

研究種目：特別推進研究
研究期間：平成19年～平成23年度
課題番号：19002014
研究課題名（和文） 細胞核初期化の分子基盤
研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying nuclear reprogramming
of somatic cells
研究代表者 山中 伸弥（YAMANAKA SHINYA）
京都大学 物質—細胞統合システム拠点・教授
研究者番号：10295694

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：再生医学、幹細胞、分化多能性、核初期化、転写因子

1. 研究計画の概要

私達は、4つの転写因子を体細胞に導入することで、ES細胞に類似したiPS細胞を樹立した。iPS細胞は再生医療の資源として理想的な多能性幹細胞であり臨床応用が期待されるが、iPS細胞の由来、すなわち、多能性が誘導された細胞が真に体細胞に起源するものなのかという点や、iPS細胞の低い誘導効率の原因、細胞核初期化の過程における4因子の作用機序など不明な点が多い。またゲノムに挿入され、潰瘍原性を生じせしめる恐れがあるレトロウイルスの利用という安全上の問題がある。これらを踏まえ、以下のよう

- (1) 4因子によるiPS細胞誘導の分子機構の解明
- (2) レトロウイルスを用いないiPS細胞誘導方法の確立
- (3) ヒトiPS細胞の特性解明と分化誘導法の確立

2. 研究の進捗状況

平成19年度の研究で初代培養肝細胞に由来するiPS細胞は、線維芽細胞由来のiPS細胞と比較してレトロウイルスの挿入数が少なく、クローン間に共通する挿入場所は無く、さらにキメラマウスやその子孫に腫瘍が多発しないことがわかった。

平成20年度は線維芽細胞由来iPS細胞におけるレトロウイルス挿入部位の決定を行ったがクローン間における共通挿入部位は見つからなかった。このことから、iPS細胞誘導にレトロウイルスの特異的部位への挿

入は重要ではないことが示唆された。また、レトロウイルスによる誘導ではc-Mycは必須でないことを見だし、キメラマウスにおける腫瘍形成リスクの低減化に成功した。さらに安全性の高いiPS細胞樹立のために体細胞ゲノムへの挿入を伴わないプラスミドを用いてiPS細胞の樹立に成功した。

平成21年度はいくつかの方法でiPS細胞誘導効率の上昇に成功した。癌抑制遺伝子p53がiPS細胞誘導を負に制御していることを見だし、誘導中にp53の機能を抑えることでより多くのiPS細胞を作り出すことができた。また、誘導中に培養条件の一つである酸素濃度を低くすることでiPS細胞誘導効率が上昇することを明らかにした。

iPS細胞誘導方法が様々報告されているがどの方法で樹立した細胞が安全なのかは未だ不明である。そこでiPS細胞の安全性を検討する実験系を確立した。方法はiPS細胞を神経幹細胞に分化誘導し、マウスの脳に移植したのち経過を観察する。分化抵抗性の強いiPS細胞は移植部位で腫瘍を形成したことから、この方法でより安全なiPS細胞の選別が可能となった。この系を用いた解析から、iPS細胞樹立に用いる元細胞の種類が重要であることが明らかとなった。

ヒトiPS細胞を再生医療に応用するためには、異種成分を含まない培養系の確立が重要である。iPS細胞を樹立・維持培養する時に用いるフィーダー細胞はマウス由来の細胞を用いてきたため、ヒト細胞で代用可能か検

討した結果、自己細胞由来フィーダー細胞上で iPS 細胞の誘導・維持培養が可能なが分かった。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

(1) 4 因子による iPS 細胞誘導の分子機構の解明

これまでに 4 または 3 因子を導入した際に起こる iPS 細胞樹立の分子機構はよく分かっていなかった。我々は癌抑制遺伝子である p53 が iPS 細胞樹立に深く関与していることを発見し、分子機構の一端を明らかにした。さらには、まだメカニズムは分かっていないが低酸素条件で培養することで、iPS 細胞樹立効率が上昇することも見いだした。低酸素条件下で何が起きているのかを解析することで、樹立の分子機構をより明らかにできると考える。また、p53 の機能を解析し、詳細な分子機構を解明できることが見込まれる。

(2) レトロウイルスを用いない iPS 細胞誘導方法の確立

マウス iPS 細胞をプラスミドを用いて樹立することに成功し、現在はヒト iPS 細胞についても同様の研究をすでに行っている。ベクターの改良や培養条件など至適条件が決まれば、より安全な iPS 細胞の樹立が見込まれる。また、iPS 細胞の評価系もマウスでは確立でき、今後はヒトでも同様の評価系を開発する。これらを組み合わせることで真に応用可能なヒト iPS 細胞の樹立方法の確立が見込まれる。

(3) ヒト iPS 細胞の特性解明と分化誘導法の確立

ヒト iPS 細胞を自己細胞由来のフィーダー細胞で樹立・維持培養できることは、今後の応用に大きく寄与すると考えられる。ヒト iPS 細胞はクローン毎に性質が異なることも分かりつつあり、解析方法の確立も進めばより詳細な特性解明が進むことが見込まれる。いくつかの細胞系譜に対する分化誘導方法の開発も始めており、特性解明で得られた知見を組み合わせることで、速やかに成果が見込まれると考える。

4. 今後の研究の推進方策

今後は、p53 の iPS 細胞樹立における詳細な機能解析、低酸素状態による iPS 細胞樹立効率上昇のメカニズムの解析、その他 iPS 細胞誘導におけるメカニズムの解明を進める。最近注目されている、エピジェネティックスの解析も行う。ウイルスを用いずにヒト iPS 細胞を樹立する方法を確立する。これまでに報告されている方法では効率が低いいため安

定した実験が行えないことから、より高効率に安定した樹立方法のためにベクターの改良や樹立条件の再検討などを進める。iPS 細胞はクローン毎に性質が違ってくるようになってきており、その特性解明を進める。肝細胞、心筋細胞、神経細胞など特定の系譜への分化誘導法の確立を鋭意進める。前述の通り、クローン毎に分化のし易さは違ってくるが予想され、適したクローンの選択方法の検討も行う。

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 42 件)

1. Takahashi, K., Narita, M., Yokura, M., Ichisaka, T., Yamanaka, S. Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *PLoS ONE* **4**:e8067, 2009.
2. Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **5**:237-241, 2009.
3. Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., Yamanaka, S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**:1132-1135, 2009.
4. Okita, K., Nakagawa, M., Hong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**:949-953, 2008.
5. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**:699-702, 2008.

[学会発表] (計 182 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 30 件)

○取得状況 (計 4 件)

[その他]

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>