

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：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790285

研究課題名（和文） ES細胞の分化系を利用した初期化阻害因子の探索

研究課題名（英文） Identification of reprogramming inhibitory factors by ES cell differentiation

研究代表者

沖田 圭介（OKITA KEISUKE）

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：90512434

研究成果の概要（和文）：

新たに報告された初期化促進遺伝子の知見を取り入れ、非ウイルスベクターであるプラスミドを用いたヒト iPS 細胞の効率の良い樹立方法を開発した。本方法で、ゲノム中へプラスミドが取り込まれていない iPS 細胞が得られている。さらに、免疫拒絶反応に関与する HLA-A, B, C, DR がいずれもホモである歯髄細胞 2 株からも iPS 細胞を作製し、ドーパミン神経細胞や網膜色素上皮細胞に分化することも確認した。計算上は日本人の約 20% へ移植適合性がある。

研究成果の概要（英文）：

We developed an efficient and simple method to generate integration-free human iPSCs with episomal plasmid vectors from multiple donors, including two in which only one HLA haplotype was detected. These iPSCs were effectively differentiated into various cell types in vivo and in vitro. The two putatively HLA-homozygous iPSC lines match ~20% of the Japanese population at major HLA loci.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：人工多能性幹細胞・iPS細胞・初期化・ベクター

1. 研究開始当初の背景

私の所属する研究室では、ヒトやマウス線維芽細胞に、4つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc)を導入することによって、ES細胞様の iPS 細胞を作製できることを報告した(Cell, 126, 663-676, 2006, Cell, 131,

861-872, 2007)。ES細胞が持つ倫理問題や免疫拒絶の問題を回避できることから、iPS細胞は細胞移植治療への応用が期待されている。

しかし最近の研究から、iPS細胞とES細胞の遺伝子発現やエピジェネティック状態の相違点も明らかとなっており、iPS細胞の初

期化が必ずしも十分ではないことが分かってきた(Cell Stem Cell 5, 111-123, 2009)。申請者らはマウス iPS 細胞を *in vitro* で神経前駆細胞へ分化誘導し、免疫不全マウスの脳へ移植するという研究を行なった。すると iPS 細胞は移植部位で高頻度に腫瘍を形成し、しかもその頻度は iPS 細胞の樹立に用いられた体細胞の種類を反映するということが明らかにした(Nat Biotechnol., 27, 743-745, 2009)。つまり iPS 細胞には元になった体細胞の何らかの性質が残っていると考えられる。この結果も、現在の iPS 細胞の初期化が不十分であることを示唆している。マウス線維芽細胞に 4 つの初期化因子を発現させたとしても、iPS 細胞へと変化する細胞はそのうちの 1%程度でしかなく、大多数の細胞では初期化が起こらない。これらのことから、体細胞内には初期化を阻害する因子が存在していることが示唆される。近年、申請者らを含む複数の研究室が阻害因子の一つとして p53 を報告した(Nature, 460, 1132-1135, 2009, Cell Stem Cell, 3, 475-479, 2008)。これらの研究から、初期化誘導時には細胞内の p53 が活性化され細胞増殖の停止や細胞死を引き起こすことで、一部の細胞の初期化が停止することが明らかになった。このように阻害因子の同定は初期化のメカニズムの理解にもつながると考えられる。しかし p53 を抑制した場合であっても初期化効率はマウスで 20%(ヒトでは 0.1%)程度である。依然として多くの細胞では初期化が阻害されていることから、体細胞内には p53 以外にも阻害因子が、おそらくは複数存在していると考えられる。

2. 研究の目的

体細胞に数種類の初期化因子を導入することによって人工多能性幹(iPS)細胞が樹立できるが、その効率は非常に低く、大多数の細胞では初期化が起こらない。このことは体細胞内には初期化を阻害する因子が存在していることを示唆する。本研究では、マウス胚性幹(ES)細胞の分化系を用いて *in vitro* の初期化モデル系を作製し、初期化の過程を阻害する因子の同定を目標とする。そして、その阻害活性を抑制することで、よりよい iPS 細胞の樹立方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究は大きく分けて以下の 3 つのステップからなる。

1. 初期化の誘導モデル系の構築

薬剤の添加により効率良く初期化を誘導できる ES 細胞を作製する。

2. 候補因子のスクリーニング

作製した ES 細胞に分化誘導刺激を加え、種々の程度に分化した細胞を作製する。これらの細胞の遺伝子発現やエピジェネティック状態等を調べるとともに、薬剤で処理して初期化を誘導する。初期化の効率と負の相関を示す遺伝子等を初期化阻害因子の候補とする。

3. 初期化阻害因子の同定

各候補因子について実際の阻害活性の有無を調べ、初期化阻害因子を同定する。

4. 初期化効率の改善

shRNA やドミナントネガティブ変異体の使用により、初期化阻害因子の活性を低下させることで初期化効率が向上するかを検討する。また、最新の知見なども積極的に取り入れて、効率の良い iPS 細胞の作製方法を確立する。

4. 研究成果

本研究の開始後、国内外の研究室から iPS 細胞の樹立効率を改善する様々な因子が報告された。例えば、中川らは c-Myc の代わりに L-Myc を使用することで iPS 細胞の作製効率が上昇することを示した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 14152-14157 (2010))。また、坪岡らは SALL4 がヒトの線維芽細胞の株特異的に初期化効率を上昇させることを明らかにした(Genes to Cells. 14, 683-694 (2009))。この他にも、NANOG, ESRRB, TBX3, GLIS1, UTF1, RARG, NR5A2, GLIS1, mir-302s など多数の因子が報告された。

そこで私は自身の知見と、これらの報告された知見を組み合わせることで、ヒト iPS 細胞を従来よりも効率よく樹立できるのではないかと考えた。初めに種々の遺伝子の組み合わせをレトロウイルスベクターを用いて検討した。ヒト線維芽細胞に遺伝子を導入し、約 1 カ月後に iPS 細胞のコロニー数を測定して初期化効率を判定した。その結果、p53 に対する shRNA を使用した場合に、初期化効率が大きく上がることを確認した。また、c-MYC よりも L-MYC を用いると、効率が改善することを見出した。さらに L-MYC の導入と p53 の抑制を同時に実施すると、初期化効率がさらに上昇することを明らかにした。一方で NANOG はヒト線維芽細胞からの初期化効率の改善には寄与しないことが分かった。

この結果をもとに、より安全性の高い iPS

細胞樹立系ができるのではないかと考え、非ウイルス系ベクターであるプラスミドベクターを用いて研究を進めた。ヒト細胞において持続的に外来因子を発現させるために、Epstein-barr ウイルス由来の OriP および EBNA-1 配列をプラスミドに組み込んだ。ヒト細胞内において EBNA-1 配列からは EBNA-1 タンパク質が発現し、これが OriP 配列を認識することで、細胞内でプラスミドを増幅させることが知られている。また、初期化遺伝子の発現量を高くするために、CAG プロモーターを用いた。一方で、初期化遺伝子の下流には WPRE 配列 (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) を挿入した。この配列は mRNA からの効率的なタンパク質の翻訳に関与すると考えられている。これらの工夫をすることで、ヒト線維芽細胞から高効率に iPS 細胞を樹立することに成功した。この研究成果は 2011 年に Nature Methods 誌にて発表した。この方法は、遺伝子導入にプラスミドを用いているため、ウイルスの使用に伴う危険性が無い。また、ゲノム中へプラスミドが取り込まれていない iPS 細胞が得られていることから、従来のレトロウイルスベクターによる方法よりも安全性が高くなっていると考えている。岐阜大学の協力により、同じ方法で、免疫拒絶反応に関与する HLA-A, B, C, DR がいずれもホモである歯髄細胞 2 株からも iPS 細胞を作製した。計算上はこの 2 株で約 20% の日本人への移植適合性がある。樹立した iPS 細胞の核型には異常は認められなかった。また ES 細胞と同等の遺伝子発現を示した。さらに、分化多能性を持ち、in vivo の分化誘導法によりドーパミン作動性神経細胞 (京大、高橋淳ら) あるいは網膜色素上皮細胞 (理研、高橋政代ら) へと分化した。本研究成果は、将来期待されている細胞移植治療に利用可能な iPS 細胞バンクを作る上で非常に重要な知見である。また、作製したプラスミドベクターは、すでに非営利団体 Addgene を通して世界の 100 を超える研究室に分配されており、世界的な iPS 細胞研究の発展に貢献するものと期待される。

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 7 件)

①Okita K, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. 査読有、Nat. Methods. 2011、8 : 409-412. PMID: 21460823
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/139494>

② Egusa H, Okita K, et al. Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. 査読有、2010、PLoS One. 5 : e12743. PMID: 20856871

[学会発表] (計 12 件)

①Okita K, Generation of iPS cells for therapeutic treatment. Interdisciplinary approaches for the study of senescence. (招待講演) 2012/2/9 University of Cambridge, UK

②沖田圭介 iPS 細胞の臨床応用を目指して第 21 回日本サイトメトリー学会学術集会 (招待講演) 2011/6/25 日、京都

③沖田圭介他 非ウイルスベクターによる血液細胞からのヒト iPS 細胞の樹立 第 10 回日本再生医療学会総会 2011/3/2 東京

④Okita K, et al. Human iPS induction from adult fibroblasts in virus free condition. Biochemistry and Molecular biology 2010 2010/12/10 神戸

⑤沖田圭介 人工多能性幹 (iPS) 細胞の課題と展望 日本放射線影響学会第 53 回大会 (招待講演) 2010/10/21 京都

[図書] (計 2 件)

①青井貴之、大貫菜里、沖田圭介、実験医学別冊、細胞培養プロトコール、iPS 細胞—樹立培養方法、210-228、羊土社、2012 年

②Okita K, Yamanaka S. Academic press Principles of Regenerative Medicine, Second edition, Chapter13 Induced pluripotent stem cells, pp241-252, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法

発明者：沖田圭介/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：

JP：未着

EP：10806584.8

US：13/389,359

CN：201080035155.9

KR：10-2012-7004663

IN：384/KOLNP/2012

CA：未着

AU：2010279913

SG : 201200686-2
出願年月日 : 2010/8/6
国内外の別 : 国外

○取得状況 (計 0 件)

[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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :