

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間： 2007～2008

課題番号：19689008

研究課題名(和文) 既知因子によるヒト体細胞核の初期化

研究課題名(英文) Nuclear reprogramming of human somatic cells by defined factors

研究代表者 高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)

京都大学 物質 細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター 特定拠点助教

研究者番号：80432326

研究成果の概要：

本研究課題では、体細胞を既知遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) によって初期化する技術を人に応用することを目的として掲げた。

iPS 細胞の安全性を高める目的でいくつかの検討課題を設け、改善を試みた。結果として、初期化に必要な遺伝子のうち癌化の可能性となりうる c-Myc を用いずに iPS 細胞を作製することに成功した。また、皮膚由来の線維芽細胞よりも肝臓や胃粘膜由来の上皮細胞の方が、容易に質の良い iPS 細胞が樹立できることもわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2008年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
年度			
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

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：再生医療、再プログラム化、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

胚性幹 (ES) 細胞は受精卵由来の幹細胞であり、体を構成するあらゆる細胞系譜へと分化することができる分化多能性を有している。1998年、ヒトES細胞の樹立が報告されたことをきっかけとして、再生医療への応用に期待が高まっている。ES細胞を安全に医療へ応用するためには、その分化多能性を規定する分子メカニズムを解明することが必須である。これまでに分化多能性にはOct3/4、Sox2、Nan

ogといった転写因子群が必須であることが明らかになり、一方で、高い増殖能にはERas、β-catenin、c-Mycなどの癌関連遺伝子が重要であることが見出されている。

ES細胞を用いた移植治療にはいくつかの問題点がある。第一に、移植後に生じる拒絶反応の問題がある。これは現存するES細胞と移植を受ける患者の遺伝情報が完全に一致しないことによる。第二に、ES細胞を樹立する際に受精卵の破壊を伴うという問題である。こ

これらの技術的および倫理的問題を解決しない限りは、多能性幹細胞を用いた再生医療は実現不可能である。これらの問題を克服しうる理想的な方法として、患者自身の体細胞から分化多能性を有する細胞を作り上げることが考えられる。

申請者らは ES 細胞の分化多能性および高い増殖能に關与している遺伝子群の中に、体細胞核を初期化し分化多能性を再獲得させる能力を有する因子が存在するという仮説を立てた。

体細胞の分化多能性再獲得を鋭敏に感知する系として、ES 細胞や生殖細胞などの分化多能性細胞で特異的に発現する *Fbx15* 遺伝子の遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子を挿入したマウス (*Fbx15*-Neo) を利用した。分化多能性を再獲得した場合のみ *Fbx15* の発現が ON となり、G418 耐性になることを期待した系である。

分化多能性の再獲得を引き起こす候補因子として、ES 細胞の性質に重要な役割を果たしていると考えられる、ES 細胞で特異的に発現する遺伝子群および癌関連遺伝子群の中から 24 遺伝子を選び出した。これらをレトロウイルスベクターに組み込み、*Fbx15*-Neo マウス由来の繊維芽細胞に導入した。その結果、*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4* および *c-Myc* の 4 遺伝子を同時に強制発現させることで ES 様細胞を体細胞から誘導することができた。申請者らはこの細胞を誘導多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell; iPS 細胞) と名付けた。iPS 細胞は ES 細胞と同様に、試験管内および生体内の分化誘導系において、神経、筋肉、消化管、軟骨などの三胚葉系細胞に分化した。また、胚盤胞に注入することによりキメラマウスの発生に寄与したことから、分化多能性を有していると結論付けた。

2 . 研究の目的

申請者らは、マウスの胎児または成体由来の繊維芽細胞に、4種の既知遺伝子 (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*) を導入することにより ES 細胞に類似した性質を有する誘導多能性幹 (induced Pluripotent Stem; iPS) 細胞を作製する技術を開発した。

本研究課題では、マウス細胞を用いた検討結果をもとに、ヒト体細胞から iPS 細胞を作製することを目的とする。

3 . 研究の方法

マウス細胞を用いた実験で得られた知見をもとに、実験系の改良を行い、ヒト体細胞集団中に ES 細胞特異的遺伝子群を発現する細胞を出現させることを目的とする。

本研究課題の目的は、マウスの実験系で成功した iPS 細胞の作製をヒト細胞において実現することである。この目的を達成するために、まずマウス細胞とヒト細胞の違いに焦点を当てて実験を行う。

近年、幹細胞の増殖や自己複製において、原癌遺伝子産物が重要な役割を果たしているケースがいくつも明らかになっており、幹細胞と癌細胞の共通点が示唆されている。マウス細胞は培養下において、一定の頻度で自発的に不死化することからヒト細胞と比較して明らかに腫瘍化しやすいと考えられている。ES 細胞においても類似した現象が見られる。マウス ES 細胞は 1 日に 2 回ほど分裂し、非常に速い速度で増殖する。一方で、ヒト ES 細胞は 3~4 日に 1 回程度の非常に低い速度でしか増殖できない。

分化した体細胞が未熟な (未分化な) 状態に戻るという観点からすると、細胞の腫瘍化と iPS 細胞の作製は類似したメカニズムによって引き起こされている可能性が考えられる。

そこで、ヒト体細胞から iPS 細胞を作製するに当たり、まず細胞を不死化させることによりある程度腫瘍化しやすい状態 (マウス細胞に近い状態) にすることが重要であると考えている。ヒト細胞を不死化する方法としては、ヒトパピローマウイルス 16 型の E7 による癌抑制遺伝子 Rb の不活性化とテロメラーゼによるテロメア長の維持が必要である。その他にも、SV40 ウイルスの ラージ T 抗原による Rb および p53 の不活性化も有効である。これらの方法を組み合わせて、ヒト細胞を不死化して実験に用いる。

iPS 細胞を作製するために用いるヒト体細胞として、皮膚細胞である HDF および BJ を候補に考えている。HDF は胎児、新生児および

成人由来の細胞が入手可能であり、増殖能も高いが腫瘍化に対する応答性は低い。一方で、BJ細胞は成人由来であり増殖はやや遅いものの、腫瘍化刺激に対する応答性が比較的高い。これら、性質の異なる皮膚細胞を並行して用いることにより比較検討を行う。また、皮膚細胞に特化するのではなく、他の細胞種の使用も考えている。より未熟な細胞である、間葉系間質細胞、脂肪組織由来の成体幹細胞および滑膜由来細胞などを候補として考えている。マウスとは異なり、ヒトにおいては分化の進行した皮膚細胞等を未分化状態に引き戻し、iPS細胞を作製することは不可能かもしれない。しかし、将来的な医療への応用を考慮した場合、完全に分化した細胞に分化多能性を再獲得させることにこだわる必要はない。これらの比較的未分化度の高い細胞に分化多能性を獲得させることが可能になれば、患者自身から採取した細胞でiPS細胞を作製し、移植することは十分可能である。

また、ヒト細胞を用いた実験を行うにあたり、遺伝子導入法に関する問題が生じると考えられる。マウス細胞に遺伝子を導入するために用いたレトロウイルスは非常に高力価なものである。これまでの研究により、マウスiPS細胞を作製するためには導入遺伝子の高発現が必要であることが示唆されており、ヒト細胞を用いた実験においても同様であると考えられる。これまで用いたレトロウイルスはエコトロピックウイルスであり、げっ歯類の細胞に対してのみ感染が可能である。そこで、これまでにエコトロピックウイルスレセプターである*Slc7a1*遺伝子をヒト細胞に強制発現させることにより、エコトロピックウイルスに感受性であるヒト細胞を現在準備している。これらの細胞を利用することにより、マウス細胞で行ったものと同様の遺伝子導入が可能になると考えられる。この系を利用して、ヒト細胞に遺伝子を導入しiPS細胞の作製を試みる。

初年度で作製したiPS細胞を他の細胞から分離、純化しその性質を詳細に検討することを目的とする。また、iPS細胞を実用化するために克服すべき問題点について検討を行う。

マウス細胞を用いたiPS細胞の作製におい

て重要なポイントであるのが、ES細胞特異的遺伝子座に薬剤選択マーカーを導入したマウス由来の細胞を用いたことである。分化多能性の再獲得によりES細胞特異的遺伝子が発現することを利用し、薬剤選択によるiPS細胞の単離を行った。しかし、ヒト細胞においてこのような遺伝子改変は不可能であるため、代替法を用いてiPS細胞を分離する必要がある。

薬剤選択に代わる細胞分離法として、多能性幹細胞特異的表面抗原を利用した分離方法が考えられる。マウスES細胞はその細胞表面にSSEA-1やアルカリフォスファターゼ(APase)等を発現している。分化誘導後に発現が消失することから、未分化細胞マーカーとして広く用いられている。これまでの研究により、マウスiPS細胞においてもSSEA-1およびAPaseが発現していることを確認した。

一方、ヒトES細胞ではSSEA-3、SSEA-4およびAPaseが未分化特異的な細胞表面マーカーとして知られている。また、造血幹細胞等多くの幹細胞および癌幹細胞において発現が確認されているABCG-2も幹細胞特異的な表面抗原として用いることができる。これらの分子に対する抗体を用いて、分化多能性を獲得した細胞のみを分離することが目標である。

8×10^5 個のマウス初代胎児由来繊維芽細胞に対して、iPS細胞誘導に必要なOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycをレトロウイルスで導入した場合、形成されるiPSコロニーの数は200~300個程度である。レトロウイルスの感染効率が70%程度であることを考慮して計算すると、約0.05%の確率でiPS細胞が出現することがわかる。この非常に微小な細胞集団を分離する場合、いくつかの問題点が想定される。

蛍光標識した抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターを用いてソーティングを行う方法が一般的であるが、このような微量な細胞集団を分離するためには非常に時間がかかることが考えられる。そのため、細胞に対するダメージも大きくなることが懸念される。そこで、申請者らは磁気ビーズ標識した抗体と専用カラムによる分離を行う方法であるMagnetic Activated Cell Separation (MACS)を用いることを考えている。磁気ビーズで標識した抗体と細胞を反応させ、磁場中に置いた

カラムに通す。抗体と結合した細胞のみがカラム中に残り、結合しない細胞は洗い流される。この方法を用いることにより、極微量の細胞集団でも短時間でダメージを与えることなく分離できると考えている。

さらに、陽性細胞に対して陰性細胞の割合が圧倒的に多い場合、どのような分離法を用いても陰性細胞の混入が増加すると考えられる。マウスiPS細胞は、もととなる繊維芽細胞よりも非常に増殖能が高いため、繊維芽細胞が多少混入した場合でも影響は少ない。しかし、ヒト細胞を考えた場合、ヒトES細胞の分裂が3~4日に一回であることから繊維芽細胞の混入は分離後における細胞集団の性質を変化させるほどの威力を持ちうると考えられる。そこで、上述の幹細胞特異的表面抗原であるSSEA-3、SSEA-4、APaseおよびABCG-2に対する抗体を組み合わせて、複数回のMACSを行いiPS細胞の分離および純化を行う。iPS細胞がある程度の高い割合に達した時点で、フローサイトメーターを用いたソーティングも併用することを考えている。

得られたヒトiPS細胞の性質を解析する。ES細胞特異的遺伝子の発現をRT-PCR法で確認する。また、半永久的に安定して増殖できることがES細胞の特徴であるため、ヒトiPS細胞も同様の増殖能を有するかどうかを検討する。そして、最大の特徴である分化多能性を確認する試験として、胚様体形成による*in vitro*分化誘導を行う。三胚葉系の細胞に分化していることを免疫抗体染色およびRT-PCRで確認する。さらに、免疫不全マウスに対して、iPS細胞を皮下注射することにより奇形腫を形成させる。奇形腫の組織切片を作製、観察することにより、*in vivo*においても分化多能性を有していることを確認する。

本研究の主な目的はヒト体細胞から多能性幹細胞を作り上げることである。これまでにマウス細胞を用いた研究を通して、iPS細胞を医療への実用化に近づけるために改良すべき点が見つかっている。

第一に、レトロウイルスを用いた遺伝子導入である。レトロウイルスの挿入部位によっては細胞の形質転換を引き起こすことも考えられる。また、導入する遺伝子に癌遺伝子

c-Mycが含まれていることも不安材料である。これらの問題を解決するために、アデノウイルスやタンパク質導入による一過性発現系を用いたiPS細胞の作製を検討する。また、c-Mycに代わる遺伝子をcDNAライブラリーを用いたスクリーニングで探索する。

第二に、遺伝子が導入された細胞に対するiPS細胞の形成効率が非常に低いことである。これまでの研究により、遺伝子導入細胞のうち、約0.05%が分化多能性を獲得すると考えられる。サイトカイン刺激、フィーダー細胞、培地の組成等を改善し、確率を上昇させる条件を検討する予定である。

4. 研究成果

我々は、ヒトの皮膚由来繊維芽細胞にマウスの場合と同様の4遺伝子を導入することにより、ヒトiPS細胞を作製することに成功した。ヒトiPS細胞はマウスES細胞と比較して扁平なコロニーを形成するヒトES細胞とよく似た形態を示した。ヒトiPS細胞はSSEAsやTRAsといったヒトES細胞の表面抗原だけでなく、様々なマーカー遺伝子を発現しており、マイクロアレイの結果からもES細胞と類似した発現様式を示した。

多能性細胞特異的遺伝子群のプロモーター領域においてCpG配列は脱メチル化状態にあり、抗ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降の結果、ヒストンH3の4番目のリジン残基が高度にメチル化を受けていた。また、GATA6、MSX2、HAND1など発生に関与する遺伝子群のプロモーター領域では、4番目および27番目のリジンが共にメチル化を受けたバイバレントな状態であった。

胚様体形成による分化誘導の結果、ヒトiPS細胞は内胚葉、中胚葉、外胚葉を含む細胞へと分化することができた。免疫不全マウスに注射して作製した奇形腫においても同様の分化多能性を確認することができた。さらに、これまでにES細胞を用いて開発された分化誘導法をヒトiPS細胞に適用することで、高効率にドーパミン産生ニューロンや心筋細胞を作製することにも成功した。

染色体解析の結果、ヒトiPS細胞は正常な核型を保持しており、マウスES細胞の培養

条件では樹立および維持ができないが、ヒト ES 細胞の培養条件下では少なくとも半年以上は増殖を続けている。このことから、ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞に良く似た性質を備えていると考えられる。我々は、36 歳の女性、69 歳の男性、胎児および新生児の線維芽細胞でヒト iPS 細胞の作製に成功している。この結果は年齢や性別に関係なく、線維芽細胞が初期化され多能性細胞になりうることを示している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Takashi Aoi, Kojiro Yae, Masato Nakagawa, Tomoko Ichisaka, Keisuke Okita, Kazutoshi Takahashi, Tsutomu Chiba and Shinya Yamanaka, “Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells.” *Science* 321: 699-702 (2008)
2. Masato Nakagawa, Michiyo Koyanagi, Koji Tanabe, Kazutoshi Takahashi, Tomoko Ichisaka, Takashi Aoi, Keisuke Okita, Yuji Mochiduki, Nanako Takizawa and Shinya Yamanaka, “Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.”, *Nature Biotechnology* 26: 101-106, 2008
3. Kazutoshi Takahashi, Keisuke Okita, Masato Nakagawa and Shinya Yamanaka, “Induction of pluripotent stem cells from

fibroblast cultures.” *Nature Protocols* 2:

3081-3089, 2007

4. Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda and Shinya Yamanaka, “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.” *Cell* 131: 861-872 (2007)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 高橋和利：ヒト iPS 細胞研究の最新動向 平成 20 年度 KAST フォーラム 3 (2009.3.13 神奈川)
2. 高橋和利：日本人由来 iPS 細胞の樹立 第 8 回日本再生医療学会(2009.3.5 東京)
3. 高橋和利：Induction of Pluripotency by Defined Factors. 第 21 回日本動物細胞工学会大会 (2008.11.25 福岡)
4. 高橋和利：iPS 細胞の樹立とその展開 WalkAgain2008 シンポジウム「患者に語る：iPS 細胞」(2008.10.5 東京)
5. Takahashi, K.: Induction of pluripotency by defined factors. Royal College of Surgeons of Edinburgh “Programming pluripotent cell identity” (2008.8.27 スコットランド)
6. 高橋和利：iPS 細胞の樹立と再生医療への応用 JST シンポジウム CREST12 科学技術イノベーションを目指す CREST の挑戦 (2008.5.27 東京)

7. Takahashi, K., Yokura, M., Okada, A., Tanaka, T., Ichisaka, T., and Yamanaka, S.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Japanese Skin. 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) (2008.12.9 神戸)
8. 高橋和利: ヒト人工多能性幹細胞の樹立 科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」 第4回公開シンポジウム (2007.12.14 東京)
9. 高橋和利、沖田圭介、中川誠人、山中伸弥: 人工多能性幹細胞作成法の改良 BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会) (2007.12.12 神奈川)

〔図書〕(計4件)

1. 「遺伝子導入による万能細胞の作製」高橋和利、沖田 圭介、山中 伸弥 関節外科 26: 1191-1192, 2007
2. 「遺伝子導入による万能細胞の作製」高橋和利、沖田 圭介、山中 伸弥 再生医療 6: 284-289, 2007
3. 「体細胞培養から誘導される人工万能幹細胞」高橋和利、山中伸弥 細胞工学 26: 489-492, 2007
4. 「特定因子による多能性幹細胞の誘導」高橋和利、山中伸弥 実験医学 25: 479-483, 2007

〔その他〕

ホームページ等

http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc02/ym_hp2009/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 和利 (TAKAHASHI KAZUTOSHI)
京都大学 物質・細胞統合システム拠点
iPS細胞研究センター 特定拠点助教
研究者番号: 80432326