

アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた生体内短期間リプログラミングの確立

所属： 兵庫医科大学 医学部 総合診療内科学

助成対象者：庄嶋健作

概要

臓器不全に対し、移植に替わる障害を受けた臓器を積極的に再生する新規治療法が求められている。先行研究では、Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc（リプログラミング因子）を用いた人工多能性幹細胞（iPS 細胞）誘導方法を応用し、遺伝子改変マウスの生体内でリプログラミング刺激を与えること（生体内リプログラミング）で、腫瘍化を回避し、早老症マウスの寿命延長・筋再生増強に成功した。そこで本研究では、様々な病態モデルマウスで生体内リプログラミングが可能とする、アデノ随伴ウイルス(AAV)を用いたシステムを構築することで、臨床応用への道を拓くことを目指した。

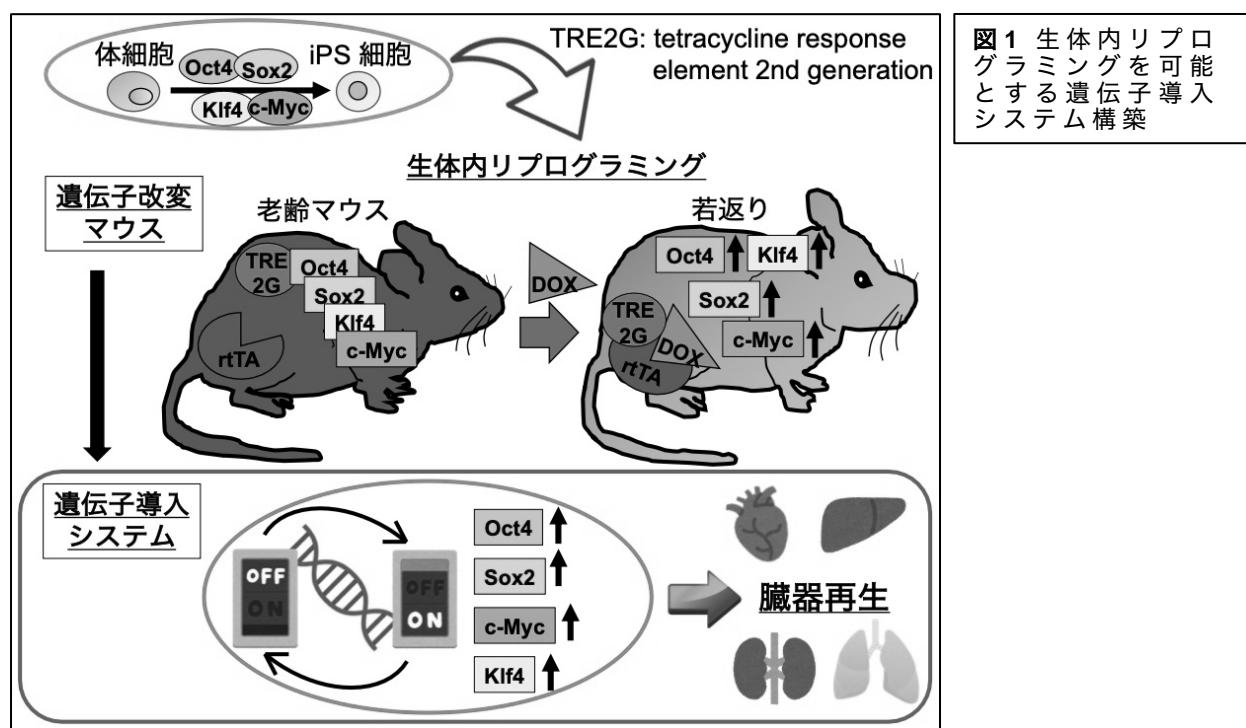
Abstract

There is a growing need for novel therapies that actively regenerate impaired organs as an alternative to organ transplantation. In a previous study, lifespan extension and enhanced muscle regeneration were achieved in a mouse model of premature aging through in vivo reprogramming, using genetically modified mice and reprogramming factors—Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc—based on the induced pluripotent stem cell (iPS cell) induction method, while avoiding tumorigenesis. The present study aims to establish an adeno-associated virus (AAV)-based system that enables in vivo reprogramming in various disease model mice, thereby paving the way for future clinical applications.

研究内容

【研究の背景・目的】

臓器不全に対し、臓器移植を除いて根本的治療はなく、対症療法に頼らざるをえない^[1]。Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (リプログラミング因子) を用いた人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 誘導方法の発見^[2]以来、生体外で準備した細胞・組織を生体内に移植する治療法の開発が試みられている^[3,4]。しかし、細胞培養・組織作製に関わる費用や時間、移植時の生着率の低さなどの問題がある。一方で、リプログラミングの過程において老化に伴う細胞の変化 (テロメアの短縮やミトコンドリア機能の低下) が消失する^[5]ことに着目し、生体内でリプログラミング刺激を加えること (生体内リプログラミング) で有益な効果を得ようと試みられている。だが生体内リプログラミングでは腫瘍が生じる^[6]といった問題があった。この問題を克服するため、申請者が所属していた留学先では、ドキシサイクリンを投与した時だけリプログラミング因子を高発現する Tet-On システムが組み込まれた遺伝子改変マウスを用いて、生体内で短期間・繰り返しリプログラミング刺激を加えること (生体内短期間リプログラミング) で、腫瘍化を回避し、早老症マウスの寿命延長・筋再生増強に成功した^[7]。そこで遺伝子改変マウスを必要としない、生体内短期間リプログラミングを効率よく行える生体内への遺伝子導入システムを構築することができれば、臨床応用への可能性を拡げることができるのでないかと考えた (図 1)。



【研究の方法】

生体内へ遺伝子導入する方法として、非病原性で遺伝子導入効率がよく、セロタインにより発現部位をコントロールすることが可能であるアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus; AAV) に着目した。リプログラミング因子及び Tet-On システムに必要なリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (reverse tetracycline transactivator; rtTA) を搭載した、高品質の AAV を作製・精製し、病態モデルマウスに投与することで、生体内短期間リプログラミングによる臓器不全に対する新たな治療戦略を確立することを本研究では目指している。

AAV が搭載できる遺伝子のサイズには制限があるため、Tet-On システムと 4 つのリプログラミング因子を導入するためには、通常 3 種類の AAV が必要となり、まずこれを作製した。論文発表前のため詳細は割愛するが、この従来型では目的を達成するに十分ではないことが予備実験で明らかになったため、より効率的に生体内短期間リプログラミングを可能とする AAV をデザインした。

改良した AAV システムを用いてリプログラミングが可能かを調べ、*in vitro* で線維芽細胞の iPS 細胞樹立に取り組む。次にマウスに投与し、DOX 投与により生体内で高発現することを確認するとともに、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）を含むテトラトーマ形成可能かを調べる。

生体内短期間リプログラミングを可能とする AAV システムを確立した後、マウスモデルで臓器再生や寿命延伸が見られるか確認していく。

【結果と考察】

本研究助成期間中に、従来型より遺伝子導入効率の良い生体内短期間リプログラミングを可能とする AAV の作製まで達成することができた。現在より優れた AAV の作製に取り組んでおり、*in vitro* での検討を今後行なっていく。

引用文献

- [1] Riedel S, et al. Procalcitonin as a marker for bacteremia and sepsis in the ED. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(2):182–9.
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of iPS cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.

- [3] Mandai M, et al. Autologous iPSC-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med.* 2017;376(11):1038–46.
- [4] Takahashi J. Stem cells and regenerative medicine for neural repair. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;52:102–8.
- [5] Mahmoudi S, Brunet A. Aging and reprogramming: a two-way street. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(6):744–56.
- [6] Ohnishi K, et al. Premature termination of in vivo reprogramming leads to cancer. *Cell.* 2014;156(4):663–77.
- [7] Ocampo A, et al. In vivo amelioration of aging hallmarks by partial reprogramming. *Cell.* 2016;167(7):1719–33.e12.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

なし

[口頭発表]

庄嶋健作、時間と資金の壁を超えて：総合診療の研究が目指す未来（パネルディスカッション：病院総合診療における研究活性化を目指して 若手医師が取り組む研究実践）、第30回日本病院総合診療医学会、広島、2025

[ポスター発表]

なし

[その他]

なし

今後研究を継続し、国内外の学会、および国際誌への投稿を予定している。