

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： iPS 細胞を用いた再生医療における造腫瘍性の対策に関する研究
2. 研究開発代表者： 小澤 敬也 (学校法人 自治医科大学 医学部)
3. 研究開発の成果

iPS 細胞を分化誘導し生体に移植することは難治性疾患に対する画期的治療法であるが、人為的にゲノム操作を加えた iPS 細胞の造腫瘍性が大きな課題として残されている。本研究では、挿入変異発癌の可能性を極力排除した部位特異的遺伝子組み込み法により自殺遺伝子を iPS 細胞に導入し、トラブル発生時には細胞死を誘導できる fail safe システムを確立する。部位特異的遺伝子組み込み法は、非病原性のアデノ随伴ウイルスが第 19 番染色体の AAVS1 領域に特異的に組み込まれる性質を利用する。自殺遺伝子は、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子もしくは inducible caspase 9 (FKBP12 と caspase 9 とのキメラ蛋白質、iCasp9) 遺伝子を用いた。

1) iPS細胞の遺伝子操作

iCasp9遺伝子と薬剤耐性遺伝子発現カセットを持つプラスミドをiPS細胞にトランスフェクションしiCasp9遺伝子がAAVS1へ組み込まれている5クローンを樹立した。インスレーター配列を付加したTK遺伝子発現プラスミドを用い同様に8クローンを樹立した。

2) 自殺遺伝子搭載iPS細胞のin vitroでの評価

iCasp9-iPS細胞を自殺遺伝子作動薬AP20187で処理すると30 pM以下の極めて低い濃度で死滅した。一方TK-iPS細胞も自殺遺伝子作動薬ガンシクロビルを加えると0.1 µg/mlの濃度でほぼ死滅し、iCasp9およびHSV-TKが自殺遺伝子としてiPS細胞で確実に機能することを確認できた。

3) 自殺遺伝子搭載iPS細胞のin vivoでの評価

iCasp9-iPS細胞をNOGマウスに移植し奇形腫を形成させiCasp9作動薬を投与したが、増殖スピードが低下したのみであった。DNAメチル化阻害薬パノビノスタットを併用しiCasp9作動薬を投与すると奇形腫が退縮したが、投与終了後再び増大した。一方同様にTK-iPS細胞をマウスに移植しガンシクロビルを投与したところ、TK-iPS細胞由来の奇形腫は退縮した。TK遺伝子に付加したインスレーター配列が功を奏したと考えられる。

4) iPS細胞のエピジェネティクス解析

iCasp9発現株におけるゲノムのDNAメチル化状態を解析し、導入遺伝子の発現調節領域を含め、異常なメチル化は観察されず、AAVS1への遺伝子導入操作によりエピゲノムに変化を及ぼさない事が確認できた。iCasp9抵抗性奇形腫からDNAを採取し自殺遺伝子発現用プロモーターのメチル化状態を親株と比較し、奇形腫ではメチル化が亢進していることが分かった。自殺遺伝子作動薬に対する耐性となったことの一因と考えられた。iPS細胞におけるエピジェネティック因子の発現をスクリーニングしたところ、ヒストン脱メチル化酵素LSD1とヒストン脱アセチル化酵素HDAC6の発現が低レベルに維持され、奇形腫の形成過程においてLSD1とHDAC6の発現が亢進していた。造血幹細胞におけるLSD1の強発現が前白血病幹細胞の形成に関与しており、iPS細胞の腫瘍化にも同様のメカニズムが働いている可能性がある。

5) iPS細胞のヒツジへ移植後の体内動態の解析

ヒツジ胎仔にサルES細胞を移植すると高率で(6頭中4頭)奇形腫を形成する。iCasp9搭載iPS細胞および非搭載ヒトiPS細胞を9例のヒツジ胎仔に移植した。その結果、7例で流産し、2例の産仔が得られたが、奇形腫を持ったヒツジは得られなかった。奇形腫が形成されなかった原因としては、サルとヒトの種の違い、あるいは、ES細胞とiPS細胞の違い、の2点が考えられた。