

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成 15 年度採択研究代表者

山中 伸弥

(京都大学再生医科学研究所 教授)

「真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立」

## 1. 研究実施の概要

胚性幹 (ES) 細胞は受精後間もない胚から樹立する幹細胞であり、様々な細胞へと分化する多能性を維持したまま、長期かつ大量に培養することが可能であることから、脊髄損傷、若年性糖尿病、心不全などに対する細胞移植療法の資源として期待されている。しかし、ヒト胚利用に関する倫理的問題や移植後の拒絶反応など、問題点も多い。私たちの研究目標は成体の細胞から ES 細胞と類似した多能性幹細胞を樹立し、ES 細胞の持つ倫理的問題や拒絶反応を克服することである。これまでに、マウス線維芽細胞に、4 つの転写因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) をレトロウイルスで導入することにより、ES 細胞に類似した多能性幹細胞を樹立することに成功し、iPS (induced pluripotent stem) 細胞と命名した。今後は、同技術をヒト細胞に適用するとともに、レトロウイルスや c-Myc の使用という安全性での課題を克服し、細胞移植療法に貢献することを目指す。

## 2. 研究実施内容

ES 細胞は、分化多能性を維持したまま長期培養が可能であり、細胞移植療法の資源として期待されている。さらに核移植技術と組み合わせることにより患者専用の ES 細胞を樹立し拒絶反応を回避できる可能性がある。しかし、ヒト胚利用に対する倫理的な反対意見も大きい。分化した体細胞から ES 細胞に類似した多能性幹細胞を直接に樹立することができたなら、倫理的問題や拒絶反応を回避することができる。ES 細胞と体細胞を融合すると分化細胞ゲノムが初期化されることから、ES 細胞には初期化因子が存在していると考えられる。私たちは ES 細胞に存在する初期化因子は、多能性の維持因子と多くが重複していると考え、ES 細胞の特性維持の分子機構を解析してきた。その結果、ES 細胞における多能性の長期維持には、多能性細胞で特異的に発現している転写因子 (Oct3/4、Sox2、Nanog) に加えて、複数の癌関連遺伝子 (STAT3、 $\beta$  カテニン、c-Myc など) が関与していることが明らかになってきた。これらの知見を踏まえ、私達は初期化因子の候補として 24 因子を選定した。

また私たちは、初期化現象を薬剤への耐性に置換する実験系を構築した。初期胚と ES 細胞で特異的に発現するが、機能的には必須では無い Fbx15 遺伝子座に、 $\beta$  ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子 ( $\beta$ geo) とノックインしたマウスを作製した。ホモ変異 ES 細胞 (Fbx15 $\beta$ geo/ $\beta$ geo 細胞) は高濃度 (12mg/ml) の G418 に耐性であった。一方、Fbx15 $\beta$ geo/ $\beta$ geo マウスの体細胞は G418 感受性であり、初期化が誘導され ES 類似細胞となると薬剤耐性を獲得することが期待された。

Fbx15 $\beta$ geo/ $\beta$ geo マウス由来の胎児線維芽細胞 (MEF) に初期化因子候補をレトロウイルスにより導入し、G418 を含む ES 細胞培地で培養した。各因子を単独で導入しても G418 耐性コロニーは出現しなかった。しかし、24 因子のレトロウイルスを混合して投与すると、耐性コロニーを再現性良く得ることができた。これらのコロニーから樹立した細胞は、形態と増殖能において ES 細胞に類似し、Oct3/4、Nanog など ES 細胞マーカー遺伝子の発現も認められた。さらに ES 類似細胞をヌードマウスの皮下に移植すると、三胚葉系の各種組織を含む奇形腫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。この細胞を誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) と命名した。因子の絞り込みを行った結果、4 因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc および Klf4) が必須であることが明らかとなった。

次に、成体マウスに由来する体細胞からも iPS 細胞が誘導できるかを検討した。10 から 50 週齢の Fbx15 $\beta$ geo/ $\beta$ geo マウスの尾部皮膚より線維芽細胞を単離した。前述の 4 因子をレトロウイルスで導入し、ES 細胞培養条件下で G418 による薬剤選択を行った結果、薬剤耐性コロニーが得られた。同コロニーを継続して培養すると、全例において形態上、ES 細胞と区別のつかない細胞が樹立された。ヌードマウスに移植すると三胚葉の様々な組織からなる奇形腫を形成したことから、iPS 細胞であることが証明された。さらに成体マウスに由来する iPS 細胞を胚盤胞に移植すると、その後の胎児発生に寄与することが明らかとなった。

これらの実験から、成体皮膚および胎児に由来する線維芽細胞培養から、4 因子の組み合わせにより、多能性幹細胞 (iPS 細胞) を樹立しうることが明らかとなった。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「山中伸弥」グループ

##### ①研究者名

山中 伸弥(京都大学再生医科学研究所 再生誘導研究分野 教授)

##### ②研究項目

- ES-L 細胞の培養法の最適化
- ES-L 細胞の分化能の解析
- 同定した因子の MEF 以外の細胞における初期化誘導能力の検討

- ・初期化誘導の効率をさらに高める他の因子の探索
- ・初期化因子の投与方法の検討
- ・薬剤選択の必要性の検討
- ・ヒト細胞での初期化誘導

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- Uemoto, Y., Suzuki, S., Terada, N., Ohno, N., Ohno, S., Yamanaka, S., and Komada, M. Specific role of the truncated betaIV-spectrin Sigma6 in sodium channel clustering at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Biol Chem* **282**:6548-6555, 2007.
- Nimura, K., Ishida, C., Koriyama, H., Hata, K., Yamanaka, S., Li, E., Ura, K., and Kaneda, Y. Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes Cells* **11**:1225-1237, 2006.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**:663-676, 2006.
- Tanaka, T.S., Lopez de Silanes, I., Sharova, L.V., Akutsu, H., Yoshikawa, T., Amano, H., Yamanaka, S., Gorospe, M., and Ko, M.S. Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos, germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets. *Dev Growth Differ.* **48**:381-90, 2006.
- Imamura, M., Miura, K., Iwabuchi, K., Ichisaka, T., Nakagawa, M., Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Shinohara, T., and Yamanaka, S. Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *BMC Dev Biol.* **6**:34, 2006

##### (2) 特許出願

平成 18 年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:6 件)