

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者： 山中 伸弥(京都大学物質・細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター センター長／再生医科学研究所 教授)

3. 研究内容及び成果：

ES細胞は様々な組織の細胞へ分化する多能性を有している。私たちはES細胞に特異的に発現し、特性維持に関与する遺伝子として*Nanog*や、*ERas*、*Fbx15*などのES cell associated transcript (ECAT)を明らかにしてきた。そこで、本研究ではES細胞の多能性維持因子の多くは体細胞の核を初期化して多能性を誘導する因子であろうという仮説を立て、体細胞からの多能性幹細胞の樹立を試みた。

### 1) マウス線維芽細胞からの多能性幹細胞の創出

ECAT を基に、多能性誘導に関与すると考えられた 24 遺伝子を多能性誘導因子候補とした。また、マウス ES 細胞に特異的に発現するが、ノックアウトしても致死とならない遺伝子、*Fbx15* に  $\beta$  geo カセットを導入し、G418 耐性を指標に多能性獲得を評価する系を構築した。レトロウイルスで  $\beta$  geo をノックインしたマウス由来の胎仔線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast、MEF) に 24 の候補因子を単一で導入していったが、G418 耐性コロニーは出現しなかった。しかし、24 因子全てを導入すると ES 細胞類似の形態を示すコロニーが得られた。ヌードマウスの皮下に、このコロニー細胞を移植すると三胚葉系の各種組織を含むテラトーマを形成したことから分化多能性を獲得していることが明らかとなった。次に 24 因子中で必須の因子を同定するために、24 因子の中から 1 因子を除いて誘導していくことで、必須 10 因子を特定できた。この 10 因子の中からさらに単一因子を除去して同様に調べたところ、MEF から多能性幹細胞を誘導するには 4 因子 (*Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*) が重要な役割を担っていることが示唆された。この 4 因子の導入によって、ES 細胞マーカー遺伝子を発現し、ヌードマウスへの移植でテラトーマを形成する多能性幹細胞を作製できた。

*Fbx15* へ  $\beta$  geo をノックインした成体マウス由来の線維芽細胞を用いても、4 因子導入によって、多能性幹細胞が得られ、これは胚盤胞に移植し子宮に移植すると胎仔発生に寄与することが明らかとなった。

これらの結果から、胎仔及び成体マウス由来の線維芽細胞に 4 因子 (*Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc*) を導入することにより、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)を樹立できることが明らかとなった。

### 2) 生殖系譜へ分化可能なiPS細胞の樹立

*Fbx15* ノックインマウス由来の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞 (*Fbx15*-iPS) は ES 細胞に似た特性をもつが、部分的に遺伝子発現や DNA メチル化様式が異なり、キメラマウス作製までは至らなかった。*Fbx15* と *Nanog* はいずれも *Oct3/4* および *Sox2* の標的であり *Nanog* のほうが多能性により深く関与すると考えられたため、*Nanog* を選択指標として iPS 細胞の樹立を行った。

マウス *Nanog* 遺伝子を有する BAC を作製し、そこに GFP-IRES-Puro<sup>r</sup> カセットを挿入した。この BAC を導入した ES 細胞は GFP を発現するが分化誘導すると GFP を発現しない。この ES 細胞からキメラマウスを作製し、*Nanog*-GFP-IRES-Puro<sup>r</sup> のトランスジェニックマウス (*Nanog* レポーターマウス) を作製した。*Nanog* レポーターマウスの MEF に、上述の 4 因子を挿入し、ピューロマイシンを含む ES 細胞培地で培養すると形態的に

ES 類似細胞を得ることができた。その細胞をヌードマウスの皮下に移植すると三胚葉に由来する種々の組織からなるテラトーマが形成され、この細胞は多能性を有することが示された。これを Nanog-iPS 細胞と命名した。Nanog-iPS 細胞は ES 細胞マーカー遺伝子を Fbx15-iPS 細胞よりも強く発現しており、レトロウイルスでゲノム挿入された外来 4 遺伝子の発現はサイレンシングされていた。

Nanog-iPS 細胞を C57BL/6 系統マウス由来胚盤胞へ移植するとキメラマウスを得られた。各組織への寄与率は 10~90%であり、細胞株によっては精巣への寄与率が高かった。キメラマウスを C57BL/6 雌と交配して得られた F1 マウスは全て黒色被毛であったが、全頭が外来因子を有し、半数が GFP-IRES-PuroR カセットを保持していた。F1 同士の交配から生まれた F2 の半数はアグーチ被毛を有しており、Nanog-iPS 細胞は生殖系列に分化することが判った。一方、Nanog-iPS 細胞由来の F1 マウスで高率に腫瘍形成を認め、これらの腫瘍では *c-Myc* の発現が再活性化されていた。

### 3) Mycなしでのマウス及びヒトiPS細胞の樹立

*c-Myc* の再活性化によりキメラマウスや F1 マウスで腫瘍が認められ、これでは将来の臨床応用において大きな課題となる。そこで Myc レトロウイルスを用いずに iPS 細胞を誘導する改良方法を検討した。

Nanog マウスを用いて4因子の各ファミリーに属する他の遺伝子やタンパク質でも iPS 細胞が誘導できるか検討していたところ、Nanog-MEF から Myc レトロウイルスなしでも ES 類似細胞を少数得られた。この細胞は、ES 細胞マーカー遺伝子を発現し、胚盤胞に移植するとキメラマウスを産生できた。Fbx15-MEF の系でも Myc なしで iPS 細胞を誘導できた。Myc なしで得られた iPS 細胞を Myc-iPS 細胞と命名した。Myc-iPS 細胞から産出されたキメラマウスの腫瘍発生を Fbx15-MEF および Nanog-MEF の両系について検討した。100 日齢まで観察したところ、4 因子を導入して作製した iPS 細胞由来のキメラマウスでは約 20%に腫瘍発生を認めたが、Myc-iPS 細胞由来のキメラマウスには腫瘍発生を認めなかった。これは Myc-iPS 細胞では、レトロウイルスがサイレンシングされているためと考えられた。また、成体マウス由来線維芽細胞からも Myc を除外しても iPS 細胞を誘導できることが明らかとなった。

### 4) 成熟マウスの肝臓および胃由来細胞からの iPS 細胞の作製

iPS 細胞の誘導効率は極めて低く、その誘導機構は不明な点がある。また、線維芽細胞から樹立した iPS 細胞に由来するキメラマウスで腫瘍形成が認められた。そのため、上皮細胞から iPS 細胞を樹立し、性状を比較検討した。

*Fbx15* ノックインマウスの肝細胞および胃上皮細胞を採取し、4 因子をレトロウイルスベクターで導入した。これらの細胞への遺伝子導入効率は MEF に比べて低いが、肝細胞および胃上皮細胞の何れからも ES 細胞類似のコロニーを得られた。継続的に培養すると、マウスの ES 細胞と形態および増殖能が類似し、ES 細胞マーカー遺伝子を発現している細胞株が得られた。この細胞株をヌードマウスの皮下に移植するとテラトーマを形成し多能性が確認できた。これらを、iPS-Hep 細胞および iPS-Stm 細胞と命名した。

*Fbx15* で選択した iPS-Hep 細胞および iPS-Stm 細胞、Nanog で選択した iPS-Hep 細胞、及び形態のみで選択した iPS-Hep 細胞を胚盤胞に移植するとキメラマウスを得られた。*Fbx15* 選択による iPS-Hep 細胞と iPS-Stm 細胞でも生殖系譜への分化が確認された。

次に iPS-Hep 細胞、iPS-Stm 細胞、iPS-MEF 細胞由来マウスのそれぞれの腫瘍発生を比較した。iPS-MEF 細胞由来キメラマウスを 30 週間観察したところ、約 30%のマウスに腫瘍発生を認めた。これに対し、iPS-Hep 細胞および iPS-Stm 細胞由来のキメラマウスでは腫瘍発生は認められなかった。iPS-MEF 細胞由来キメラマウスの F1 では 30 週までに約 20%で腫瘍が発生したのに対し、iPS-Hep 細胞および iPS-Stm 細

胞に由来するキメラマウスの F1 では4因子導入による iPS 細胞にも関わらず、同観察期間に腫瘍発生を認めなかった。iPS-Hep 細胞および iPS-Stm 細胞のゲノムにおけるレトロウイルス挿入は、iPS-MEF 細胞よりも少なく、また挿入部位には共通性はなかった。以上から、上皮細胞由来 iPS 細胞の腫瘍原性の低さが確認されたとともに、iPS 細胞の樹立に特定の部位にレトロウイルスが挿入される必要は無いことが明らかとなった。

## 5) ヒト成人線維芽細胞からの iPS 細胞の作製

マウスの線維芽細胞や体細胞に 4 因子をレトロウイルスベクターで導入すると iPS 細胞を誘導できる。そこで、この系を用いてヒト体細胞から iPS 細胞の誘導を検討した。

白人女性の顔の皮膚由来線維芽細胞 (HDF) に、遺伝子導入効率を高めるためのレトロウイルスのレセプター遺伝子を導入しておき、その後 *Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc* をレトロウイルスで導入するとヒト ES 細胞に類似した細胞コロニーが得られた。

このコロニーから樹立した細胞は、形態と増殖能においてヒト ES 細胞に類似し、ヒト ES 細胞特異的な表面抗原と ES 細胞マーカー遺伝子の発現も認められた。また OCT3/4, SOX2, Nanog, SALL4, E-CADHERIN, および hTERT のタンパク質量はヒト ES 細胞と同等であった。

この ES 類似細胞を浮遊培養すると神経細胞、敷石様細胞、上皮細胞等に類似した多様な形態を呈し、三胚葉系の細胞へ分化していることが示された。また、*in vitro* での神経や心筋の特定組織への分化誘導も可能であった。また、この細胞を SCID マウスの皮下に移植したところ、三胚葉系の各組織を含むテラトーマを形成したことから、多分化能を獲得していることが明らかとなった。以上から、ヒト iPS 細胞樹立が確認された。

この方法で、69 歳男性の線維芽細胞類似滑膜細胞および BJ 細胞 (新生児線維芽細胞由来株) からヒト iPS 細胞を樹立できた。

## 4. 事後評価結果

### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

真に臨床応用できる多能性幹細胞の確立という提案どおりに、世界に先駆け、成し遂げた点は素晴らしく極めて高く評価される。一つの分野を切り開いた素晴らしい成果である。

ES 細胞に特異的に発現されている遺伝子群、ECAT の知見を元に、わずか 4 因子の組み合わせでマウス及びヒトの体細胞から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立することに成功した。「分化した体細胞から多能性幹細胞を得る」というブレイクスルーをもたらした。

これらの研究成果は、論文発表 (国際誌 22 件)、学会発表 (国際会議 15 件、国内 85 件)、特許出願 (国内 9 件、海外 16 件) があげられる。Nature, Science, Cell など国際的に評価の高い学術誌や、国際会議での招待講演 (36 件) など際立っている。

以下はその中の特筆すべきものである。

- 1) マウス体細胞を初期化する 4 因子 (*Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc*) を同定した。マウスについてヒトで、体細胞にその 4 因子を導入して ES 細胞に極めて近似した多能性をもつ人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立する方法を確立した。
- 2) 年齢や性を問わず、ヒトの線維芽細胞から iPS 細胞を樹立する方法を確立し、自家多能性幹細胞による再生医療へつながる重要な成果を挙げた。
- 3) *c-Myc* を除く 3 因子での iPS 細胞の作製、レトロウイルスベクターを用いない iPS 細胞の作製に成功した。これらの研究成果は、iPS 細胞の臨床応用に向けた基盤研究が着実に進展してことを示すものである。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

iPS細胞樹立に関する本研究成果は、今後の新しい再生医療、疾患原因・病態研究の発展に大きなインパクトを与えるものであり、極めて高く評価できる。また、ヒトiPSの作製と安全性の検討などが着実に進行しており、ヒト治療への道(希望)を拓いた。特に、最新の成果では、マウス細胞にプラスミドで4因子を導入し、一過性的に発現させることによりiPS細胞を誘導することに成功した。今後、より安全性の高いiPS細胞の樹立技術が確立され、再生医療に応用が可能になる日が到来することが期待される。

加えて、iPS細胞は、*in vitro*での病因論解明、治療薬の効果などの検定への応用も多いに期待できる。iPS細胞の応用としては、理想的なヒト細胞評価系として、患者に大きな負荷をかけることなく病態の解明を行うことができ、また、新薬の探索や、薬剤副作用の評価への応用が期待できる。

今後、ヒトES細胞とiPS細胞との類似点と相違点を明らかにする詳細な比較研究が必要となる。また、再生医療、疾患研究あるいは薬効評価においては、実際に使用するのはiPS細胞そのものではなく、iPS細胞から分化誘導した筋肉組織や神経組織であるため、iPS細胞からさまざまな細胞や組織に分化誘導する方法を確立しなければならない。これらの課題を克服し、画期的な医療の創出が進展することを大いに期待したい。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究の成果をふまえて平成19年11月の総合科学技術会議においてiPS細胞研究の推進・支援策が決定された。文部科学省は「iPS細胞(人工多能性幹細胞)研究等の加速に向けた総合戦略」を発表し、それを受けて科学技術振興機構は「iPS細胞等の細胞リプログラミングによる幹細胞研究戦略事業プログラム」を立ち上げた。

本研究の成果に対し、研究代表者は、平成18年度日本学術振興会賞、2007年度ドイツガン研究センター・マイエンブルグ賞、2008年度ロベルトコッホ賞、平成20年度科学技術特別賞、平成20年度中日文化賞、2008年度ショウ賞、2008年度ローゼンスティール賞、平成20年秋の紫綬褒章などを受賞した。

以上