

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成19年度採択分

平成22年 4月 1日現在

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

氏名 山中 伸弥 (YAMANAKA SHINYA)

所属研究機関・部局・職

京都大学・iPS細胞研究所・所長



研究の概要：胚性幹（ES）細胞は様々な細胞へと分化できる万能性（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、運用面や移植後の拒絶反応が問題となる。そこで、体細胞のリプログラミングにより得られるiPS細胞の再生医療への応用が期待されている。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

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

私達は、4つの転写因子を導入することで、ES細胞に類似したiPS細胞を樹立した。再生医療の資源として理想的な多能性幹細胞でありiPS細胞は、将来、臨床応用が期待されるが、iPS細胞の由来、すなわち、多能性が誘導された細胞が真に体細胞に起源するものなのかという点や、iPS細胞の低い誘導効率の原因、細胞核初期化の過程における4因子の作用機序など不明な点が多い。またゲノムに挿入され、潰瘍原性を生じせしめる恐れがあるレトロウイルスの利用とする安全上の問題がある。それらを踏まえ、以下のように目的を定めた。

2. 研究の目的

- (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

iPS細胞誘導に関わる因子の同定と機能解析を行う。促進・阻害因子を同定し分子機構を明らかにする。体細胞ゲノムにウイルス遺伝子の挿入を伴わないでiPS細胞を樹立する方法を開発する。iPS細胞の特性解析を通して真に応用可能なヒトiPS細胞の選別方法の開発を行う。また、それらの細胞を用いて分化誘導法の確立を進める。

4. これまでの成果

平成19年度の研究で初代培養肝細胞に由来するiPS細胞は、線維芽細胞由来のiPS細胞と比較してレトロウイルスの挿入数が少なく、クローン間に共通する挿入場所は無く、さらにキメラマウスやその子孫に腫瘍が多発しないことがわかった。

平成20年度は線維芽細胞由来iPS細胞におけるレトロウイルス挿入部位の決定を行ったがクローン間における共通挿入部位は見つからなかった。このことから、iPS細胞誘導にレトロウイルスの挿入は重要ではないことが示唆された。また、レトロウイルスによる誘導ではc-Mycは必須でないことを見だし、キメラマウスにおける腫瘍形成リスクの低減化に成功した。さらに安全性の高い



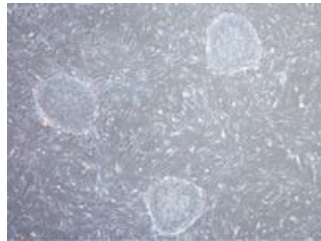
iPS細胞樹立のために体細胞ゲノムへの挿入を伴わないプラスミドを用いてiPS細胞の樹立に成功した（写真はプラスミドiPS由来のキメラマウス）。

平成21年度はいくつかの方法でiPS細胞誘導効率の上昇に成功した。癌抑制遺伝子p53がiPS細胞誘導を負に制御していることを見だし、誘導中にp53の機能を抑えることでより多くのiPS細胞

胞を作り出すことができた。また、誘導中に培養条件の一つである酸素濃度を低くすることでiPS細胞誘導効率が上昇することを明らかにした。

iPS細胞誘導方法が様々報告されているがどの方法で樹立した細胞が安全(質の高い)なのかは未だ不明である。そこでiPS細胞の安全性を検討する実験系を確立した。方法はiPS細胞を神経幹細胞に分化誘導し、マウスの脳に移植したのち経過を観察する。分化抵抗性の強いiPS細胞は移植部位で腫瘍を形成したことから、この方法でより安全なiPS細胞の選別が可能となった。この系を用いた解析から、iPS細胞樹立に用いる元細胞の種類が重要であることが明らかとなった。

ヒトiPS細胞を再生医療に応用するためには、異種成分を含まない培養系の確立が重要である。iPS細胞を樹立・維持培養する時に用いるフィーダー細胞はマウス由来の細胞を用いてきたため、ヒト細胞で代用可能か検討した。その結果、自己細胞由来フィーダー細胞上でiPS細胞の誘導・維持培養が可能になった(自己フィーダー細胞上で増殖する73歳男性由来のiPS細胞)。



5. 今後の計画

今後は、p53のiPS細胞樹立における詳細な機能解析、低酸素状態によるiPS細胞樹立効率上昇のメカニズムの解析、その他iPS細胞誘導におけるメカニズムの解明を進める。最近注目されている、エピジェネティクスの解析も行う。ウイルスを用いずにヒトiPS細胞を樹立する方法を確立する。これまでに報告されている方法では効率が低い安定した実験が行えないことから、より高効率に安定した樹立方法のためにベクターの改良や樹立条件の再検討などを進める。iPS細胞はクローン毎に性質が違ってくるの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。前述の通り、クローン毎に分化のし易さは違ってくるが予想され、適したクローンの選択方法の検討も行う。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)(主要なもの)

1. Okita, K., Hong, H., Takahashi, K., Yamanaka, S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nature Protocol* **5**:418-428, 2010.

2. Takahashi, K., Narita, M., Yokura, M., Ichisaka, T., Yamanaka, S. Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *PLoS ONE* **4**:e8067, 2009.
3. Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **5**:237-241, 2009.
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.
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.
6. Okita, K., Nakagawa, M., Hong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**: 949-953, 2008.
7. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., Yamanaka, S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**:699-702, 2008.
8. 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.
9. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**:861-872, 2007.
10. Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**:313-317, 2007.

主な受賞

2008 Shaw Prize

平成20年 秋の紫綬褒章

2009 Canada Gairdner International Award

2009 Albert Lasker Basic Medical Research Award

平成22年 学士院賞・恩賜賞

ホームページ等

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