

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：特別推進研究

研究期間：2007～2011

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・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：10295694

研究成果の概要（和文）：

4つの転写因子を体細胞に導入することで多分化能を持った iPS 細胞が樹立できる。c-Myc を含めた4因子を用いた場合にキメラマウスで腫瘍化が高頻度で認められ、レトロウイルス由来の c-Myc が原因の一つであることが分かった。樹立条件などを検討し Myc を用いずに iPS 細胞を作ることに成功したが、性質の点で不十分であった。c-Myc の代替因子の探索を行い L-Myc を同定した。L-Myc iPS 細胞は腫瘍化リスクもほとんど認められず、性質の点でも十分であった。レトロウイルスを用いずにプラスミドを用いることでも iPS 細胞の樹立に成功した。このことにより体細胞への初期化因子の挿入が起らずより安全な作製方法の確立に成功した。神経細胞への分化誘導とそれらの移植実験により安全性を検討する方法の確立も行った。また、肝細胞、血液細胞、心筋細胞への分化誘導系も確立した。iPS 細胞の性状解析をディープシーケンサーなどを用いて詳細に解析する技術の導入も完了し、網羅的な遺伝子発現、メチル化解析、スプライシング解析なども行った。

研究成果の概要（英文）：

iPS cells can be generated by introduction of four reprogramming factors into somatic cells. We have found that chimera mice produced with c-Myc show high tumorigenicity. To overcome this issue, we could generate iPS cells without Myc under the modified conditions. But Myc minus iPS cells showed less pluripotency compared to iPS cells generated with c-Myc. Next, we explored the factors which could replace the c-Myc function. We found L-Myc as a candidate. We could confirm that L-Myc enhances the efficiency of iPS generation and that the tumorigenicity of L-Myc is hardly observed. So, we can obtain the safer iPS cells using L-Myc. We established the system to examine the safety of iPS cells using the iPS cells-derived neuronal cells. We also established the differentiation methods of iPS cells into hepatocytes, blood cells, and cardiomyocytes in vitro. Next generation sequencer (NGS) is very powerful tool for analysis of genetic properties of iPS cells. We have analyzed the gene expression, DNA methylation, changes of splicing pattern in iPS cells using NGS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	148,100,000	44,430,000	192,530,000
2008年度	114,100,000	34,230,000	148,330,000
2009年度	79,300,000	23,790,000	103,090,000
2010年度	74,900,000	22,470,000	97,370,000
2011年度	70,600,000	21,180,000	91,780,000
総計	487,000,000	146,100,000	633,100,000

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. 研究開始当初の背景

胚性幹 (ES) 細胞は様々な細胞へと分化できる多能性を維持したままほぼ無限に増殖することから、神経細胞や心筋細胞など、移植治療用の細胞を大量に準備し、再生医療に応用することが期待されている。しかしヒト胚から樹立する ES 細胞の利用に関しては倫理的観点から慎重な運用が求められており、また、他家となるため、移植後の拒絶反応も問題となる。

私達は最近、マウス皮膚由来線維芽細胞に 4 転写因子 (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4) をレトロウイルスベクターにより導入すると、約 0.1%の細胞が ES 細胞に類似した人工多能性幹 (iPS) 細胞になることを見いだした (Takahashi & Yamanaka, Cell, 2006)。また、本手法によりヒト細胞からも iPS 細胞を誘導できることを実証した (Takahashi et al., Cell, 2007)。

2. 研究の目的

再生医療の資源として iPS 細胞は、将来、臨床応用が期待されるが、樹立における低い誘導効率の原因、細胞核初期化の過程における 4 因子の作用機序の詳細など不明な点も多い。また、ゲノムに挿入され、腫瘍形成の恐れがあるレトロウイルスの利用という安全上の課題もある。

上記をふまえて、本研究の目的を以下に示す。

(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

3. 研究の方法

(1) 4 因子による iPS 細胞誘導の分子機構の解明

iPS 細胞の樹立においてレトロウイルスで 4 つの転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) をマウス線維芽細胞へ導入した場合、数パーセントの細胞だけが iPS 細胞になることがわかってきた。レトロウイルスの導入効率はマウ

ス線維芽細胞ではほぼ 100%にも上ることから遺伝子が導入された細胞のうち、わずかな割合しか iPS 細胞にならない。なぜこのように効率が低いのか、という問題に対して様々な解決方法を試行する。たとえば、iPS 細胞になる途中で抑制的に働く因子が存在していないか、促進的に働く因子が存在していないか、などについて候補因子をリストアップし 4 因子との組み合わせでその効果を検討する。また、培養条件によっても樹立効率が改善される可能性も考えられるので、培地の組成、添加物、培養環境、など iPS 細胞樹立に適した方法を確立する。培養条件による効率の違いがどのようなメカニズムから生じるのかについて、遺伝子発現、エピジェネティックス解析、などを行い解析する。

(2) レトロウイルスを用いない iPS 細胞誘導方法の確立

iPS 細胞の元となる体細胞のゲノムに対するレトロウイルス遺伝子の挿入が腫瘍発生のリスクを高めることが分かってきた。我々はこの問題を解決するために遺伝子挿入を伴わない方法で iPS 細胞を樹立する。アデノウイルスやその他ウイルスにはゲノムへの挿入を伴わないものがあるので、その様なウイルスを用いて樹立を試みる。また、ウイルスを用いない遺伝子導入法にはプラスミドベクターを用いた方法がある。細胞への導入は試薬を使った方法、電気刺激を使った方法、インジェクション法、などがあり iPS 細胞樹立に適用可能な方法を確立する。ベクターの改良も試みることでより効率の良い方法を見いだす。

iPS 細胞樹立方法の違いによる iPS 細胞の性質の違いを検討することは必須と考える。iPS 細胞そのものの性状解析はもちろん、分化誘導させた後の細胞の解析、キメラマウスにおける腫瘍形成および生存率の解析を進めどの方法が最適なのかを検討する。

(3) ヒト iPS 細胞の特性解明と分化誘導法の確立

再生医療へ応用可能なヒト iPS 細胞を樹立・維持・分化誘導させる方法を確立する。現在はヒト以外の動物因子を含む培養条件を用いているため、できる限りヒト由来因子だけを用いる培養方法を検討する。特にヒト iPS 細胞樹立・維持の時に用いているフィー

ダー細胞はマウス由来の細胞を使っているため、ヒト細胞由来フィーダー細胞を用いるか、フィーダーフリーでの培養系を作り上げる必要がある。その他、ヒト iPS 細胞の特性解明を通して真に応用可能な方法を確立する。その後、必要な体細胞への分化誘導方法を検討する。

iPS 細胞はクローン毎に性質が違うことが明らかになってきており、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。

また、新たな視点として、iPS 細胞の樹立過程における転写ネットワークと核内構造変化、エピゲノム制御に着目し、核内情報制御に関わる候補因子を同定し、その個体レベルでの機能解析を進める。そこから得られた細胞初期化に関する核内イベントに関する情報は、速やかに進行中の iPS 細胞の特性や誘導機構、分化誘導メカニズムの解明研究にフィードバックし、これらの統合的理解を目指す。

4. 研究成果

(1) 4 因子による iPS 細胞誘導の分子機構の解明

c-Myc を初期化因子として用いた場合にキメラマウスで腫瘍形成が多発することが分かっていた。iPS 細胞の樹立条件を再検討し、レトロウイルスベクターによる c-Myc 導入無しでの 3 因子導入で、4 因子導入と同様の iPS 細胞 (Myc⁻ (マイナス) iPS 細胞) の樹立に成功した。この Myc⁻ iPS 細胞由来のキメラマウスでは腫瘍の形成は 6 ヶ月の観察期間において認められなかった。したがって、多能性誘導プロセスにおいて、細胞外から導入する 4 因子において c-Myc は他 3 因子とは異なる特性を有すること、また iPS 細胞の安全性の改善を明らかとした。次に、iPS 細胞の由来や成立の機序を明らかにするため、成体マウスの肝および胃の細胞に 4 因子を導入し、iPS 細胞を樹立した。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が確認され、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、iPS 細胞の複数のクローンのゲノムでのウイルスベクター挿入状況をインバート PCR 法で調べたところ、iPS 細胞誘導には染色体の特定位置への因子導入は不要であることも明らかにした。

一方、Nanog 遺伝子座に緑色蛍光蛋白質 (GFP) をノックインした体細胞に 4 因子を導入し、継時的に GFP 陽性細胞を回収、各時点において、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析や、ChIP on Chip によるクロマチン修飾状態、4 因子の標的への結合の網羅的

解析を進めた。また、iPS 細胞を誘導する 4 因子のファミリー蛋白質、変異体による iPS 細胞誘導の可能性についても鋭意検討している。

また、iPS 細胞樹立の分子機構に関して癌抑制遺伝子 p53 が関与していることを明らかにした。iPS 細胞誘導中に p53 の発現を抑制すると iPS 細胞の樹立効率が上昇することが分かった。さらに、低酸素状態で iPS 細胞を樹立すると効率が上昇することを突き止めた。p53 の iPS 細胞誘導におけるメカニズムおよび低酸素の作用機序については今後の課題である。

c-Myc による腫瘍化リスクの問題を解決すべく c-Myc 代替因子として同じ Myc 遺伝子ファミリーの中の L-Myc を同定した。L-Myc を用いることでマウス・ヒト両方の体細胞からの iPS 細胞誘導効率の上昇が認められた。また、L-Myc iPS 細胞由来キメラマウスにおいてはほとんど腫瘍形成が認められなかった。さらには L-Myc iPS 細胞の性質が野生型の ES 細胞とほぼ同等であることも確認できた。以上の結果から、L-Myc を用いることで効率的に安全な iPS 細胞を樹立することに成功した。

(2) レトロウイルスを用いない iPS 細胞誘導方法の確立

iPS 細胞が開発された当初はレトロウイルスを用いて初期化因子を体細胞に導入していた。しかしながらこの方法ではウイルス由来の遺伝子が初期化因子と共に体細胞ゲノムに取り込まれてしまい、将来腫瘍化のリスクを高めるのではないかと考えてきた。特に原癌遺伝子の c-Myc については特に注意が必要だろうと推測された。

レトロウイルスによる誘導では c-Myc は必須ではないことを確認し、他の 3 因子をゲノムに組み込まれないアデノウイルスで導入し iPS 細胞を誘導可能か検討した。この際線維芽細胞に加えて肝細胞等の上皮細胞を用いた。予備的実験でアデノウイルスの 1 回投与では iPS 細胞は樹立されることがわかっているため、連続投与など、導入方法の最適化をはかった。1 因子をアデノウイルスで投与する事で iPS 細胞を樹立することに成功したが、全ての因子をアデノウイルスで投与して iPS 細胞を樹立することはできなかった。

ウイルスを用いずに因子を導入する為にプラスミドを用い iPS 細胞の誘導を行なった。一つのプラスミドに 3 因子を挿入する事で同じ細胞に 3 因子が発現する工夫を行なった。マウス胎仔線維芽細胞に市販の遺伝子導入試薬で 3 因子をトランスフェクションしたところ iPS 細胞を樹立することに成功した。詳細な解析の結果、このプラスミド iPS 細胞の

染色体中に外来遺伝子が入っていない事を確認した。このプラスミド iPS 細胞は ES 細胞やレトロウイルスで樹立した iPS 細胞と同様の形態、遺伝子発現パターンを示した。また、キメラマウスを作製することもでき、さらには生殖系列への伝承も確認できた。

レトロウイルスを用いた場合染色体にウイルス由来の遺伝子が挿入されて腫瘍形成のリスクが考えられるが、今回樹立できたプラスミド iPS 細胞はこの問題を解決したものと考えられ、非常に重要な結果である。また、エピゾーマルベクターを用いることで体細胞ゲノムに傷を付けずにヒト iPS 細胞を樹立する方法も確立した。

(3) ヒト iPS 細胞の特性解明と分化誘導法の確立

本研究課題においてまず最初に iPS 細胞の安全性の評価系の確立を行った。マウス iPS 細胞を神経幹細胞に分化誘導しマウス脳内へ移植し腫瘍が形成されるか検討した。この結果、iPS 細胞を樹立する際に用いる元細胞の種類が重要であることを明らかにした。続いて、iPS 細胞の腫瘍形成に関わる c-Myc の機能解明を行った。iPS 細胞の樹立には c-Myc を含めた 4 因子をレトロウイルスを用いて導入してきた。結果得られた iPS 細胞からキメラマウスを作り長期観察を行ったところ、8 割近いマウスで腫瘍形成が認められた。詳細な結果からこの腫瘍形成にはレトロウイルス由来 c-Myc の再活性化が関与していることが分かった。

神経細胞への分化誘導だけでなく、肝細胞、血液細胞、心筋細胞、などへの分化誘導法の確立も進め、iPS 細胞の性状解析の一つのツールとして用いることができることを確認した。

初期化誘導過程における分子機序を明らかにするために、薬剤で初期化誘導遺伝子群の発現を自在に制御することで高効率に初期化を行うシステムの構築を行った。体細胞が iPS 細胞になる中途段階の解析を行うために、数%程度の割合で存在するリプログラミングされ始めた細胞を分離・濃縮し、ヒト線維芽細胞が初期化を受け進行していく過程を詳細に解析した。また、その知見を利用し、iPS 細胞の樹立効率に影響がある因子として同定した LIN28, p53, Cyclin D1 の作用メカニズムを明らかにした。

遺伝子発現制御機構の一つである DNA メチル化について、次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析を行い、4000 箇所を超える iPS 細胞に特異的な DNA メチル化領域を同定した。そして、これらの領域と初期化誘導因子の DNA 結合配列に相関があることを示し、

エピゲノム制御が初期化に大きく関わっていることが示唆された。

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析によって初期化前後におけるスプライシングバリエーションごとの発現プロファイリングを行った結果、体細胞初期化前後でスプライシングパターンが変化する遺伝子を 500 個以上同定した。さらに、スプライシングパターンが変化するタイミングは遺伝子ごとに異なり、初期化の様々な段階で起こることを示した。

5. 主な発表論文等

(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 71 件)

1. Nakamura, T. et al. (他 4 名、1 番目) Essential roles of ECAT15-2/Dppa2 in functional lung development. *Mol Cell Biol* 31(21):4366-4378, 2011. 査読有
2. Maekawa, M. et al. (他 9 名、1 番目) Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 474(7350):225-229, 2011. 査読有
3. Iwabuchi, K. et al. (他 6 名、1 番目) ECAT11/Lltd1 is enriched in ESCs and rapidly activated during iPSC generation, but it is dispensable for the pluripotency. *PLoS ONE* 6(5): e20461, 2011. 査読有
4. Okita, K. et al. (他 15 名、1 番目) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8(5):409-412, 2011. 査読有
5. Nakagawa, M. et al. (他 4 名、1 番目) Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(32):14152-14157, 2010. 査読有
6. Okita, K. et al. (他 3 名、1 番目) Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* 5(3):418-428, 2010. 査読有
7. Takahashi, K. et al. (他 4 名、1 番目) Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *PLoS ONE* 4(12):e8067, 2009. 査読有
8. Yoshida, Y. et al. (他 4 名、1 番目) Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 5(3):237-241, 2009. 査読有
9. Hong, H. et al. (他 7 名、1 番目)

- Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. Nature 460(7259): 1132-1135, 2009. 査読有
10. Miura, K. et al. (他 13 名、1 番目) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. Nat Biotechnol 27(8):743-745, 2009. 査読有
 11. Tsubooka, N. et al. (他 5 名、1 番目) Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. Genes Cells 14(6):683-694, 2009. 査読有
 12. Okita, K. et al. (他 4 名、1 番目) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science 322(5903):949-953, 2008. 査読有
 13. Aoi, T. et al. (他 7 名、1 番目) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science 321:699-702, 2008. 査読有
 14. Nakagawa, M. et al. (他 9 名、1 番目) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotechnol 26:101-106, 2008. 査読有
 15. Takahashi, K. et al. (他 3 名、1 番目) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc 2:3081-3089, 2007. 査読有
 16. Takahashi, K. et al. (他 6 名、1 番目) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131:861-872, 2007. 査読有
 17. Okita, K. et al. (他 2 名、1 番目) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 448:313-317, 2007. 査読有

[学会発表] (計 234 件)

1. Yamanaka, S. Induction of Pluripotency by Defined Factors. Keystone Symposia 2012 Cardiovascular Development and Regeneration 2012/1/22 タオス (アメリカ)
2. 山中伸弥 偶然と幸運から生まれた iPS 細胞 第 34 回分子生物学会年会 日本分子生物学会若手教育シンポジウム 若手教育ランチョンセミナー2011 2011/12/1 東京
3. Yamanaka, S. Induction of Pluripotency by Defined Factors. ISSCR 9th Annual Meeting 2011/6/17

- トロント (カナダ)
4. Yamanaka, S. Induction of Pluripotency by Defined Factors. ISSCR 8th Annual Meeting 2010/6/16 サンフランシスコ (アメリカ)
 5. 山中伸弥 iPS 細胞の可能性と課題 第 9 回日本再生医療学会総会 2010/3/19 東京
 6. 山中伸弥 Induction of Pluripotency by Defined Factors. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009/12/9 神奈川
 7. Yamanaka, S. Induction of Pluripotency by Defined Factors. ISSCR 7th Annual Meeting 2009/7/11 バルセロナ (スペイン)
 8. 山中伸弥 iPS 細胞の可能性と課題 第 8 回日本再生医療学会総会 2009/3/5 東京
 9. 山中伸弥 多能性総論 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2008) シンポジウム”多能性幹細胞を規定する因子群-臨床応用を見据えて-” 2008/12/9 兵庫
 10. Yamanaka, S. Generation of iPS cells from adult human fibroblasts. Keystone Symposia "Signaling Pathways in Cancer and Development" 2008/3/25 スティームボート スプリングス (アメリカ)
 11. 山中伸弥 人工万能幹 (iPS) 細胞の可能性と課題 第 7 回日本再生医療学会総会 2008/3/14 愛知

[産業財産権]

○出願状況 (計 55 件)

○取得状況 (計 7 件)

1. 名称:Nuclear Reprogramming Factor and Induced Pluripotent Stem cells
発明者: 山中伸弥、高橋和利、他
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 特許
番号: 8129187
取得年月日: 2011/12/27
国内外の別: 国外
2. 名称:Nuclear Reprogramming Factor and Induced Pluripotent Stem cells
発明者: 山中伸弥、高橋和利
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 特許
番号: 8058065
取得年月日: 2011/11/15
国内外の別: 国外
3. 名称: Nuclear Reprogramming Method
発明者: 山中伸弥、高橋和利、中川誠人
権利者: 国立大学法人京都大学

- 種類：特許
番号：0153139
取得年月日：2011/6/15
国内外の別：国外
4. 名称：誘導多能性細胞からの体細胞の製造方法
発明者：山中伸弥
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：4411363
取得年月日：2009/11/20
国内外の別：国内
5. 名称：誘導多能性幹細胞の製造方法
発明者：山中伸弥
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：4411362
取得年月日：2009/11/20
国内外の別：国内
6. 名称：誘導多能性幹細胞の製造方法
発明者：山中伸弥
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：4183742
取得年月日：2008/9/21
国内外の別：国外
7. 名称：Genes with ES Cell-specific Expression
発明者：山中伸弥
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：US7250255
取得年月日：2007/7/31
国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 伸弥 (YAMANAKA SHINYA)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：10295694

(2) 研究分担者

青井 貴之 (AOI TAKASHI)
京都大学・iPS細胞研究所・教授
研究者番号：00546997

中川 誠人 (NAKAGAWA MASATO)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：10379539

高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)

京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：80432326

沖田 圭介 (OKITA KEISUKE)
京都大学・iPS細胞研究所・講師
研究者番号：90512434

吉田 善紀 (YOSHIDA YOSHINORI)
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師
研究者番号：20447965

渡辺 亮 (WATANABE AKIRA)
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号：60506765

山本 拓也 (YAMAMOTO TAKUYA)
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号：60546993

Knut Woltjen
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号：50589489

小柳 三千代 (KOYANAGI MICHIO)
京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員
研究者番号：90432327

(3) 連携研究者

()

研究者番号：