

平成22年 5月24日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008年～2009年度  
 課題番号：20790227  
 研究課題名（和文） 再生医療への応用可能な人工多能性幹（iPS）細胞の樹立  
 研究課題名（英文） Generation of safer iPS cells for clinical application  
 研究代表者 中川 誠人（NAKAGAWA MASATO）  
 京都大学・再生医科学研究所・助教  
 研究者番号：10379539

## 研究成果の概要（和文）：

アデノウイルスを用いることでゲノムに外来遺伝子の挿入のない iPS 細胞の樹立を検討した。iPS 細胞誘導因子のうち、Sox2, Klf4, c-Myc のどれか一つをアデノウイルスで導入することで iPS 細胞を樹立することができた。しかし、Oct3/4 についてはアデノウイルスでの導入で iPS 細胞を樹立することはできなかった。今後は各因子のアデノウイルスによる導入条件の最適化を進め、全ての因子をアデノウイルスで導入して iPS 細胞を樹立する。

## 研究成果の概要（英文）：

I tried to generate non-integrated iPS cells using adenovirus expression system. Mouse iPS cells could be obtained by introducing the reprogramming factors by adenoviruses. Adenovirus of Sox2, Klf4, or c-Myc could be used for iPS generation instead of retroviruses. I could not generate iPS cells using Oct3/4 adenoviruses. I will examine the conditions for adenovirus infection and generate iPS cells only by adenovirus expression system.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：iPS細胞、ES細胞、リプログラミング、再生医療、転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

胚性幹（ES）細胞は、成体を構成するすべての細胞へ分化できる多能性を維持したまま、半永久的に増殖するという特性から再生医療の資源として期待されてきた。しかし、「ヒト ES 細胞の樹立＝受精卵の破壊」という運用上の問題があり、我々を含めた研究者

はその回避策を模索してきた。我々の研究室では体細胞（繊維芽細胞）に4つの転写因子を導入することで生体のすべての細胞に分化できる人工多能性幹（iPS）細胞の樹立に成功した。その結果、受精卵の破壊という運用上の問題も解決でき、また移植治療における拒絶反応の回避も可能と考える。つまり、

iPS 細胞は再生医療において非常に有用な資源となり得る。しかしながら、iPS 細胞を樹立する際にレトロウイルスを用いており、それらは体細胞のゲノムへ挿入される。その中のひとつ c-Myc が原因で iPS 細胞由来のマウスの 30% で腫瘍形成が起こることが分かってきた。

## 2. 研究の目的

レトロウイルス以外の遺伝子導入方法によって iPS 細胞が樹立できないかと模索した結果、ゲノムへの挿入が無く、実際の医療の場でも実績のあるアデノウイルスを用いることを考えた。アデノウイルスで 4 つまたは c-Myc 以外の 3 つの転写因子 (Sox2、Oct3/4、Klf4) を導入し iPS 細胞を樹立できれば、本当に再生医療へ応用できるものになると考えた。

## 3. 研究の方法

アデノウイルスにより 4 つの転写因子をマウス体細胞に導入し iPS 細胞の樹立を行なう。まずはアデノウイルスによってマウス体細胞に遺伝子が十分に導入できるか検討する。レトロウイルスと比べてアデノウイルス由来の遺伝子の発現量や発現期間の検討も行う。これらの実験によりマウス体細胞へのアデノウイルスの感染方法の確立を行なう。次に、4 つの転写因子のうちひとつをアデノウイルスで導入し iPS 細胞が樹立できるか検討する。4 つの転写因子それぞれに適したアデノウイルスの感染方法が確立できれば、必要な転写因子全てをアデノウイルスでマウス体細胞に導入し、iPS 細胞の樹立を目指す。

## 4. 研究成果

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ので、連続投与など、導入方法の最適化をはかった。因子によって細胞内で速やかに分解されるものもあり様々な条件を検討した。3 因子全てをアデノウイルスで同時に投与しそれぞれの因子が細胞内で発現している事を確認できたので、この条件を用いてアデノウイルスによる iPS 細胞の樹立を進めた。アデノウイルスで 1 因子を導入し、ほかの因子をレトロウイルスでマウス線維芽細胞に導入することで iPS 細胞を樹立することに成功した。しかしながら、Oct3/4 をアデノウイルスで導入しほかの因子をレトロウイルスで導入しても iPS 細胞を樹立できなかった。このことは Oct3/4 の安定した発現が iPS 細胞誘導に重要であることを示唆するものと考えた。

次に iPS 細胞樹立の元細胞としてマウス初代培養の肝細胞を用いた。肝細胞は線維芽細胞に比べて少ない量のレトロウイルスで iPS 細胞が樹立できることからアデノウイルスを用いた場合にも有効であると考えた。肝細胞を用いた場合も線維芽細胞の時と同様に Oct3/4 をアデノウイルスで導入した場合は iPS 細胞の樹立ができなかったことから、iPS 細胞誘導時の Oct3/4 の発現レベルは非常に厳密に制御されていることが再確認された。アデノウイルスによる遺伝子導入後、短期間で目的遺伝子の高発現が確認できるが 1 週間後にはかなりの減衰が認められる。レトロウイルスでは 2, 3 日後に発現が上昇してその発現はほぼ一定のまま維持される。この問題を解決するには、アデノウイルスの感染量や時間、回数をいろいろ検討し最適な条件を見つけることが必要である。また、アデノウイルスを用いた場合に少なからず細胞に対して毒性が認められたため、この点も検討が必要である。より毒性の低いベクターを構築するなどしてより iPS 細胞誘導に適したウイルスの作製を目指す。

## 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. Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., Takehara, S., Higaki, K., Nakagawa, M., Takahashi, K., Yamanaka, S., Oshimura M. Complete genetic correction of iPS cells from duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy* **18**, 386-393, 2010 査読有
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., 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
3. 中川誠人、山中伸弥 体細胞のゲノム操作によるリプログラミング～人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の現状と今後の展開～ *ゲノム医学* **9**, 167-170, 2009, 査読無
4. 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, 査読有
5. Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., Yamanaka, S. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology* **27**: 743-745, 2009, 査読有
  6. Niwa, A., Umeda, K., Chang, H., Saito, M., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Nakahata, T., Heike, T. Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1<sup>+</sup> hemoangiogenic progenitors. *Journal of Cellular Physiology* **221**: 367-377, 2009, 査読有
  7. Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Yamanaka, S. Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells* : 683-694, 2009, 査読有
  8. Okita, K., Nakagawa, M., Hong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**: 949-953, 2008, 査読有
  9. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**:101-106, 2008, 査読有

[学会発表] (計12件)

1. 中川誠人、瀧澤奈々子、一阪朋子、杉山逸未、山中伸弥 「Generation of safer iPS cells by factor X instead of c-MYC」 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月10日、横浜
2. 中川誠人 「iPS細胞の再生医療への応用=iPS細胞研究の現状と課題=」 第25回創薬セミナー、2009年7月29日、山梨
3. 中川誠人 「臨床応用へ向けたiPS細胞研究の現状 (iPS cell research for clinical application)」 化学研究所セミナー、2009年7月23日、京都
4. 中川誠人 「iPS細胞研究の現状と今後の展開」 2009年7月15日、大阪
5. 中川誠人 「Generation and characterization of induced pluripotent stem (iPS) cells」 iCeMS

- Cross-Disciplinary Seminar、2009年7月1日、京都
6. 中川誠人 「Mechanism for generation of induced pluripotent stem (iPS) cells」 第8回日本再生医療総会 2009年3月5日、東京
  7. Masato Nakagawa 「Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells」 3rd Annual JAPANESE-FRENCH FRONTIERS OF SCIENCE SYMPOSIUM、2009年1月24日、神奈川
  8. Masato Nakagawa, Yuji Mochiduki, Kazutoshi Takahashi, Keisuke Okita, Nanako Takizawa, Tomoko Ichisaka, and Shinya Yamanaka 「Generation of induced pluripotent stem cells by family genes」 BMB2008、2008年12月9日、神戸
  9. Masato Nakagawa 「Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells by Sox2, Oct4, Klf4, and c-Myc Transcription Factors and their Family Genes」 The 11th Kyoto University International Symposium 2008 (KUIS-11)、2008年10月11日、上海、中国
  10. 中川誠人 「iPS細胞の現状と再生医療への応用」 第9回日本分子脳神経外科学会、2008年8月31日、京都
  11. Masato Nakagawa, Yuji Mochiduki, Kazutoshi Takahashi, Keisuke Okita, Nanako Takizawa, Tomoko Ichisaka, and Shinya Yamanaka 「Generation of induced pluripotent stem (iPS) cells by family genes of Sox, Oct, Klf, and Myc transcription factors」 6th ISSCR、2008年6月10日、フィラデルフィア、米国
  12. 中川誠人 「iPS細胞の展望と課題」 日本実験動物科学技術2008、2008年5月15日、仙台

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

名称: 効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法  
 発明者: 中川誠人/沖田圭介/山中伸弥  
 権利者: 国立大学法人京都大学  
 種類: 特許  
 番号: 61/307,306  
 出願年月日: 2010年2月23日  
 国内外の別: 外国

名称: 人工多能性幹細胞の樹立効率改善方法  
 発明者: 中川誠人/山中伸弥  
 権利者: 国立大学法人京都大学  
 種類: 特許  
 番号: 61/282,320  
 出願年月日: 2010年1月22日

国内外の別：外国

名称：効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法

発明者：中川誠人/沖田圭介/山中伸弥

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：61/232,402

出願年月日：2009年8月7日

国内外の別：外国

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 誠人 (NAKAGAWA MASATO)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：10379539