

平成 31 年 4 月 26 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 0469

氏 名

坂野 公孝

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： インディアナポリス （国名： アメリカ合衆国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

ヒト iPS 細胞からの高品質な血管内皮作成技術とゲノム編集を用いた血管疾患研究

3. 派遣期間： 平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Indiana University, Herman B Wells Center for Pediatric Research

5. 所期の目的の遂行状況及び成果

本研究員の所属した米国インディアナ大学医学部の研究室（受入研究者; Mervin C. Yoder）は、培養皿上で単一細胞からでも血管内皮細胞の均一な細胞群（コロニー）を短期間で形成できるような、増殖性の高い血管内皮細胞（ECFC; Endothelial Colony-forming Cell）をヒト iPS 細胞から分化誘導する技術において世界をリードしている（Prasain et al. 2014 Nat Biotech）。本研究員は、再生医療に実際に用いる細胞の提供を計画する同研究室にて、高品質な血管内皮細胞の作成に携わり、さらにこれまで扱っていなかったゲノム編集技術を本研究員が応用し、血管再生分野において有用なレポーター遺伝子の発現するヒト iPS 細胞株を作成した。本報告書では、本研究員の派遣期間内でゲノム編集技術を用いて行った研究の、遂行状況および成果について報告する。

循環血液中に存在する血管内皮細胞（Circulating ECFC）の誘導を目指したレポーターiPS 細胞の作成実験

臍帯血由来の高増殖性の血管内皮細胞（Cord blood ECFC）を培養すると、培養皿の表面から離れ、Z 軸方向に分裂し浮遊する細胞が生じる。本研究室では、その浮遊する血管内皮細胞に特異的に発現する重要な遺伝子を複数発見した（未発表データ）。本研究員は、そのうちの 1 つの遺伝子（遺伝子 A）にノックインを行った。図 1 上段のようなスキームで、遺伝子 A に特異的なガイド RNA を設計、ノックインベクターを作成し、CRISPR/Cas9 技術を用いてヒト iPS 細胞のゲノム編集を行った。Junction PCR や Outside PCR を用いて遺伝子改変アレル数を確認し、フローサイトメトリーでの RFP 蛍光タンパクの発現も確認した（図 1 左下）。さらに Cre リコンビナーゼを用いて、LoxP に挟まれたベクター由来の DNA 配列が取り除かれたことを、PCR および RFP 蛍光タンパクの発現消失によって確認した。最後に、遺伝子 A が発現することが既知である血液細胞系列にヒト iPS 細胞を分化させると、GFP の発現が確認され、遺伝子 A のノックインが問題なく生じていることがわかった（図 1 右下）。

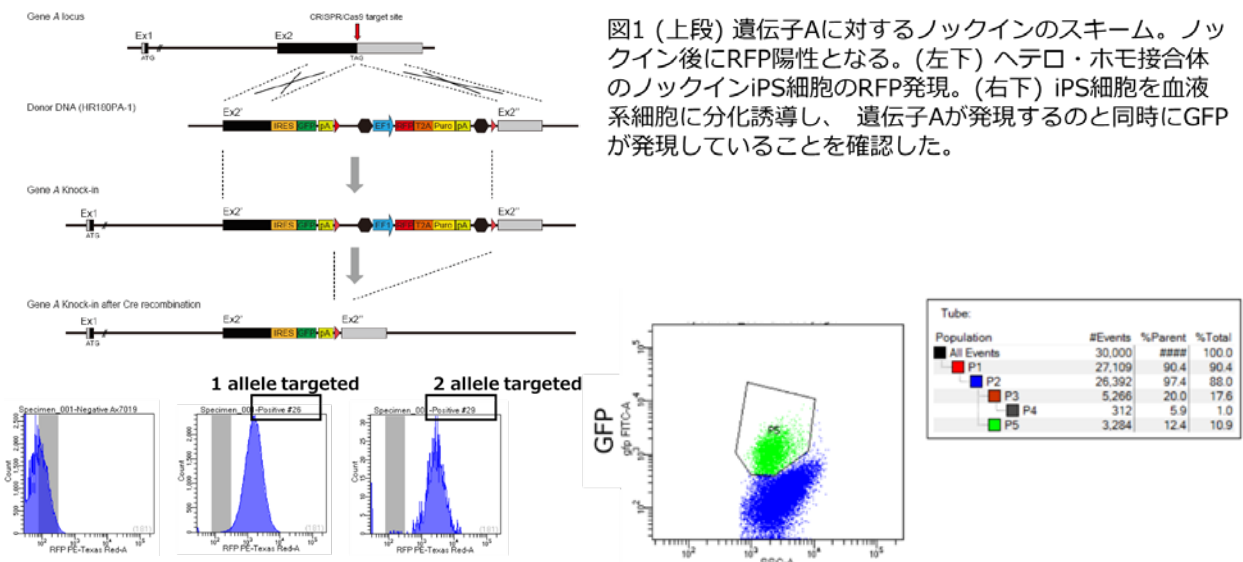


図1 (上段) 遺伝子Aに対するノックインのスキーム。ノックイン後にRFP陽性となる。(左下) ヘテロ・ホモ接合体のノックインiPS細胞のRFP発現。(右下) iPS細胞を血液系細胞に分化誘導し、遺伝子Aが発現すると同時にGFPが発現していることを確認した。

同ノックイン iPS 細胞株から高品質の ECFC を作成し、他の遺伝子の過剰発現や各種サイトカインなどを用いて、ECFC の培養途中で浮遊する細胞を誘導し、その GFP 発現を確認する実験は、現在も進行中である。

本実験は、**増殖性の高い血管内皮細胞が生体の循環血液中で発生するしくみ**を解明することに繋がる。最終的には、**この細胞群を生体内で誘導、もしくはヒト iPS 細胞から分化誘導して投与することができれば、虚血に関わる多くの疾患の組織修復の治療法の 1 つとなる可能性がある。**

蛍光タンパク発現ヒト iPS 細胞の作成

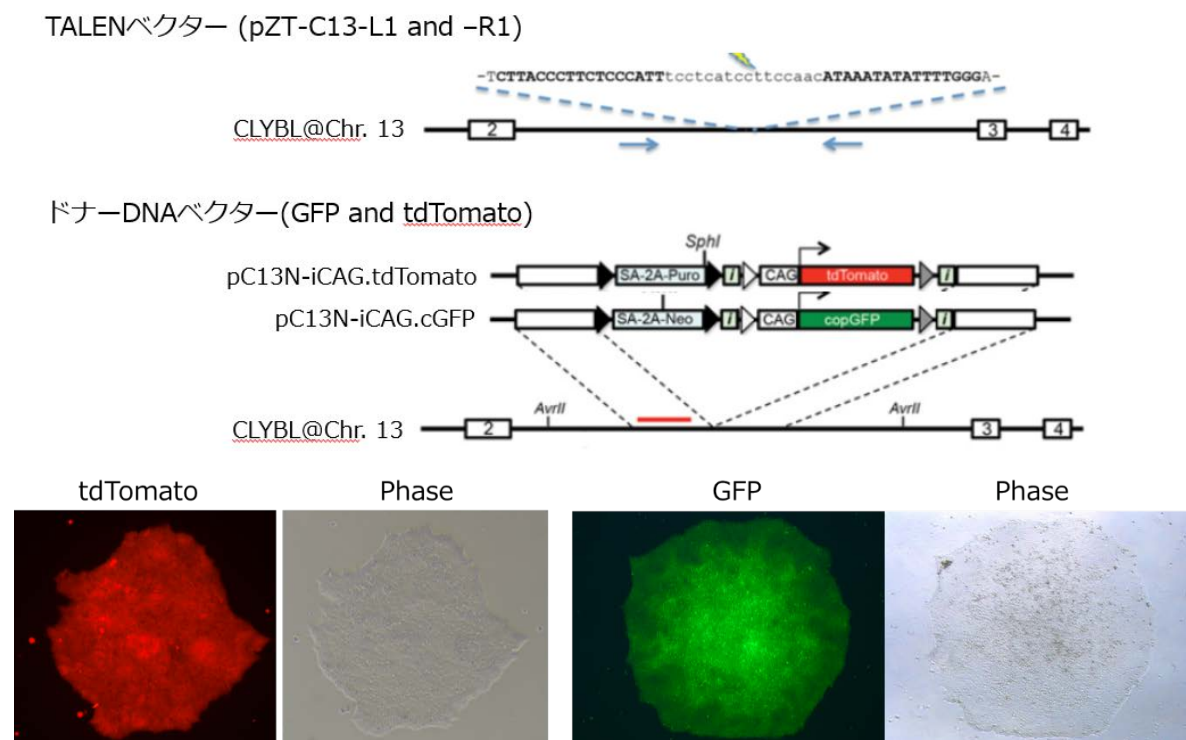
(および酸素誘導未熟児網膜症マウスモデルに対する細胞移植)

臍帯血およびヒト iPS 細胞から誘導した、高増殖性の血管内皮細胞を移植する再生医療のターゲットとなる疾患は多岐にわたる。その中で、未熟児網膜症マウスモデルは本研究室のコラボレーターである眼科医の Dr. Maria Grant の協力で、移植実験の効果が確認された疾患モデルの 1 つである。本研究者は小児科医かつ新生児科医で、日常診療経験からも未熟児網膜症の治療に繋がる研究に貢献したいと考えていたため、本疾患モデルに応用できるような細胞を提供することを検討した。

Dr. Grant らのグループは、高増殖性の血管内皮細胞（ECFC）単独よりも、臍帯血 CD34 陽性細胞と ECFC を混合した細胞（以下、Combo）が、より効果的に未熟児網膜症モデルマウスの網膜血管再生を誘導できるというデータを得ていた。そこで本研究員は、ヒト iPS 細胞自体を、その多能性を損なうことなく蛍光タンパクで標識しておき、血管内皮細胞を分化誘導して移植に用いれば、上記の Combo の移植治療の詳しい画像評価（導入した細胞の局在や CD34 陽性細胞との関係性、他の遺伝子発現の解析など）が可能になると考えた。

ヒト iPS 細胞を安全に蛍光タンパクで標識する方法としては、NIH の Dr. Jizhong Zou から分与されたドナーベクターをもとに、TALEN を用いたゲノム編集を行った。Dr. Zou が発見したヒトゲノムの新規の Safe Harbor Locus（遺伝子改変を行っても細胞表現型が影響を受けにくい遺伝子座）である、*CLYBL* 遺伝子座において、tdTomato もしくは GFP が発現できるカセットを挿入した。図 2 に今回行ったゲノム編集の実際（上段）と得られたヒト iPS 細胞（下段）を示す。

図2 *CLYBL*遺伝子におけるゲノム編集の方法（上段）と得られたヒトiPS細胞（下段）



なお、本実験については、本研究室のコラボレーターである Dr. Grant および本研究者の受入研究者である Dr. Yoder らによって共同提出し採択された RO1 の実験計画に準じて行われた。Dr. Grant は RO1 が採択されたのち、アラバマ大学に研究室を移したため、Grant Lab のポスドク研究員に蛍光タンパク標識ヒト iPS 細胞を譲渡した。ヒト iPS 細胞からの血管内皮細胞分化および移植実験は、同大学で主に行われている。