

機関番号：14301

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

研究成果の概要（和文）： 体細胞を多能性幹細胞に変換する再プログラム化技術の発展を目的に、体細胞と胚性幹（ES）細胞との細胞融合による体細胞核の再プログラム化を応用した。その結果、1）ヒト ES 細胞はヒト体細胞核の再プログラム化能をもつ、2）ヒト融合細胞からの染色体除去が可能、3）染色体除去により ES 細胞では相同染色体組換えによる正常 2 倍体細胞の出現、が明らかになった。これらの成果は、人工多能性幹（iPS）細胞への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）： To develop technology of nuclear reprogramming of somatic cells into pluripotent stem cells, human somatic cells were cell-fused with human embryonic stem (ES) cells. We got the following results; 1) human ES cells had potential of reprogramming of human somatic cells into pluripotent stem cells, 2) selected chromosome(s) were eliminated from ES-somatic hybrid cells, and 3) karyotypically normal ES cells were generated by duplication of an eliminated chromosome. These developed techniques could be applied to induced pluripotent stem (iPS) cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：ES 細胞、体細胞、細胞融合、拒絶反応、再プログラム化

## 1. 研究開始当初の背景

体細胞の再プログラム化による多能性幹細胞への変換は、テラーメイドの幹細胞の作製技術として世界の注目を集めている。我々の細胞融合系は、倫理問題が少なく応用範囲の広いシステムとして注目されている。また、米国ハーバード大学の研究グループからヒト ES 細胞を用いた体細胞の多能性幹細胞化は、新たな胚材料を用いない体細胞の幹細胞化システムとして世界の注目を集めている。細胞

融合を用いた体細胞の幹細胞化技術の完成には、核から標的となる染色体を自在に取り除く技術の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

- (1) 細胞融合による体細胞の幹細胞化技術の改良
- (2) 余分な染色体を取り除く技術の開発
- (3) 余分な染色体を取り除くツールである一分子の開発と改良

### 3. 研究の方法

#### (1) 染色体除去カセットの考案と作製

① 単純染色体除去カセット分子を構築する

#### (2) ES 細胞への染色体除去カセットの導入

① 染色体除去カセットは *Hprt* 遺伝子を欠損した雄 ES 細胞株、HM-1 にランダムに導入する

② ES 細胞への遺伝子導入はエレクトロポレーション法により行う

③ サザンハイブリダイゼーション法により導入染色体除去カセットのコピー数を解析する

④ 染色体除去カセットの導入部位を遺伝子マッピング法により解析する

#### (3) 改変 ES 細胞と体細胞との細胞融合

① 染色体除去カセット導入 ES 細胞と胸腺細胞を電氣的に融合する

② 融合細胞での GFP の発現、核型を解析する

#### (4) 染色体除去カセットの活性化

① 融合細胞への一過的な Cre 酵素遺伝子導入により染色体除去を誘導する

② 染色体除去後 7-10 日間の継代培養を行う

#### (5) 染色体除去融合細胞の選別

① セルソーターを用いて GFP 陰性細胞を分取する

② GFP 陰性細胞の染色体核型を G-バンド解析する

#### (6) 染色体除去の確認

① 染色体ペインティング法による除去染色体の確認

### 4. 研究成果

#### (1) 染色体除去カセット (CEC) の作製に成功

① 染色体除去に必要な向かい合わせの LoxP 配列に蛍光マーカー遺伝子である GFP や DsRed、加えて薬剤選択耐性遺伝子 Neo や Hygro を導入して、単純で小型の染色体除去カセットの作製に成功した。

#### (2) マウス ES 細胞における染色体除去カセット導入ライブラリーの作製

① マウスの 20 対の常染色体上にそれぞれ 1 個染色体除去カセットが導入された ES 細胞クローンからなる染色体除去カセットライブラリーを作製に成功した。

#### (3) マウス ES 細胞への多コピー染色体除去カセットの導入

① マウスの 20 対の常染色体すべてに染色体除去カセットが導入された ES 細胞の作製を目指して、レンチウイルスを用いて染色体除去カセットを遺伝子導入することに成功した。

② マウス ES 細胞に 40 コピー以上の染色体除去カセットを導入したクローンの

作製に成功しコピー数をサザンハイブリダイゼーション解析により確認した。

#### (4) CEC-ES 細胞と体細胞の融合細胞の作製

① 1 または多コピーの染色体除去カセットを導入した ES 細胞と体細胞を電氣的に細胞融合して、融合細胞株を樹立することに成功した

② 融合細胞に LoxP 配列を標的にして DNA 組み換えを引き起こす Cre 組み換え酵素遺伝子を、一過性発現の状態を導入することに成功した。

#### (5) 融合細胞からの ES 細胞ゲノム除去

① DNA 組み換え処理後の融合細胞から FACS ソーティングにより、GFP または DsRed 陰性クローンを選別し、染色体除去カセットを欠損した融合細胞クローン株の作製に成功した。

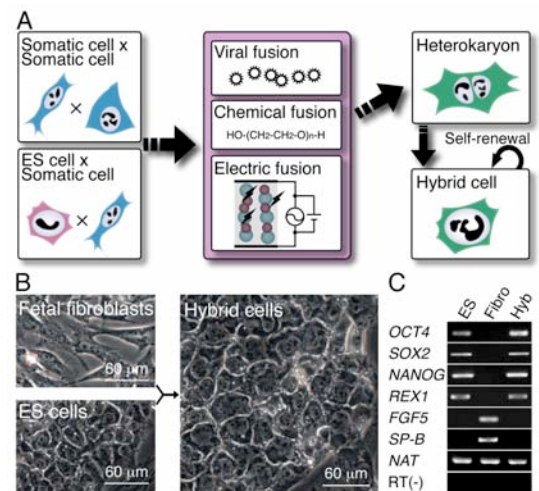
② DNA 組み換え処理後の融合細胞を G418 またはハイグロマイシンを含む培地で培養することで、細胞致死が誘導されることから染色体除去カセットの欠損を確認した。

③ 除去染色体を染色体ペインティングで確認した。

#### (6) ヒト ES 細胞への染色体除去カセットの導入

① ヒト ES 細胞に染色体除去カセットを一般的電気遺伝子導入法および新しく開発された核遺伝子導入法により遺伝子導入することに成功した。

② 融合細胞を G418 またはハイグロマイシン耐性細胞株として樹立することに成功した (図参照)



③ 染色体除去カセット挿入部位を PCR 法の応用により同定することに成功した。

#### (7) ヒト ES 細胞と体細胞の融合細胞の作製

① ヒト体細胞株 TIG1 および TIG3 と CEC-ES 細胞を電氣的に細胞融合した。薬剤選択により融合細胞株を樹立することに成功した (図参照)。

- ② 融合細胞にLoxP 配列を標的にして DNA 組み換えを引き起こす Cre 組み換え酵素遺伝子を、一過性発現の状態を導入することに成功した。
  - ③ DNA 組み換え処理後の融合細胞から FACS ソーティングにより、GFP または DsRed 陰性クローンを選別し、染色体除去カセットを欠損した融合細胞クローン株の作製に成功した。
  - ④ DNA 組み換え処理後の融合細胞を G418 またはハイグロマイシンを含む培地で培養することで、細胞致死が誘導されることから染色体除去カセットの欠損を確認した。
- (8) ヒト融合細胞からの染色体除去の解析
- ① 除去染色体を染色体ペインティングで確認した。
  - ② 核型解析により、染色体除去を確認した。
- (9) マウスおよびヒト 2 倍体 ES 細胞からの染色体除去
- ① ヒトおよびマウス CEC-ES 細胞を DNA 組み換え酵素で処理した結果、染色体除去が成功下にもかかわらず、正常核型を維持している細胞株のあることを確認した。
  - ② 正常核型染色体除去 ES 細胞株では、欠損した染色体が対になる染色体の重複により正常化していることを発見した。

ES 細胞との細胞融合による体細胞の再プログラム化と融合細胞からの染色体除去技術は、その後に出現した人工多能性幹 (iPS) 細胞作製技術の発見により有用性が低下した。一方、染色体除去により発見された、2 倍体細胞での自然に起きる相同組み換えによる異常 (染色体欠損) の正常化は、iPS 細胞技術の応用に新たな可能性を示している。

## 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 9 件)

- ① Shineha, R., Kawakami, M., Kawakami, K., Nagata, M., Tada, T. and Kato, K.: Familiarity and prudence of the Japanese public with research into induced pluripotent stem cells, and their desire for its proper regulation. **Stem Cell Review**, **6**, 1-7 (2010). 査読有
- ② 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**, 4011-4020 (2009). 査読有

- ③ 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**, 1395-1404 (2009). 査読有
  - ④ Tada, M., Matsumura, H., Kurose, Y., Nakatsuji, N. and Tada, T.: Target chromosomes of inducible deletion by a Cre/inverted loxP system in mouse embryonic stem cells. **Chromosome Research** **17**, 443-450 (2009). 査読有
  - ⑤ Tada, T.: Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent cells: fantasy or reality? **Cell Stem Cell**, **3**, 121-122 (2008). 査読有
  - ⑥ 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**, 328-336 (2008). 査読有
  - ⑦ Mise, N., Fuchikami, T., Sugimoto, M., Kobayakawa, S., Ike, F., Ogawa, T., Tada, T., Kanaya, S., Noce, T. and Abe, K.: Differences and similarities in the developmental status of embryo-derived stem cells and primordial germ cells revealed by global expression profiling. **Genes Cells**, **13**, 863-877 (2008). 査読有
  - ⑧ Matsumura, H. and Tada, T.: Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. **Reproductive BioMedicine Online**, **16**, 51-56 (2007). 査読有
  - ⑨ Matsumura, H., Tada, M., Otsuji, T., Yasuchika, K., Nakatsuji, N. and Tada, T.: Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cell nuclei. **Nature Methods**, **4**, 23-25 (2007). 査読有
- [学会発表; 招待講演のみ] (計 20 件)
- ① 多田 高: 空想が現実になった核リプログラミング: 細胞融合から iPS 細胞へ (2010) 「第 26 回京都賞記念ワークショップ・先端技術部門」、京都、日本
  - ② 多田 高: ヒト体細胞の人工多能性幹 (iPS) 細胞化リプログラミングの効率化

- (2010) 第 82 回日本遺伝学会シンポジウム「多様な生命現象におけるエピゲノム制御」、札幌、日本
- ③ Tada, T. (2010) Reprogramming efficiency and reprogramming in ground state of human somatic cells to iPSCs: 「Biology Seminar in York University」、York, UK
- ④ Nagata, S., Yamaguchi, S., Hirano, K. and Tada, T. (2010) Reprogramming-susceptible somatic cells and reprogramming-optimized Sox2 expression: 「Symposium; “Nuclear Reprogramming: From germline to cloned animals” in 43<sup>rd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists」, Kyoto Japan
- ⑤ 多田 高: 融合細胞と iPS 細胞のリプログラミング(2010)日本細胞生物学会総会シンポジウム「遺伝現象におけるエピジェネティクス制御とリプログラミング」、大阪、日本
- ⑥ 多田 高: ヒト iPS 細胞と尿膜細胞の可能性(2010)再生医療学会総会シンポジウム「ES・iPS 細胞の特性・未分化性維持」、広島、日本
- ⑦ 多田 高: ES 細胞および iPS 細胞を利用した薬理・トキシコロジー研究とその将来(2009)「第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、特別講演」、盛岡、日本
- ⑧ Tada, T. (2009) Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent stem cells: Fantasy or reality?: 「BioMedical Asia 2009」, Singapore, SINGAPORE
- ⑨ Tada, T. (2009) Nuclear Reprogramming and Regenerative Medicine: 「INDO-JAPAN Workshop on Nanobiotechnology and Nanodevices」, Thanjavur, INDIA
- ⑩ Tada, T. (2008) Nuclear Reprogramming; Pluripotent Stem Cells by Cell Fusion and iPS Induction 「The 2008 Seoul International Symposium on Stem Cell Research」, Seoul, KOREA
- ⑪ 多田 高: 体細胞の多能性幹細胞への再プログラミング(2008)「生体機能と創薬シンポジウム 2008-生命システムにおける情報ネットワークの重要性を解く-」、東京、日本
- ⑫ 多田 高: 細胞融合と細胞核の再プログラミング(2008)日本細胞培養学会第 81 回大会シンポジウム、つくば、日本
- ⑬ Tada, T. (2007) Cell fusion-mediated Nuclear Reprogramming and Pluripotency Factor Nanog: Stem Cell Seminar in Institute for Stem Cell Research, University of Edinburgh, Edinburgh, UK
- ⑭ 多田 高: 再プログラミングとゲノム(2007)クロマチン研究会「ゲノム・細胞核から個体発生まで」、三島、日本
- ⑮ Tada, T. (2007) Molecular mechanisms of nuclear reprogramming by cell fusion. The Satellite Symposium “Reprogramming of Somatic Cells for the Therapy of Heart Disorders” Dusseldorf, GERMANY
- ⑯ 山口新平、黒田貴雄、中辻憲夫、多田 高: 未分化性維持因子 Nanog の修飾と機能(2007)第 79 回日本遺伝学会ミニシンポジウム、岡山、日本
- ⑰ 多田 高: 体細胞からの再プログラミング幹細胞-細胞融合と染色体除去- (2007) 第 11 回 Molecular Cardiovascular Conference、キロロ・北海道、日本
- ⑱ 多田 高: 細胞の若返り-体細胞から万能細胞を作る- (2007) 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-」、東京、日本
- ⑲ Tada, T. (2007) Cre-dependent elimination of loxP-tagged chromosomes from mouse ES-somatic hybrid cells. 23<sup>rd</sup> RBC International Symposium, Kyoto, JAPAN.
- ⑳ Matsumura, H., Shinpei, Y., Hirano, K. and Tada, T. (2007) Chromatin reprogramming of somatic nuclei mediated by cell fusion with embryonic stem cells. International Symposium: Functional Organization of the Nucleus. Awaji, JAPAN
- 〔図書〕(計 11 件)
- ① Kunio, H. and Tada, T.: Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. In “Nuclear reprogramming and stem cells” Ed by Justin Ainscough, Sinya Yamanaka and Takashi Tada (Springer, USA), in press.
- ② Toyoda, M., Nagata, S., Makino, H., Akutsu, H., Tada, T. and Umezawa, A.: Generation of induced pluripotent stem cell from human amnion cells. In “Lineage-specific differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells methods and protocols” Ed by Kaiming Ye and Sha Jin (Humana Press, USA), in press.
- ③ 多田 高: 「リプログラミングの未来と過去」 in 「幹細胞研究の最近の進歩」(須田年生 監修) pp568-580 (最新医学社増刊号 64 巻 802 号、最新医学社、2009)
- ④ 多田 高: 「細胞融合と「核のリプログラミング」 in 「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)
- ⑤ 多田 高:「幹細胞と細胞核構造」 in 「細胞核-遺伝情報制御と疾患」 (平岡 泰・原田昌彦・木村宏・田代聡 編集)  
pp2847-2852 (実験医学 増刊号 27 巻 17 号、羊土社、2009)
- ⑥ 多田 高:「細胞融合と体細胞核の再プログラム化」 in 「培養細胞実験ハンドブック 改訂第 2 版」 (許 南浩・中村幸夫 編集) pp284-290 (実験医学別冊、羊土社、2008)
- ⑦ 多田 高:「ES 細胞から iPS 細胞へ; 再プログラム化の応用」 in 「特集:iPS 細胞誕生後-新たな謎と基礎課題-」  
pp28-32 (現代化学 452 巻、東京化学同人、2008)
- ⑧ 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」 in 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)
- ⑨ 多田 高:「再プログラム化融合細胞の個人対応化技術」 in 「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)
- ⑩ 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」 in 「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術まで」 (山中伸弥 企画) pp462-567 (実験医学、25 巻 4 号、羊土社、2007)
- ⑪ 多田 高:「再プログラム化融合細胞の個人対応化技術」 in 「再生医療へのブレイクスルー その革新技术と今後の方向性」 (田畑泰彦 編集) pp26-31 (遺伝子医学、メディカルドゥ、大阪、2007).

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし