

「iPS 細胞と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成26年度終了研究課題－

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ると考えられる分野、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. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 3件(内、大挑戦型1件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「iPS 細胞と生命機能」領域に設けた選考委員7名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>) の他、特に下記二点を重視した。

①オリジナリティー： 研究提案が分かりやすく、十分に独創的である。

②実力・可能性： 研究提案書や過去の実績から考えて、テーマ遂行に十分な実力・可能性がある。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー7名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ2課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			11件	内 訳	3年型	8件
対象数	98件	22件			5年型	3件(1件)

()内は大挑戦型としての採択数。

備考：

1)平成 21 年度採択課題のうち、5 年型課題は次の通りである。

・依馬正次研究者、大日向康秀研究者、房木ノエミ研究者

5. 研究実施期間

平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月(5年型)

6. 領域の活動状況

領域会議：12回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究成果報告会、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。

(事後評価の流れ)

平成 27 年 1 月	評価会開催
平成 27 年 2 月	研究総括による事後評価
平成 27 年 3 月	被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) 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。

9. 評価結果

第二期・五年型の研究者3名については、総じてほぼ当初の期待通りの研究成果が得られたと感じる。今後は更なる研究進展を目指し、さがけの領域で得られたネットワークも大いに活用して精進していただきたいと考える。なお各研究者の研究成果とそれに対する事後評価を、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」

もともとこの分野で堅実な業績を上げている中堅研究者で、多能性についての経験豊かな専門家として、若いさがけの研究者の相談相手になってもらうことも含めて、採択した。研究については採択当時から進めていた KLF5 と多能性についての研究を地道に進めたと評価している。残念ながら論文数は極めて少ないが、Cell Stem Cell, Development と高いレベルの雑誌に採択されており、実際の研究内容も着実で、重要性の高い貢献をしていると評価している。また期待通り、領域アドバイザーの花園教授、さがけメンバーの佐々木研究者などと共同研究を行い、成果を上げている。これ以外にも、若手研究者に的確にアドバイスをっており、十分期待の成果をあげたと評価する。

さがけ期間中に、滋賀医大動物生命科学研究センターの教授に着任し、現在はサルを用いた研究へと舵を切りつつある。iPS も含め、依馬研究者の能力が最大限に活かせるポジションであると今後の活躍を期待している。

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)

5年かけて挑戦するのに価する申し分ない研究計画が提案され、審査員全員一致で採択した。また毎回、領域会議でも常に最新データを提出しており期待を持って見守ってきた。しかし、成果論文をまとめるという点では、厳しい評価をせざるを得ない。最近の TS 細胞培養に関する PlosONE の論文は、期待が持てる。ただ、5年という期間に論文として、この研究に大きな将来があることを示せなかったことは反省する必要がある。原因を考えると、一つは極めて競争の激しい分野で、安定した研究実施場所を持たないまま、大きなグループと競争せざるを得なかったことを挙げることができるだろう。しかし、何よりもタイムリーに論文をまとめるという能力に欠けていたことが一番大きな原因だと思う。最終報告書には、将来性を感じさせる部分はあるので、今後は是非この点に集中して研究を続けて欲しいと思っている。

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」

センダイウイルスを用いる iPS 作製法を、さがけ研究者並びに、新しく iPS 研究を始めたいという世界中の研究グループに提供しつつ、方法自体を進化させるという2つのミッションを期待してさがけに採択した。論文発表には反映されていないものの、センダイウイルスに基づく方法を世界中に普及させた点、またさがけ研究者の iPS 作製を積極的に手伝った点は評価している。事実、我が国をはじめ世界中の研究者と行った共同研究が業績として記載されており、当初の期待は十分満たしたのではと思う。さらに、この技術を用いた iPS 作製キット CytoTune の商品化にこぎつけた点も評価する。商品化については研究者個人の関

題ではないが、もっと迅速に行うべきだったと感じる。現在 iPS を利用している研究室を見てみると、他の方法を凌駕できる、さらにいい上市のタイミングがあったのではと残念に思う。
共同研究だけでなく、個人研究として当初期待した、このシステムの分化誘導などへの新しい使い方の開発については、5年という十分な時間があっても関わらず、満足できる結果ではない。さがけ以後のキャリアを考えると、この個人研究の部分が一番重要であり、今後はこの点に焦点を絞って、成果をあげてほしい。

10. 評価者

研究総括 西川 伸一 JT 生命誌研究館・顧問

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 27 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 多細胞システム形成研究センター・チームリーダー
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27年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	0	22	22
口 頭	30	26	56
その他	5	2	7
合 計	35	50	85

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
2	1	3

(3) 受賞等

- ・大日向康秀 研究者
平成 23 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞 (H23.4)
- ・房木ノエミ 研究者
日本遺伝子治療学会・アンジェスMG賞 (H23.7)

(4) 招待講演

国際 2 件
国内 5 件

別紙

「iPS 細胞と生命機能」領域 事後評価実施 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 27 年 3 月末現在) (応募時所属)	研究費 (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/滋賀医科学 大学 動物生命科学研究センター)	滋賀医科大学 動物生命科学研究 センター 教授 (筑波大学大学院 人間総合科学 研究科 講師)	103
大日向 康秀 (専任)	始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/山梨大学 生命環 境学部)	(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)	100
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)/慶應義塾大学 医 学部)	(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)	97

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

繊維芽細胞などの体細胞は、山中4因子と呼ばれる Oct4、Sox2、cMyc、Klf4によって多能性幹細胞へ初期化される。初期化因子には他に Nanog、STAT3、Esrrb など転写因子が報告されているが、多くの初期化因子は、発生初期、特に胚盤胞期の多能性幹細胞の出現の段階で重要な役割を果たしている。しかしKlf4は、皮膚のバリア形成に寄与するものの初期胚発生には必要ではないことが報告されていた。我々は Klf5 という Klf4 の類似遺伝子が胚盤胞期に必須の役割を果たすことを明らかにしていた。本研究では、Klf5 に着目することで初期胚発生過程における多能性獲得機構を解明することを目指した。また、ヒト iPS 細胞はマウス iPS/ES 細胞とは形態、成長因子依存性、遺伝子発現において異なるが、低い細胞増殖率はヒト iPS 細胞を実用化する上でのボトルネックの一つであると認識される。マウス ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に相当するのに対して、ヒト ES 細胞は円筒胚の原始外胚葉に相当すると考えられている。Klf5 を始めとする Klf ファミリー遺伝子は内部細胞塊やマウス ES 細胞に高発現するものの、ヒト ES 細胞やマウス原始外胚葉幹細胞には殆ど発現していない。そこで、ヒト iPS 細胞を、Klf ファミリー遺伝子を導入することにより幼弱で増殖性の高い細胞に変換し、扱いやすいヒト多能性幹細胞の開発を目標にした。

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に必須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。これまでの研究により、Klf5 は Fgf4 の発現を抑制し、FgfR の下流のシグナルを抑制する Spry4 の発現が低下していることを見出した。さらに FgfR 阻害剤、MEK 阻害剤を添加することで、Klf5 KO 胚の表現型は殆どレスキューされた。このことから、Klf5 は Fgf-FgfR-MAPK シグナルを抑制することで Nanog 陽性の多能性幹細胞の出現を保証する役割を果たしていることを解明した。重要なことに、マウス ES 細胞においても Klf5 は Fgf シグナルに関連する遺伝子群を制御することにより、ERK リン酸化レベルを低下させる役割を担っていることを明らかにした。こうした機能は Klf2、Klf4 には見られず、Klf5 に特有の性質であった。また、原始外胚葉幹細胞に 2i(MEK 阻害薬、GSK3 β 阻害薬)、LIF 存在下において Klf2/Klf4/Klf5 はリプログラミングを誘導することが可能であるが、MEK 阻害薬非存在下においては、Klf5 が顕著なリプログラミング活性を示し、MEK 阻害に類似した効果を発揮すると推察された。

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、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」

内部細胞塊の多能性獲得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を試みた。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 Fgf4 の発現が

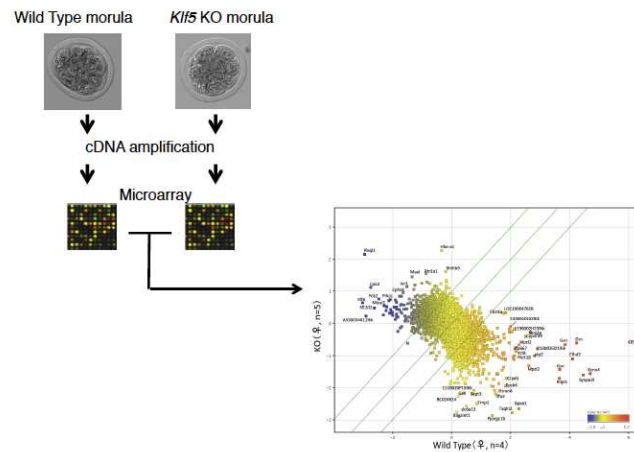


図1. マウス胚盤胞胚におけるKlf5の標的配列探索。微量のRNAからcDNAを増幅し、マイクロアレイ解析により、Fgf4が上昇していることを見出した。

亢進していること、Fgf 受容体の下流でブレーキとして作用する Spry4 の発現が低下していることを見出した。そのことから結果として 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ことが示唆された。その仮説を検証するために、FgfR 阻害剤、MEK 阻害剤存在下で Klf5 KO 胚を培養したところ、細胞周期異常は解消され、細胞数は野生型と同レベルまでレスキューされた。さらに通常 Klf5 KO 胚の内部細胞塊からは ES 細胞は樹立されないが、FgfR 阻害剤もしくは 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(図2)。24 時間 MEK 阻害薬下で培養した

胚盤胞から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 胚に見られる多能性幹細胞の発達不全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。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)。

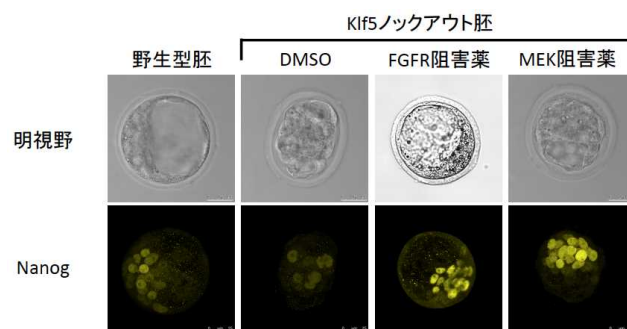


図2. FGFR阻害によるKlf5ノックアウト胚のレスキュー。Nanog陽性多能性幹細胞が正常に発生しないKlf5ノックアウトマウス胚盤胞胚をFGFR阻害、あるいはMEK阻害処理を行うことで、ほぼ表現型がレスキューされる。

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 ES 細胞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。原始外胚葉由来幹細胞は、マウス ES 細胞と異なり、ヒト ES 細胞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 ES 細胞に於いて 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移行したと考えられる。このようなことから、ヒト ES 細胞に於いて Klf5 を過剰発現させた場合に、マウス ES 細胞様の特性(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た。花園先生との共同研究により、キメラ形成能を有する Naïve ブタ iPS 細胞(Kusabira-Orange を恒常的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 iPS 細胞は 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)。

3. 今後の展開

本研究によって、げっ歯類初期胚において多能性幹細胞が出現する仕組みや、体細胞から Naïve 型多能性幹細胞が誘導される過程の一端が明らかとなった。今後は、非ヒト霊長類であるカニクイザルを利用できる施設を管理しているという利点を活かし、キメラ貢献能を有する霊長類多能性幹細胞を化合物によって誘導する方法の確立を試みる予定である。これによって、扱いやすいヒト多能性幹細胞の開発に繋げていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究目的の一つである胚発生初期における多能性獲得機構については、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することで、達成できたと考えている。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、胚発生過程および体細胞からの多能性獲得

機構の類似性を明らかに出来たと自己評価している。一方、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。しかし、外来遺伝子に依存しない Naïve 化の方法自体は樹立することが出来なかった。今後、カニクイザルなどの非ヒト霊長類多能性幹細胞をモデル系として用いて、キメラ貢献能を有する Naïve 多能性幹細胞の研究を進めていく予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

もともとこの分野で堅実な業績を上げている中堅研究者で、多能性についての経験豊かな専門家として、若いさがけの研究者の相談相手になってもらうことも含めて、採択した。研究については採択当時から進めていた KLF5 と多能性についての研究を地道に進めたと評価している。残念ながら論文数は極めて少ないが、Cell Stem Cell, Development と高いレベルの雑誌に採択されており、実際の研究内容も着実に、重要性の高い貢献をしていると評価している。また期待通り、領域アドバイザーの花園教授、さがけメンバーの佐々木研究者などと共同研究を行い、成果を上げている。これ以外にも、若手研究者に的確にアドバイスをを行っており、十分期待の成果をあげたと評価する。

さがけ期間中に、滋賀医大動物生命科学研究センターの教授に着任し、現在はサルを用いた研究へと舵を切りつつある。iPS も含め、依馬研究者の能力が最大限に活かせるポジションであると今後の活躍を期待している。

5. 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 Naive-like Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development.、Stem Cells and Development、2013, 22: 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

研究期間累積件数:0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)

- | |
|--|
| 1. 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 |
| 2. 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 |
| 3. 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 |
| 4. 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) |
| 5. Ema M, The Role of Klf5 in Pluripotent Stem Cells and Reprogramming, Biology and Pathology of Kruppel-Like Factors (KLFs), FASEB summer conference, Colorado, USA, 8/4, 2014(招待講演) |
| |

研究報告書

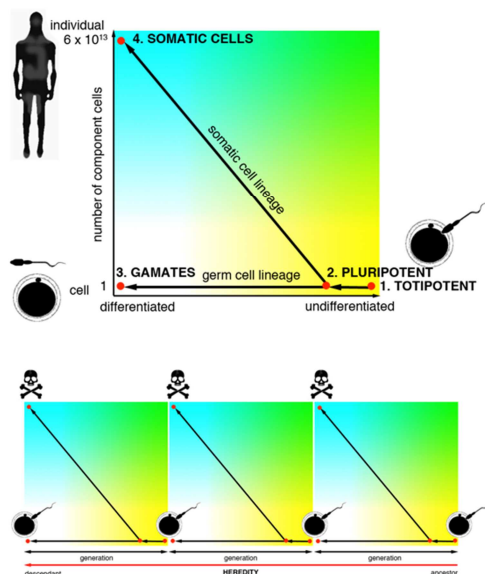
「始原生殖細胞形成機構とiPS細胞誘導機構の統一原理」

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全能性を保持する唯一つの受精卵から始まり、多能性状態を経て生殖細胞系列と体細胞系列に分離する。生殖細胞系列が究極的には精子・卵子に分化し、それらの融合によって次世代個体の再構築を担うのに対して、体細胞系列は様々な細胞種に分化し、個体を構築、恒常性を維持する。iPS 細胞の樹立により、4 つの多能性関連遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)の体細胞での発現によって多能性状態へのリプログラミングが可能であることが示された。しかし、現在においても人為的に全能性状態を他の細胞状態から誘導した報告はない。本研究においては哺乳動物における生命環を全能性、多能性、生殖細胞、体細胞間の連続した状態間遷移現象として単純化して捉え、その基本概念を解

明し、試験管内で再構築することを目的とする。具体的には、1.試験管内においてマウス ES/iPS 細胞が保持するナイーブな多能性状態から生体内のエピブラストに相当する多能性状態を誘導、2.エピブラスト様状態から PGC 様細胞を誘導、3.PGC 様細胞から卵母細胞を誘導することで、試験管内で雌性生殖細胞形成の全過程を再構築することを目指す。

受精卵は卵割を繰り返し、最初に栄養膜芽系列と内部細胞塊系列に細胞運命を分岐させる。これまでに栄養膜芽細胞からは栄養膜幹細胞(trophoblast stem cell, TS cell)、内部細胞塊からは胚性幹細胞(embryonic stem cell, ES 細胞)が樹立されている。しかしこれら幹細胞のみを用いて全能性の再構成に成功した報告はまだない。TS 細胞の樹立・維持・三次元培養法の条件を検討することによって新規 TS 細胞の樹立・培養法を確立し、ES 細胞との共培養法を用いることによって初期発生の概念を解明、試験管内再構成することを目指す。

2. 研究成果

(1)概要

多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の性質を評価する上で、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能は最も上位の指標である。これまでに樹立された多能性幹細胞株についてこれら指標を満たす質を有する株は部分である。試験管内で多能性幹細胞から生殖細胞を誘導する研究を実施する場合、用いる細胞株が十分に上質であり、上位多能性指標を満たしていることが確認されている必要がある。本研究においては piggyBAC トランスポゾンを用い、通常のプラスミドトランス

フェクションによって、ドキシサイクリン誘導性プロモーターの制御下、ポリシストロニックに連結された Oct3/4-Klf4-Sox2、c-Myc、キメラ貢献能及び精子形成過程への寄与能を可視化する CAG-TagRFP; Acr-EGFP を体細胞に導入し、iPS 細胞を誘導、更に蛍光タンパク質の発現によって非侵襲的にキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を評価することを可能とした。更に本実験系を用い、ラット iPS 細胞を誘導、マウス胚盤胞に注入することで異種キメラ動物を作製、世界で初めてマウス-ラット異種キメラ内でラット iPS 細胞由来の精子を形成させ、更に ICSI を行うことで産仔を得ることに成功した(Ref.1)。

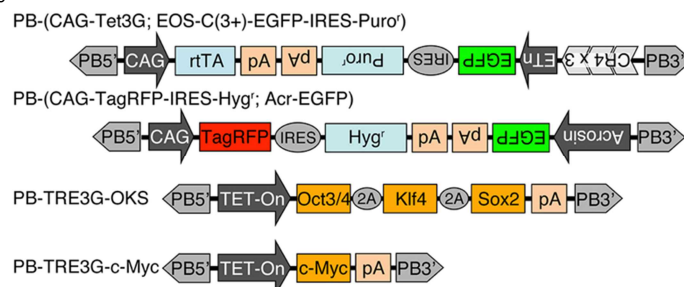
今日までに様々な哺乳動物から多能性幹細胞株(ES/iPS 細胞)が樹立されているが、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能を示す ES/iPS 細胞は齧歯類を越えては得られていない。マウス・ラット ES 細胞は LIF-Jak/Stat シグナルで指示されることが知られ、より受精卵に近いナイーブな多能性を保持している。一方、齧歯類以外の ES 細胞は FGF/Activin シグナルで支持され、より分化状態に近いプライムドな多能性を保持している。本研究ではマウスの系を用い、LIF-Jak/Stat シグナル非依存的に、プライムドな多能性を支持する培養条件を改変する事によってキメラ貢献能・生殖細胞系列寄与能を有する新規多能性状態を見出すべく解析を行った。結果、マウスにおいては化学的定義条件において、LIF 非存在下、bFGF/Activin A/CHIR99021 を添加することによって、上位多能性指標を満たす状態を維持可能であることを示した(Ref.2)。

唯一つの細胞である受精卵は分裂を繰り返し、最初に栄養膜芽系列と内部細胞塊系列に細胞運命を分岐させる。今日までにマウス初期胚より栄養膜芽細胞からは栄養膜幹細胞(trophoblast stem cell, TS 細胞)が、内部細胞塊(inner cell mass, ICM)からは胚性幹細胞(embryonic stem cell, ES 細胞)が樹立されている。TS 細胞の樹立・培養法については最初の報告以後、血清・MEF 条件培地の使用等が必須であり、未分化性も安定しなかった。本研究においては、化学的定義培地を用い、胚盤胞から生じる outgrowth の増殖因子要求性を調べ、化学的定義培養条件において新規 TS 細胞を樹立・培養することに成功した。樹立した TS 細胞は試験管内および生体内で栄養膜芽系列細胞への分化能を有していた(Ref.3)。

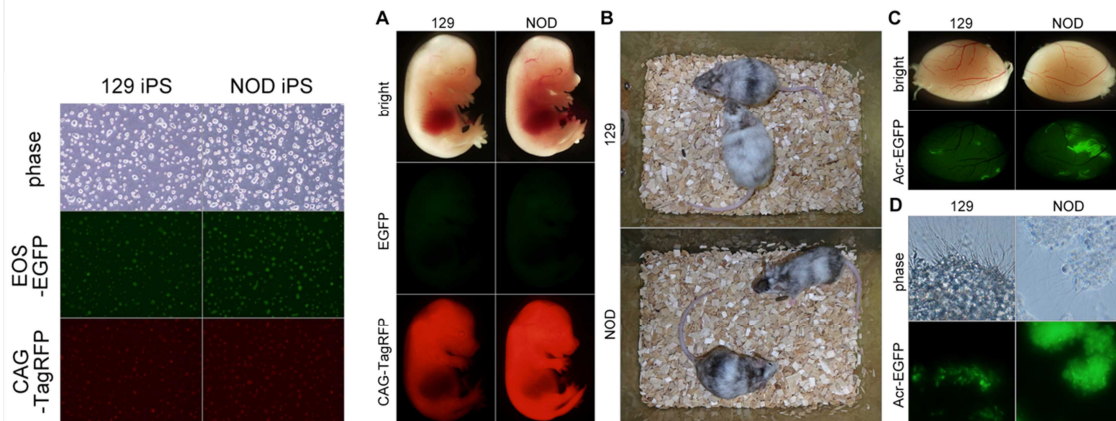
(2) 詳細

「piggyBAC トランスポゾンを用いた iPS 細胞の樹立及び非侵襲的評価系の開発」

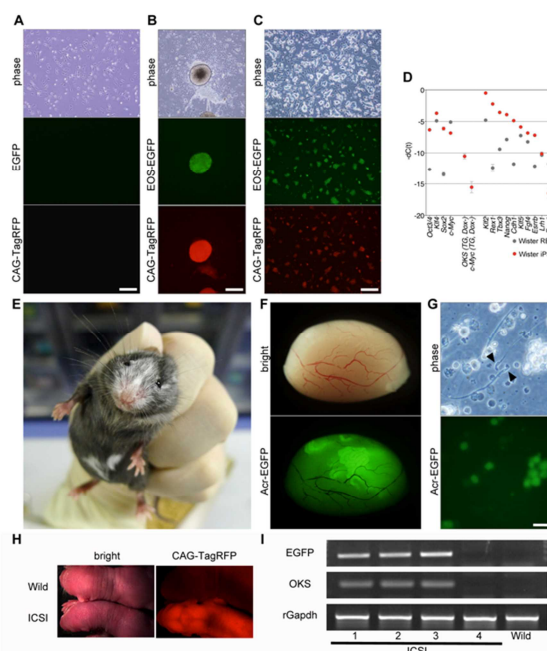
多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の性質を評価する上で、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能は最も上位の指標である。本研究においては piggyBAC トランスポゾンを用い、通常のプラスミドトランスフェクションによって、ドキシサイクリン誘導性プロモーターの制御下、ポリシストロニックに連結された Oct3/4-Klf4-Sox2、c-Myc、キメラ貢献能及び精子形成過程への寄与能を可視化する CAG-TagRFP; Acr-EGFP を体細胞に導入し、iPS 細胞を誘導、更に蛍光タンパク質の発現によって非侵襲的にキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を評価することを目的に研究を行った(下図)。



これらプラスミドを高い効率で多能性幹細胞を樹立できることで知られる 129 を遺伝的背景とするマウス胚性線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)と樹立が難しいことで知られる NOD を遺伝的背景とする MEF にトランスフェクションすることによって iPS 細胞の誘導を行い、どちらの系統を用いても十分な効率で細胞株を樹立可能であることを示した(左下図)。



また樹立した iPS 細胞はキメラ貢献能、精子形成過程への寄与能を有していた(右上図)。



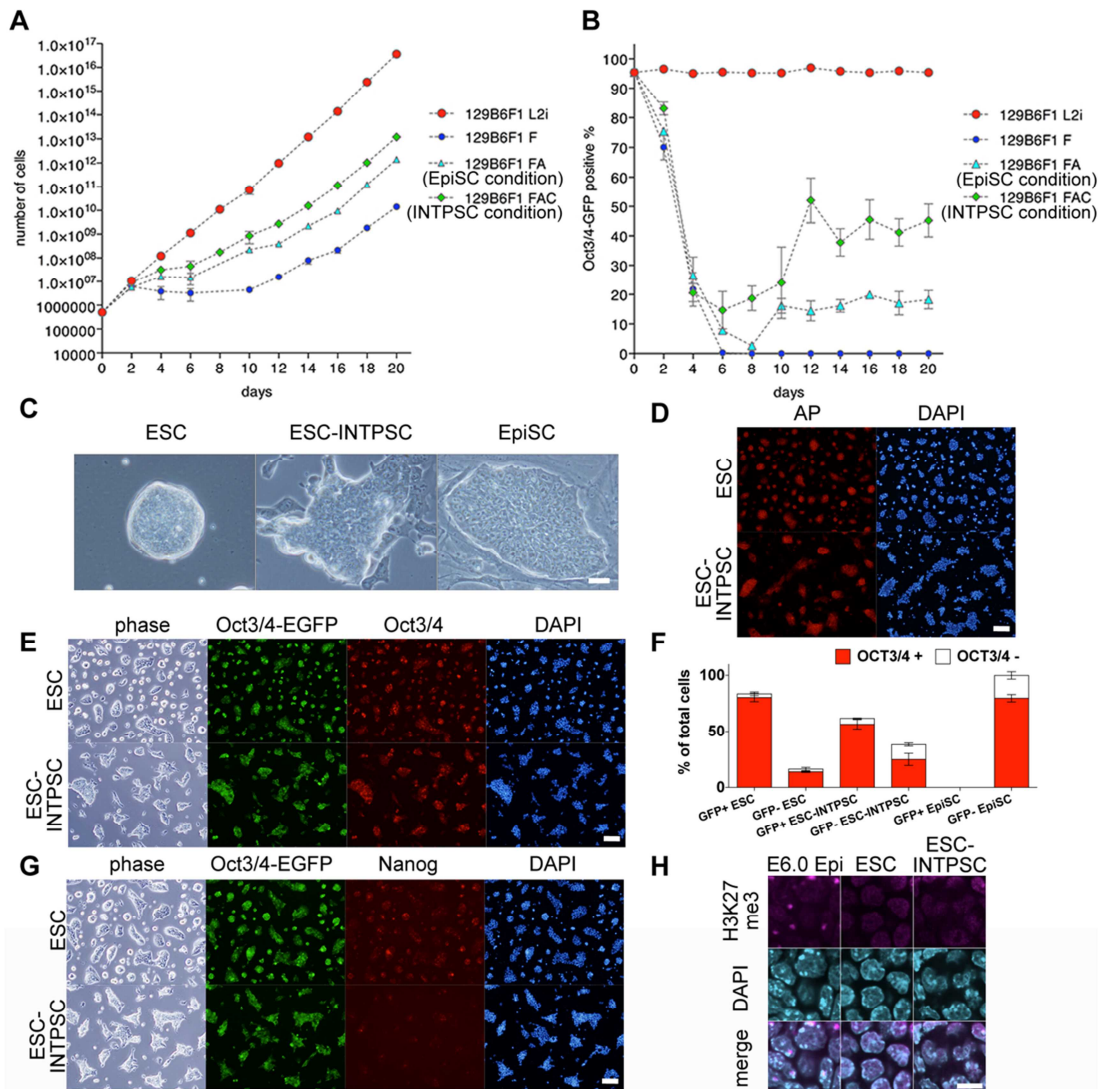
次にこの技術を用い、ラット iPS 細胞を樹立し、マウス胚盤胞に注入することでマウス-ラット異種キメラ動物を作製した(左図)。異種キメラ動物においては一般にドナー細胞の寄与率は低く、それらの精子形成過程への寄与を解析することは、従来困難であったが、本技術を用いることでドナー細胞に由来する後期精子細胞、精子を可視化することが可能となり、これらを容易に回収することもできた。これらキメラ動物内で形成されたラット精子については細胞質内精子注入法(intra-cytoplasmic sperm injection, ICSI)を実施し、正常産仔が得られることも確認できた。本研究は、マウス-ラット異種キメラ動物内でドナー細胞が精子形成過程に貢献していることを示し、更にそれらが正常な機能を

有していることを示した世界で初めての報告でもある。

「生殖細胞系列寄与能を有する新規多能性状態の探索」

今日までに様々な哺乳動物から多能性幹細胞株(ES/iPS 細胞)が樹立されているが、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能を示す ES/iPS 細胞は齧歯類を越えては得られていない。マウス・ラット ES 細胞は LIF-Jak/Stat シグナルで指示されることが知られ、より受精卵に近いナイーブな多能性を保持している。一方、齧歯類以外の ES 細胞は FGF/Activin シグナルで支持され、より分化状態に近いプライムドな多能性を保持している。またマウスにおけるプライムドな多能性状態にある細胞としてはエピブラスト幹細胞(epiblast stem cell, EpiSC)が知られるが、これらを生体内エピブラストと同様に扱っても試験管内で PGC を誘導することができない。本研

究ではマウスの系を用い、LIF-Jak/Stat シグナル非依存的に、プライムな多能性を支持する培養条件を改変する事によってキメラ貢献能・生殖細胞系列寄与能を有する新規多能性状態を支持できる培養条件の探索を行った。

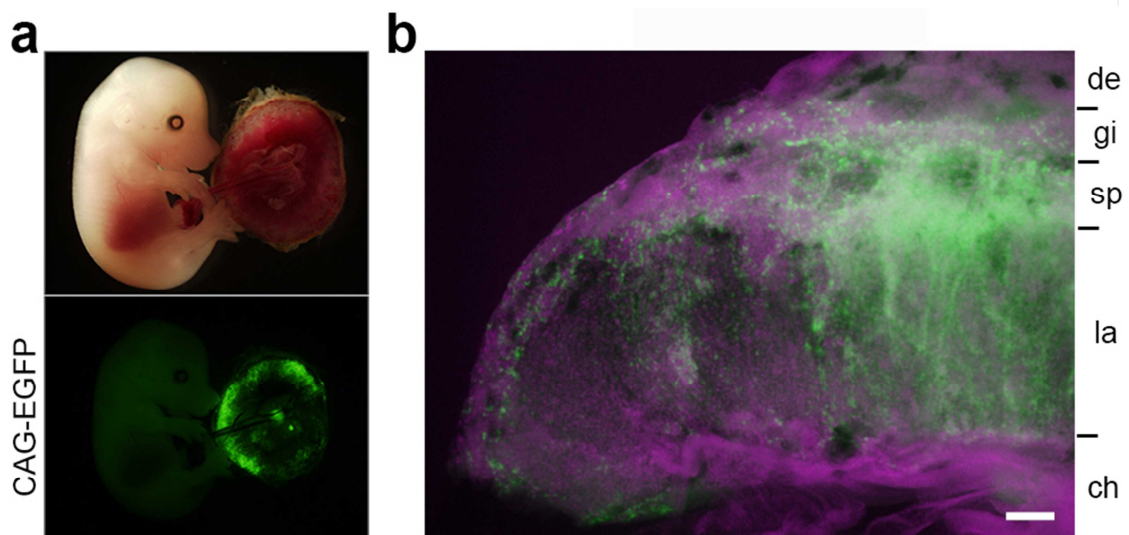


ES 細胞を様々な培養条件に適応させる実験を繰り返した結果、マウスにおいては化学的定義条件において、LIF 非存在下、bFGF/Activin A/CHIR99021 を添加することによって、EpiSC とはコロニーの形態の異なる、Oct3/4 陽性の状態で維持できることを見出し、intermediate pluripotent stem cell (INTPSC) と名付けた(上図)。INTPSC は多能性マーカー遺伝子を発現し、X 染色体の不活性化が見られず、テラトーマ形成能、キメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を有していた。本知見はナイーブな多能性を支持するためには必ずしも LIF-Jak/Stat 経路が活性化される必要はないこと、FGF/Activin シグナルを介するによっても支持され得ることを示した。本知見は齧歯類以外の哺乳動物種においてナイーブな多能性状態を維持可能な培養条件を決定するためにも有用であると考えられる。

「化学的定義培養条件における新規栄養膜幹細胞の樹立」

唯一つの細胞である受精卵は分裂を繰り返し、最初に栄養膜芽系列と内部細胞塊系列に細

胞運命を分岐させる。今日までにマウス初期胚より栄養膜芽細胞からは栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cell, TS 細胞)が、内部細胞塊(inner cell mass, ICM)からは胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES 細胞)が樹立されている。TS 細胞の樹立・培養法については Tanaka らによる最初の報告以後、血清・MEF 条件培地の使用等が必須であり、未分化性も安定しなかった。本研究においては、化学的定義培地を用い、胚盤胞から生じる outgrowth の増殖因子要求性を調べ、化学的定義培養条件において bFGF、Activin A、XAV939、Y27632 を添加することによって新規 TS 細胞を樹立・培養することに成功した。樹立した TS 細胞は典型的な未分化 TS 細胞様のコロニー形態を示し、TS 細胞マーカー遺伝子を発現していた。また栄養膜芽細胞系列の分化マーカーの発現は殆ど見られなかった。新規 TS 細胞の未分化性維持は特に bFGF、Activin A に強い依存性を示した。Y27632 は TS 細胞の生存に必要であった。また bFGF あるいは Activin A の除去によっては速やかに巨細胞、スポンジ層栄養膜芽細胞、迷宮層栄養膜芽細胞のマーカー遺伝子の発現が開始し、分化を起こした。更に胚盤胞への注入によって胎盤への特異的貢献を示し、巨細胞、スポンジ層栄養膜芽細胞、迷宮層栄養膜芽細胞の全てに分化した(下図)。本新規知見、培養技術は ES/iPS 細胞と共に初期胚を構成する細胞状態を補足した栄養膜幹細胞の特性を更に精密に解明し、胚発生能の理論を解明するために有用であると考えられる。



3. 今後の展開

初期胚において、狭義の上位全能性概念、即ち胚発生能が支持される機構について解析を進め、人為的操作を可能とする革新的発生工学技術の開発を試みる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

さがけという制度の恩恵を受け、期間中自らの発想で自由に研究を行うことができた。試験管内で全生殖細胞形成過程を再構築するという大目標については、世界的な分野の急速

な進展もあり、十分な成果をあげることはできなかったが、基盤技術は確立し、それらについて原著論文 2 報として公表することができた。また、それら分野の発展状況を鑑み、より独自色の強い研究テーマを模索し、新規栄養膜幹細胞の樹立、維持条件を同定することができ、これについても原著論文として公表し、また特許として申請することができた。今後は、これまでに確立した基盤技術を基礎に我が国の科学技術の発展、再生医療分野に波及効果をもたらすことなどによって貢献をしていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

5年かけて挑戦するのに価する申し分ない研究計画が提案され、審査員全員一致で採択した。また毎回、領域会議でも常に最新データを提出しており期待を持って見守ってきた。しかし、成果論文をまとめるという点では、厳しい評価をせざるを得ない。最近の TS 細胞培養に関する PlosONE の論文は、期待が持てる。ただ、5年という期間に論文として、この研究に大きな将来があることを示せなかったことは反省する必要がある。原因を考えると、一つは極めて競争の激しい分野で、安定した研究実施場所を持たないまま、大きなグループと競争せざるを得なかったことを挙げることができるだろう。しかし、何よりもタイムリーに論文をまとめるという能力に欠けていたことが一番大きな原因だと思う。最終報告書には、将来性を感じさせる部分があるので、今後は是非この点に集中して研究を続けて欲しいと思っている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Tsukiyama T, Kato-Itoh M, Nakauchi H, <u>Ohinata Y*</u> : A comprehensive system for generation and evaluation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition. <i>PLOS ONE</i> 9, e92973 2014 |
| 2. Tsukiyama T, <u>Ohinata Y*</u> : A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. <i>PLOS ONE</i> 9, e95329 2014 |
| 3. <u>Ohinata Y*</u> , Tsukiyama T: Establishment of trophoblast stem cells under defined culture conditions in mice. <i>PLOS ONE</i> 9, e107308 2014 |
| |
| |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 大日向 康秀

発明の名称: 栄養膜幹細胞の樹立及び維持方法

出 願 人: 独立行政法人理化学研究所

出 願 日: 2014/2/21

出 願 番 号: 2014-032314

(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)

招待講演

第 58 回日本生殖医学会総会教育講演 神戸ポートピアホテル “多能性幹細胞からの試験管内生殖細胞誘導”2013 年 11 月 15 日

受賞

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 年 3 月

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

センダイウイルスは Paramixoviridae に属する Mononegavirus の一種で、宿主の細胞質で増殖し、そのゲノムは RNA であり、染色体に組込まれない。これを F 欠失型にし、外来遺伝子の挿入が可能ないようにベクター化したもの(SeV)は、再度感染性を持つ事はなく、広範囲な細胞種の細胞質で、大量の目的タンパク質を発現することができるという特徴を持つ。さて 2006 年に山中・高橋によりマウス体細胞に 4 因子を導入することで iPS 細胞の作製が報告され、2007 年にはヒト細胞でも可能になり、再生医療の実現が加速化された。しかしながら染色体に導入遺伝子の組み込みがなく、がん化のリスクを低減した「安全」かつ高効率な iPS 細胞の作出法が当時求められていた。そこで上述のセンダイウイルスベクター(SeV)を用いて 4 因子を細胞に導入することにより、我々は高効率なヒト iPS 細胞の作製に成功し、2009 年に報告を行った。本研究では、(1) SeV を用いたより効率のよい iPS 細胞の作製法として、(a) 温度感受性ベクターを利用した効率のよい外来因子フリーの iPS 細胞作製法と分化ベクターへの応用、(b) 当初皮膚線維芽細胞からが主であった iPS 細胞の作製を、汎用性の高い HLA ホモの細胞、あるいは大型実験動物も含めた種々の細胞から出来るようにする事、(c) より高い「万能性」を持つような naïve 様 iPS 細胞の作製、(d) 外来因子フリーであることを利点とした SeV を用いたヒト疾患 iPS 細胞への応用、そして(2) SeV を用いた効率的な分化誘導を目的として研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

テーマ(1) SeV を用いたより効率のよい iPS 細胞の作製法

(a) 温度感受性ベクターの解析と応用: 温度感受性を与える既知のポリメラーゼ関連部位の変異の組み合わせにより、種々の温度感受性ベクターを開発、iPS 細胞樹立の効率とベクター除去効率の比較を行い、温度シフトあるいは自然除去いずれの方法でも除去効率のよいベクターを選択した。

(b) iPS 細胞作製時の細胞種の拡大: 研究開始当時は皮膚線維芽細胞が主流であったが、末梢血および臍帯血、歯髄細胞への応用でサンプル確保の負担を軽減、HLA ホモを含むサンプルから外来因子フリーの iPS 細胞の高効率樹立が可能になった。これらは将来の臨床応用を考える上で患者負担の軽減や、汎用性の高いストック iPS 細胞株を作る点で重要である。また大型動物での再生医療のモデル実験を視野に、動物種の拡大(マーマセツやサル・ブタ)を行った。

(c) SeV の外来遺伝子高発現を利用した naïve 様 iPS 細胞の樹立: 従来ヒト iPS 細胞は bFGF 依存・トリプシン非耐性の EpiStem 細胞だと言われていた。より高い分化能力・完全な初

期化を求めて、マウス iPS 細胞のような LIF 依存性・トリプシン耐性のヒト iPS 細胞の樹立を、高発現 SeV を用いて検討した。

(d) ヒト疾患 iPS 細胞への応用: 従来のレトロ／レンチウイルスで iPS 細胞を作製した場合、外来遺伝子の宿主染色体への組み込みが起こり、本来の形質が解析しにくい場合があり、外来遺伝子のコピー数の少ない、大量の iPS 細胞のスクリーニングが必要であった。また、疾患患者由来組織は疾患やその他の原因で樹立効率が著しく低い、あるいは樹立困難なことも多い。そこで高発現 SeV により外来因子フリーの iPS 細胞を疾患患者由来細胞(皮膚細胞あるいは末梢血)から樹立し、解析を行った。正常初代培養線維芽細胞より効率は落ちたが、必ず樹立することに成功し創薬研究も行った。疾患の種類は様々であるが、現在も眼科疾患や原因不明の全身性の先天性器官形成不全の疾患の樹立と解析を継続中。

テーマ (2) SeV の分化誘導への応用

種々の分化ベクターを作製し、さきがけ研究者ほかに配布を行い、研究を行っている。温度条件(35 度での誘導)、ウイルス量の条件を検討することで高発現かつ、発現の OFF は温度シフトで制御を試みた。

(2) 詳細

テーマ(1) SeV を用いたより効率のよい iPS 細胞の作製法

(a) 温度感受性ベクターの解析と応用:

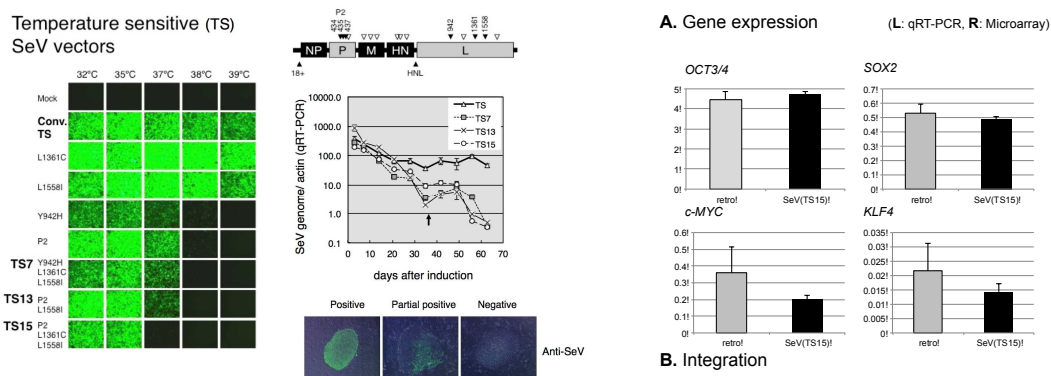


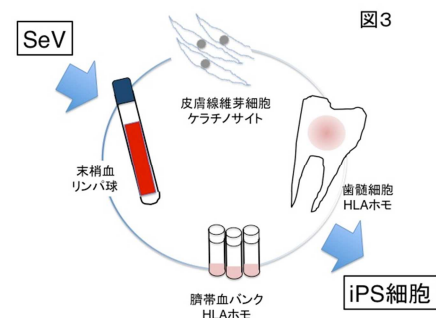
図1(左) 図2(右)

温度感受性を与える既知のポリメラーゼ関連部位の変異の組み合わせにより、種々の温度感受性 SeV ベクターを作製し検討を行った。通常、37°Cで培養を行っても従来の SeV ベクターは RNA ポリメラーゼ活性を発現し続け、自然に除去されることはなかったが(Conv.TS)、種々の変異体の中には、37°Cで GFP を発現するが、38°Cや 39°Cの培養ではポリメラーゼが失活してしまう株、あるいは、32°C、35°Cの低温下のみで GFP を発現する株が認められた(図1)。これら温度感受性株を用いて、それぞれに初期化因子(OCT3/4, KLF4, SOX2, c-MYC: OKSM)を搭載してヒト線維芽細胞(BJ)を用いて iPS 細胞を誘導したところ、図1の TS7 あるいは TS13 を用いた場合に、効率よく iPS 細胞を誘導することが出来、TS13 の場合は、37°Cで長期培養しているうちにウイルスベクターは消失した。TS7 の場合

は、38℃から 39℃で数日間培養することで、ウイルスが除去可能であり、再度のポリメラーゼの活性化が認められなかった。また、c-MYC ベクターのみを温度感受性ベクターにしても、効率よくウイルスフリー・ヒト iPS 細胞が誘導することが可能であり、37℃で誘導することで、SeV ゲノムは効率よく自然に除去された(図1右)。これは、c-MYC がベクターの HNL 部に挿入され、3' 側の 18 位に比較し、発現量は弱い(3' > 5')、ウイルスの複製には有利であるためと考えられる(論文 2, 著書1)。図1の下部パネルに示すように、iPS コロニー中の抗 SeV 抗体陽性細胞は、継代を経るうちに次第に希釈されていく様子が認められた。TS15 が最も温度感受性が高く、37℃での除去効率が良いため、今後 c-MYC 遺伝子発現には TS15 を用いることとした(現在販売中のキットすべてに適用されている)。

SeV で作製された iPS 細胞株の 4 因子の発現を、レトロウイルスで作製した iPS 株と比較すると、4 因子すべての発現が、SeV で作製された iPS 細胞にバラツキが少なく、宿主 DNA に外来遺伝子が挿入されていないため、4 因子のコピー数も均一であった(図 2)。マイクロアレイの網羅的遺伝子解析によっても、SeV で作製した iPS 細胞は、レトロウイルスで作製された既知の株、あるいは今回作製したレトロウイルス iPS 細胞株と比較し、より ES 細胞に近い事が示されている(論文 2)。この特徴は、以後に述べる疾患 iPS 細胞を作製する際に極めて重要となる。なお、SeV ベクターの作製は、DNAVEC 社内にて伴浩志研究員(当時)と社内生産センターの協力により行われた。

(b) iPS 細胞作製時の細胞種の拡大:



従来、iPS 細胞は皮膚線維芽細胞から作製されていた。ヒトの皮膚を採取する場合は、大きな傷跡が残るなど負担も大きく、また培養する時間も長く細菌感染の危険性も高かった。そのため、他のソースが求められていた。SeV は活性化 T 細胞と CD34 陽性血液細胞への感染能力が非常に高いが、これを利用して、慶應義塾大学医学部・福田恵一教授との共同研究で、末梢血 T 細胞を IL-2 と抗 CD3 で活性化する iPS 細胞の樹立法(論文 1)および、先端医療セン

ター研究所・川真田伸グループリーダーとの共同研究で CD34 陽性臍帯血からの効率的な iPS 細胞樹立を報告している(論文 2)。さらに、岐阜大学医学部の手塚 建 准教授から細胞の提供を受け、歯髄細胞から iPS 細胞の作製を試みた。歯髄細胞は、廃棄される「歯」から採取され、岐阜大には多くのストックが存在し、その中には移植で日本人の 20%をカバー可能な、HLA3 座(A, B, DR)ホモの細胞株も含まれている(DP-74, DP-94)。これらの歯髄細胞から、様々な SeV で iPS 細胞の樹立を試みたところ、3 因子同時搭載(3'-KLF4-OCT3/4-SOX2-5': KOS)の SeV と c-MYC の 組 合 せ (論 文 5)、あるいは 3 因子同時搭載(3'-OCT3/4-SOX2-KLF4-5': OSK)に KLF4 と c-MYC を加えた組合せで最も高率に iPS 細胞を誘導することが出来た。c-MYC の代わりに L-MYC では効率アップに貢献しなかった。これらの樹立した iPS 細胞はヒト ES 細胞のマーカーやテラトーマ形成能、OCT3/4 プロモーター領域の脱メチル化に差はなかったが、マイクロアレイ解析で、使用したベクターの種類によってややクラスタリングが認められた。詳細については検討中である(PLoS One. 2014 Dec 18;9(12):e1115392, 未発表データ)。また、さらに、さきがけ研究者の佐々木えりか氏との共同

研究で、マーマセットの iPS 細胞樹立も試み、さらにブタ・サルからの iPS 細胞樹立も検討を行った(非公開データ)。このように、様々な細胞種から外来因子フリー iPS 細胞樹立が可能になった(図 3)。

(c) SeV の外来遺伝子高発現を利用した naïve 様 iPS 細胞の樹立: 従来ヒト iPS 細胞は bFGF 依存・トリプシン非耐性の EpiStem 細胞だと言われていた。より高い分化能力・完全な初期化を求めて、マウス iPS 細胞のような LIF 依存性・トリプシン耐性のヒト iPS 細胞の樹立を、高発現 SeV により用いて効率的な樹立を検討した。既に、2008 年にヒト成人皮膚由来線維芽細胞から、OKSM の 4 因子搭載の SeV を用いて、異常に増殖性の高い、厚みのある iPS 細胞コロニーを得ていた。現在の組み合わせと異なるのは、発現の高い 18+ のベクターを c-MYC に用いていることである。この細胞を詳細に解析したところ、トリプシン耐性で、マウス ES/iPS 細胞同様に、SSEA1 を発現していた。しかしながら継代を重ねても外来遺伝子(OSK)が除去されず、この外来因子に依存して増殖しているように思われた。そこで(a)で作製した温度感受性ベクターを用いて、同様に iPS 細胞を作製し、トリプシン処理により 2i および LIF 存在下で生存するシングルセルをスクリーニングしたところ、ドーム状のマウス ES/iPS 細胞様のコロニーが得られた(図 4 右)。これらの細胞は、SeV 陰性で、SSEA1 陽性、Xist の発現が低下し、OCT3/4, KLF4, NANOG の発現は変化がなかったが、KLF2, 5, TBX3 の発現が上昇していた。テラトマ形成実験で、三胚葉への分化能も有していることが認められた。従来、ヒト naïve 様 iPS 細胞の作製には種々の薬剤の添加が必要とされ、また長期の継代・維持も難しいとされているが、OKSM の発現量が高ければ、naïve 様 iPS 細胞の作製も可能となり、かつ外来因子フリーという点で新しい。

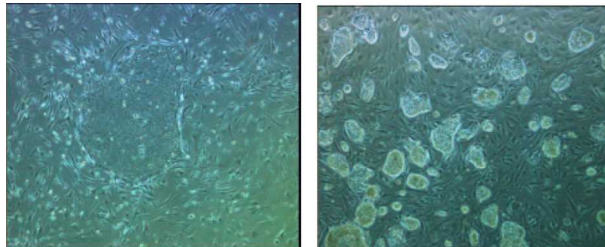
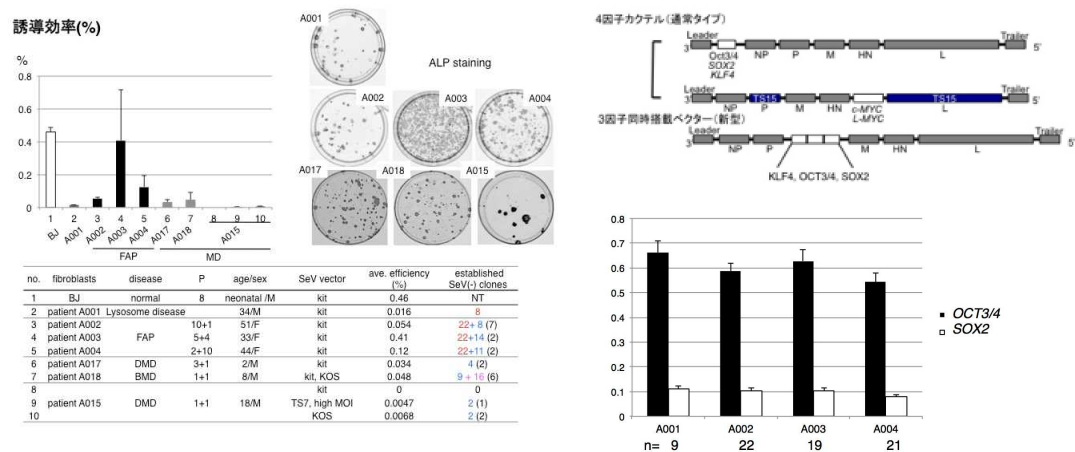


図 4. EpiStem 細胞様ヒト iPS 細胞(左)、naïve 様ヒト iPS 細胞(右)

(d) ヒト疾患 iPS 細胞への応用: 従来のレトロ／レンチウイルスで iPS 細胞を作製した場合、外来遺伝子の宿主染色体への組み込みが起こり、本来の形質が解析しにくい場合があり、外来遺伝子のコピー数の少ない、大量の iPS 細胞のスクリーニングが必要であった。また、疾患患者由来組織は疾患やその他の原因で樹立効率が著しく低い、あるいは樹立困難なことも多い。そこで高発現 SeV により外来因子フリーの iPS 細胞を疾患患者由来細胞(皮膚細胞あるいは末梢血)から樹立し、解析を行った。筋ジストロフィー(ディシエンヌ型、ベッカー型)、リソソーム病、家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)など様々な疾患 iPS 細胞を樹立したが、新生児初代培養皮膚由来線維芽細胞に比較し、効率は低かった(図 5 左)。同じ疾患由来でも樹立効率が異なるが、年齢とは関連がなく、初代培養細胞の株による。しかし 3 因子同時搭載ベクター(図 5 右上、論文 5)等を用いて必ず樹立することが出来た。(a)と同様、OCT4 や SOX2 の発現 variation は株間で少ないように思える(図 5 右下)。この基盤研究を応用して、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症(論文 3)、1 型及び 2 型糖尿病(Stem Cells Trans Med. June 2012 vol. 1 no. 6 451-461)、頭蓋骨形成異常症(Cellular Reprogramming, Dec;15(6):503-513)、

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP) (Stem Cell Res. 2014 Mar;12(2):574-83)、進行性骨化性線維異形成症(FOP) (Stem Cells. 2012 Nov;30(11):2437-49)、ニーマンピック病タイプ C (Stem Cells. 2014 Online, Dec 17)等の疾患由来 iPS 細胞の樹立と疾患の再現、一部創薬および遺伝子治療の試みを他研究者との共著で報告した。現在は原因不明の先天性全身性器官形成異常および難治性眼科疾患 iPS 細胞の樹立と解析を行い、疾患の発生機序や遺伝的背景について深く掘り下げる予定である。

図 5.



テーマ(2) SeV の分化誘導への応用:

種々の分化誘導用 SeV ベクターを作製し提供を行った。また、さがけ研究者の片岡研究者から etv(ヒト、マウス) 遺伝子の提供を受け、etv-SeV による血液細胞の分化誘導を行った(非公開データ)。

なおテーマ(1)の(a)(b)および(c)(d)の一部は、ディナベック株式会社にて行われ、テーマ(2)の分化ベクターはディナベック社内で作製された。

3. 今後の展開

iPS 細胞の樹立に関しては、かなり SeV の応用範囲(動物種・細胞種)が広がり、疾患 iPS 細胞への応用も順調に行われている。今後は、現在検討中の希少疾患の発生機序や原因遺伝子の同定、創薬などについて掘り下げて検討を行う予定である。また、分化ベクターの成果が少ないため、現在進行中のプロジェクトを継続実行する予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

基本的には現在の流れ:より効率のよい外来遺伝子フリーな iPS 細胞の樹立法を世界に先駆け発表し、様々な細胞種への応用、汎用性の高い HLA ホモの iPS 細胞樹立、疾患 iPS 細胞樹立を通じた疾患発症機構の解明と創薬、そして naïve 様 iPS 細胞の簡易樹立法、分化誘導といった流れを、現在では当たり前になってしまったが、この5年半の技術革新の1つとして会社の制限の中で実行していった。その根本としてセンダイウイルスベクター(SeV)という優れたツールとその改良を特徴としている。研究期間中に modified RNA の技術も報告されてきた

が、まだその発現量や簡便さでは SeV は優位であると考えられる。また、なるべく多くの研究者にこのツールを普及させたいという思いから、様々な研究者に配布、あるいは会社に配慮して販売という形で提供を行った。分化ベクターに関しては、増殖する細胞でないと除去が難しいこと、また温度感受性ベクターを用いると発現量が減少、個別にベクターを作る事の産業上の制限、複数の因子を順番に発現させる技術的困難などの課題がまだ残っていて成果が充分でないことが心残りである。科学技術や社会・経済への波及効果は、このベクターを使用することの知財的な制限が撤廃されていけば、すでに率先して初期化ベクターの商品化を行った結果、国内・海外で広く使用されていることを考慮するとかなり大きいのではと思われる。またすでにこのベクターを用いて樹立した疾患 iPS 細胞株は研究者に配布され、創薬研究にも用いられている。今後は、さがけ研究で培った研究者ネットワークを継続させ、共同研究などでさらに大きな研究の広がりや成果を出したいと考えている。初めて外来因子フリー・高効率ヒト iPS 細胞樹立を発表した時の、臨床系再生医療研究者の期待に輝く瞳を初心として忘れず、未来の再生医療に貢献していきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

センダイウイルスを用いる iPS 作製法を、さがけ研究者並びに、新しく iPS 研究を始めたいという世界中の研究グループに提供しつつ、方法自体を進化させるという2つのミッションを期待してさがけに採択した。論文発表には反映されていないものの、センダイウイルスに基づく方法を世界中に普及させた点、またさがけ研究者の iPS 作製を積極的に手伝った点は評価している。事実、我が国をはじめ世界中の研究者と行った共同研究が業績として記載されており、当初の期待は十分満たしたのではと思う。さらに、この技術を用いた iPS 作製キット CytoTune の商品化にこぎつけた点も評価する。商品化については研究者個人の問題ではないが、もっと迅速に行うべきだったと感じる。現在 iPS を利用している研究室を見てみると、他の方法を凌駕できる、さらにいい上市のタイミングがあったのではと残念に思う。

共同研究だけでなく、個人研究として当初期待した、このシステムの分化誘導などへの新しい使い方の開発については、5年という十分な時間があつたにも関わらず、満足できる結果ではない。さがけ以後のキャリアを考えると、この個人研究の部分が一番重要であり、今後はこの点に焦点を絞って、成果をあげてほしい。

5. 主な研究成果リスト

- 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. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. **Cell Stem Cell** 2010 Jul 2;7(1):11-14
- Ban H, Nishishita N, **Fusaki N**, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. **Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.**, Aug

23;108(34):14234-9.

- Yusa, K., S. T. Rashid, H. S-Marchand, I. Varela, P-Q. Liu, D. E. Paschon, E. Miranda, A. Ordóñez, N. Hannan, F. Rouhani, S. Darche, G. Alexander, S. J. Marciniak, **Fusaki N**, M. Hasegawa, M. C. Holmes, J. P. Di Santo, D. A. Lomas, A. Bradley and L. Vallier, Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. **Nature**, **2011** Oct 12;478(7369):391-4.
- Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim JW, Kriks S, Taldone T, **Fusaki N**, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ, Studer L. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. **Cell Stem Cell**. **2013** Dec 5;13(6):691-705.
- Fujie Y, **Fusaki N**, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H and Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. **PLoS ONE**, **2014**, Dec 5;9(12):e113052.

(1)論文(原著論文)発表

1. 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. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. **Cell Stem Cell** **2010** Jul 2;7(1):11-14
2. Nishishita N, Takenaka C, **Fusaki N**, Kawamata S. Generation of human induced pluripotent stem cells from cord blood cells. **J Stem Cells**. **2011**;6(3):101-8.
3. Ban H, Nishishita N, **Fusaki N**, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. **Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.**, Aug 23;108(34):14234-9. **#Corresponding author**
4. Yusa, K., S. T. Rashid, H. S-Marchand, I. Varela, P-Q. Liu, D. E. Paschon, E. Miranda, A. Ordóñez, N. Hannan, F. Rouhani, S. Darche, G. Alexander, S. J. Marciniak, **Fusaki N**, M. Hasegawa, M. C. Holmes, J. P. Di Santo, D. A. Lomas, A. Bradley and L. Vallier, Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. **Nature**, **2011** Oct 12;478(7369):391-4.
5. 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. Transgene-free disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with type 1 and type 2 diabetes. **Stem Cells Trans Med**. Online May30, **2012**; June 2012 vol. 1 no. 6 451-461
6. Nishishita N, Shikamura M, Takenaka C, Takada N, **Fusaki N**, Kawamata S. Generation of Virus-Free Induced Pluripotent Stem Cell Clones on a Synthetic

- Matrix via a Single Cell Subcloning in the Naïve State. **PLoS One.** 2012;7(6):e38389.
7. Hamasaki M, Hashizume Y, Yamada Y, Katayama T, Hohjoh H, **Fusaki N**, Nakashima Y, Furuya H, Haga N, Takami Y, Era T. Pathogenic mutation of ALK2 inhibits iPS cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification. **Stem Cells.** 2012 Nov;30(11):2437-49.
 8. Ye L, Muench MO, **Fusaki N**, Beyer AI, Wang J, Qi Z, Yu J, Kan YW. Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors. **Stem Cells Transl Med.** 2013 Aug;2(8):558-66.
 9. Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, Tojo A, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, **Fusaki N**, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of in vivo administration of reprogramming factors in the mouse liver. **Oncol Lett.** 2013 Aug;6(2):323-328.
 10. Chen IP, Fukuda K, Fusaki N, Iida A, Hasegawa M, Lichtler A, Reichenberger EJ, Ernst J, Reichenberger. Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. **Cellular Reprogramming**, Dec;15(6):503-513.
 11. Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim JW, Kriks S, Taldone T, **Fusaki N**, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ, Studer L. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. **Cell Stem Cell.** 2013 Dec 5;13(6):691-705.
 12. Isono K, Jono H, Ohya Y, Shiraki N, Yamazoe T, Sugasaki A, Era T, **Fusaki N**, Tasaki M, Ueda M, Shinriki S, Inomata Y, Kume S, Ando Y. 4. Generation of familial amyloidotic polyneuropathy-specific induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Res.** 2014 Mar;12(2):574-83.
 13. Fujie Y, **Fusaki N**, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H and Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. **PLoS ONE**, 2014, Dec 5;9(12):e113052.
 14. Takeda-Kawaguchi T, Sugiyama K, Chikusa S, Iida K, Aoki H, Tamaoki N, Hatakeyama D, Kunisada T, Shibata T, **Fusaki N**, Tezuka K. Derivation of iPSCs after Culture of Human Dental Pulp Cells under Defined Conditions. **PLoS One.** 2014 Dec 18;9(12):e115392.
 15. Soga M, Ishitsuka Y, Hamasaki M, Yoneda K, Furuya H, Matsuo M, Ihn H, **Fusaki N**, Nakamura K, Nakagata N, Endo F, Irie T, Era T. HPGCD Outperforms HPBCD as A Potential Treatment for Niemann-Pick Disease Type C During disease Modeling with iPS Cells. **Stem Cells.** 2014 Dec 17. doi: 10.1002/stem.1917. [Epub ahead of print]

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 伴 浩志、上田泰次、房木ノエミ、佐伯晃一、長谷川 護

発明の名称: 多能性幹細胞を誘導するための組成物およびその使用

出 願 人: ディナベック株式会社

出 願 日: 2010/8/30

出 願 番 号: PCT/JP2011/069588 (特願 2010-192753, 公告番号 WO2012029770 A1)

(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)

(主要な学会発表-1: 招待講演)

1. 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

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.」

発生生物学会(京都)2010.6.21

3. 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

(主要な学会発表-2: プレナリー)

4. 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

5. 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

(受賞)

アンジェス MG 賞受賞 (2011 年 7 月 15 日 日本遺伝子治療学会)

(主な著書)

1. Noemi Fusaki and Hiroshi Ban: 「Chapter 7: Induction of Human Pluripotent Stem Cells by the Sendai Virus Vector: Establishment of a Highly Efficient and Footprint-Free System」
Book Title: Sendai Virus Vector Advantages and Applications. Nagai, Y. (Ed.) Springer, 2014.
p171-183.

2. **Noemi Fusaki**:「Epigenetic reprogramming without genetic modification: use of sendai virus vectors for generating safe induced pluripotent stem cells.」
Book Title: Therapeutic Applications in Disease and Injury. Hayat, M.A. (Ed.)/ Stem Cells and Cancer Stem Cells; Volume 9, Springer, 2013, p59-69. ISBN 978-94-007-5645-8
3. **Noemi Fusaki**:“Primary and Stem Cells: Gene Transfer Technologies and Applications”
Chapter 6 “Nonintegrating RNA viruses”, Wiley Publishers, 2011, p103-119
4. **房木ノエミ**:「難治性疾患患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデル・薬剤開発と再生医療への応用」臨床化学 43, vol.3, 2014, p197-202
5. **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.

(プレスリリース)

1. 2011/10/13:「重篤な遺伝性疾患の患者 iPS 細胞を用いた遺伝子修復療法に関する Nature 誌論文掲載につきまして」
http://www.dnavec.co.jp/press/ATDnature_20111012.pdf
2. 2011/8/2:「細胞に使用痕跡を残さない遺伝子発現期間制御型ベクターの開発とそれを用いた臍帯血からの iPS 細胞の作製」
<http://www.dnavec.co.jp/press/20110801.pdf>