

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390072

研究課題名（和文）再プログラム化によるヒト体細胞幹細胞化のための基盤技術開発

研究課題名（英文）Development of the technology of nuclear reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cell

研究代表者

多田 高（TADA TAKASHI）

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：30188247

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ES細胞、体細胞、細胞融合、拒絶反応、再プログラム化

1. 研究計画の概要

本研究課題は、ES-体細胞融合細胞から ES 細胞由来の染色体のみを取り除くことで体細胞由来の多能性幹細胞を作り出すための基盤技術の開発を目的としている。方法として、（1）染色体除去の新分子ツール、染色体除去カセット(CEC)の開発、（2）染色体除去の高効率化をもたらす技術の開発、（3）ECE-ES 細胞ライブラリーの作製、（4）ES 細胞全染色体への CEC の導入、（5）ホスト ES 細胞の開発、（6）ヒト ES 細胞と体細胞の新細胞融合技術の開発、を挙げていた。マウス細胞を用いた研究成果として、（1）ECE-ES 細胞ライブラリーの作製の成功、（2）ES 細胞へ 40 コピー以上の CEC の挿入、（3）染色体の一斉除去による細胞死の誘導、（4）染色体除去技術を用いた遺伝子量バランスの重要性、を明らかにすると共に、（5）ES 細胞：体細胞=1：1 の融合システムの開発を行った。

2. 研究の進捗状況

マウス細胞を用いた研究成果として、（1）ECE-ES 細胞ライブラリーの作製の成功、（2）ES 細胞へ 40 コピー以上の CEC の挿入、（3）染色体の一斉除去による細胞死の誘導、（4）染色体除去技術を用いた遺伝子量バランスの重要性、を明らかにすると共に、（5）ES 細胞：体細胞=1：1 の融合システムの開発を行った。ヒト細胞を用いた研究成果として、（1）ES-体細胞の電気融合に融合細胞の作製技術の開発、（2）融合細胞からの染色体除去の成功、（3）ヒト融合細胞における遺伝子量バランスの重要性、が明らかになった。ヒトとマウス細胞において、生きた細胞の核

からの選択的染色体除去技術により、細胞は 25%迄の遺伝子変動には寛容性があるが、50%になると細胞死を招く事が明らかになった。

加えて、染色体除去の過程で ES 細胞や ES-体細胞融合細胞では、相同染色体間の組み換えが予想以上に高い頻度で誘導されることが明らかになった。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

（理由）研究期間にヒト iPS 細胞が発表されたが、本研究でえられた成果は、ヒト iPS 細胞研究にも応用可能であり、貢献度は高いと考えられる。えられた成果の機構をより詳細に検討することにより、ヒトの幹細胞生物学および応用医学に寄与すると考えられる。マウス ES 細胞で確立した技術をヒト ES 細胞に応用し、体細胞の幹細胞化の基盤技術を開発する目的は、扱いに熟練を要するヒト ES 細胞を用いているが順調に進んでいる。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究成果から、細胞には遺伝子量の変動に敏感な遺伝子量モニタリング遺伝子が存在する可能性が示された。現在、遺伝子量モニタリング遺伝子の存在を仮定して、同定を行う。

相同染色体間での組み換えが比較的高い頻度で誘導される成果を受け、ES 細胞や iPS 細胞において、遺伝的異常が正常化されたクローンの選別を行う。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Yamaguchi, S., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Sasaki, H., Nakatsuji, N., Saitou, M. and Tada, T.: Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development* **136**, pp4011-4020 (2009) 査読有り
- ② Nagata, S., Toyoda, M., Yamaguchi, S., Hirano, K., Makino, H., Nishino, K., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Akutsu, H., Umezawa, A. and Tada, T.: Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells* **14**, pp 1395-1404 (2009) 査読有り
- ③ Tada, T.: Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent cells: fantasy or reality? *Cell Stem Cell* **3**, pp121-122 (2008) 査読有り
- ④ Otsuji, T., Matsumura, H., Suzuki, T., Nakatsuji, N., Tada, T. and Tada M.: Rapid induction of large chromosomal deletions by a Cre/inverted loxP system in mouse ES cell hybrids. *J. Mol Biol* **378**, pp328-336 (2008) 査読有り
- ⑤ Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Nakatsuji, N., Tada, T.: Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cell nuclei. *Nature Methods*, **4**, pp23-25 (2007) 査読有り

[学会発表] (計37件)

- ① Tada, T.: Nuclear Reprogramming: Pluripotent Stem Cells by Cell Fusion and iPS induction 「The 2008 Seoul International Symposium on Stem Cell Research」 (2008. 12. 03, Seoul, KOREA) (invited)
- ② Tada, T.: Molecular Mechanisms of Nuclear Reprogramming by Cell Fusion: NRW Satellite Symposium "Reprogramming of Somatic Cells for the Therapy of Heart Disorders" (2007. 10. 9-10, Dusseldorf, GERMANY) (invited)
- ③ 多田 高: 体細胞からの再プログラム化幹細胞-細胞融合と染色体除去-: 11th Molecular Cardiovascular Conference-Keynote Lecture- (2007. 9. 14-16, 小樽) (招待講演)
- ④ 多田 高: 細胞の若返り-体細胞から万能細胞を作る-: 科学技術政策研究所シンポジウム-科学技術と社会をつなぐ-ナイ

スステップな研究者 2006 からのメッセージ (2007. 4. 13, 東京) (招待講演)

- ⑤ Matsumura, H., Yamaguchi, S., Hirano, K., Tada, T.: Chromatin reprogramming of somatic nuclei mediated by cell fusion with embryonic stem cells: International Symposium Function Organization of the Nucleus (2007. 1. 9-11, Awaji JAPAN) (invited)

[図書] (計8件)

- ① 多田 高: リプログラミングの未来と過去、「幹細胞研究の最近の進歩」(須田年生監修) pp568-580 (最新医学社) 刊号 64 巻 802 号、最新医学社、2009)
- ② 多田 高: 細胞融合と「核のリプログラミング」、「細胞核の初期化メカニズム 多能性・全能性獲得のナゾに迫る」 pp28-33 (メディカルバイオ 6 巻 5 号、オーム社、2009)
- ③ 山中伸弥・多田 高: 世界が注目! ヒトの皮膚から多能性幹細胞 再生医療だけではない。オーダーメイド医療にも貢献する「iPS細胞」とは? pp150-155 (ニュートン別冊、ニュートン プレス社、2008)
- ④ 多田 高: 再プログラム化融合細胞の個人対応化技術、「進みつつける細胞移植治療の実際」(田畑泰彦 編集) pp140-144 (遺伝医学MOOK別冊、メディカル ドゥ社、2008)
- ⑤ 多田 高: ES細胞の多能性誘導能と融合細胞核のゲノム改変、「再生医療への新たな挑戦; 多能性幹細胞の維持と誘導-初期化の制御機構とエピジェネティクス、万能細胞樹立の新技术まで」(山中伸弥 企画) pp462-567 (実験医学、25 巻 4 号、羊土社、2007)

[その他]

ホームページ

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es03/index.html>