

人工万能幹細胞の創薬および再生医療への応用

研究期間 平成18年度～平成22年度(予定)

研究体制

総括 山中 伸弥[京都大学]

※平成21年度における研究体制

既知因子による体細胞からの多能性細胞作製

Project Keyword

人工多能性幹細胞 (iPS細胞)

2006年当研究室において、マウス線維芽細胞に特定の遺伝子を導入することにより、ES細胞に似た分化多能性と自己増殖能をもつ細胞を誘導することに成功し、人工多能性幹細胞(iPS細胞)と名付けました。

リプログラミング (初期化)

分化した細胞を、脱分化し未分化な状態に変化させることで、メチル化などのDNA修飾の変化を伴います。これまで卵への核移植や、ES細胞との細胞融合によりリプログラミングが可能であることが知られていました。

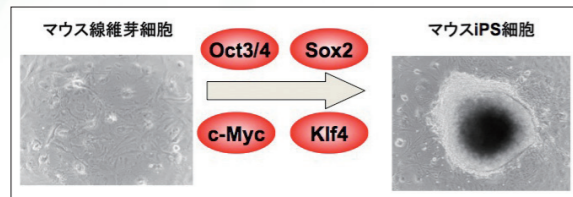
4因子 (リプログラミング因子)

当研究室では、マウス線維芽細胞にES細胞で発現する24個の遺伝子を導入することで、リプログラミングが可能であることを見出し、さらなる検討により、そのうちの4つの因子だけでiPS細胞を樹立できることを報告しました。

1 研究の背景・意義

多能性幹細胞の臨床応用に向けて

胚性幹(ES)細胞は、様々な細胞へと分化できる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を大量に準備し、創薬や再生医療に応用することが期待されています。しかしヒトの胚から樹立するES細胞の利用に関しては、倫理的問題もあり、慎重な運用が求められています。また再生医療においては患者自身の細胞ではないため、拒絶反応の問題もあります。当研究室では最近、マウスの線維芽細胞に4因子(Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4)を導入することにより、胚性幹(ES)細胞に類似した人工多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立することに成功しました。また、ヒトiPS細胞の樹立にも成功したことから、患者自身の多能性幹細胞を作成することができ、疾患のメカニズムの解明や治療薬のスクリーニング、副作用試験、さらにiPS細胞より誘導した細胞による再生医療の実現が期待できます。

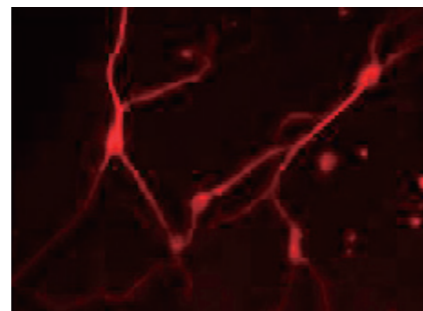


▲マウスの体細胞に4つの遺伝子の導入を行うことにより、ES細胞用の形態をしたiPS細胞が樹立される。

2 研究プロジェクトの目標

iPS細胞の実用化

この研究プロジェクトは、各種疾患モデル動物や、さまざまな遺伝的背景、疾患背景を有するヒト細胞からiPS細胞を効率良く樹立する方法を確立し、また、iPS細胞から分化させた神経細胞、心筋細胞、肝細胞などの細胞を、薬効および毒性の評価に利用し、さらに安全性を確保することにより、各種疾患への移植療法に利用することを目的とします。そのために、ヒトやマウスの体細胞からより効率よく質の高いiPS細胞を作製する方法、およびiPS細胞の質や安全性を評価する方法を確立するための研究を行います。またiPS細胞から分化誘導した細胞を用いた薬剤のスクリーニングや、毒性の判定のための技術を開発するとともに、細胞移植治療の実現のための研究を、疾患モデル動物などを用いて行います。



▲マウスiPS細胞を用いた分化誘導実験。誘導された神経細胞(βIII-tubulinによる免疫染色)。

3 研究プロジェクトの成果

生殖細胞系列に寄与するiPS細胞の樹立

当初作製されたFbx遺伝子マーカーにより選別されたiPS細胞は、in vitroおよびin vivoにて分化多能性を示していました。しかし、マウスの胚盤胞にインジェクションすると、キメラ胎仔はできましたが、これらのキメラは胎生致死でした。そこで、より分化多能性の高いiPS細胞を作製するために、より厳しい多能性幹細胞のマーカーであるNanog遺伝子をマーカーとしてiPS細胞を樹立しました。作製されたNanog iPS細胞は、キメラマウスが誕生し、これらのキメラマウスからiPS細胞



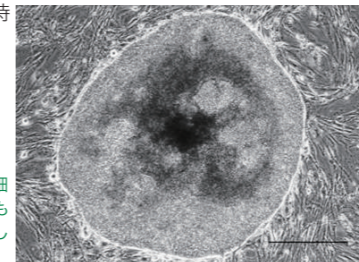
Nature, Vol 448,316,2007

由来の子が生まれ、生殖細胞系列にも寄与するES細胞とほぼ同等の分化多能性を持つことがわかりました。

◀Nanog-iPS細胞から生殖系列への伝承が起こりiPS細胞だけからなるマウスが誕生した(茶色い毛色のマウス)。

ヒト皮膚線維芽細胞からのiPS細胞の樹立

マウス体細胞から、ES細胞とほぼ同等の性質をもつiPS細胞を作成することが可能になりましたが、ヒト体細胞でも同様のリプログラミングが可能かどうかはわかりませんでした。当研究室では成人ヒト皮膚線維芽細胞にマウスと同じ4つの遺伝子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)を導入することにより、ヒトiPS細胞を樹立することに成功しました。ヒトiPS細胞はES細胞とほぼ同等の遺伝子発現パターンを示し、in vitroおよびin vivoにてES細胞と同様に三胚葉の細胞に分化する能力を持つことを明らかにしました。

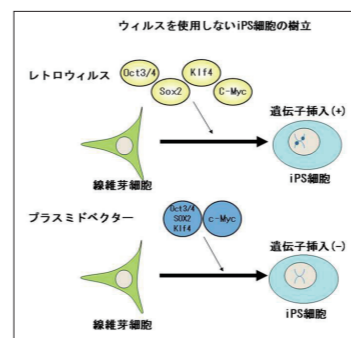


Cell, Vol 131,882,2007

▶ヒトiPS細胞の樹立。ヒトiPS細胞を用いてテラトーマの形成にも成功し、さまざまな組織に分化したことを確認した。

ウイルスを使用しないiPS細胞の樹立

レトロウイルスを用いて樹立されたiPS細胞のゲノムには、ウイルス由来の遺伝子の挿入があり、腫瘍化の原因にもなることがわかってきました。ゲノムへの遺伝子挿入のないiPS細胞を作成するために、Oct3/4, SOX2, Klf4とc-Mycのプラスミド発現ベクターを交互に、リポフェクション法により一過性に遺伝子導入することにより、マウス胎仔線維芽細胞よりiPS細胞を誘導することに成功しました。得られた



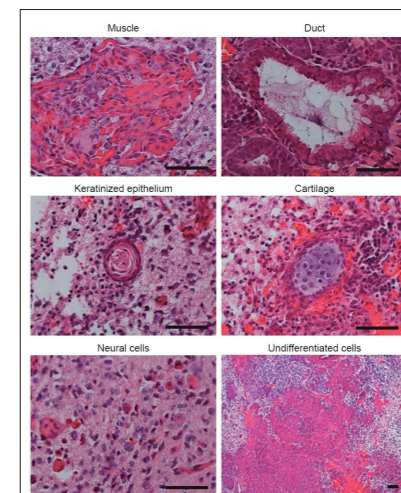
iPS細胞は、ゲノムに外来遺伝子の挿入は確認されず、またこれらの細胞は、ES細胞と同様の遺伝子発現パターンを示し、キメラマウスは生殖系列への伝承が確認されました。

◀プラスミドの導入による一過性遺伝子発現により、ゲノムへの遺伝子挿入のないiPS細胞を樹立。上段は従来のレトロウイルスを用いた方法。

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

iPS細胞の標準化

他のグループの報告も含め、これまで、マウスにおいてプラスミドベクターや精製タンパク質によりゲノム挿入のないiPS細胞が樹立され、またヒトにおいても、エピソームベクターや精製タンパクなどにより、ゲノム挿入のないiPS細胞の樹立が報告されています。さまざまな樹立方法が開発され、さまざまな細胞からiPS細胞が作製できるようになりました。これらのiPS細胞を分化誘導し細胞移植を行うときに、分化抵抗性で未分化な細胞が残存すると奇形腫などの発生の原因となります。当研究室での検討により、起源となる細胞のタイプにより分化抵抗性の細胞の頻度が異なることが明らかになりました(Miura et al. Nat biotech. 2009)。iPS細胞の実用化のために、どのようなiPS細胞が最



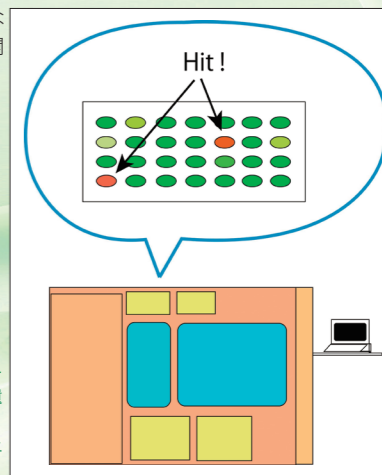
Nature Biotechnology, Vol 27,744,2009

適であるのかを、iPS細胞の様々な評価法を通して明らかにし、iPS細胞の標準化を進めていく必要があります。そのため、iPS細胞の治療効果や、腫瘍形成などの安全面の評価のために、疾患モデル動物への移植実験を進めていきます。

◀分化抵抗性の細胞の多いiPS細胞のクローンから誘導した神経細胞を移植したマウスに発生した腫瘍(奇形腫)。

高効率で高品質なiPS細胞の樹立法の開発

マウスおよびヒトにおいて、プラスミドや精製タンパクなどにより、外来遺伝子のゲノム挿入のないiPS細胞の樹立が可能であることが報告されましたが、その効率は大変低いものです。そのため、さらにiPS樹立効率を上げる方法の開発は重要と考えられます。そこで我々は、遺伝子や化合物天然物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを行い、遺伝子導入を用いずに、より高いリプログラミング効率でiPS細胞を誘導する技術の開発をめざします。また、iPS細胞の実用化のためには、iPS細胞の誘導効率だけでなく、質の高いiPS細胞の誘導法を開発することも重要であると考えられます。遺伝子や化合物天然物のスクリーニングや、様々な樹立方法を検討することにより、より良質なiPS細胞の誘導法の開発をめざします。



▶ハイスループットスクリーニングシステムを用いて、遺伝子や化合物天然物から、リプログラミング効率を上げるものを探索する。

参考文献

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006 Aug 25; 126(4):663-676.
Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature. 2007 Jul 19; 448(7151):313-317.
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. 2007 Nov 30; 131(5):861-872.