細胞上に再播種し、FGF2 含有 ES 細胞用培地で培養し、iPS 細胞コロニーを誘導した。各細胞ディッシュに対し、遺伝子導入 8 日後 (再播種 1 日後) より 21 日後 (再播種 14 日後) まで連日アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行い、ディッシュ中の ALP 陽性コロニーの総数を測定した。

4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

BJ、HDF、DFAT および DFAT 由来 iPS 細胞から total RNA を抽出し、幹細胞マーカー 25 因子について RT-PCR 解析を行った。PCR 産物はアガロースゲルによる電気泳動を行い、SYBR Gold で染色し、イメージアナライザーで撮影した。GAPDH を同様に測定し、内部標準とした。

5. 免疫染色

培養したディッシュは 4% パラホルムアルデヒド (PFA) により固定後、1 次抗体としてウサギ抗ヒト Nanog 抗体 (1:800)、ウサギ抗ヒト Oct3/4 抗体 (1:500)、マウス抗ヒト SSEA-1 抗体 (1:500)、マウス抗ヒト SSEA-4 抗体 (1:500)、マウス抗ヒト Tra-1-60 抗体 (1:1000)、マウス抗ヒト Sox17 抗体 (1:200)、ウサギ抗ヒト AFP 抗体 (1:200)、マウス抗ヒト α SMA 抗体 (1:100)、ウサギ抗ヒト Desmin (1:100) マウス抗ヒト β -III tubulin 抗体 (1:200)、を反応させ、二次抗体とし

て Alexa-594 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体 (1:1000)、Alexa-488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:1000) を作用させて可視化した。Hoechst33342 で核染色を行った後、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察、写真撮影を行った。

6. 統計処理

実験で得られたデータは mean±SE で示した。群間比較は Unpaired Student's t test を用いて解析した。P<0.05 を統計学的有意差とした。

【結果】

1. ヒト DFAT のフローサイトメトリーと多分化能解析

iPS 細胞の細胞源として用いたヒト DFAT は、間葉系マーカーである CD73、CD90、CD105 がほぼ 100%陽性であり、血液マーカー CD45、CD34、CD11b、CD19、HLA-DR は陰性であった。ヒト DFAT を適切な分化誘導培地を用いて培養することにより、脂肪細胞、骨芽細胞、II 型コラーゲン陽性の軟骨細胞、平滑筋 α アクチン陽性の平滑筋様細胞に分化する所見が認められた。

2. センダイウイルスベクターの遺伝子導入効率解析

GFP 発現用センダイウイルスベクターを用いて、BJ、HDF、DFAT に遺伝子導入を行い、導入 36 時間後に GFP 導入効率を比較検討した。その結果、GFP 陽性細胞数は、各細胞とも 90%前後の高い導入効率を示した。

3. 幹細胞マーカーの遺伝子発現解析 (RT-PCR 法)

RT-PCR 法を用いて、BJ、HDF、DFAT および DFAT 由来 iPS 細胞の幹細胞マーカー 25 因子の遺伝子発現解析を行った。BJ、HDF は KLF4、c-MYC といった一部の幹細胞マーカーの発現が認められたが、他の多くの幹細胞マーカーは陰性であった。DFAT も BJ や HDF と同様に、多くの幹細胞マーカーは陰性であったが、REX1 や PODXL といった幹細胞マーカーの発現が認められた。DFAT から樹立した iPS

細胞では、検討した 25 因子の幹細胞マーカーすべての発現を認めた。元々発現が認められていた REX1、PODXL、GRB7 は iPS 誘導により著明に発現が増加した。

4. DFAT 由来 iPS 細胞コロニーの免疫組織学的評価

作製した DFAT 由来の iPS 細胞コロニーの免疫組織学的検討を行った。DFAT 由来 iPS 細胞コロニーは、胚性幹細胞マーカーである Oct4、Nanog、SSEA-4、Tra-1-60 が強陽性を示した。マウス胚性幹細胞マーカーとして知られている SSEA-1 は陰性であった

5. DFAT 由来 iPS 細胞の *in vitro* 多分化能の評価

DFAT 由来 iPS 細胞から胚様体を誘導し、*in vitro* における三胚葉分化能を免疫組織化学的に検討した。DFAT に由来する胚様体組織中には、内胚葉マーカーである Sox17、AFP、中胚葉マーカーである α SMA、Desmin、外胚葉マーカーである β - III tubulin が陽性を示す領域がそれぞれ認められた。

6. BJ、HDF および DFAT における iPS 細胞誘導効率の比較検討

DFAT の iPS 誘導効率を、BJ および HDF と比較検討した。各細胞の ALP 陽性コロニー数の定量グラフを図に示す。BJ、HDF、DFAT とともに遺伝子導入 11 日頃より ALP 陽性 iPS 細胞コロニーの形成が始まり、遺伝子導入 19 日頃にピークを示した。DFAT は、BJ や HDF に比べ、遺伝子導入 13 日から 20 日まで ALP 陽性コロニー数が多い傾向が認められた。統計学的にも遺伝子導入 15 日から 20 日まで連日 DFAT の ALP 陽性コロニー数は BJ のコロニー数に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$)。誘導効率 (ピーク時の ALP 染色陽性 iPS コロニー数 / 播種した iPS 細胞数) は、BJ 0.32%、HDF 0.45% に比べ、DFAT で 0.75% と 1.7~2.3 倍高かった。

【考察】

今回、ヒト DFAT にセンダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子を遺伝子導入することにより iPS 細胞を誘導することができた。ヒト DFAT から iPS 細胞を樹立したとの報告は今までになく、新規性の高い研究成果と思われる。今回樹立した DFAT 由来 iPS 細胞は、RT-PCR で検討したヒト幹細胞マーカー 25 因子において、すべての発現を認めた。また、iPS 細胞コロニーの免疫組織学的検討では、胚性幹細胞に特徴的なマーカーである OCT4, NANOG, SSEA-4 が陽性であった。また、多能性と相関するマーカーとして知られている Tra-1-60 も陽性を示した。一方、マウス ES 細胞/iPS 細胞に特徴的な糖鎖マーカーである SSEA-1 は陰性であった。SSEA-1 は、未分化段階のヒト ES 細胞や iPS 細胞では発現しておらず、分化に伴い発現してくることが報告されている⁵⁾。さらに胚様体法により分化を誘導した結果、今回樹立した iPS 細胞が全三胚葉系列への多分化能を有することが確認できた。これらの結果より、今回樹立した iPS 細胞は、完全に初期化された胚性幹細胞様の形質を有し、機能的にも未分化性の高い iPS 細胞であることが示唆された。

センダイウイルスベクターを用いた山中 4 因子導入による iPS 細胞の誘導では、DFAT はヒト繊維芽細胞に比べ、約 2 倍の効率で ALP 陽性コロニーが形成された。神経幹細胞、胎児付属物由来幹細胞、脂肪組織由来幹細胞などの体性幹細胞を細胞源とした場合、iPS 細胞の誘導効率が高くなることが報告されている⁶⁾。また神経幹細胞では c-Myc を除く 3 因子や 2 因子さらには Oct4 のみの 1 因子でも誘導可能であることが報告されている⁷⁾。今回の検討により、DFAT は繊維芽細胞に比べ、誘導前より REX1 や PODXL といった幹細胞マーカーの内発性発現を認めた。TRA-1-60, DNMT3B, REX1 は完全にリプログラミングされた iPS 細胞と不完全な iPS 細胞を識別するよいマーカーであることが報告されている⁸⁾。DFAT は繊維芽細胞に比べ多分化能があり、胚性幹細胞に近い形質であると考えられるため、iPS 細胞になりやすい性質があると考えられる。今後、山中 4 因子の遺伝子導入数を減らしたり、フィーダーフリーで誘導できるかを検討する価値がある。

DFAT を iPS 細胞の細胞源として用いる有益性として、皮膚繊維芽細胞やケラチノサイトに比べて、採取に伴う侵襲性が低く、細胞増殖能や iPS 細胞誘導効率が高いことから移植に必要な細胞数を得るまでの期間が短くてすむこと、脂肪細胞は医療廃棄物として廃棄されているためバンク化が容易であること、エピジェネティックメモリー作用を期待して脂肪細胞の機能異常を主因とする遺伝性疾患の病態解明や治療開発に有用となる可能性があることがあげられる。

【まとめ】

本研究では、ヒト DFAT にセンダイウイルスベクターを用いて山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞の作製を試みた。その結果、ヒト DFAT から多分化能を有するフルリプログラミングされた iPS 細胞を樹立することができた。また、DFAT は iPS 細胞の標準的な供給源である皮膚繊維芽細胞に比べ、iPS 細胞コロニーの誘導効率が高いことが明らかになった。DFAT は、ヒト iPS 細胞の細胞源として各種細胞治療や創薬開発、疾患研究などに役立つ可能性が示された。

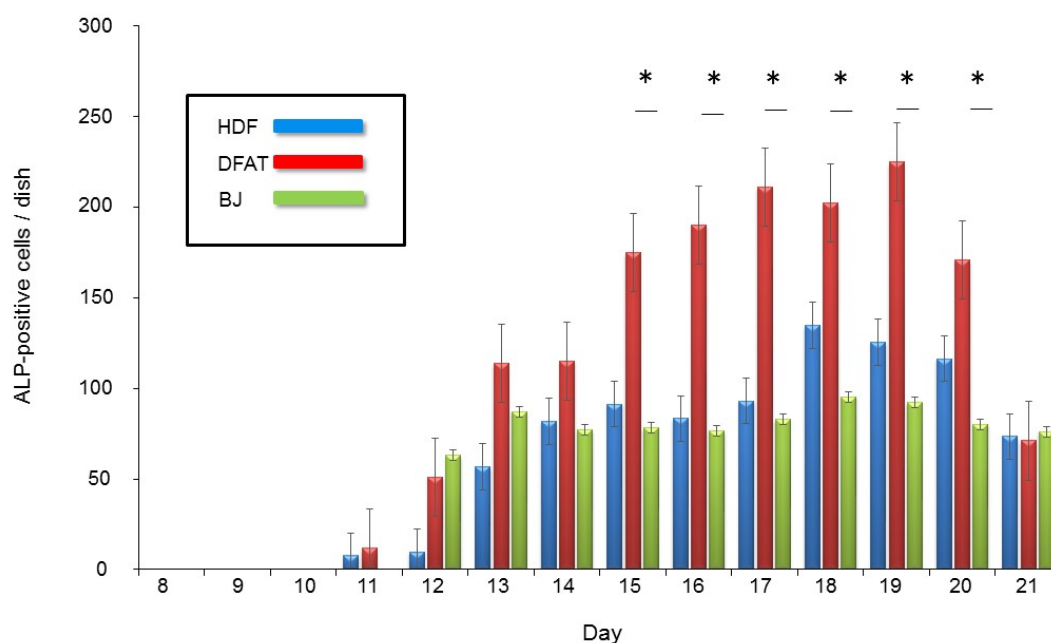


図. 各細胞における iPS 細胞コロニー誘導効率の比較

【引用文献】

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**:663-676.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**:861-872.
- 3) Kim K, Doi A, Wen B *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; **467**:285-290.
- 4) Matsumoto T, Kano K, Kondo D *et al.* Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**:210-222.
- 5) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; **26**:101-106.
- 6) Kim JB, Zaehres H, Arauzo-Bravo MJ *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells. *Nat Protoc* 2009; **4**:1464-1470.
- 7) Kim JB, Sebastiano V, Wu G *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; **136**:411-419.
- 8) Chan EM, Ratanasirinrawoot S, Park IH *et al.* Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 2009; **27**:1033-1037.