

「iPS 細胞と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書

－平成21年度採択研究課題－

研究総括 西川 伸一

1. 研究領域の概要

本研究領域は、日本発となる iPS 細胞を樹立する技術によって大きなブレークスルーがもたらされと考えられる分野、すなわち、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学などを対象としている。また、これまでにない自由で創意に満ちた発想による基礎研究とともに、医療などに将来貢献できる基礎研究も対象としている。

具体的には、1)リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2)幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3)iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構解析、4)iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5)ヒト疾患モデルの構築などの研究を対象とする。

これら研究の成果は、疾患の原因の解明や新治療薬の開発に寄与するとともに、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現に向けて貢献できるものと信じている。

2. 中間評価対象の研究課題・研究者名

件数： 3件(うち、通常型2件、大挑戦型1件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月(※平成 27 年 3 月終了予定)

4. 中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(中間評価の流れ)

平成 25 年 1 月 評価会開催

平成 25 年 2 月 研究総括による中間評価

平成 25 年 3 月 被評価者への結果通知、研究計画見直し

5. 中間評価項目

(1)研究の進捗状況と今後の見込み

(2)研究成果の現状と今後の見込み

(3)大挑戦型については、さらに、大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展についても評価項目とした。

6. 研究結果(中間評価)

第二期・五年型の研究者3名については、ほぼ期待通りの研究成果が現時点で得られつつあるが、さらなる研究進展を目指して頑張っていただくとともに、今後とも最大限の研究支援を行いたいと考える。なお各研究者の現時点での研究成果とそれに対する中間評価を、以下に個別に記載する。

1. 依馬研究者「Klf ファミリーによる幹細胞機能制御の分子機構」

日本でも有数の多能性についての研究者であり、本人の研究成果自体への期待とともに、経験の少ない iPS 若手研究者を抱える本領域の中心となって、若手に様々なアドバイスを行う事を期待して採択している。期待に違わず、研究については着実に成果を上げており、Klf5 の機能解明を通して、多能性幹細胞の分子ネットワークについて独自の研究計画を着実にこなし、現時点においても満足できる業績を上げたと評価している。

2. 大日向研究者「始原生殖細胞形成機構とiPS誘導機構の統一原理」(大挑戦型)

本人の発表や報告書からだけ判断すると、すばらしい業績をあげていると評価できる。例えば、ブタ等での多能性細胞作製培養条件の確立、あるいはマウス ES/iPS からの成熟卵子の作製法の開発などは、世界レベルの業績に思える。従って、当初期待した成果をあげていると評価する事も可能である。ただ、これらの成果を世界に先駆けて論文としてまとめることは出来ておらず、その意味で正しい評価が出来るところまでは至っていない。もしこのまま論文としての発表が得られない場合は、研究自体が無に帰する事もあり得、最悪の評価で終わる恐れもある。

3. 房木研究者「センダイウイルスベクターを用いた安全なiPS細胞作製と分化誘導」

日本初の安全なiPS作製法を完成させ、多くの研究者に提供するという技術的期待で本領域に採択された。着実にベクターの改良を重ね、領域内にとどまらず、国内外の多くの研究室でこのベクターは利用されるようになって来ており、ほぼ所期の目的は達成したのではないかと考える。更に、日本初のiPS誘導のためのキットとして製品化された事も高く評価している。この成果は、論文発表にも現れており、広く使われる技術として着実に進展している。

7. 評価者

研究総括 西川 伸一 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
グループディレクター(副センター長)

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成25年3月末現在)

石野 史敏	東京医科歯科大学 難治疾患研究所・教授
岡野 栄之	慶応義塾大学 医学部・教授
相賀 裕美子	情報-システム研究機構 国立遺伝学研究所・教授
中内 啓光	東京大学 医科学研究所・教授
丹羽 仁史	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター・プロジェクトリーダー
花園 豊	自治医科大学 分子病態治療研究センター・教授
春山 英幸	第一三共 RD ノバーレ株式会社・代表取締役社長

(参考)

件数はいずれも、平成25年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	0	9	9
口 頭	6	14	20
その他	3	0	3
合 計	9	23	32

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
1	0	1

(3) 受賞等

- ・大日向 康秀
文部科学大臣表彰 若手科学者賞(平成19年)
- ・房木 ノエミ
日本遺伝子治療学会 アンジェス MG 賞(平成19年)

(4)招待講演
国際 2件
国内 4件

別紙

「iPS 細胞と生命機能」領域 中間評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成25年3月末現在) (応募時所属)	研究費(3年間) (百万円)
依馬 正次 (兼任)	Klf ファミリーによる幹細胞機能制御 の分子機構 (筑波大学 医学医療系)	筑波大学 医学医療系 准教授 (筑波大学大学院 人間総合科学 研究科 講師)	60
大日向 康秀 (専任)	始原生殖細胞形成機構とiPS誘導機 構の統一原理 (理化学研究所 発生・再生科 学総合研究センター)	(独)科学技術振興機構 さきがけ 研究者 (理化学研究所 発生・再生科 学総合研究センター 研究員)	54
房木 ノエミ (専任)	センダイウイルスベクターを用いた安 全な iPS 細胞作製と分化誘導 (ディナベック(株))	(独)科学技術振興機構 さきがけ 研究者 (ディナベック(株) 事業開発本部 リーダー)	65

研究報告書

「Klf ファミリーによる幹細胞機能制御の分子機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 依馬 正次

1. 研究のねらい

本研究は、繊維芽細胞の iPS 細胞への初期化や ES 細胞の幹細胞機能に極めて重要な転写因子である Klf5 による、内部細胞塊の ES 化の分子機構を解明するとともに、内部細胞塊から原始外胚葉への遷移の分子機構を明らかにすることである。また、ヒト iPS 細胞を、より未分化な細胞に変換することで、より扱いやすいヒト多能性幹細胞の開発を目標にしている。

2. 研究成果

(1) 概要

我々の先行研究により、転写因子 Klf5 がマウス初期胚の発生およびマウス ES 細胞の樹立に重要であることが分かっていたが、その分子基盤は殆ど不明であった。これまでの3年間の研究により、Klf5 は Fgf-FgfR-MAPK シグナルを抑制することで Nanog の発現を活性化させることを見出した。同様に、マウス ES 細胞においても Fgf シグナルに関連する遺伝子発現を制御することにより、ES 細胞の機能に寄与していることを示した。繊維芽細胞中での Klf5 を欠失させることで、山中4因子からの iPS 細胞の樹立効率が著減することから、リプログラミング過程においても、Gateway 分子として機能する Nanog の発現に関与することが推測されている。

Klf5 はマウス ES 細胞の増殖能を顕著に促進することが知られていたために、増殖能が低いヒト iPS 細胞をより増殖能が高いマウス型多能性幹細胞へと変換することを試みた。これまでに、ブタ iPS 細胞をモデル系として研究し、山中4因子によりマウス型多能性幹細胞に類似した状態に変換できることを、自治医大の花園先生との共同研究により明らかにした。

(2) 詳細

サブテーマ「マウス内部細胞塊の ES 化に関わる Klf5 下流遺伝子群の同定」

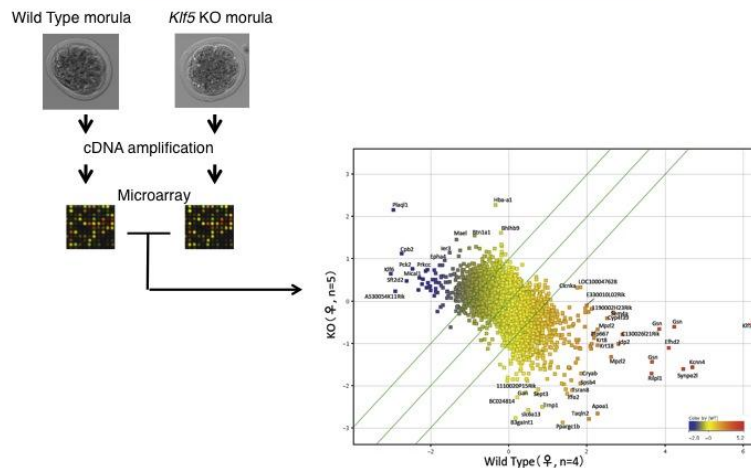
内部細胞塊の幹細胞化の分子機構を明らかにするために、内部細胞塊細胞に於ける Klf5 の下流遺伝子群を同定することが一つの目的である。これまでに、不明な点が多く残されていた Klf5 ノックアウトマウスの表現型解析を詳細に行い、E2.75 では細胞数や細胞周期の異常が全く見られないものの、E3.0 では細胞周期の遅延が見られ始めることを見出した。そこで、E3.0 の野生型胚および Klf5 KO 胚から図1のように cDNA を増幅し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、Klf5 KO 胚では Fgf-FgfR-Mapk 経路が活性化されており、それが細胞周期の遅延や細胞死の亢進に繋がっているデータを得た。通常 Klf5 KO 胚の内部細胞塊からは ES 細胞は樹立されないが、MEK 阻害薬存在下で培養することにより Nanog 陽性の細胞

の出現がレスキューされることが分かった。24 時間 MEK 阻害薬下で培養した胚盤胞から免疫手術で内部細胞塊を精製し、ES 細胞の樹立を試みたところ、野生型胚と比較して 50%程度の効率で ES 細胞を得ることが出来た。従って

Mapk 経路の阻害によって、Klf5 KO 胚からの ES 化の過程もレスキューされることが分かった。以上のことから、Klf5 は Fgf-FgfR-Mapk 経路を抑制することで、正常な多能性幹細胞の出現・維持を保証していることを解明した。達成度としては 80%程度と考えている。また、c-Myc が Max と協調す

ることで、マウス ES 細胞中での pERK 水準を調節していることを示した(論文1)。

図1 Klf5標的遺伝子の探索(3.0 dpc)



サブテーマ「Klf5 過剰発現によるヒト iPS 細胞の特性変換」

Klf5 ノックアウト ESC の遺伝子発現様式は、原始外胚葉由来幹細胞(EpiSC)と類似していることが判明している。EpiSC は、マウス ESC と異なり、ヒト ESC が持ついくつかの主要な特質(緩やかな増殖、FGF 依存性、その他遺伝子発現)を有している。マウス ESC に於いて Klf5 を強制発現させると、Fgf5 や Brachyury の発現がさらに低下し、LIF を抜いても分化しなくなることから、さらに未分化な状態に遷移したと考えられる。このようなことから、ヒト ESC に於いて Klf5 を過剰発現させた場合に、マウス ESC 様の特性(高い増殖能、その他特徴的な遺伝子発現)を獲得するのではないかと推測している。マウス ESC に極めて近い特性を獲得できない可能性もあるが、増殖が極めて早い事が知られるマウス ESC に於いて Klf5 強制発現を行うと、顕著な増殖亢進が認められることから、少なくとも増殖能の亢進は期待される。花園先生との共同研究により、キメラ形成能を有する Naïve pig iPSC(Kusabira-Orange を ubiquitous に発現するブタ線維芽細胞から樹立)について研究を行ったところ、この iPSC は Naïve 性のマーカーである STELLA を高発現し、キメラ形成能を有していることを示した。この細胞は内在性の KLF2 や KLF5 を高発現することが分かった。レトロウイルスベクター由来の Kusabira-Orange の発光強度には幅があり、強陽性細胞が存在する一方、殆ど陰性の細胞が存在することが分かった。興味深いことに、陰性の細胞では内在性の STELLA、OCT3/4、NANOG などの発現が亢進している一方、ウイルス由来の外来遺伝子の発現は低かった。Kusabira-Orange 強陽性細胞においては、遺伝子発現様式において逆の関係が見られた。これらのことから、蛍光陰性の細胞ではリプログラミングが進行しているものの、外来遺伝子の発現が低くなるため、リプログラミングが完全に進行しない可能性が考えられた(論文2)。

また、マウス型ヒト iPS 細胞の樹立後、循環器前駆細胞への分化手法を確立することを目

指している。これまでにマウスES細胞をモデル系として、Flk1 陽性多分化性細胞が心血管系細胞へと分化する機構を解析し、分泌性因子による Flk1 活性化の分子機構を解明した(論文3)。このサブテーマの達成度としては70%程度と考えている。

3. 今後の展開

今後2年間はChIP-seq解析を行うことで、Klf5が結合するゲノム領域を網羅的に同定する。既に保有するESCでのマイクロアレイ解析データと比較することで、ESCにおけるKlf5の直接下流遺伝子群を同定する。これにより、ESの未分化性維持機構およびリプログラミング機構に対する知見を得ることを試みる。これまでの共同研究により、FLAG タグ付き Klf を安定発現するマウスESCを用いて、Klf2、Klf4、Klf5と相互作用する因子を探索しており、いくつかの候補タンパク質を見つけている状況である。今後は、これらのタンパク質が実際に Klf と結合しているかどうか、協調して機能発現に寄与しているかどうか解明していく予定である。

Naïve-like pig iPSC を、真の naive 状態に変換するために必要な遺伝子のスクリーニングを行う予定である。適宜、他のサブジェクトで見出された遺伝子、シグナル伝達経路を候補遺伝子として検討し、真の naive 状態に変換できたかどうか、キメラ形成能評価することにより決定する予定である。

4. 自己評価

Klf5 が発生過程において MEK 阻害薬に類似した活性を発揮し、正常な Nanog の発現を維持することで多能性幹細胞の出現を保証していることを明らかにした。また、体細胞からのリプログラミング過程においても、内在性の Klf5 が Nanog 陽性多能性幹細胞の出現に必須であることを明らかにしており、Klf5 の機能を解明できたことを自己評価している。また、キメラ貢献能を有するブタ iPS 細胞の樹立・解析に共同研究で取り組み、ヒト Naïve iPS 細胞が直面する問題(外来性遺伝子への依存性)を再現できることを見出した。以上のことから、外来遺伝子に依存しないブタ iPS 細胞を樹立することで、より未分化なヒト多能性幹細胞の開発へと前進したと考えている。

5. 研究総括の見解

日本でも有数の多能性についての研究者であり、本人の研究成果自体への期待とともに、経験の少ないiPS若手研究者を抱える本領域の中心となっており、若手に様々なアドバイスを行う事を期待して採択している。期待に違わず、研究については着実に成果を上げており、Klf5 の機能解明を通して、多能性幹細胞の分子ネットワークについて独自の研究計画を着実にこなし、現時点においても満足できる業績を上げたと評価している。

今後の展開については、これまで進めて方向性を維持し、これまでのペースを守れば良いと思っている。領域内部での若手指導も、期待以上に行っており残りの期間、領域アドバイザーの補佐としての役割も大きいと期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, Okuda A.、Indefinite Self-Renewal of ESCs through Myc/Max Transcriptional Complex-Independent Mechanisms.、Cell Stem Cell、9、37-49、2011
2. Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. Generation of Naïve-like Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development.、Stem Cells and Development、2013、22(3): 473-482.
3. Ishitobi H., Wakamatsu A., Liu F., Azami T., Hamada M., Matsumoto K., Kataoka H., Kobayashi M., Choi K., Nishikawa S, -I, Takahashi S, Ema, M、Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse.、Development、138、5357-5368、2011

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Ema M、The role of Kruppel-like factor 5 in mouse embryonic stem cells、Biology and Pathology of Kruppel-Like Factors (KLFs), FASEB summer conference, Colorado, USA、8/12, 2010(招待講演)
2. Azami T, Matsumoto K, Jeon H, Takahashi S, Ema M、EMERGENCE OF PLURIPOTENT STEM CELLS CONTROLLED BY KLF5、10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan、6/14, 2012
3. Ema M, Jeon H, Azami T, Takahashi S, Niwa H, Matsumoto K、Role of Klf5 in the maintenance of subpopulations of mouse ES cells、10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan、6/14, 2012
4. Fujishiro S, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Matsunari H, Arai Y, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Furukawa Y, Umeyama K, Ema M, Nagashima H, and Hanazono Y、Generation of Naïve Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development.、10th Annual Meeting, International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan、6/14, 2012
5. Ema M、Klf5 functions in blastocyst development and ES cells、Biology and Pathology of Kruppel-Like Factors (KLFs), FASEB summer conference, Colorado, USA、8/5, 2012(招待講演)

研 究 報 告 書

「始原生殖細胞形成機構と iPS 誘導機構の統一原理」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 大日向 康秀

1. 研究のねらい

我々ヒトを含む哺乳動物の発生は、唯一全能性を有する単一の細胞である受精卵を起点とし、多能性状態を経て、体細胞系列及び生殖細胞系列に運命を分岐し、分化状態に到達することで個体と次世代個体の起源が形成される現象であり、細胞の状態間遷移とその反復として捉えることができる。生命環の実体としての状態間遷移現象の機構を解明し、試験管内において人為的に精密な制御下、1.全能性、2.多能性、3.生殖細胞、4.体細胞間の細胞状態の操作を可能とする事で、1)哺乳類における多能性状態支持機構、2)細胞状態間遷移機構を解明する事を目的とする。

近年の生殖細胞研究分野の進展によりマウスにおいては試験管内で多能性幹細胞(ES・iPS細胞)から胚中に出現する最も初期の生殖細胞である始原生殖細胞(PGC)様の細胞を誘導する事が可能である事が示され、これらPGC様細胞は胎仔生殖巣由来の支持細胞と凝集させ、生体内に移植を行なう事によって精子・卵母細胞形成過程に寄与できる事が判明している。しかし齧歯類を越え、ヒトを含む他の哺乳動物で多能性幹細胞から生殖細胞誘導を行なう事を考えた場合、多能性幹細胞研究分野には解決しなければならない一つの根本的問題が残されている。マウスES細胞樹立の報告より30年、ヒトES細胞の樹立の報告から10年以上が経過した今日においても、マウス、ラット等の齧歯類を越えてはキメラ貢献能、生殖細胞寄与能の指標を満たす真の多能性幹細胞は樹立されていない。近年この問題は、多能性幹細胞の性質はマウス型のES・iPS細胞が示すLIF-Jak-Statシグナル経路を介して支持され、厳密な多能性指標を満たすnaïveな状態と、ヒト型のES・iPS細胞に代表されるbFGFシグナル経路を介して支持され、より多能性準位の低いprimedな状態として概念が整理されつつある。ヒト型の多能性幹細胞の培養の煩雑さ、不安定な未分化性、細胞株間における不均一な性質等はprimedな多能性状態に起因していると考えられ、ウサギ・ブタ・サル等の大型哺乳動物を用いた医用モデル動物・遺伝子改変動物の作出も極めて困難な状況にある。これまで大型哺乳動物やヒトの初期胚を用いた細胞株の樹立実験は材料的・倫理的律速と不可分であり、十分に理想的な培養条件を検討する事が不可能であったが、今日においてはiPS技術の確立により、初期胚を破壊する事無く、体細胞から直接、多能性状態を誘導する事が可能である。独自に開発した精密なiPS樹立手法と多能性・キメラ貢献能・生殖細胞寄与能の評価系を駆使することにより、既知の細胞株樹立・培養条件に拘られる事無く、組織的に至適培養条件を探索し、現存のヒト型多能性幹細胞の欠点を克服した、生殖細胞形成能を有する新型iPS細胞株の樹立を行なう。

2. 研究成果

(1) 概要

近年の生殖細胞研究分野の進展によってマウスにおいては、試験管内において多能性幹細胞(ES・iPS細胞)より胚中に出現する最も初期の生殖細胞である始原生殖細胞(PGC)様の細胞を誘導する事が可能となっており、これら細胞は胚より得た生殖巣に由来する支持細胞と凝集させ、生体内に移植する事によって、機能的な精子・卵母細胞形成過程に寄与できる事が示されている。しかしマウス以外の動物種においては試験管内で機能的な始原生殖細胞を誘導することには未達成の課題である。今日までに様々な哺乳動物種に由来するiPS細胞株の樹立が報告されてきたが、マウス、ラット等の齧歯類を越えては高いキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能の指標を満たす多能性幹細胞株は樹立されていない。

我々は哺乳類における生殖細胞系列形成能を有するナイーブな多能性幹細胞の維持培養を可能とすることを目的に、マウス(129、NOD両系統)、ブタ(クラウン近交系)、ヒト由来初代繊維芽細胞を体細胞として用い、独自に開発したドキシサイクリン制御性piggyBAC遺伝子導入法を駆使した、iPS誘導技術、キメラ貢献能・生殖細胞寄与能評価系を適用し、導入するリプログラミング因子はOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの基本的組み合わせに固定し、培養条件(基礎培地、フィーダー細胞、コーティング、血清、血清代替試薬、培養添加物、増殖因子、化合物等)について組織的探索を行なった。

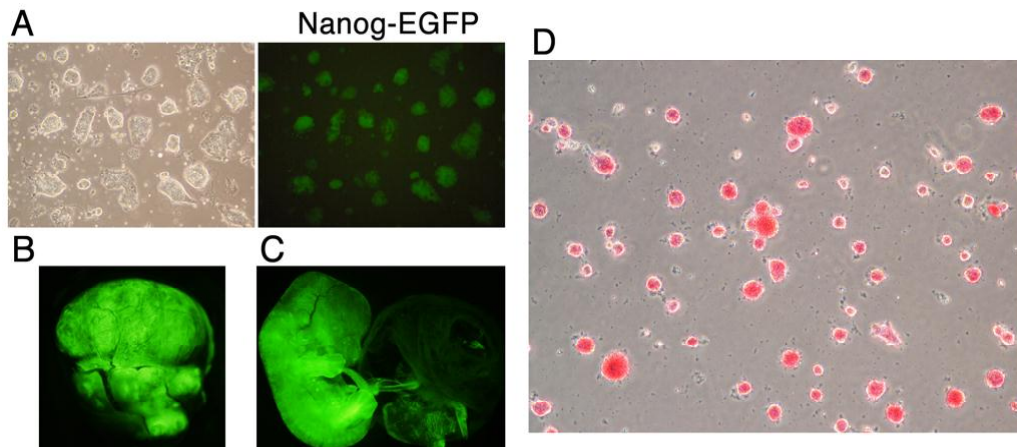
マウス(129、NOD両系統)における探索の結果、LIFを不含のいくつかの増殖因子(XY)と化合物(Z)を含む無血清培地中で多能性幹細胞様コロニーが形成され、30継代以上の維持培養が可能である事が判明した。樹立した細胞株は多能性幹細胞マーカー遺伝子を発現し、アルカリ性ホスファターゼ活性陽性であり、トリプシンによる単一細胞への解離が可能であり、メスの細胞においてはX染色体の不活性化は起きていなかった。またヌードマウスへの移植によってはテラトーマを形成した。さらに胚盤胞への注入によってはキメラ個体に貢献し、生殖細胞系列にも寄与した。

次に我々はブタ体細胞を用い、同定した新規培養条件がマウスの場合と同様に新規のiPS細胞の樹立・維持を支持できるかどうかについて検討を行った。現在までにブタにおいてもドーム状のナイーブな多能性幹細胞様の形態を示すコロニーが形成され、30継代を越えて維持培養が可能である事が分かっている。現在、これら細胞株の性質について解析を行なうと共に、ヒト体細胞を用いた場合についても同様の現象が確認できるかどうかについて検証を進めている。

(2) 詳細

我々は現在、マウス(129B6F1、NOD両系統)細胞及び実際にキメラ実験等の実施が可能で、かつ再生医療分野においても全臨床研究におけるモデル動物として有用と考えられているブタ細胞を用いてnaïve状態を有する新規多能性幹細胞の樹立と培養条件について探索を行っており、既にマウスにおいてはLIF非依存的にキメラ貢献能、生殖細胞寄与能を有するnaïveな多能性を支持可能な新規の培養条件を見出している(A, LIF非依存的に維持可能な新型マウス多能性幹細胞 B, 新型多能性幹細胞のテラトーマ形成能 C, キメラ貢献能)。また新規の培養条件においてブタにおいてもnaïveな多能性を支持可能かどうかについても検証を進めており、今後は細胞株樹立・培養条件の至適化、樹立した細胞の性質の解析を

行いたい(D, ブタ胎仔繊維芽細胞より樹立した新規多能性幹細胞様細胞株のアルカリ性ホ



スファターゼ染色)(未公表)。

本研究により「真の」多能性を有する哺乳類新型iPS細胞株を樹立する事、即ち精密な制御下で任意に体細胞-多能性状態間遷移させる技術を確立することで多能性幹細胞研究分野に残された根本的課題を解決し、生殖細胞系列寄与能を有する新型多能性幹細胞株を樹立したい。さらに樹立した細胞株を用い、再生移植医療の分野にも直接的に貢献したい。具体的には高品質で安定な多能性幹細胞株の供給、前臨床研究における医用実験モデル動物の作製等を行いたい。

3. 今後の展開

独自に同定した培養条件において、今後もウサギ、ブタ、サル、ヒト等の哺乳動物種の体細胞を用い、ナイーブな多能性幹細胞株の樹立を目指して、研究を進める。ウサギ、ブタについては得られた細胞株を胚盤胞に注入する事でキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能について評価を行う。生殖細胞系列への寄与が確認できた場合は、試験管内での生殖細胞誘導を行なう。

4. 自己評価

iPS 技術を用いる事で未知の培養条件について、組織的かつ迅速に探索する系についてはマウスにおいては非常に良く機能し、実際に新規培養条件においてナイーブな多能性を維持できており、目的を達成する事ができた。しかし、ブタ、ヒト等の動物種においては種依存的な予期せぬ問題が浮上し、機能評価を行う段階まで計画通りのスケジュールで研究を進捗させる事が困難であった。現在、それら問題点に対応し、齧歯類以外の哺乳動物においても細胞株の樹立が可能となりつつあるので、今後はそれらの性質、機能について解析を進めて行きたい。

5. 研究総括の見解

本人の発表や報告書からだけ判断すると、すばらしい業績をあげていると評価できる。例えば、ブタ等での多能性細胞作製培養条件の確立、あるいはマウス ES/iPS からの成熟卵子の作製法の開発などは、世界レベルの業績に思える。従って、当初期待した成果をあげていると評価する事も可能である。ただ、これらの成果を世界に先駆けて論文としてまとめることは出来ておらず、その意味で正しい評価が出来るところまでは至っていない。もしこのまま論文としての発表が得

られない場合は、研究自体が無に帰する事もあり得、最悪の評価で終わる恐れもある。

上述したように、今最も重要なのは、成果が公表できるかどうかである。従って、次の1年で成果の公表が出来るよう指導し、その上で再度評価を行う事が良いと考えている。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

Tsukiyama T, Asano R, Kawaguchi T, Kim N, Yamada M, Minami N, Ohinata Y, Imai H. Simple and efficient method for generation of induced pluripotent stem cells using piggyBAC transposition of doxycycline-inducible factors and an EOS reporter system. <i>Genes to Cells</i> , 2011, 16, 815-820

(2)特許出願

該当無し

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

文部科学大臣表彰 若手科学者賞 マウス始原生殖細胞形成機構及び試験管内再構築の研究(2011)

研究報告書

「センダイウイルスベクターを用いた安全なiPS細胞作製と分化誘導」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 房木 ノエミ

1. 研究のねらい

センダイウイルス(SeV)ベクターは従来のレンチ／レトロウイルスベクターと異なり、感染した宿主染色体に組み込まれず、細胞質でのみ増殖し、ヒトや霊長類に対し病原性を持たない比較的安全なウイルスを元に作製された。その外来遺伝子発現量は驚異的なほど高く、宿主遺伝子を傷つけずに発現するため、遺伝子治療やワクチンなどの臨床研究への応用が検討されている。

さて人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、初期化遺伝子を導入することにより作製され、近い将来の臨床応用を期待される画期的な新技術であるが、従来初期化因子遺伝子を染色体を傷つけるウイルスベクターにより導入されて作製され、挿入された遺伝子の思わぬ活性化によりがん化の危険性が指摘されていた。この危険性を回避するため様々な手法(プラスミド、タンパク導入、mRNA など)が検討されてきたが、発現量の低さから作製効率に問題があり、また度重なる導入が必要であるなどの問題があった。そこで上記の特長を持つ SeV ベクターを iPS 細胞作製に応用を試みたところ、著しい高効率で染色体に組み込みのない「安全な」iPS 細胞の作製に成功する事が出来た。本研究では、この手法をさらに発展させ、高効率に、より簡単にウイルスフリーの iPS 細胞を作るためにベクターを改変し、さらに様々な種類の細胞から外来遺伝子の組み込みノイズのない iPS 細胞を樹立し、疾患研究や将来の臨床研究や薬剤の開発、毒性試験などを加速化させ、また SeV ベクターを用いて高効率な分化誘導を可能とすることをねらいとする。

2. 研究成果

(1) 概要

染色体に組み込まれない「安全な」SeV ベクターを用いてより効率的な iPS 細胞誘導と分化誘導を行うことを目的として下記研究を行い、疾患患者由来 iPS 細胞の作製やバンク化を目指した HLA ホモ二重陽性細胞からの iPS 細胞の作製に成功し、外来因子フリーの安全な iPS 細胞を用いた臨床応用や遺伝子治療への応用の可能性を示した。

1. より除去しやすい SeV ベクターによる iPS 細胞の高効率樹立

2. 細胞種の拡大

線維芽細胞から血液細胞、健常細胞から疾患細胞、バンク化を視野に入れた HLA ホモ iPS 細胞の樹立、ヒト Naïve 様 iPS 細胞の樹立法の検討

3. 分化ベクターへの応用

分化ベクターの作製および共同研究を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A 「より効率的な SeV ベクターによる外来遺伝子フリー iPS 細胞の作製」

温度感受性ベクターや補助因子などを利用してより高効率化を目指した(詳細は非公開)。

研究テーマ B 「細胞種の拡大」

1. 疾患患者由来 iPS 細胞の樹立(筋ジストロフィー、FAP および FOP など)
2. 日本人の 20%をカバーする外来因子フリー歯髄細胞由来 HLA ホモ iPS 細胞の樹立
3. Naïve 様 iPS 細胞の樹立
4. 血液細胞からの iPS 細胞の樹立

上記研究を遂行し樹立方法と高効率化に成功した(詳細は非公開)。

研究テーマ C 「分化誘導への SeV ベクターの応用」

1. 血液分化
2. 共同研究

を行い分化誘導に応用可能な基礎データを得た。残り研究期間にて詳細に検討を行う。

3. 今後の展開

3年間の研究期間に於いて温度感受性ベクターを用いて幅広い細胞種から iPS 細胞を高効率に樹立することに成功した。疾患由来 iPS 細胞では疾患が再現され、新たな治療薬候補も見つかっている。後半の研究期間は SeV ベクターによる分化誘導について行う予定である。

4. 自己評価

当初の研究計画は

1. より除去しやすい SeV ベクターによる iPS 細胞の高効率樹立
2. 細胞種の拡大
3. 分化ベクターへの応用

であり、2までは3年間で確実に研究を進展させ、線維芽細胞から血液細胞、健常細胞から疾患細胞、バンク化を視野に入れた HLA ホモ iPS 細胞の樹立までカバーできている。SeV ベクターによる iPS 細胞樹立法を de facto standard にすることも目標にしており、海外などで幅広く使用されるよう配布に努力し、SeV ベクターで樹立した安全な iPS 細胞に遺伝子治療を施す共同研究論文が出ている。国内外で共同研究も進んでいる。3は一部進行中であるが、後半期間で重点的に実施する予定である。

5. 研究総括の見解

日本初の安全な iPS 作製法を完成させ、多くの研究者に提供するという技術的期待で本領域に採択された。着実にベクターの改良を重ね、領域内にとどまらず、国内外の多くの研究室でこのベクターは利用されるようになって来ており、ほぼ所期の目的は達成したのではないかと考える。更に、日本初の iPS 誘導のためのキットとして製品化された事も高く評価している。この成果は、論文発表にも現れており、広く使われる技術として着実に進展している。

iPS 樹立を目指したベクターの完成については、ほぼ達成したと言える。ただ、この技術が細胞の分化誘導などにも利用できる技術として発展できるかどうかについては、まだ具体例を示せていない。後半はこの点についても成果が得られる事が重要であると考えている。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K. Cell Stem Cell. 2010 Jul 2;7(1):11-4.
2. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Aug 23;108(34):14234-9.
3. Targeted gene correction of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordóñez A, Hannan NR, Rouhani FJ, Darche S, Alexander G, Marciniak SJ, Fusaki N, Hasegawa M, Holmes MC, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, Vallier L. Nature. 2011 Oct 12;478(7369):391-4.
4. Transgene-free disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with type 1 and type 2 diabetes. Kudva YC, Ohmine S, Greder LV, Dutton JR, Armstrong A, De Lamo JG, Khan YK, Thatava T, Hasegawa M, Fusaki N, Slack JM, Ikeda Y. Stem Cells Transl Med. 2012 Jun;1(6):451-61.
5. Pathogenic mutation of ALK2 inhibits iPS cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hohjoh H, Fusaki N, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y, Era T. Stem Cells. 2012 Nov;30(11):2437-49.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(学会招待講演)

1. 房木ノエミ、伴浩志、長谷川護:「ゲノムを傷つけない iPS 細胞の高効率作製法: センダイウイルスベクターの利用」
日本再生医療学会(広島) 2010/3/18
2. 房木ノエミ、長谷川護:「Highly efficient generation of transgene-free iPS cells using temperature sensitive Sendai virus RNA vectors.」
発生物学会(京都) 2010/6/21
3. 江良沢実、房木ノエミ:「難治性疾患由来からの iPS 細胞の樹立」
日本再生医療学会(東京・新宿) 2011/3/1
4. 房木ノエミ:「センダイウイルスを用いた染色体を傷つけない安全な iPS 細胞の作製」
iPS 細胞がもたらす未来: 染色体・体細胞 リプログラミング技術の新展開
染色体学会 第 62 回(2011 年度)年会 公開シンポジウム 2 (平塚市中央公民館)
2011/11/13

(主な学会発表)

1. 房木ノエミ、伴 浩志、佐伯晃一、田畑寿晃、長谷川 護:「細胞質型センダイウイルスベクターによる染色体を傷つけない外来因子フリーヒト iPS 細胞の作製」

日本分子生物学会(横浜) 2009/12/10 (P)

2. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa:「Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using Sendai virus vectors, the RNA virus vectors that do not integrate into the host genome.」

Keystone Symposium (Colorado, USA) 2010/2/16 (P)

3. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa.:「Simple and Efficient Preparation of Immaculate Human iPS Cells with Transgene-Free and No Chromosomal Damages Using an Extranuclear Manipulation System of Genetic Information, PlasmEx™」

13th ASGCT annual meeting, Washington DC, USA 2010/5/22 (Oral)

4. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Koichi Saeki and Mamoru Hasegawa:「TEMPERATURE SENSITIVE SENDAI VIRUS VECTORS ENABLE TO GENERATE COMPLETELY TRANSGENE-FREE HUMAN IPS CELLS EFFICIENTLY.」

ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, USA 2010/6/18 (P)

5. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa:「SIMPLE AND EFFICIENT GENERATION OF FOREIGN-GENE-FREE HUMAN iPS CELLS WITHOUT CHROMOSOMAL DAMAGE USING SENDAI VIRUS RNA VECTORS.」

日本遺伝子治療学会(宇都宮)2010/7/1, Plenary

6. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Mamoru Hasegawa, Hironobu Ihn and Takumi Era:「Comprehensive generation of intractable disease patient-specific induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors for cell banking using non-integrating Sendai virus vectors」

Keystone symposium (Santa Fe, USA) 2011/1.31 (P)

7. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Akihiro Iida, Mamoru Hasegawa, Hironobu Ihn and Takumi Era:「Efficient generation of vector/transgene free human induced pluripotent stem cells from intractable disease patients using non-integrating Sendai virus vectors」

ASGCT (アメリカ遺伝子・細胞治療学会: Seattle, WA, USA), 2011/5.18-21 (P)

8. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Akihiro Iida, Mamoru Hasegawa, Hironobu Ihn and Takumi Era:「Efficient generation of patient-specific iPSCs using temperature-sensitive Sendai virus vectors」

ISSCR (Toronto, Canada), 2011/6.16

9. N. Fusaki, H. Ban, N. Nishishita, T. Tabata, M. Shikamura, N. Takada, M. Hasegawa, S. Kawamata and S.-I. Nishikawa.「Temperature-sensitive Sendai virus vectors to generate ‘immaculate’ induced pluripotent stem cells (iPSCs).」Cell Symposia (Lisbon, Portugal) 2011/12/10

10. Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Masataka Hada, Akihiro Iida, Mamoru Hasegawa and

Ken-ichi Tezuka. 「Generation of integration-free human dental-pulp-derived iPS cells from HLA-homozygous donors.」Keystone symposia (C3) The Life of a Stem Cell: From Birth to Death. 2012/3/12

11. N. Fusaki, H. Ban, M. Hada, A. Iida, M. Hasegawa, T. Kunisada, K. Tezuka. 「Generation of integration-free human dental-pulp-derived iPS cells from HLA-homozygous donors using Sendai virus RNA vectors.」ISSCR, Yokohama, 2012/6/14

(受賞)

2011 年 日本遺伝子治療学会アンジェス MG 賞受賞

(主な著作物)

1. 房木ノエミ: 「センダイウイルスベクターによる iPS 細胞の樹立法」

Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.11, 2011, p28-31.

2. 房木ノエミ: 「センダイウイルスベクターによる血液からの iPS 細胞の誘導」

BIO Clinica (北隆館) Vol.26, No.9, 2011, p48-50.

3. 房木ノエミ: 「センダイウイルスベクターによる iPS 細胞作製法」

Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.1, 2011, p7-9.