

「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

京都大学物質-細胞統合システム拠点／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

私たちの研究目標は、体細胞や組織幹細胞からES細胞に類似した多能性幹細胞を樹立し、拒絶反応や倫理的問題のない、理想的な細胞移植療法を実現することである。平成18年度までの研究で、4つの転写因子(Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc)をレトロウイルスベクターで導入し、Fbx15遺伝子の発現を指標に選択することにより、マウス胎児線維芽細胞(MEF)および成体尾部由来線維芽細胞(TTF)から、多能性幹細胞(iPS細胞: induced pluripotent stem cell)を誘導することに成功した(Takahashi & Yamanaka, Cell, 2006)。本年度の研究においては、iPS細胞樹立の分子機構の解明と、よりES細胞に近いiPS細胞の樹立を大目標として、具体的には次の各項目を目標(マイルストーン)として設定し、研究

を行った。

1. レトロウイルス挿入部位の決定
2. iPS 細胞の由来の探索
3. MEF および TTF 以外の細胞からの iPS 細胞誘導
4. Fbx15 以外の遺伝子発現を指標とした iPS 細胞の樹立
5. クロマチン免疫沈降による 4 転写因子の標的探索
6. ファミリー遺伝子による iPS 細胞樹立
7. 野生型マウスやラットからの iPS 細胞樹立

#### 1. レトロウイルス挿入部位の決定

iPS 細胞はこれまでのところレトロウイルスを用いた場合しか樹立できていない。また 4 因子を導入した線維芽細胞の中で iPS 細胞となるのは 1%以下である。これは、レトロウイルス挿入による第 5 の因子の活性化が iPS 細胞樹立に必要である可能性を示唆する。そこで Inverted PCR 法などを用いて、iPS 細胞における共通のレトロウイルス挿入部位を探索するとともに、iPS 細胞樹立における役割を解析した。その結果、マウス iPS 細胞のゲノムにおける因子の挿入状況にクローン間で相同性はみとめられず、iPS 細胞の誘導に、染色体の特定位置への因子導入は不要であることが示唆された。この結果得られた iPS 細胞の由来や成立の機序における知見を、今後、iPS 細胞の安全性向上に役立てていく。

#### 2. iPS 細胞の由来の探索 及び 3. MEF および TTF 以外の細胞からの iPS 細胞誘導

臨床応用を考える場合、成体に由来する細胞においても初期化を誘導することができるかが極めて重要な問題である。これまでに成熟マウスの尾部に由来する線維芽細胞であっても、同じ因子の組み合わせで iPS 細胞が樹立されることを示した。平成 19 年度においては、尾由来線維芽細胞に加えて、骨髄由来の間葉系幹細胞や、肝臓細胞、胃粘膜細胞などからの iPS 細胞樹立を試みるとともに、由来の異なる iPS 細胞の特性を比較した。

具体的には、マウス肝臓および胃の細胞から iPS 細胞を誘導した。成体マウスの肝および胃の細胞に、線維芽細胞と同じ因子を導入することにより、iPS 細胞を樹立することに成功した。iPS 細胞の樹立効率は上述のとおり低く、その由来は線維芽細胞ではなく混在する組織幹細胞である可能性がある。肝細胞からの iPS 細胞誘導時にあらかじめ表面抗原で分離した後、各分画の細胞に因子導入を行った。得られた iPS 細胞の遺伝学的な解析により、肝細胞または肝前駆細胞が iPS 細胞に変化したことを確認し、iPS 細胞は真に体細胞に由来することを明らかにした。

また、将来の臨床応用に向けて、ヒト細胞から iPS 細胞の樹立を試みた。レトロウイルスによる 4 因子導入において、実験上の安全性を考慮しつつ、ウイルスベクターの感染効率を上げる工夫することで、ヒト成人皮膚由来の線維芽細胞から iPS 細胞を得た。このヒト iPS 細胞についても、形態や増殖能に加えて、遺伝子発現パターンもヒト ES 細胞と類

似していること、神経、心筋、軟骨、脂肪細胞、腸管様内胚葉組織などの細胞へと分化することを認め、ES細胞と同様の多能性を有していることを確認した。

#### 4. Fbx15 以外の遺伝子発現を指標とした iPS 細胞の樹立

私達はこれまでに、Fbx15 以外にも多くの ES 細胞特異的発現遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたマウスを作製している。これらのマウスの体細胞から iPS 細胞の樹立を行い、選択マーカーの違いによる iPS 細胞の質の違いを解析した。具体的には、ES 細胞特異的に発現する Nanog を指標として、4 因子を導入後、培養細胞から iPS 細胞を選択した。その結果、Nanog 遺伝子を指標として樹立した iPS 細胞は、成体キメラマウスを経て全身が iPS 細胞に由来するマウスを生むことを確認し、iPS 細胞は生殖系列へも分化できることが確認できた。いわゆる Germline transmission が確認され、iPS 細胞の多能性を確認できた。一方で、ただ、これらのマウスの約 2 割において、甲状腺腫瘍の発生が観察された。この腫瘍は、4 因子のひとつである c-Myc のレトロウイルスに起因しているものと考えられた。

iPS 細胞の腫瘍形成の課題を鑑み、Myc 以外の 3 因子を用いた誘導法を検討した。その結果、成体のマウスおよび成人皮膚細胞から iPS 細胞の樹立に成功した。Myc を用いて作製したマウス iPS 細胞に由来するキメラマウス 37 匹中、6 匹のマウスは生後 100 日までに腫瘍の形成により死亡した。一方、Myc を用いずに作製した iPS 細胞に由来するキメラマウス 26 匹には、生後 100 日までは腫瘍による死亡は認められなかったことから、Myc を省略することにより安全性が向上することが明らかとなった。

また、私達はヒト皮膚細胞から、Myc を用いずに iPS 細胞を樹立することにも成功した。

#### 5. クロマチン免疫沈降による 4 転写因子の標的探索

4 因子がいかに多能性を誘導するかを明らかにするため、各因子が結合する標的遺伝子を同定する。アジレント社の Chip on Chip (クロマチン免疫沈降と DNA チップ技術を組み合わせたもの) による網羅的な解析を進めた。本研究項目については、次年度に引き続き解析を行なう。

#### 6. ファミリー遺伝子による iPS 細胞樹立

4 因子にはそれぞれ複数のファミリー遺伝子が存在する。これらの機能的に類似点と相違点の両者を有する。どのファミリー遺伝子により iPS 細胞の樹立が可能であるかを検討した。本研究項目については、次年度に引き続き解析を行う。

#### 7. 野生型マウスやラットからの iPS 細胞樹立

iPS 細胞を創薬スクリーニングや移植治療へ応用するためには Fbx15 ノックインなどの遺伝子改変マウスからではなく、野生型マウスやラットから樹立できることが重要である。

そこで、細胞播種密度の最適化や、分化細胞の増殖を抑制する薬剤の使用などにより、マーカー選択を用いない iPS 細胞樹立を試みた。本研究項目については、次年度に引き続き解析を行う。

### 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(京都大学物質-細胞統合システム拠点/再生医科学研究所、教授)

② 研究項目

1. レトロウイルス挿入部位の決定
2. iPS 細胞の由来の探索
3. MEF および TTF 以外の細胞からの iPS 細胞誘導
4. Fbx15 以外の遺伝子発現を指標とした iPS 細胞の樹立
5. クロマチン免疫沈降による 4 転写因子の標的探索
6. ファミリー遺伝子による iPS 細胞樹立
7. 野生型マウスやラットからの iPS 細胞樹立

### 4. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

1. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science* in press 2008.
2. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**:101-106, 2007.
3. Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Fibroblast Cultures. *Nat Protoc* **2**:3081-3089, 2007.
4. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**:861-872, 2007.
5. Yoshikane, N., Nakamura, N., Ueda, R., Ueno, N., Yamanaka, S., and Nakamura, M. Drosophila NAT1, a homolog of the vertebrate translational regulator NAT1/DAP5/p97, is required for embryonic germband extension and metamorphosis. *Dev Growth Differ*

49:623-634, 2007.

6. Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**:313-317, 2007.

(2) 特許出願

平成 19 年度国内特許出願件数： 0 件 (CREST 研究期間累積件数： 6 件)