

アデノウイルスベクターを用いた ES, iPS 細胞への高効率遺伝子導入

田代 克久

Optimization of Adenovirus Vectors for Transduction in Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells

Katsuhisa TASHIRO

Laboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation,
7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

(Received May 28, 2011)

Because embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells can differentiate into various types of cells *in vitro*, they are considered as a valuable model to understand the processes involved in the differentiation into functional cells as well as an unlimited source of cells for therapeutic applications. Efficient gene transduction method is one of the powerful tools for the basic researches and for differentiating ES and iPS cells into lineage-committed cells. Recently, we have developed an adenovirus (Ad) vector for efficient transduction into ES and iPS cells. We showed that Ad vectors containing the cytomegalovirus enhancer/ β -actin promoter with β -actin intron (CA) promoter or the elongation factor (EF)-1 α promoter were the appropriate for the transduction into ES and iPS cells. We also found that enforced expression of a *PPAR γ* gene or a *Runx2* gene into mouse ES and iPS cells by an optimized Ad vector markedly augmented the differentiation of adipocytes or osteoblasts, respectively. Thus, a gene transfer technique using an Ad vector could be an advantage for the regulation of stem cell differentiation and could be applied to regenerative medicine based on ES and iPS cells.

Key words—gene transfer; adenovirus vector; embryonic stem cell; induced pluripotent stem cell; differentiation

1. はじめに

幹細胞は自己複製能と多分化能を有する細胞であり、培養条件により *in vitro* で種々の細胞に分化可能であることから、再生医療や創薬研究等への医療応用が期待されている。医療応用が期待されている幹細胞として、受精卵（胚）から樹立された胚性幹（embryonic stem: ES）細胞^{1,2}や生体に存在する間葉系幹細胞³、そして体細胞に 4 あるいは 3 種類の遺伝子（Oct-3/4, Sox2, Klf4, (c-Myc)）を導入することにより作製された人工多能性幹（induced pluripotent stem: iPS）細胞^{4,5}などが挙げられる。これらの幹細胞を医療へ応用するには、幹細胞から目的とする機能細胞を効率よく分化誘導する技術の確立が必須であるが、サイトカインや増殖因子等の

液性因子のみを用いたこれまでの分化誘導法では、分化効率が十分とはいえない。そこで、われわれは幹細胞へ分化関連遺伝子を導入することにより、機能細胞を高効率に誘導できるのではないかと考え研究を進めてきた。今回、ES 細胞、iPS 細胞へ高効率に遺伝子導入可能なアデノウイルス（Ad）ベクターを最適化するとともに、本 Ad ベクターを用いて機能遺伝子を導入した際の分化効率について評価したので、その結果を紹介する。⁶⁻⁸

2. マウス ES, iPS 細胞への遺伝子導入

これまでマウス ES 細胞に対しては、エレクトロポレーション法やレトロウイルスベクターなどが外来遺伝子の導入法として汎用されてきた。⁹⁻¹¹しかしこれらの方法では、導入遺伝子がランダムに染色体に組み込まれるだけでなく、細胞分化後も遺伝子発現が続き、細胞機能に影響を及ぼす可能性がある。医療への応用を考慮すると、一定の時期にのみ幹細胞に導入遺伝子を発現させて目的細胞へ分化させ、細胞分化完了後は導入遺伝子の発現が消失する

独立行政法人医薬基盤研究所創薬基盤研究部幹細胞制御プロジェクト（〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-6-8）

e-mail: tashiro@nibio.go.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会近畿支部奨励賞（生物系薬学）の受賞を記念して記述したものである。

ことが好ましい。すなわち、ES細胞やiPS細胞を含む幹細胞の分化誘導には、導入遺伝子を一過性に効率よく発現させるベクターが望まれる。この点、Adベクターは、遺伝子発現効率に優れているだけでなく、宿主染色体への遺伝子挿入を伴わないため、効率面及び安全面において“細胞分化の方向付け”を行う目的に適していると考えられる。そこで筆者らは、まずAdベクターを用いてマウスES細胞、iPS細胞への遺伝子導入法の確立を行った。まず、プロモーターの異なる4種類(RSV, CMV, CA (β アクチンプロモーターとCMVエンハンサーからなるハイブリッドプロモーター), EF-1 α)の β -ガラクトシダーゼ(LacZ)発現Adベクターを調

製した。マウスES細胞、iPS細胞へ各種Adベクターを3000 vector particles (VP)/cellの濃度で作用させてLacZ発現を解析した結果、従来の遺伝子導入実験で汎用されているRSVプロモーターやCMVプロモーターではほとんどLacZの発現が検出されず、CA及びEF-1 α プロモーターを有するAdベクターを用いることにより極めて効率よく遺伝子導入できることが明らかとなった [Fig. 1 (A)].^{7,12)}

次にAdベクターによる遺伝子導入がマウスiPS細胞の多分化能に影響を与えるかどうかを検討した。Adベクターにより外来遺伝子(mCherry)を導入したマウスiPS細胞を免疫不全マウスに皮下注射

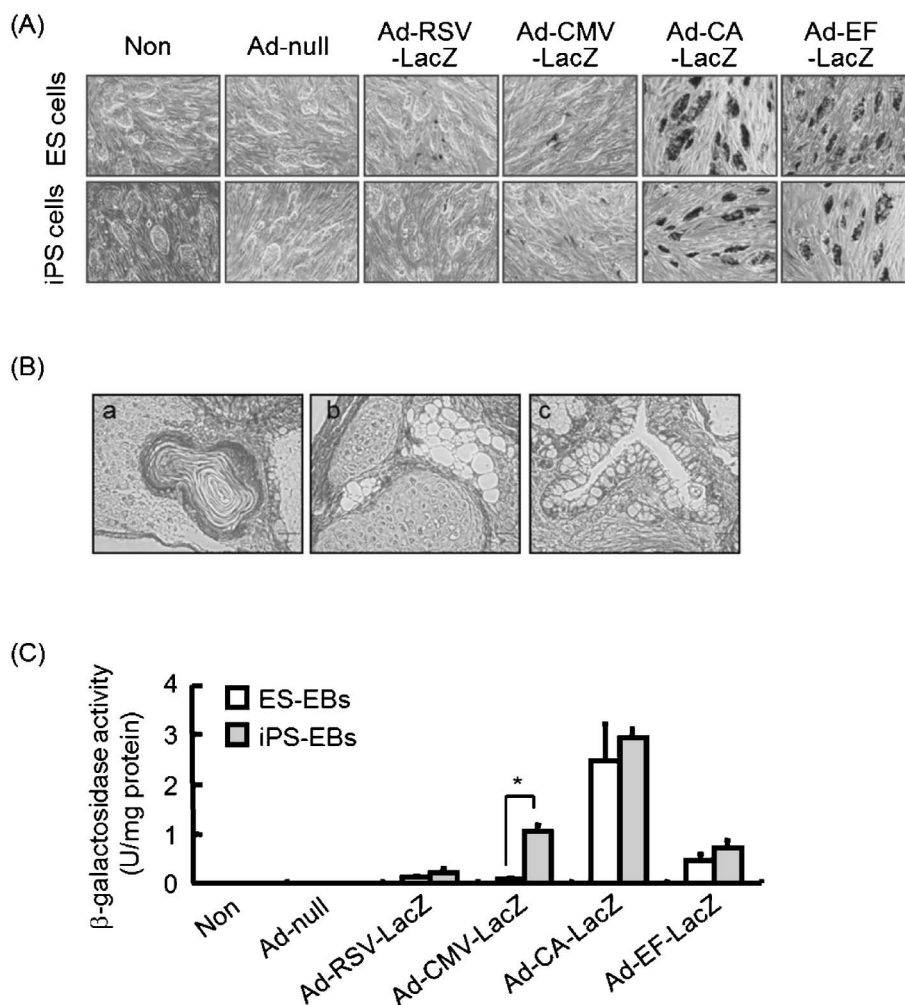


Fig. 1. Efficient Transgene Expression in Mouse ES and iPS Cells by an Ad Vector

(A) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with LacZ-expressing Ad vector at 3000 VP/cell for 1.5 h. On the following day, LacZ expression in the cells was detected by X-gal staining. Data shown are from one representative experiment of three performed. (B) Paraffin sections of the teratomas derived from Ad-CA-mCherry-treated iPS cells were prepared, and sections were stained with hematoxylin and eosin. a, ectoderm (epidermis); b, mesoderm (cartilage and adipocyte); c, endoderm (gut epithelium). (C) ES-EBs or iPS-EBs were transduced with each Ad vector at 3000 VP/cell. After 48 h, β -galactosidase luminescence assay was carried out. Results shown were the mean of five independent experiments with indicated standard deviations.

し、形成させた奇形腫を解析した。その結果、Adベクターを作用させて形成した奇形腫は、皮膚（外胚葉）、軟骨・脂肪（中胚葉）及び消化管様構造（内胚葉）などを含んでいたことから、多能性を保持していることが確認された [Fig. 1(B)].⁷⁾ なお、マウス ES 細胞においても同様の結果が得られた。したがって、Ad ベクターはマウス ES, iPS 細胞の多分化能を妨げることなく、効率よく外来遺伝子を導入可能であることが示された。

マウス ES 細胞から目的の細胞へ分化させる場合、まず、胚様体 (Embryoid body; EB) を形成させ、その後液性因子などを加えることにより目的細胞に分化させる手法が一般的である。そこで上述の LacZ 発現 Ad ベクターを用いて、ES-EB, iPS-EB

への遺伝子導入効率を評価した。その結果、ES-EB 及び iPS-EB において CA プロモーターを有する Ad ベクターを作用させた場合に最も高い LacZ 発現が観察された [Fig. 1(C)]. 以上の結果から、マウス ES, iPS 細胞、そしてこれらの細胞由来の EB への遺伝子導入には CA プロモーターを有する Ad ベクターが適していることが明らかとなった。^{6,7)}

3. 脂肪細胞、骨芽細胞への分化誘導

Ad ベクターを用いた遺伝子導入法が分化誘導系に応用可能か否か検討するため、機能遺伝子の導入を試みた。分化モデルとして ES, iPS 細胞から脂肪細胞への分化誘導を行うとともに、脂肪細胞分化に必須の PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) 遺伝子を ES, iPS 細胞へ導入することに

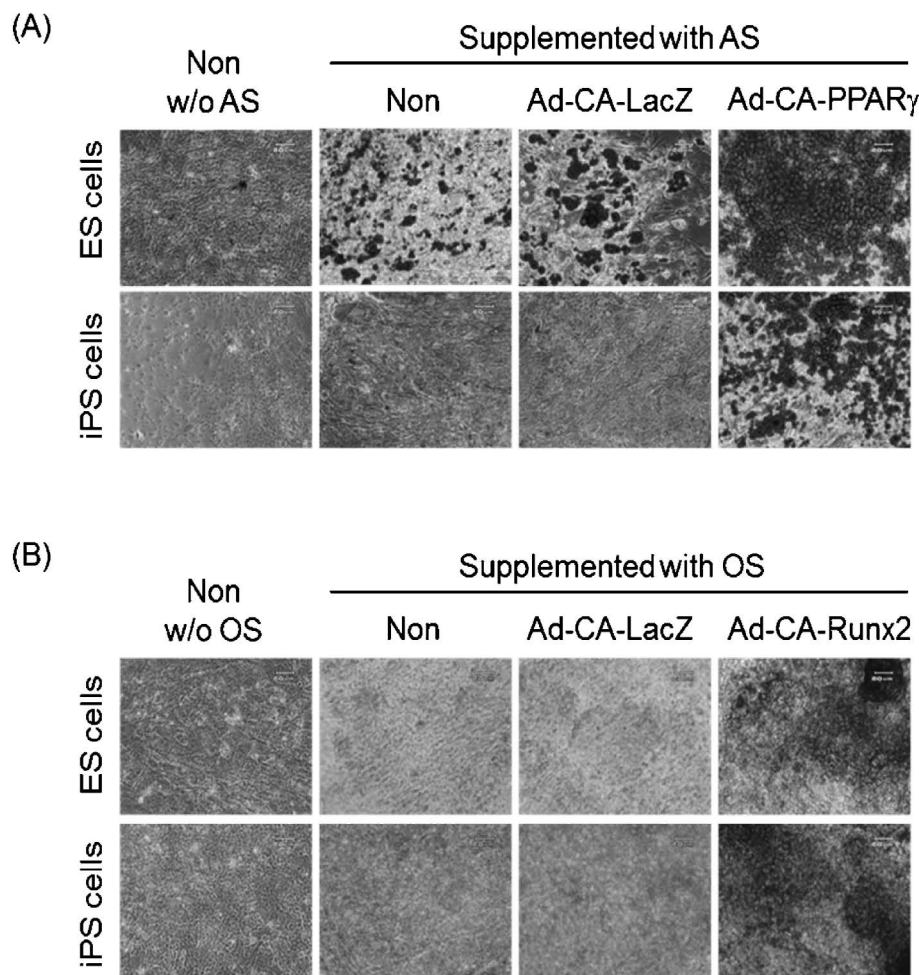


Fig. 2. Increased Adipocyte or Osteoblast Differentiation from Mouse ES and iPS Cells by Ad Vector-mediated PPAR γ Gene or Runx2 Gene Transduction

(A) ES-EBs or iPS-EBs were transduced with Ad-CA-LacZ or Ad-CA-PPAR γ . After plating onto a gelatin-coated dish on day 7, ES-EBs and iPS-EBs were cultured for 15 d in the presence or absence of adipogenic supplements (AS). After cultivation, lipid accumulation was detected by oil red O staining. Data shown are from one representative experiment of three performed. (B) ES-EBs or iPS-EBs were transduced with Ad-CA-LacZ or Ad-CA-Runx2, and were then cultured for 15 days with or without osteogenic supplements (OS). Matrix mineralization in the cells was detected by von Kossa staining. Data shown are from one representative experiment of three performed. Abbreviation; w/o, without.

より、脂肪細胞への分化効率が向上するかどうかを検討した。PPAR γ 遺伝子を ES, iPS 細胞へ導入し、脂肪細胞分化用の液性因子（インスリン等）中で培養することにより脂肪細胞への分化誘導を行った。その結果、液性因子のみを作用させる従来の誘導法では約 40% の細胞が脂肪滴を蓄積していたのに対し、PPAR γ 遺伝子の導入と液性因子を併用した誘導法では、90% 以上の細胞が脂肪滴を蓄積していた [Fig. 2(A)].^{6,7)} すなわち、マウス ES/iPS 細胞から脂肪細胞への分化効率は Ad ベクターを用いた PPAR γ 遺伝子の導入により飛躍的に改善できることが示された。

次に、骨芽細胞への分化誘導系においても、Ad ベクターによる機能遺伝子の導入した際の分化効率について検討した。Ad ベクターを用いて ES, iPS 細胞へ骨芽細胞分化のマスター遺伝子である Runx2 (Runt-related transcription factor 2) 遺伝子を導入し、 β グリセロリン酸等の液性因子を含む培地中で培養した。骨芽細胞への分化効率を解析した結果、Runx2 遺伝子を導入した ES, iPS 細胞は、液

性因子のみで培養した細胞及び LacZ 遺伝子（コントロール）を導入した細胞と比較し、石灰化した細胞が著明に増加していること明らかとなった [Fig. 2(B)].⁷⁾ 以上の結果から、Ad ベクターを用いた Runx2 遺伝子の導入により、骨芽細胞へ効率よく分化誘導可能であることが示された。

4. ヒト ES, iPS 細胞への遺伝子導入

ヒト ES, iPS 細胞は、アルカリフォスファターゼや Oct-3/4, Nanog の発現など、マウス ES, iPS 細胞と同様の特徴を有する一方で、SSEA-4, TRA-1-60 などの分子の発現や増殖速度、継代方法など、マウス ES, iPS 細胞との性質の違いも明らかとなっている。そこで、マウス ES, iPS 細胞で確立した遺伝子導入法がヒト ES, iPS 細胞においても応用可能か否か、LacZ 発現 Ad ベクターを用いて検討した。その結果、CA 及び EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクターを作用させたヒト ES, iPS 細胞において LacZ の発現がコロニー全体でみとめられた [Fig. 3(A)].⁸⁾ なお、ヒト iPS 細胞の Oct-3/4 及び Nanog の発現は Ad ベクターによる遺伝子導入後も維

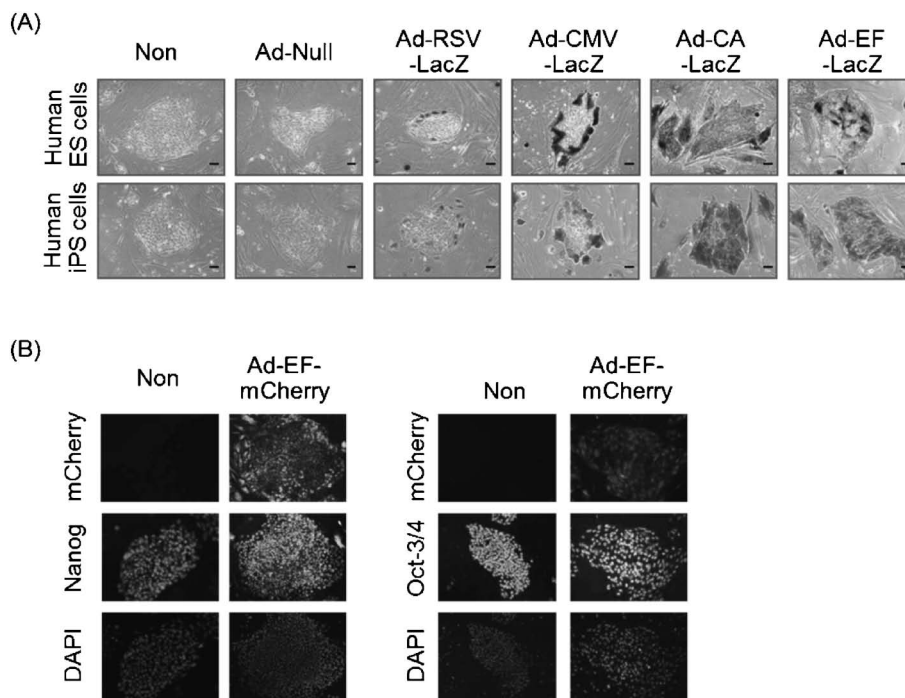


Fig. 3. Ad Vector Could Efficiently Transduce a Foreign Gene in Human ES and iPS Cells without Any Decrease in the Expression of Pluripotent Genes

(A) Human ES cells (KhES-1) and iPS cells (201B7) were passaged into culture plates in the presence of ROCK inhibitor, Y-27632. On the following day, they were transduced with LacZ-expressing Ad vectors containing various types of promoters at 3000 VP/cell for 1.5 h. Forty-eight hours later, X-gal staining was performed. Data shown are from one representative experiment of three performed. (B) Human ES cells and iPS cells were plated into culture plates using Y-27632. On the following day, they were transduced with Ad-EF-mCherry at 3000 VP/cell for 1.5 h. Two days later, the expression of Nanog (left) and Oct-3/4 (right) was detected by immunostaining.

持されていたことから、ヒト iPS 細胞は未分化を維持していることが示唆された [Fig. 3(B)].⁸⁾ したがって、マウス ES, iPS 細胞と同様に、ヒト ES, iPS 細胞への外来遺伝子の導入もプロモーターの選択が重要であること、そして CA 又は EF-1 α プロモーターがヒト ES, iPS 細胞への遺伝子導入に適していることが明らかとなった。

5. おわりに

今回、筆者らは Ad ベクターを用いたマウス ES, iPS 細胞及びヒト ES, iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の確立に成功し、さらに、Ad ベクターを利用して分化関連遺伝子をマウス ES, iPS 細胞へ導入することにより特定の細胞へ効率よく分化誘導することに成功した。なお、異なる iPS 細胞株についても今回と同様の結果が得られており、最適化された Ad ベクターによる遺伝子導入法は種々の ES, iPS 細胞株に適用可能であることが示唆されている。現在、筆者らのグループでは Ad ベクターを用いた遺伝子導入技術を駆使して ES, iPS 細胞から他の細胞種への分化誘導も行っており、肝細胞様細胞¹³⁾や血液細胞（未発表）を効率よく誘導することにも成功している。また、筆者らは Ad ベクターを用いて間葉系幹細胞、ヒト造血幹細胞への高効率遺伝子導入法も確立しており、これらの細胞を用いて医療応用を目指した研究を進めている。¹⁴⁻¹⁶⁾ 一過性発現を示す Ad ベクターを用いた ES, iPS 細胞を含む幹細胞への遺伝子導入技術は、幹細胞の分化誘導研究や再生医療研究において重要なツールになるものと考えられ、今後、ますますの応用が期待される。

謝辞 本稿で紹介した研究は、独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクトにて行われたものであり、多大なご協力を頂いた大阪大学大学院薬学研究科水口裕之教授（幹細胞制御プロジェクトチーフプロジェクトリーダー併任）、幹細胞制御プロジェクトプロジェクトリーダー川端健二先生及び大阪大学大学院薬学研究科櫻井文教准教授を始めとする関係者の皆様に深く感謝いたします。また、マウス iPS 細胞、ヒト iPS 細胞をご供与頂きました京都大学山中伸弥教授、ヒト ES 細胞をご供与頂きました京都大学中辻憲夫教授に心より感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Evans M. J., Kaufman M. H., *Nature*, **292**, 154-156 (1981).
- 2) Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M., *Science*, **282**, 1145-1147 (1998).
- 3) Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R., *Science*, **284**, 143-147 (1999).
- 4) Takahashi K., Yamanaka S., *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
- 5) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., *Cell*, **131**, 861-872 (2007).
- 6) Tashiro K., Kawabata K., Sakurai H., Kurachi S., Sakurai F., Yamanishi K., Mizuguchi H., *J. Gene Med.*, **10**, 498-507 (2008).
- 7) Tashiro K., Inamura M., Kawabata K., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Stem Cells*, **27**, 1802-1811 (2009).
- 8) Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Cell Reprogram*, **12**, 501-507 (2010).
- 9) Cherry S. R., Biniszkiwicz D., van Parijs L., Baltimore D., Jaenisch R., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7419-7426 (2000).
- 10) Kosaka Y., Kobayashi N., Fukazawa T., Totsugawa T., Maruyama M., Yong C., Arata T., Ikeda H., Kobayashi K., Ueda T., Kurabayashi Y., Tanaka N., *Artif. Organs*, **28**, 271-277 (2004).
- 11) Tompers D. M., Labosky P. A., *Stem Cells*, **22**, 243-249 (2004).
- 12) Kawabata K., Sakurai F., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **12**, 547-554 (2005).
- 13) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue M. K., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **19**, 400-407 (2011).
- 14) Mizuguchi H., Sasaki T., Kawabata K., Sakurai F., Hayakawa T., *Biochem. Biophys. Res.*

-
- Commun.*, **332**, 1101–1106 (2005).
- 15) Sakurai F., Kawabata K., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Gene Ther*, **12**, 1424–1433 (2005).
- 16) Tashiro K., Kondo A., Kawabata K., Sakurai H., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 127–132 (2009).