

**「iPS 細胞と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書**  
**－平成23年度終了研究課題－**

研究総括 西川 伸一

1. 研究領域の概要

本研究領域は、日本発となる iPS 細胞を樹立する技術によって大きなブレークスルーがもたらされると考えられる分野、すなわち、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学などを対象としている。また、これまでにない自由で創意に満ちた発想による基礎研究とともに、医療などに将来貢献できる基礎研究も対象としている。

具体的には、1)リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2)幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3)iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構解析、4)iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5)ヒト疾患モデルの構築などの研究を対象とする。

これら研究の成果は、疾患の原因の解明や新治療薬の開発に寄与するとともに、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現に向けて貢献できるものと信じている。

2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「iPS 細胞と生命機能」領域に設けた選考委員7名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、基本的には募集要項に公表した選考基準に沿って行ったが、特に下記二点を重視した。
  - ①オリジナリティー： 研究提案が分かりやすく、十分に独創的である。
  - ②実力・可能性： 研究提案書や過去の実績から考えて、テーマ遂行に十分な実力・可能性がある。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数
対象数	127 件	25 件	10 件

備考:

- 1)平成 20 年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価を実施しない。
  - ・佐々木 えりか 研究者  
研究期間が5年で、今年度終了しないため。
  - ・富澤 一仁 研究者  
内閣府の「最先端・次世代研究開発支援プログラム」への採択に伴い、同プログラムの規定により平成 23 年 3 月末をもって研究を終了したため。

5. 研究実施期間

平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

6. 領域の活動状況

- 1)領域会議: 7回
- 2)研究報告会(公開): 1回
- 3)研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:  
研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への

協力依頼を行った。

## 7. 評価の手続き

研究報告会および研究者の研究報告書を基に、領域アドバイザーの意見を参考に、研究総括が評価を行った。

(評価の流れ)

平成 20 年 6 月～  
平成 24 年 3 月 研究期間終了  
平成 24 年 1 月 研究報告会開催  
平成 24 年 2 月 研究報告書提出  
平成 24 年 3 月 研究総括による評価

## 8. 評価項目

- 1) 研究開始時点の研究構想をベースにした研究の達成状況
- 2) 外部発表(学術論文、学会発表)、特許など研究成果の発信状況
- 3) 受賞、招待講演、新聞記事等、外部からの評価状況
- 4) 研究成果の科学技術への貢献度(基礎、応用を含む)

## 9. 研究結果

第一期研究者8名の研究成果とそれに対する評価を個別に記載する。

○荒木 良子 研究者

「iPS 法と核移植法の比較による初期化機構の解明」

不慣れな分野で、また準備もなく最初は苦労したと思われるが、iPS 細胞化における c-Myc の役割などについて評価すべき研究成果が得られている。ただ、この分野をリードする業績を上げる事が出来たかと言う点では、まだまだである。幸い、このプロジェクトが始まるまで研究を進めていた本来の専門分野との接点が見つかって来ているようなので、独自の研究分野を切り開く事を期待したい。

○長船 健二 研究者

「多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞を用いた病態解析」

1期生の中でも、本分野に最も準備ができており、疾患の iPS について真っ先にチャレンジした事は評価できる。研究期間中に本課題での論文を掲載するところまでは至らなかったが、患者由来 iPS の作製、突然変異で影響される分化細胞の誘導、さらには正常と患者由来細胞の比較など、研究は着実に進んでおり、一つの方向へあらゆる資源を集中させ研究を進めるオーガナイザーとしての能力の高さを示している。今後は、細胞生物学と病理学を結びつけるためのアイデアが必要で、焦らずこの壁を克服し独自の分野を切り開いてほしい。

○岸上 哲士 研究者

「体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発」

体細胞核移植におけるクローン発生率の向上に寄与するファクターを見出しつつあり、共著ではあるが論文発表もしっかりできている。生粋のクローン研究者であり、iPS 分野の研究者との共同実験も期待したが、後半になりようやく始まったという状況である。さきがけで始めた共同研究を是非とも実らせ、iPS とクローン研究のタッグの重要性をアピールする仕事へと発展させる事を期待する。

○鈴木 淳史 研究者

「肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術」

iHep 細胞 (induced hepatocyte-like cells) を構想し、実現にまで至った事は極めて高く評価できる。研究の進め方、ラボ内での管理、他研究者とのやり取り、論文の纏め方、など十分に独立研究者としての能力がある事を示したと評価する。今後、メカニズムの解明、ヒト iHep の作製などに是非とも成功し、この分野の第一人者へと成長する事を期待する。

○清野 研一郎 研究者

「細胞リプログラミング技術を用いた免疫細胞再生医療の開発」

iPSを用いたがん治療を構想し、その実証をマウスモデルで得るという研究であり、マウス iPS から Tリンパ球への分化に成功するなど、当初計画の7-8合目までは到達したのではと評価する。ただ、これまでの研究は他に追随を許さない研究者独自のものかという点では、まだまだその領域には達し得てないと言える。今後は本成果の上に、iPS と彼なくしては不可能であるという分野を見だし、発展させる事を期待する。

○升井 伸治 研究者

「任意細胞の樹立法開発」

任意細胞の樹立のため、iPS 干渉法を構想し、神経系および肝細胞系譜において研究成果を得た。良く言えば論理的、悪く言えば独断的な計画であり、実際にどこまで研究が進むか懸念したが、予想以上の成功を収めたと評価している。残念ながら、論文を然るべき雑誌に発表するのに苦労しているようであるが、彼なしには成し得ないオリジナルな研究であり、今後とも持論を大いに展開していただきたい。

○松田 修 研究者

「非ウイルス的手段による iPS 誘導法の確立」

当初心配した通り、EB ウイルスベクターを用いて iPS を樹立するという研究については、少し遅れをとった。ただ、アドバイザー等の意見を参考に、エピジェネティックな遺伝子修飾を検討するためのベクターシステム開発へと方向転換を試み、成果が出るところまで到達できたことは評価する。このベクターシステムはオリジナルであり、また iPS 研究にとっても有用なツールとなる可能性を秘めており、是非とも汎用されるシステムへと発展させる事を期待する。

○山田 泰広 研究者

「リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用」

1期生の中でも、本分野での準備が出来ていると期待した研究者であり、現にがんのエピジェネティクスについて焦点を当てた研究をしっかりと進めて来たと評価している。研究期間中に本課題での論文を掲載するところまでは至らなかったが、今後発表されるものと期待している。研究スタート時には、がんのエピジェネティクスの重要性はそれほど認識されていなかったが、現在は当たり前になっている。その意味で、当初の計画とは異なる新しい方向性の模索が必要になると思う。これまでの仕事をしっかりと纏めるとともに、今後はがんのエピジェネティクスへ切り込む独自の展開を期待する。

## 10. 評価者

研究総括 西川 伸一 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター  
グループディレクター(副センター長)

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成24年3月末現在)

石野 史敏 東京医科歯科大学 難治疾患研究所・教授  
岡野 栄之 慶応義塾大学 医学部・教授  
相賀 裕美子 情報-システム研究機構 国立遺伝学研究所・教授  
中内 啓光 東京大学 医科学研究所・教授  
丹羽 仁史 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター・プロジェクトリーダー  
花園 豊 自治医科大学 分子病態治療研究センター・教授  
春山 英幸 第一三共 RD アソシエ株式会社・代表取締役社長

(参考)

### (1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	35	35
口頭	27	21	48

その他	4	1	5
合計	31	57	88

※平成 24 年 3 月現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計
8	6	14

(3)受賞等

- ・長船 健二 研究者  
CKD Award 2009 奨励賞(2009 年 11 月)
- ・鈴木 淳史 研究者  
平成 21 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞(2009 年 4 月)  
第 8 回日本再生医療学会・若手研究奨励賞(2009 年 3 月)  
第 15 回肝細胞研究会・会長賞(2008 年 6 月)

(4)招待講演

国際 8 件  
国内 21 件

## 「iPS細胞と生命機能」領域 終了評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成24年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
荒木 良子 (兼任)	iPS法と核移植法の比較による初期化機構の解明 (独)放射線医学総合研究所 研究基盤センター)	(独)放射線医学総合研究所 研究基盤センター 室長 (独)放射線医学総合研究所 先端遺伝子発現研究グループ チームリーダー)	51
長船 健二 (兼任)	多発性嚢胞腎患者由来のiPS細胞を用いた病態解析 (京都大学 iPS細胞研究所)	京都大学 iPS細胞研究所 准教授 (科学技術振興機構 ICORP 研究員)	46
岸上 哲士 (兼任)	体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発 (近畿大学 生物理工学部)	近畿大学 生物理工学部 准教授 (近畿大学 生物理工学部 講師)	40
鈴木 淳史 (兼任)	肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術 (九州大学 生体防御医学研究所)	九州大学 生体防御医学研究所 准教授 (九州大学 生体防御医学研究所 特任准教授)	53
清野 研一郎 (兼任)	細胞リプログラミング技術を用いた免疫細胞再生医療の開発 (北海道大学 遺伝子病制御研究所)	北海道大学 遺伝子病制御研究所 教授 (聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 准教授)	42
升井 伸治 (兼任)	任意細胞の樹立法開発 (京都大学 iPS細胞研究所)	京都大学 iPS細胞研究所 特定講師 (国立国際医療センター研究所 室長)	58
松田 修 (兼任)	非ウイルス的手段によるiPS誘導法の確立 (京都府立医科大学 大学院医学研究科)	京都府立医科大学 大学院医学研究科 教授 (京都府立医科大学 大学院医学研究科 准教授)	40
山田 泰広 (兼任)	リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用 (京都大学 iPS細胞研究所)	京都大学 iPS細胞研究所 特定拠点教授 (岐阜大学 大学院医学系研究科 講師)	40

# 研究報告書

## 「iPS法と核移植法の比較による初期化機構の解明」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：荒木 良子

### 1. 研究のねらい

iPS細胞樹立は、再生医療のみならず、発生分化の理解および応用において多大なる可能性を有する発見であり、その機構の分子レベルでの理解は極めて重要である。本課題では、iPS細胞樹立の過程でいつどのような反応が生じ、どのような分子が関与するのか明らかにすることを目標とする。この目標を達成するため、樹立した細胞の多能性の実験的証明、更には体細胞核移植法によるリプログラミングの実験も可能なマウスの系を用いて、iPS細胞及びその樹立過程の分子解析を試みる。

### 2. 研究成果

#### 2-1 体細胞から iPS 細胞化への劇的な変化は遺伝子導入後3日以内に始まっている

まず初めに、体細胞への Yamanaka4 因子導入後、どの細胞が、いつどのような変化を経て iPS 細胞の特徴を獲得するか、単一細胞レベルでの形態学的観察を試みた。iPS 細胞が樹立できる確率は 1000 細胞に 1 個程度であることに加え、細胞の移動・分裂が激しいことから、iPS 化の開始から完成までの一連の経過を捉えることは予測通り困難を極めた。我々は、当時長期間連続撮影に適応していなかったインキュベータ内でのタイムラプス顕微鏡撮影システムを改良し、単一細胞レベルで追跡できる広視野(数 mm 四方)、高解像度(対物レンズ 10 倍)での短インターバル(7.5min)でかつ長期(2 週間)の連続撮影(明視野および蛍光)記録に成功した。この様にして記録した個々の画像を2次元、時間軸でつなぎ合わせ、14 日目にはっきり確認出来た iPS 細胞コロニーから最初の体細胞迄を「遡り追跡」するシステムを構築した。解析の結果、iPS 細胞の一部の特徴を有する細胞が4因子感染後3日以内には既に出現し、その後段階的に変化しながら iPS 細胞に至っていることを明らかにした(図 1, Stem Cells, 2010)。今後行う、新たな iPS 細胞誘導因子等の解析も含め、iPS 細胞機構の理解において本システムは強力なツールとなる。

#### 2-2 比較解析に最適な近交系 C57BL/6 マウス iPS 細胞株の樹立

iPS 細胞樹立効率に関わる因子、樹立された iPS 細胞の質の評価等を正しく行うためには、多くの場合比較する細胞の遺伝的バックグラウンドを統一させること

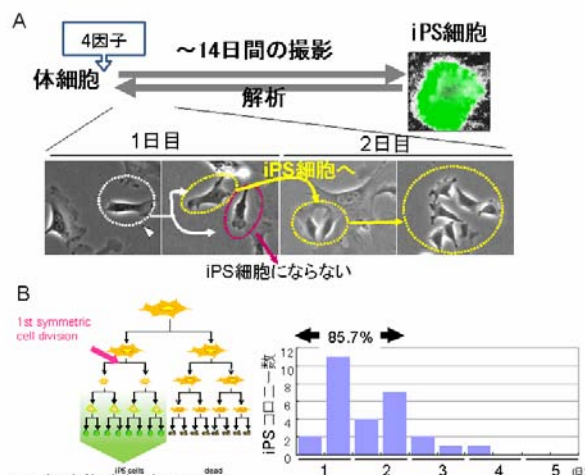


図1 iPS細胞樹立観察システム (A) iPS細胞の出現の瞬間を解析するアッセイ系 (B) 1つのiPS細胞のコロニーを形成する細胞が出現した時間(1st symmetric cell divisionの時間)を示した。

が必要となる。そこで種々の近交系マウス線維芽細胞について樹立効率の比較を行い、全ゲノムプロジェクトの対象にもなり最も広く研究に使われている C57BL/6 マウスにおいて iPS 細胞形成効率が高いことを明らかにした。この結果に基づき、C57BL/6 マウスの線維芽細胞を用いて種々の条件において iPS 細胞樹立を行ったところ、(効率が低くなる) c-Myc を除く3因子のみでも、ゲノムへのインテグレーションの無い iPS 細胞樹立に初めて成功した(J Biol Chem, 2010)。

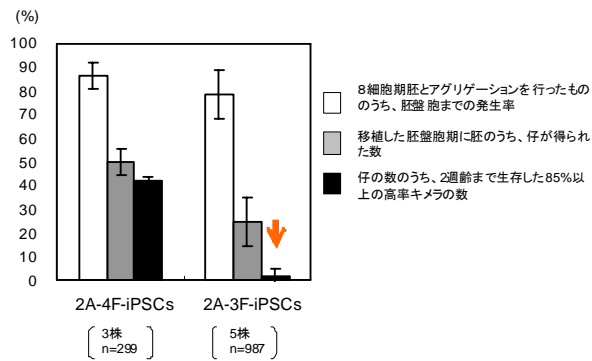


図2 外来性c-Myc遺伝子のiPS細胞の個体発生に与える影響  
すべて、genomic integration無いiPS細胞のみで解析を行った。

### 2-3 外来性 c-Myc の導入は、樹立効率の上昇だけでなく、幹細胞の多能性、即ち質の向上に決定的な役割を有する

iPS 細胞形成の効率は、外来性 c-Myc の導入により 10 倍以上上昇することが知られているが、レトロウイルスベクター等でゲノムに癌遺伝子である c-Myc が残ってしまい、iPS 細胞由来の個体で後に再活性化し、癌化の危険性を高めることなどから、再生医療を目的とする場合、はじめから導入を避けるか、後に除去する必要があると考えられている。

我々は、c-Myc を除く3因子の一過性発現で樹立した C57BL/6 iPS 細胞 (genomic integration 無し) を詳細に調べ、個体への寄与が著しく低下しており、多能性が低下することを明らかにした (図 2)。更にこの多能性の低下は樹立後に HDAC 阻害剤処理により改善された (Stem Cells, 2011)。これらの結果は、c-Myc の機能が、iPS 細胞樹立効率の上昇だけでなく、多能性の獲得という細胞の「質」に深く関わっていることを示していた。多能性の獲得が完全ではない iPS 細胞を用いた場合、ある細胞には分化できても他の細胞には分化できない、という場合が生じる可能性がある。更には、完全ではないリプログラミングから、思わぬ異常が将来出現する可能性は否定できない。これらのデータから、キメラ実験を行えないヒト iPS 細胞樹立においても、本当に c-Myc が頻度への影響だけに限定できるのか、慎重に検討を行う必要があると考えている。

### 2-4 iPS 細胞におけるゲノム変異の解析 (iPS vs ES 細胞)

iPS 細胞の「質」の確認は再生医療において極めて重要な問題である。最近になり、iPS 細胞と ES 細胞の違いがクローズアップされ、それらの中には iPS 細胞の臨床利用にブレーキをかける内容も含まれている。しかし、多くの場合、比較に用いられてきた iPS 細胞と ES 細胞は、別の場所、別の目的で作出され、遺伝的背景、培養条件、樹立後の継代数等、様々なファクターが大きく異なっており、正確な比較解析は困難に見える。我々はこれらの諸問題を解決するため、近交系マウス C57BL/6J から、多数の ES 細胞、およびゲノムへの外来遺伝子挿入の無い iPS 細胞株を、培養方法、培養期間なども極力同一になるよう配慮し樹立し、キメラマウス作製、ジャームライントランスミッション実験により多分化能が確認されたクローンのみを用いて、ゲノム全体 (エクソンだけでなく) における point mutation の頻度に違いがあるか否か比較を試みた。ゲノム

変異の検出のため、iPS細胞を樹立したまさにその個体のゲノム、また、ES細胞の場合は、樹立に用いた胚盤胞の両親ゲノムを保存しておき、実験に用いた (parental genome の確保)。イルミナ HiSeq2000 による whole genome sequencing を行い、公共データベース上の C57BL/6 リファレンスゲノム配列に mapping 後、single nucleotide variation を抽出し、parental genome に存在しない変異候補を絞り込んだ。その結果、iPS細胞ゲノムではES細胞に比べ、5から20倍の点突然変異が高頻度に生じており、一つのiPS細胞株で1000箇所以上の変異の存在が示唆された。

### 3, 今後の展開

これまでの解析から、c-MycがiPS細胞化におけるヒストン修飾制御において重要な役割を担っている可能性を示唆するデータを得ている。ヒストン修飾の更なる解析を行い、リプログラミング機構の理解にトライしたい。また、4因子導入後3日までに生じる分子変化を明らかにするため、この間に誘導される遺伝子群の同定を行い、iPS細胞形成に影響を与える分子をコードする遺伝子の同定にも成功している。今後、これらの遺伝子について、リプログラミングにおける役割の詳細を明らかにする。また、mutationが生じる機構について解析する必要があると考えている。

### 4, 自己評価

さきがけ期間中、iPS細胞化のメカニズム理解に向けて、アッセイ系の確立、オリジナルの材料の作製、そしてそれらの validation などに注力した。その過程で、1) iPS細胞の特徴を獲得する極早期のステップを同定、2) 誘導因子の一つである c-Myc は多能性の獲得に極めて重要であり、そしてその効果はHDAC阻害剤にて代替可能であること、3) iPS細胞の樹立過程にゲノム変異が生じやすいステップが存在する可能性があることを示すことに成功した。これらの結果より、リプログラミングのどこのステップに研究を集中すべきか、混沌の中から突破口を発見できたことに大きな意義があり、目標の一部を達成した。今後リプログラミング機構の反応の特異性の解明に到達できるよう進めて行きたい。

### 5, 研究総括の見解

初めての分野で、また準備もなく最初は苦労したと思われる。ただ、最終的に上手く纏めて、iPSについての論文を3報も発表したのは評価できる。ただ、この分野をリードする業績を上げる事が出来たかと言う点では、まだまだである。幸い、このプロジェクトが始まるまで研究を進めていた本来の専門分野との接点が見つかって来ているようなので、独自の分野を切り開く事を期待したい。

### 6, 主な研究成果リスト

#### (1) 論文(原著論文)発表

1. [Araki R](#), Hoki Y, Uda M, Nakamura M, Jincho Y, Tamura C, Sunayama M, Ando S, Sugiura M, Yoshida MA, Kasama Y, Abe M. Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**. 2011 29:1362-70.
2. Jincho Y, [Araki R](#), Hoki Y, Tamura C, Nakamura M, Ando S, Kasama Y, Abe M.



Generation of genome integration-free induced pluripotent stem cells from fibroblasts of C57BL/6 mice without c-Myc transduction. **J Biol Chem.** 2010 285:26384-9.

3. Araki R, Jincho Y, Hoki Y, Nakamura M, Tamura C, Ando S, Kasama Y, Abe M. Conversion of ancestral fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Stem Cells.** 2010 28:213-20.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

- 1: c-MycはiPS細胞の多能性獲得において重要な役割を担っている  
宇田 昌広, 荒木 良子, 法喜 ゆう子, 中村 美樹, 安藤 俊輔, 神長 祐子, 杉浦 真由美, 砂山 美里, 笠間 康次, 安倍 真澄  
第34回日本分子生物学会、横浜、2011
- 2: マウスiPS細胞およびES細胞における点突然変異のゲノムワイド解析  
杉浦 真由美, 荒木 良子, 笠間 康次, 砂山 美里, 安藤 俊輔, 法喜 ゆう子, 宇田 昌広, 中村 美樹, 安倍 真澄  
第34回日本分子生物学会、横浜、2011
- 3: iPS細胞誘導初期に関与する遺伝子のスクリーニング  
安藤 俊輔, 藤森 ゆう子, 神長 祐子, 宇田 昌広, 中村 美樹, 砂山 美里, 笠間 康次, 荒木 良子, 安倍 真澄  
第34回日本分子生物学会、横浜、2011
- 4: c-Myc plays a crucial role in generating full developmental potential of iPSCs  
Hoki-Fujimori Y, Araki R, Jincho Y, Uda M, Nakamura M, Ando S, Sunayama M, Kasama Y, Abe, M. ISSCR 9th meeting, Toronto 2011
- 5: A-large number of point mutations in mouse iPS cells  
Abe M , Hoki-Fujimori Y, Jincho Y, Kasama Y, Ando S, Sunayama M, Uda M, Nakamura M, Araki R. ISSCR 9th meeting, Toronto 2011
- 6: Positive effect of c-Myc transduction in iPS generation  
Hoki-Fujimori Y, Araki R, Jincho Y, Uda M, Nakamura M, Ando S, Abe M.  
ISSCR 8th meeting, San Francisco 2010
- 7: A mouse strain that is sensitive for iPS generation: C57BL/6  
Jincho Y, Araki R, Hoki-Fujimori Y, Uda M, Nakamura M, Ando S, Abe M.  
ISSCR 8th meeting, San Francisco 2010
- 8: Identification of the genes which are induced at the initial step of iPS cells generation from mouse fibroblasts  
Abe M, Ando S, Hoki-Fujimori Y, Jincho Y, Araki R.  
ISSCR 7th meeting, Barcelona 2010

# 研究報告書

## 「リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研究者：山田 泰広

### 1. 研究のねらい

細胞初期化過程にはダイナミックなエピゲノム制御機構の改変を伴う。本研究では、細胞初期化技術を、エピゲノム制御状態を改変させるツールと捉え、がん細胞に応用することで、がん細胞のエピゲノム制御状態に変化を誘導し、がん細胞のエピゲノム制御機構の意義解明を目指した。

### 2. 研究成果

#### 2-1. がん細胞のリプログラミングによるエピゲノム修飾状態のリセットの試み

本研究プロジェクトでは、腫瘍細胞に細胞初期化技術を応用し、腫瘍細胞の分化状態を変化させるとともに、腫瘍細胞のエピゲノム状態を積極的に改変することで、腫瘍細胞におけるエピジェネティック修飾の可塑性を明らかにし、腫瘍細胞の性質にどのような変化をもたらされるかを検討した。

##### 2-1-1. Apc Min マウス大腸腫瘍細胞の初期化の試み

発がんモデルとして、まずは、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである Apc Min マウスの大腸発がんモデルを用いた。大腸腫瘍細胞を初代培養後、山中 4 因子を導入することで、形態が ES/iPS 細胞に類似した細胞株 (iPSC 様細胞) を複数得ることが出来た。腫瘍細胞由来と考えられる Apc 遺伝子の loss of heterozygosity (LOH) を持つ細胞株は、3/200 株であり、腫瘍細胞の初期化効率は非常に低いことが示唆された。得られた腫瘍細胞では、大腸腫瘍に見られる Hoxa5 の異常メチル化は確認されず、少なくとも一部の腫瘍特異的な DNA メチル化は修飾可能であることが示唆された。大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞では、Nanog の発現は確認されなかったものの、大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞に分化を誘導することで、trophoblast lineage への分化に重要な Cdx2 や Eomes などの転写因子の発現が亢進することが明らかとなった。さらに大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞をマウス初期胚にインジェクションすることで、大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞の一部は生体内胎盤組織へと分化することが分かった。胎盤組織へ分化した大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞には明らかな growth advantage は確認されず、細胞種特異的な発がんを示す結果と考えられた。また、Apc null ES 細胞でも Cdx2 や Eomes の発現亢進が確認されたことから、大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞の trophoblast lineage への分化には Apc 遺伝子の loss が関与していることが示唆された。

##### 2-1-2. 明細胞肉腫細胞の初期化

腫瘍細胞の完全初期化が困難であることが示唆されている。特に oncogene addiction に関わるような遺伝子変異の存在が細胞初期化の障壁になっている可能性を疑った。この可能性を検

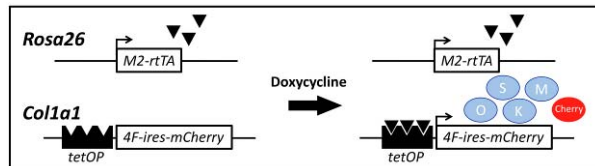
証するために、oncogene addictionに関わるがん遺伝子の発現調節が可能な腫瘍モデルの作製を試みた。明細胞肉腫の原因遺伝子であると考えられているEWS/ATF1をドキシサイクリン存在下に誘導できるマウスモデルを作製した。作製したマウスにドキシサイクリンを投与すると、明細胞肉腫に類似した腫瘍形成が誘導され、その腫瘍から細胞株を樹立した。このEWS/ATF1関連腫瘍細胞株を用いて、細胞初期化を試みた。ドキシサイクリン非存在下において山中4因子を誘導することで、iPS/ES細胞に類似した細胞株を得ることが出来た。それらの腫瘍由来細胞株ではNanog遺伝子の発現も確認され、奇形腫を形成できることが確認された。腫瘍細胞の初期化が成功した可能性が示唆された。今後、樹立された腫瘍由来iPS細胞株の性質解明を行うとともに、腫瘍の再現を試み、腫瘍モデルの構築を目指す。腫瘍細胞におけるエピゲノム異常解析に有用なツールとなることが期待される。

## 2-2. 細胞リプログラミングに関連する発がんメカニズムの解明

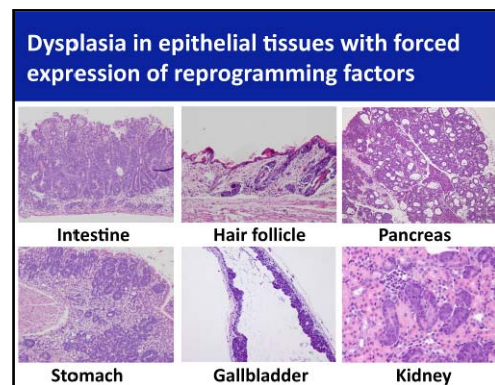
iPS細胞における発がんリスクは、再生医療応用への障壁となることが示唆されている。しかしながら、その腫瘍形成メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、山中4因子全てを成体マウスに発現させることで、初期化因子発現により体細胞がどのような変化を来すのかを、特に細胞増殖の観点から個体レベルでの検討を行った。

### 2-2-1. 初期化因子発現によるがん類似病変の形成とその可逆性

Knut Woltjen 研究室との共同研究により、薬剤誘導性の山中4因子を有するES細胞を作製した。得られた山中4因子誘導可能ES細胞を用いてキメラマウスの作製を行った。作製した“reprogrammableマウス”を用いて、以下の実験を行った。まず、成体マウスにおける山中4因子発現の影響を検討するために、山中4因子誘導可能ES細胞から作製された4週齢キメラマウスにドキシサイクリン



を投与(飲水投与)した。成体マウスに初期化因子を誘導すると、わずか数日後には、胃、小腸、大腸、毛包などに異型細胞の増生が観察された。異型細胞の増生は、膵組織や腎組織、胆嚢上皮組織など、生理的条件下では細胞増殖活性が低い臓器にも確認された。細胞増殖活性の誘導が、初期化因子発現による早期変化の一つであることが示唆された。ドキシサイクリン投与開始後7日目頃より、異型細胞は間質組織への浸潤を来し、がん細胞と同様の増殖形態を示すことが分かった。初期化因子の発現と発がんとの関連を強く示唆する結果と考えられる。



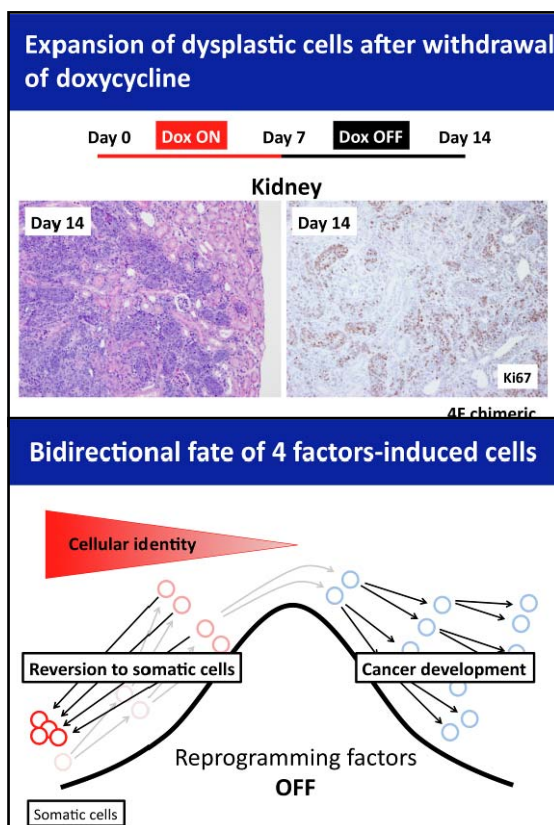
次に、初期化因子発現により誘導された異型増殖細胞において、初期化因子の発現を停止させ、その後の変化を検討した。ドキシサイクリンを4-7日間投与した後、ドキシサイクリン投与を中止し、4-7日後に解剖し、組織学的解析を行った。その結果、ドキシサイクリン投与により広範に見られた異型細胞の増生は、ドキシサイクリン投与中止により、ほとんど消失し、組織像は正

常な状態に戻ることが示唆された。実際に、pulse and chase 実験により、少なくとも一部の増殖細胞は、正常組織に組み込まれていることが明らかとなった。初期化因子発現により異型増殖細胞が誘導され、がん類似病変を形成するものの、初期化因子発現停止により、非腫瘍性組織に組み込まれることが示唆された。

## 2-2-2. 一過性初期化因子発現による初期化因子非依存性異常増殖病変の形成

興味深いことに、ドキシサイクリン投与中止後も一部の細胞は増殖し続けることが分かった。ドキシサイクリン非依存性の異型細胞増生は、単調な異型細胞の増生からなり、奇形腫とは異なる組織像であった。異型細胞の増生は周囲組織への浸潤性増生を伴い、がん細胞と同様の増殖像を呈するとともに、外来遺伝子発現が消失しているにもかかわらず、高い細胞増殖活性を持つことが確認された。このようなドキシサイクリン非依存性の自律性細胞増生は、ドキシサイクリン投与約 7 日間を境にして出現することが分かった。また、ドキシサイクリン非依存性異型細胞増生は、小児がんの組織像に酷似していることが分かった。小児がん発生と細胞リプログラミングとの関連が示唆された。

以上の結果より、一過性初期化因子発現細胞には“二方向性の運命”が存在することが示唆される。この二方向性を規定する分子機構を明らかし、細胞のアイデンティティ維持メカニズムを理解することは、細胞初期化と発がんとの関連を明らかにするのみならず、効率的な細胞初期化技術や、ダイレクトリプログラミング法の開発に有用であると考えられる。



## 3. 今後の展開

明細胞肉腫細胞から得られた iPS 細胞を用いて、発がんにおけるエピゲノム制御機構の重要性を明らかにし、エピゲノム修飾異常の意義解明を目指す。

Reprogrammable マウスを用いて、細胞のアイデンティティ維持メカニズムを理解し、細胞初期化と発がんとの関連を明らかにすることで iPS 細胞の安全な再生医療への応用を目指すとともに、効率的な細胞初期化技術や、ダイレクトリプログラミング法の開発への応用を試みる。

## 4. 自己評価

本研究では、がん細胞のリプログラミングにより、がん細胞のエピジェネティック修飾異常の起源や意義解明を目指した。当初は腫瘍細胞からの完全な初期化が誘導できず、研究期間前半は十分な研究の発展は得られなかった。その後、初期化因子発現誘導マウスを作製し、その解

析から興味深い phenotype が得られたため、研究期間の後半は主に細胞初期化因子と発がんに関する研究を行った。細胞初期化因子と発がんに関する研究は当初目的とは異なるテーマとして開始したものの、現在では iPS 細胞作製技術を用いたがん細胞のエピジェネティクス研究に展開することができたと考えている。さらに、研究期間終了間際となってしまったが、がん細胞の初期化誘導も達成することが出来た。さきがけ研究は終了したものの、樹立したがん細胞由来 iPS 細胞を用いて、研究を発展させ、がん細胞のエピジェネティック修飾異常の起源および意義の解明を目指したい。

## 5. 研究総括の見解

採択時点で、この分野での経験を有しており、さきがけのメンバーとして研究を進める上での準備が出来ていると期待した研究者であった。その点では期待通り、がんのエピジェネティクスについて焦点を当てた研究をしっかりと進めて来たと評価している。発表論文としては、がんのエピジェネティクスというより、Rest 分子の機能についての仕事を中心であるが、本来の目的に関する研究成果は今後発表されるものと期待している。研究スタート時には、がんのエピジェネティクスの重要性はそれほど認識されていなかったが、現在は当たり前になっている。その意味で、当初の計画とは異なる新しい方向性の模索が必要になると思う。これまでの仕事をしっかりと纏めるとともに、今後はがんのエピジェネティクスへ切り込む独自の展開を期待する。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T and <b>Yamada Y*</b> . Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. <i>Development</i> , in press, 2012                                   |
| 2. Hatano Y, <b>Yamada Y*</b> , Hata K, Phutthaphadoong S, Aoki H and Hara A. Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, <i>Rest</i> , does not promote mouse colon carcinogenesis. <i>Cancer Sci</i> , 102: 1659-1664, 2011. |
| 3. <b>Yamada Y*</b> , Aoki H, Kunisada T and Hara A. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. <i>Cell Stem Cell</i> , 6: 10-15, 2010.   |
| 4. <b>Yamada Y*</b> , Watanabe A. Epigenetic codes in stem cells and cancer stem cells. <i>Adv Genet.</i> 70:177-99. Review, 2010.  |
| 5. Tomita H, Hirata A, <b>Yamada Y*</b> , Hata K, Oyama T, Mori H, Yamashita S, Ushijima T, Hara A. Suppressive effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. <i>Carcinogenesis</i> . (9):1627-33, 2010                 |

### (2) 特許出願

該当なし

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

<主要な学会発表(招待講演)>

- **Yamada Y**, Role of epigenetic modifications in multistage colon carcinogenesis, 27th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Jeju, Republic of Korea, Nov. 2011.
- **Yamada Y**, Role of DNA methylation in colon tumorigenesis, The 41<sup>st</sup> international

Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, Nov. 2010

# 研究報告書

## 「多発性嚢胞腎患者由来の iPS 細胞を用いた病態解析」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研究者：長船 健二

### 1. 研究のねらい

単一遺伝子の原因で発症する遺伝性疾患(monogenic disorder)のうち最も頻度の高い疾患である「常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease 以下 ADPKD と略)」は、腎臓に嚢胞が多発し徐々に末期慢性腎不全に至る難治性疾患である。また、この疾患では肝臓の嚢胞や脳動脈瘤が高頻度で形成されるなど、複数の臓器に重篤な合併症が生じることが知られている。これまで動物モデルを用いた本疾患の研究が盛んに行われてきたが、未だ有効な治療法は確立されていない。そこで、本さがけ研究では、重症度と合併症の異なる複数の ADPKD 患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、それらを試験管内で腎臓、肝臓、及び血管に分化させ、試験管内で嚢胞や動脈瘤形成を解析可能とするヒト疾患モデル系の確立を試みた。将来的には、本研究で開発する系を用いて新規診断・治療標的分子の同定、化合物スクリーニングによる新規治療薬の探索に繋げ臨床応用を目指す予定である。

### 2. 研究成果

#### ① ADPKD 特異的 iPS 細胞の樹立とその性状解析

京都大学医学部附属病院および田附興風会北野病院に通院する 7 例の ADPKD 患者より同意の元、臍横部から皮膚生検を施行した。7 例全例が腎嚢胞に加え肝嚢胞を合併し、さらに 4 例が脳動脈瘤の合併症例であった。皮膚塊を培養し増殖させた線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いたリプログラミング 4 因子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC)または 3 因子(c-MYCを除く)の遺伝子導入にて iPS 細胞を樹立した(図 1)。導入遺伝子の発現がサイレンスされ、かつ核型の正常な iPS 細胞株を選択し、1 症例につき 1 株を研究に使用した。これらの iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に未分化状態のマーカー遺伝子(OCT3/4, NANOG, SOX2, TRA1-60, TRA1-81, SSEA4, ALP 等)を発現し、胚様体および奇形腫形成法にて三胚葉性の組織へ分化する多分化能を有していた。さらに、遺伝子発現プロファイルがヒト ES 細胞のものと類似し、OCT3/4, NANOG など未分化状態マーカー遺伝子のプロモーター領域が脱メチル化されていることも確認した。また、7 例中 3 例において家系調査、連鎖解析、遺伝子配列解析を実施し、本疾患の約 85%の症例で異常を有することが報告されている PKD1 遺伝子座の変異を確定した。

#### ② 血管病変(動脈瘤)モデル作製に向けた血管構成細胞への分化誘導

既報の分化誘導法(Homma K, 2010)を用いて 7 症例由来の ADPKD 特異的 iPS 細胞 7 株のすべてから血管構成細胞への分化誘導を行った。内皮細胞は約 10%、血管平滑筋細胞は約 35%の効率で分化誘導可能であり、マーカー遺伝子の発現(内皮細胞: CD31, VE-cadherin, eNOS など、平滑筋細胞:  $\alpha$ -SMA, Calponin, Cardesmon など)を確認した(図 1)。健常日本人由

来 iPS 細胞 3 株からも分化誘導を行い比較を行ったが、形態や分化誘導効率に有意な違いは認められなかった。

### ③.血管細胞モデルを用いた病態関連分子の同定

マイクロアレイを用いて ADPKD 特異的 iPS 細胞 7 株と健常日本人由来 iPS 細胞 3 株から分化誘導された血管内皮および平滑筋細胞の遺伝子発現の比較解析を行った(図 1)。21(7X3)通りの比較を行ったところ、ADPKD 内皮細胞で共通して 3 種の遺伝子の発現上昇が認められた。また、同様の比較解析を脳動脈瘤合併 ADPKD 特異的 iPS 細胞 4 株と非合併 iPS 細胞株 3 株由来の血管細胞間の 12(4X3)通りで行ったところ、脳動脈瘤合併例の内皮細胞で 18 種、血管壁細胞で 7 種の発現上昇を認める遺伝子が同定された。現在、それらの同定された分子を用いた新規診断法の開発や治療標的分子としての活用を検討している(投稿準備中)。

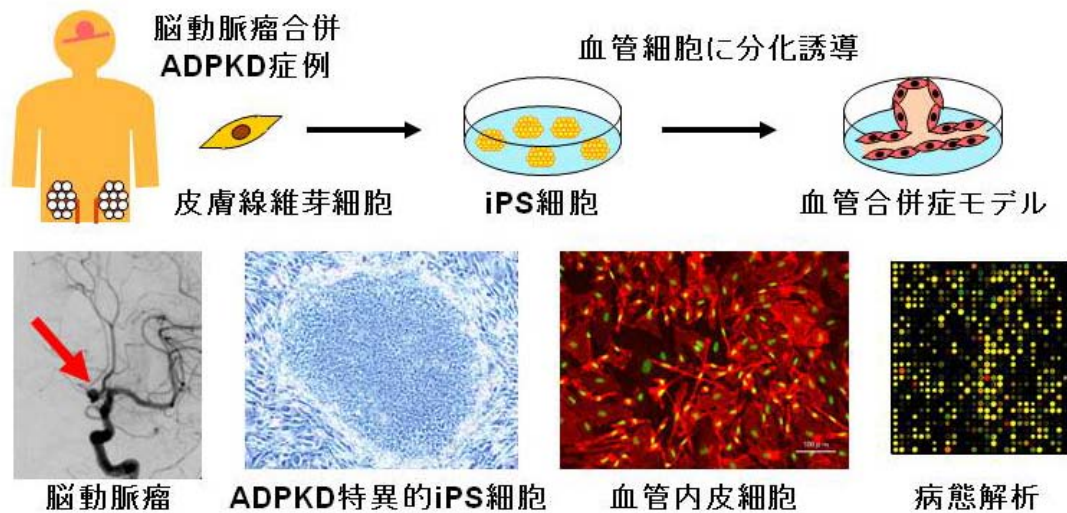


図1. 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の患者由来iPS細胞を用いた同疾患の血管合併症に対する疾患モデル作製および病態解析の概略図

### ④.腎病変(腎嚢胞)モデル作製に向けたヒト iPS 細胞からの腎臓系譜への分化誘導法開発

ヒト iPS 細胞から尿管管や集合管など腎嚢胞を発生させる罹患細胞種への分化誘導法の開発を目指し、腎臓を派生させる初期の胎生組織である中間中胚葉の分化誘導法の開発を行った。中間中胚葉の特異的マーカー遺伝子である転写因子 OSR1 を分化の指標に用いて、増殖因子の組み合わせ処理にて 90% 以上の高効率で OSR1 陽性細胞を分化誘導する方法を開発した。これらの OSR1 陽性細胞は、PAX2、LIM1、SALL1 などの他の中間中胚葉マーカー遺伝子を発現し、in vitro の長期培養と免疫不全マウスへの移植

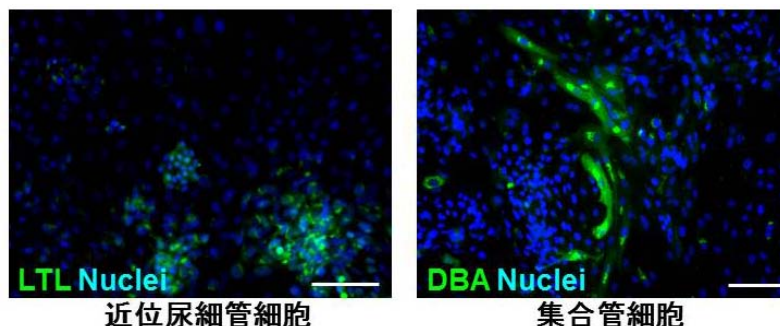


図2. ヒトiPS細胞から作製された腎尿管および集合管細胞



による in vivo 環境下で腎臓、生殖腺、副腎皮質などの中間中胚葉由来臓器の構成細胞に分化可能であった(図 2、論文リバイス中)。現在、中間中胚葉から腎前駆細胞を経て尿細管や集合管細胞を作製する高効率の分化誘導法開発を行っている。

⑤.肝病変(肝嚢胞)モデル作製に向けたヒト iPS 細胞からの胆管上皮への分化誘導法開発

ヒト iPS 細胞から本疾患の肝嚢胞を発生させる胆管上皮への分化誘導法開発を行った。酵素処理を用いた単一細胞への解離と無フィーダー培養を組み合わせた独自の分化誘導法を開発し、90%以上の高効率で胚体内胚葉を作製することに成功した。その内胚葉細胞に既報(Hay DC, 2008)にあるヒト ES 細胞から肝臓系譜への分化誘導に使用される因子である DMSO, HGF, OSM を添加することにより効率は低いが、CK19, AQP1 などのマーカー陽性の胆管上皮細胞が形成されることを確認した(図 3)。現在、増殖因子および低分子化合物のスクリーニングを行い、胆管上皮への分化誘導効率を向上させる化合物の探索とそれを用いた新規分化誘導法の開発研究を進めている。

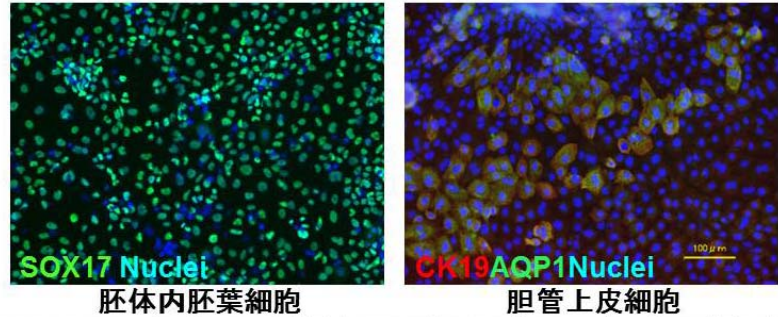


図3. ヒトiPS細胞から作製された胚体内胚葉および胆管上皮細胞

3. 今後の展開

これまでのヒト iPS 細胞の分化誘導研究、ADPKD 特異的 iPS 細胞研究を基盤とし、「ヒト iPS 細胞から腎尿細管、集合管細胞への分化誘導法開発と腎嚢胞モデルの作製」、「ヒト iPS 細胞から胆管上皮細胞への分化誘導法開発と肝嚢胞モデルの作製」、「ADPKD の血管合併症に対する新規診断法・治療法開発」を目指す。

4. 自己評価

本研究では、ADPKD 患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、同疾患の主要な病変である腎嚢胞、肝嚢胞、動脈瘤などの血管病変に対する疾患モデル作製とそれを用いた病態解析を目指した。まず、腎嚢胞、肝嚢胞モデルを作製するためにヒト iPS 細胞から罹患細胞種である腎尿細管細胞、集合管細胞と肝内胆管細胞を分化誘導しなければならないが、これらの細胞種への分化誘導法は未だ確立されていない。腎臓に関しては、本さきがけ研究期間内にヒト iPS 細胞から腎臓を派生させる胎生初期の組織である中間中胚葉を高効率に分化誘導することを目標に研究を行ったが、期間内に 90%以上の高効率で作製する方法を確立し、実際にヒト iPS 細胞由来の中間中胚葉が、尿細管細胞や集合管細胞に効率は低いが生分化可能であることを確認した。よって、当初の目標は達成しつつあるが、引き続き次の数年間で尿細管や集合管細胞を高効率に分化誘導する方法を確立し、ADPKD の腎嚢胞モデル作製を行う予定である。中間中胚葉と腎臓の分化誘導法は、その報告も少なく未だ確立されていないため、本研究の成果は、腎臓のみならず中間中胚葉が派生させる副腎皮質や生殖腺の発生再生研究の進展にも寄与するものであると考えられる。

次に、血管病変に関しては本研究開始時に既に血管構成細胞への分化誘導法は開発されていたため、それを活用した。本疾患の血管合併症のうち、高い致死率を有すクモ膜下出血を引き起こすため最も重篤なものである脳動脈瘤を合併する患者と合併しない患者の間で iPS 細胞由来の血管内皮および平滑筋細胞において有意な発現差を生じる遺伝子群を同定した。現在、それらの分子の臨床検体(血清、尿など)中の濃度を測定する臨床研究を準備しており、本疾患における脳動脈瘤合併との関連の裏付けを行う予定である。そして、疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患モデル作製研究によって、日常臨床に役立つ診断法や新規治療薬などの開発が実際に可能であることを示すことを目指している。

一方、本研究の計画では、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した細胞のみならず、それらを用いた三次元の罹患組織作製を行い、in vivo の病態をより模倣するモデルを作製する予定であったが、このプロジェクトに関しては全く着手できていない。iPS 細胞や ES 細胞の分化誘導研究の大きな課題の一つとして、三次元の組織や臓器を作ることの困難さが近年認識されている。今後、この課題の克服も眼中に置いて、組織化を用いたより高度な疾患モデルを作製することにも取り組みたいと考えている。

## 5. 研究総括の見解

1期生のなかでも、この分野に最も準備ができており、今注目されている疾患の iPS についていち早くチャレンジした事は評価できる。残念ながら期間中に、この課題での論文を掲載するところまでは至らなかったが、研究は順調に進んでいると評価している。実際、患者由来 iPS の作製、突然変異で影響される分化細胞の誘導、さらには正常と ADPKD 由来細胞の比較など、研究は着実に進んでおり、一つの方向へあらゆる資源を集中させ研究を進めるオーガナイザーとしての能力の高さを示している。これからは、細胞生物学と病理学を結びつけるためのアイデアが必要で、焦らずこの壁を克服し独自の分野を切り開いてほしい。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 11, 1269-1275, 2008.
2. Chen S, Borowiak M, Fox J, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng L, Schreiber S, Rubin L, Melton DA. A small molecule that directs differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 5, 258-265, 2009.
3. Lau F, Ahfeldt T, Osafune K, Akutsu H, Cowan CA. Induced pluripotent stem (iPS) cells: an up-to-the-minute review. *F1000 Biol Rep* 1, 84, 2009.
4. Osafune K. *In vitro* regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Exp Cell Res* 316, 2571-2577, 2010.

5. Osafune K. iPS cell technology-based research for the treatment of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:4件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

(学会発表)

1. 長船 健二 : 腎再生研究の進歩 : 第41回日本腎臓学会西部学術大会、教育講演2、徳島、2011年9月30日 (招待講演)
2. 長船 健二 : 糖尿病治療に向けたiPS細胞からの膵β細胞再生 : 第39回日本臨床免疫学会総会、ワークショップ5「再生医学と免疫疾患」、東京、2011年9月17日 (招待講演)
3. 長船 健二 : Towards regenerative medicine for chronic kidney disease, diabetes mellitus and chronic liver disease using iPS cell technology : 日独修好150周年記念シンポジウム「人類の未来を拓く研究者のグランドチャレンジを支える日独の取り組み」、東京、2011年7月15日 (招待講演)
4. 長船 健二 : iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発 : 第21回日本サイトメトリー学会学術集会、シンポジウム1「iPS細胞の臨床応用を目指して」、京都、2011年6月25日 (招待講演)
5. 長船 健二 : iPS細胞 : 第54回日本腎臓学会学術総会、よくわかるシリーズ1、横浜、2011年6月16日 (招待講演)
6. 長船 健二 : iPS細胞技術を用いた糖尿病と糖尿病性腎症の解決に向けた研究 : 第54回日本糖尿病学会年次学術集会、Leading-edge Lectures-1、札幌、2011年5月20日 (招待講演)
7. 長船 健二 : iPS細胞技術を用いた慢性腎臓病・糖尿病・肝不全に対する再生医療開発に向けた研究 : 第84回日本内分泌学会学術総会、ミニシンポジウム4「内分泌代謝疾患と再生医療」、神戸、2011年4月22日 (招待講演)
8. 長船 健二 : iPS細胞技術を用いた肝臓再生医療の開発 : 第28回日本医学会総会、シンポジウム3-S-1「肝再生の基礎と臨床」、東京、2011年4月8日 (招待講演)
9. 長船 健二 : iPS細胞技術を用いた腎臓再生医療の開発 : 第40回日本心脈管作動物質学会、シンポジウム4「最先端研究」、香川、2011年2月5日 (招待講演)
10. Osafune K.: Modeling for Intractable Disorders with Patient-specific iPS Cells. *Mini-symposium for Stem Cell Research*, Taipei, Taiwan, November 8-9, 2010. (Invited Speaker)
11. 長船 健二 : 幹細胞から腎臓への分化の戦略 : 第53回日本腎臓学会学術総会、シンポジウム2「臨床応用に向けた腎臓再生」、神戸、2010年6月16日 (招待講演)
12. 長船 健二 : ケミカルバイオロジーを用いたヒト多能性幹細胞から膵臓系譜への分化誘導 : 第53回日本糖尿病学会年次学術集会、シンポジウム4「膵内分泌機能の再生～移植から再生医療まで～」、岡山、2010年5月27日 (招待講演)

13. 長船 健二：ヒトES細胞の不均一性：第8回日本再生医療学会総会、シンポジウム  
15 「ES細胞研究の現状と課題」、東京、2009年3月6日（招待講演）

（受賞）

CKD Award 2009 奨励賞（2009年11月）

（著作物）

Osafune K and Yamanaka S. Stem cells in regenerative processes; Induced pluripotent stem cells. Regenerative nephrology (Elsevier), 2010, pp203-15.

# 研究報告書

## 「体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：岸上 哲士

### 1. 研究のねらい

体細胞クローン技術および iPS 細胞技術は、分化した体細胞をリプログラミングして全能性および多能性細胞へとそれぞれリプログラミングさせる技術である。しかしながら、その実用化に際してはリプログラミング効率が低いという共通の問題を抱えており、効率的なリプログラミング技術およびリプログラミング促進技術の開発が求められている。これまで体細胞クローンおよび iPS 細胞の作出過程において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)を添加することで作出効率が向上することが示されている。その標的タンパク質やアセチル化の制御とリプログラミングの関係などの分子機構が解明されれば、より効率的なリプログラミング技術の開発や発生・分化におけるアセチル化の制御や役割の理解に貢献することが期待される。そこで、本研究ではこれまで研究を行ってきたヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi: Histone deacetylase inhibitor)を用いた体細胞クローン技術を基盤として、その要求性の分子機構と卵子におけるアセチル化に関する解析を行った。

### 2. 研究成果

#### 2-1. 体細胞核移植が卵子の HDACi 要求性を引き起こす

卵子を除核後体細胞核移植により核置換された通常の体細胞クローン(SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer)胚の胚盤胞への発生は低率であり、トリコスタチン A(TSA)などの HDACi 処理により発生率が大きく改善される。一方、除核や核移植を行わない卵子由来核をもつ単為発生胚の場合、80%以上が胚盤胞へと発生する。この発生率の高い単為発生胚に体細胞核を移植した結果、これらの4倍体核をもつ体細胞核注入(SI: Somatic-cell injection)胚の胚盤胞への発生率は、大きく低下し単為発生胚と SCNT 胚の中間の発生率であった。この結果は、胚盤胞へ発生する能力のある卵子由来核があるにも関わらず体細胞核移植そのものが卵子の発生能の低下を導くことを示しており、体細胞核移植が卵子の発生に阻害的に働くことが示唆された。この SI 胚の TSA 処理を行ったところ、SCNT 胚と同様に胚盤胞への発生率が改善した。以上の結果から、体細胞核移植が卵子を HDACi 要求性へと質的に変化することが示唆された。同時に、SCNT 胚の HDACi 要求性が除核に伴う卵子由来因子の喪失によるものでないことが示唆された。

#### 2-2. 卵子初期発生におけるアセチル化リジンおよび非ヒストンタンパク質の挙動

SCNT 胚の TSA 処理に関する研究から、核移植後10時間の1細胞期胚の TSA 処理がその後の胚発生に最も重要であることが明らかになっている。この TSA の標的は HDAC であり、その阻害は様々なタンパク質の高アセチル化を誘導する。そこで本研究では、1細胞期におけるアセチル化リジンの挙動について解析を行った。これまでのヒストンのアセチル化の解析の報告から

予想された通り、アセチル化リジンの量は単為発生胚の前核と比べ、SCNT 胚の前核では約 70%と低かった。さらに、細胞質におけるアセチル化リジンの量も 80%近くに減少することを見出した。これらの結果から、核移植胚においては核にあるヒストンだけでなく細胞質の非ヒストンタンパク質のアセチル化も影響を受けていることが示された。以上の結果から、体細胞核移植そのものが卵子の低アセチル化を誘導し、体細胞核移植胚の TSA 要求性を誘導するという新しい可能性が考えられた。

### 2-3. 体細胞核移植における卵子の質的变化

SI 胚の発生率低下の分子機構ならびに体細胞核移植の卵子への影響を理解するために、1細胞期の前核を調べたところ卵子由来核(雌性前核)の核小体が小さくなり増えることが観察され、体細胞核由来の偽前核に似た構造に変化することが示唆された。そこで、SI 胚の前核期において、卵子由来核のアセチル化リジンの観察を行った。その結果、SI 胚においても単為発生胚に比べて、核および細胞質においてアセチル化リジンの低下が観察された。興味深いことに、SI 胚の同じ細胞質に存在する核のアセチル化リジンの量は、体細胞由来偽前核は雌性前核の約 80%であった。これらの結果から、体細胞核注入により卵子の低アセチル化を誘導するが、体細胞由来偽前核の低アセチル化が核の内在的性質に起因していることが示唆された。

### 2-4.HDACi の標的 HDAC の探索

TSA の標的となる HDAC は、クラス I(HDAC1-3, 8)/IIa(HDAC4,5,7,9)および IIb(HDAC6,10)を含めて全部で 10 種類ある。これらのうち 1細胞期の胚には、7 種類(HDAC1-4,6,8,9)の HDAC が発現することが示唆されている。最近 Ono らにより、SCNT 胚の発生率改善にはクラス IIb の HDAC 阻害が重要であることが示唆された(Ono et al., 2010)。我々も、不可逆的 HDAC 阻害剤である trapoxin A(Tx)により SCNT 胚の発生率改善を試みたが、改善の効果はなかった。胚の Tx 処理は前核におけるアセチル化リジンを大幅に増加するにも関わらず発生率改善が見られないことから、核におけるアセチル化リジンの蓄積が SCNT 胚の発生改善に直接結びつかないことが示唆された。一方、Tx は HDAC6 を阻害しないことが知られている。そこで、HDAC6 の阻害剤である Tubastatin A を用いたところ、SCNT 胚の発生が有意に改善された。これらの結果から、SCNT 胚では HDAC6 が主要な標的であり、その基質としてヒストンに加えてチューブリンなど非ヒストンタンパク質が報告されており、今回の結果からヒストンに加えて非ヒストンタンパク質のアセチル化制御が SCNT 胚の発生率改善に重要であることが示唆された。

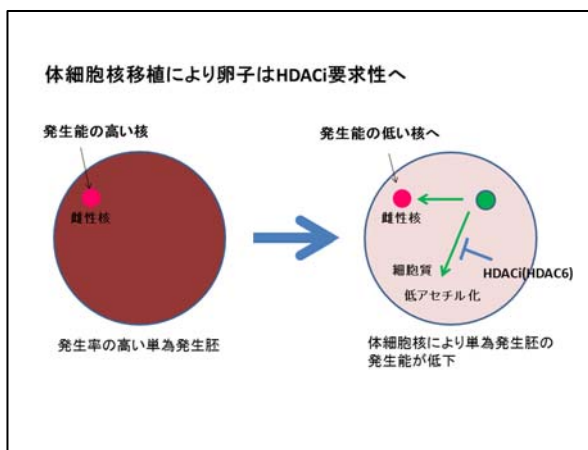
### 2-5. 卵子老化から見た発生能低下とアセチレーションの課題

排卵後の卵子は、徐々に老化していき発生能が低下する。これまで卵子の老化にともないヒストンのアセチル化が亢進することが報告されている(Chen et al., 2007)。そこで、卵子の老化にともなう発生能低下におけるアセチル化の役割を明らかにするために、老化卵子のアセチル化リジンおよび  $\alpha$  チューブリンのアセチル化状態を調べたところ、老化するにつれ染色体および細胞質においてアセチル化の亢進が観察された。この結果から、卵子の老化はヒストンのアセチル化だけでなく、非ヒストンタンパク質である  $\alpha$  チューブリンの増大を引き起こすことが示され、アセチル化の制御が老化とともに破綻をきたすことが示唆された。興味深いことに、老化過程の卵子を HDACi 処理した場合、卵子細胞質の断片化やスピンドルの伸長を抑制し、卵子の老化を促進す

るよりむしろ抑制される結果が示された。これらの結果から、タンパク質のアセチル化が正常な卵子維持に重要な役割をしていることが示された。

## 2-6. 結語

本研究では、卵子 1 細胞期のアセチル化の挙動に着目して研究を行ってきた。その結果、従来予想されていなかった非ヒストンタンパク質アセチル化の重要性、体細胞核移植にともなう卵子アセチル化制御の異常、卵子老化にともなうアセチル化の重要性、そして HDAC6 の体細胞核移植における重要性などが明らかになってきた。これらの結果から右図のような新しいモデルを提出するにいたった。このように SCNT 胚や卵子において翻訳後修飾の一つであるアセチル化の標的は、体細胞核のリプログラミングに関わるヒストンだけでなく、非ヒストンタンパク質がその発生能に大変重要な役割を果たしていると考えられる。



## 3. 今後の展開

本研究を通じて、体細胞クローン胚の低率な発生が単なる移植された体細胞由来核のエピジェネティクス異常だけでなく、体細胞クローン胚では卵子の細胞質の質自体が変化していることが示唆された。このことは、体細胞核とそれに付随した様々な因子が核移植を通じて卵子に入ることによって様々な細胞生物学的な影響を及ぼし体細胞クローン胚の発生を低下させている可能性が考えられる。今後、HDAC6 の標的因子の探索や卵子やそれら因子の発生における役割などを明らかにすることを通じて、体細胞クローン胚の発生率の低さの原因解明や発生能および全能性の分子機構の理解に貢献していきたい。

## 4. 自己評価

本研究は、iPS 細胞技術ならびに体細胞クローン技術のそれぞれの知見を参考に新しい体細胞クローン技術の開発ならびに HDAC 阻害剤によるクローン発生率向上の機構解明を通じたリプログラミングの分子機構解明の2つの目標を掲げた。残念ながら当初の研究目標について十分な成果達成とは言えるものではなかったが、本研究期間が終わる現時点においてそれぞれの研究テーマにおいてようやく小さな研究成果の芽が出始めている。今後この芽をしっかりと育て成果につなげていくことが、このさきがけをいただいた責務と感じている。

また本さきがけ研究を通じて、失敗も多かったものの研究の組み立てや運営における経験などを積ませていただき、また多くの異なる分野の先生方との交流の機会を得てこれまで経験のない新しい共同研究の機会を与えていただいている。この場を借りて、研究総括の西川伸一先生、アドバイザーの先生方、さきがけの先生方に心より感謝したい。

## 5. 研究総括の見解

リプログラミングの研究は、もともとクローン研究を起源とする。その意味で、生粋のクローン研究者が、iPS 分野の研究者とともにリプログラミングを研究する事により相乗効果が生まれるのではと期待した。クローニングの効率を上げるという、彼本来の研究は3年間で十分な進捗があったと評価している。実際、共著ではあるがこの課題についての論文発表もしっかりできている。残念ながら、他さきがけ研究者との共同実験は後半になりようやく始まったという状況であるが、さきがけで始めた共同研究を是非実らせ、iPS とクローン研究のタッグの重要性をアピールする仕事へと発展する事を期待する。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文 (原著論文) 発表

1. Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Park KK, Kim JH, Thuan NV, Wakayama T. Effect of trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication, and transcriptional activity in cloned mouse embryos. *Biol Reprod.* 83, 454–463, 2010.
2. Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, Hikichi T, Wakayama S, Kishigami S, Mizutani E, Wakayama T. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice, *Reproduction* 138, 309–317, 2010.
3. Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology, *J Reprod Dev.* 56, 20-30, 2010.
4. Kishigami S, Wakayama T. Somatic cell nuclear transfer in the mouse. *Methods Mol Biol.* 518, 207–218, 2009.
5. Wakayama S, Kishigami S, Wakayama T. Cloning of ES cells and mice by nuclear transfer. *Methods Mol Biol.* 530, 251–265, 2009.
6. Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, Hikichi T, Wakayama S, Kishigami S, Mizutani E, Wakayama T. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction.* 2009, 138, 309-17.
7. Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, Kim JH, Van Thuan N, Wakayama T. The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development.* 2008, 35, 3935-45.

### (2) 特許出願

該当無し。

### (3) その他 (主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### ・学会発表

1. Kishigami S, Lee A.R., Matsumoto K., Saeki K., Hosoi Y.: Dynamics of lysine acetylation during the one-cell stage mouse embryos. *The 8<sup>th</sup> Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society*, Guangxi, China, October 27,



- 2011.
2. Lee A.R., Kishigami S., Wakayama T., Matsumoto K., Saeki K., Hosoi Y.: Effect of inhibitors for class I/II and III histone deacetylases for aging oocytes. *Joint CSH Asia/ISSCR Conference-Cellular Programs and Reprogramming*, Suzhou, China, October 25, 2011.
  3. 岸上哲士 : クローンとエピジェネティクス : 第29回日本受精着床学会総会・Assisted Reproductive Technology Forum '11、東京、2011年9月10日 (招待講演)
  4. Lee A.R., Kishigami S., Wakayama T., Matsumoto K., Saeki K., Hosoi Y.: Vitamin C does not enhance reprogramming after SCNT. *The 16<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation*, Nara, Japan, November 16, 2010.
  5. Matsubara K., Lee A.R., Kamata Y., Magotani M., Saeki K., Matsumoto K., Kishigami S., Hosoi Y.: Analysis of acetylation in oocytes and 1-cell embryos. *The 16<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation*, Nara, Japan, November 16, 2010.
  6. Kishigami S., Lee A.R., Matsumoto K., Yamochi T., Amano T., Matsumoto K., Saeki K., Iritani A. and Hosoi Y.: What is the impact of HDACi treatment on protein acetylation and development in mice. *The 7<sup>th</sup> Annual Conference of the Asian Reproductive Biotechnology Society*, Kuala Lumpur, Malaysia, November 9, 2010.
  7. Lee A.R., Matsubara K., Kishigami S., Wakayama T., Saeki K., Matsumoto K., Hosoi Y.: Aged oocyte associated with tubulin acetylation、第103回日本繁殖生物学会、青森 2010年9月2日

・著作物

1. 矢持隆之、岸上哲士、細井美彦 : 目で見る生殖と再生—体細胞クローナー、*Hormone Frontier in Gynecology*、18 : 2—5, 2011
2. 岸上哲士、矢持隆之、松原圭吾、細井美彦 : 体細胞核移植におけるリプログラミング促進技術の開発、*再生医療*、8 : 315—8, 2009
3. 岸上哲士、辻本賀子、矢持隆之、細井美彦 : 核移植とiPS細胞技術—リプログラミングの効率化を目指して、*細胞工学*、28 : 223—6, 2009

# 研究報告書

## 「肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研究者：鈴木 淳史

### 1. 研究のねらい

通常、肝細胞は多くの転写因子の働きによって発生期に肝前駆細胞から分化するのが普通だが、稀に、障害を受けた膵臓の外分泌細胞や骨髄などに含まれる間葉系幹細胞から肝細胞が分化することがある。また、骨髄移植後に血液細胞が肝細胞と融合し、肝細胞として肝臓組織を構築することもある。これらの事象は、肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させる因子の存在を示唆しており、ある環境下ではそれらの因子が活性化して肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させていると考えられる。したがって、もし、このような肝細胞の運命決定因子を同定することができれば、それらを使って皮膚の線維芽細胞を肝細胞へと直接変化させることが可能になるかもしれない。そこで本さきがけ研究では、肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し、線維芽細胞から肝細胞を直接作り出すことを試みた。

### 2. 研究成果

#### 2-1. 肝細胞の運命決定因子の探索とマウス胎仔線維芽細胞からの iHep 細胞作製

肝細胞の運命決定因子をスクリーニングするために、肝臓の発生過程において肝細胞の分化に関連する 12 個の転写因子に着目した。レトロウイルスを用いてこれら 12 因子を同時にマウス胎仔線維芽細胞(MEF)に導入すると、肝細胞マーカーであるアルブミンや  $\alpha$ -フェトプロテイン、及び、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現が強く誘導された。そこで次に、12 因子のうち必須の因子を抽出するために、12 因子から 1 因子を除いたウイルスをそれぞれ用意して解析を行った。その結果、Hnf4a を除いたときのみ、肝細胞マーカーの発現誘導が強く阻害されることが判明した。そこで、Hnf4a とその他の 1 因子、計 2 因子を MEF に導入したところ、Hnf4a & Foxa1、Hnf4a & Foxa2、Hnf4a & Foxa3 の 3 つの組み合わせにおいてのみ肝細胞マーカーや上皮細胞マーカーの発現が強く誘導された。さらに、これらの遺伝子セットを導入した MEF をコラーゲンや肝細胞増殖因子と共に培養すると、およそ 1 ヶ月後には MEF が上皮様形態をもった細胞に変化することが明らかとなった。我々は、これらの上皮様細胞を iHep 細胞(induced hepatocyte-like cells)と名付けた。

#### 2-2. iHep 細胞の性状解析

MEF から作製された iHep 細胞は、そのほとんどが E-cadherin、アルブミンともに陽性であった。また、iHep 細胞はグリコーゲンの蓄積や低比重リポタンパク質(LDL)の取り込み、アルブミンの分泌、アンモニア代謝と尿素合成、シトクロム P450 活性、インドシアニングリーンの取り込みと排出、脂質代謝、薬物代謝などの肝細胞に特有の機能を有しており、肝細胞と同様に細胞間をタイトジャンクションで連結して毛細胆管を形成していた。さらに、iHep 細胞は肝機能を発揮する一連の酵素群をコードする遺伝子も発現していた。以上から、iHep 細胞は肝細胞のもつ形態的・機能的特徴を有することが明らかとなった。

### 2-3. iHep 細胞による肝臓組織の再構築と肝機能補助

肝機能不全で死に至る高チロシン血症モデルマウスの肝臓に対し、正常マウスから取得した肝細胞を移植すると、肝細胞は損傷を受けた肝臓組織を機能的に再構築し、マウスの命を救うことができる。そこで本研究では、iHep 細胞を高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ移植し、iHep 細胞が肝細胞として機能するか否かを調べた。その結果、iHep 細胞は損傷を受けた高チロシン血症モデルマウスの肝臓組織を再構築し、肝機能を補助することで、マウスの致死率を大幅に減少させることが可能であった。

### 2-4. iHep 細胞を用いた遺伝子治療/組織再生モデル

次に、iHep 細胞を用いた治療モデルの可能性を検証すべく、高チロシン血症モデルマウスの MEF から作製した iHep 細胞に対し、欠損遺伝子を導入して遺伝的な肝機能疾患の治療を行った。その後、これらの細胞を高チロシン血症モデルマウスの肝臓に移植したところ、移植した細胞は正常細胞と同じように損傷を受けた肝臓組織を再構築可能なことが判明した。この結果は、遺伝的な肝疾患をもつ患者自身の線維芽細胞を用いて iHep 細胞を作製し、生体外における遺伝子治療を経てから肝臓へ移植することで、肝臓を機能的に再生させて治療することが可能な新しい治療モデルを提示しているといえる。

### 2-5. 成体マウス線維芽細胞からの iHep 細胞作製

以上に述べたように、我々は MEF から iHep 細胞を作製することに成功したことから、続いて、成体マウスの皮膚から抽出した線維芽細胞(MDF)からも iHep 細胞の作製を試みた。その結果、MEF と同様に、MDF に対しても Hnf4a と Foxa (Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれかひとつ) を導入することで、肝細胞のもつ形態的・機能的特徴を有した iHep 細胞を作製することができた。また、これら MDF 由来 iHep 細胞は、高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ移植後に損傷を受けた肝臓組織を再構築することも可能であった。

### 2-6. 結語

本研究では、たった2つの転写因子を線維芽細胞に発現させるだけで、人工多能性幹細胞(iPS 細胞)を経由することなく、線維芽細胞から肝細胞を直接作製することに成功した(図 1)。

これら 2 つの転写因子は肝細胞の運命を決定する「マスター制御因子」と考えられ、肝細胞分化を促す複雑な転写因子ネットワークの根幹に位置するものと考えられる。

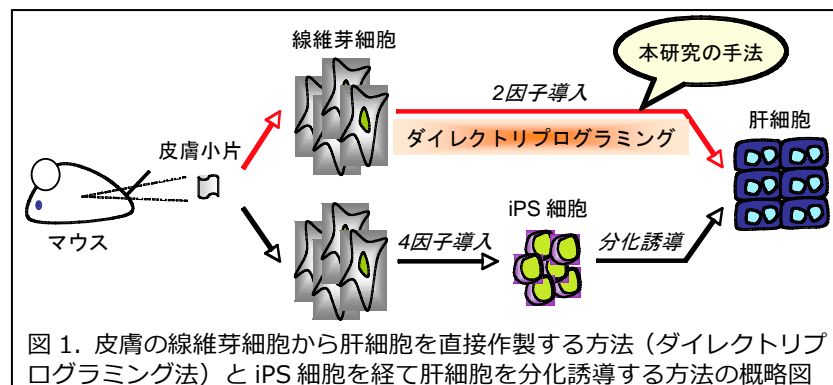


図 1. 皮膚の線維芽細胞から肝細胞を直接作製する方法(ダイレクトリプログラミング法)とiPS細胞を経て肝細胞を分化誘導する方法の概略図

2 つの転写因子が細胞内でどのような変化を引き起こし、細胞の運命転換を誘導して肝細胞を作り出すのか、そのメカニズムは非常に興味深い。一方、本研究はヒト iHep 細胞の作製に向けた基盤科学となることは言うまでもなく、ヒトで iHep 細胞が作製されれば、肝疾患に対する細胞移植や人工肝臓への応用が期待できる。また、創薬研究において、薬の効果や毒性を

評価するためのツールとして iHep 細胞が利用される可能性も十分に考えられる。

### 3, 今後の展開

これまでのマウス iHep 細胞研究を基盤とし、「ヒト iHep 細胞の作製」、「iHep 細胞作製メカニズムの解明」、「iHep 作製技術の効率化・簡素化」を目指す。

### 4, 自己評価

本さきがけ研究では、目的であった「肝細胞の運命決定を担う特定因子の同定」と「それら特定因子を用いた線維芽細胞からの肝細胞作製」を達成することができた。研究総括をはじめ、多くの方から助言をいただき、そして時には反発して議論しながら研究を進めてきた経験は私にとってかけがえのないものであり、今後の研究を進める上で大きな自信となった。今後も、この成功に慢心せず、iHep 細胞の臨床応用に向けてさらに研究を進めていきたい。

### 5, 研究総括の見解

iHep を構想し、実現にまで至った事は極めて高く評価できる。研究の進め方、ラボ内での管理、他研究者とのやり取り、論文の纏め方、など十分に独立研究者としての能力がある事を示したと評価する。今後、メカニズムの解明、ヒト iHep の作製などに是非成功し、この分野の第一人者へと進む事を期待する。

### 6, 主な研究成果リスト

#### (1)論文(原著論文)発表

1. Sekiya S. and Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475, 390–393, 2011.
2. Sekiya S. and Suzuki A. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 11175–11180, 2011.
3. Onoyama I., Suzuki A., Matsumoto A., Tomita K., Katagiri H., Oike Y., Nakayama K., Nakayama K.I. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J Clin Invest* 121, 342–354, 2011. ✓

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:2 件

発明者: 鈴木 淳史  
発明の名称: 誘導肝細胞  
出願人: 九州大学  
出願日: 2011/2/16

発明者: 鈴木 淳史  
発明の名称: 肝臓細胞を作製する方法  
出願人: 九州大学

出 願 日： 2010/2/16

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

<主要な学会発表(すべて招待講演)>

1. 鈴木淳史: 細胞運命の人為的制御 ～皮膚から肝臓をつくる～: *先端医療・バイオニックM EMS 共創フォーラム*、福岡、2011年12月5日
2. Suzuki A.: Induction of functional hepatocytes from fibroblasts by defined factors. *2011 International Forum for Stem Cell Translational Research*, Shanghai, China, October 23, 2011.
3. 鈴木淳史: 肝臓の再生機構と発癌: *第70回日本癌学会学術総会・腫瘍別シンポジウム*、名古屋、2011年10月3日
4. 鈴木淳史: 肝幹細胞のプロスペクティブな解析: 生体外の解析から生体内の解析へ: *日本遺伝学会第83回大会*、京都、2011年9月22日
5. Suzuki A.: Induction of functional hepatocytes from fibroblasts by defined factors. *The 7th FAOPS Congress*, Taipei, Taiwan, September 11–14, 2011.
6. Suzuki A.: Induction of functional hepatocytes from fibroblasts by defined factors. *43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (JSDB-APDBN) meeting*, Kyoto, Japan, June 21, 2010.

<受賞>

1. 2009年4月: 平成21年度文部科学大臣表彰若手科学者賞
2. 2009年3月: 第8回日本再生医療学会・若手研究奨励賞
3. 2008年6月: 第15回肝細胞研究会・会長賞

# 研究報告書

## 「細胞リプログラミング技術を用いた新しい免疫細胞再生医療の開発」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研究者：清野 研一郎

### 1. 研究のねらい

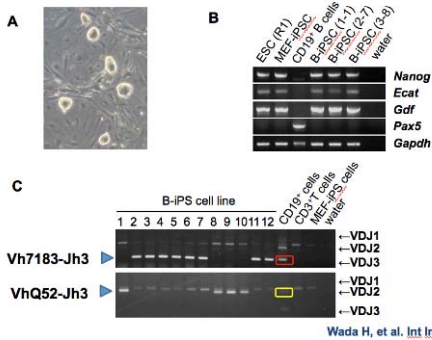
本研究を始めた当時、皮膚等の体細胞由来の iPS 細胞から様々な系統の細胞を分化誘導することで、ES 細胞の問題点を克服した新しい再生医療が可能であることが盛んに論じられていた。一方、我々が専門として来たリンパ球や抗体を用いた治療では抗原特異性が問題とされる。この抗原特異性はリンパ球においては抗原受容体の種類によって規定されるのであるが、上記のような皮膚細胞由来の iPS 細胞からは思い通りの細胞（抗原特異性を持ったリンパ球）を大量に入手することは困難であると思われた。そこで、iPS 細胞の由来細胞を免疫細胞に代えるとどうなるか？ iPS 細胞からリンパ球は分化誘導できるか？できた場合抗原特異性はどうなるか？等の疑問を持つようになった。これらに答えるには、広く免疫系細胞と iPS 細胞との関わりについて明らかにする必要があると考え、まず免疫細胞からの iPS 細胞誘導と iPS 細胞からの免疫細胞の分化について検討を行うこととした。究極的には iPS 細胞から特定の遺伝子再構成したリンパ球を分化誘導する、あるいはリンパ球サブセットの分化を制御する方法を見出し、癌や感染症、そして同種異系の移植に対して有用な細胞を得る方法論を確立することを一つの目標として研究を開始した。

### 2. 研究成果

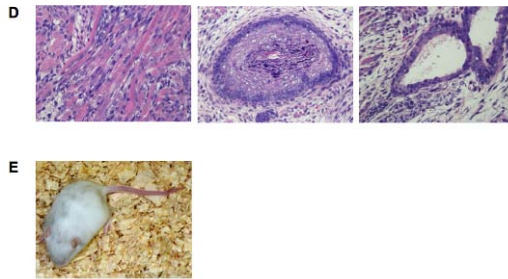
#### 2-1 末梢 B 細胞からの iPS 細胞の誘導

マウス脾臓の B 細胞、T 細胞を用い、これらに山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を遺伝子導入し iPS 細胞誘導を試みた。当初は遺伝子導入そのものに難渋し、レトロウイルス法、レンチウイルス法、タンパク質導入法など様々な遺伝子導入法を検討したが、最終的にレトロウイルス法により脾臓 B 細胞から iPS 細胞様のコロニーを得ることができた。同コロニーをクローニングし、遺伝子発現を検討したところ、B 細胞特異的な Pax5 の発現は失われ、ES 細胞マーカーである Nannog, Ecat などの発現が確認できた。また、VDJ 組み換えを検討したところ、これらのコロニーは皮膚細胞などと異なり B 細胞抗原受容体部分が遺伝子再構成していることが示され、真に B 細胞由来の iPS 細胞であることが判明した。この B 細胞由来 iPS 細胞を同系マウスに移植するとテラトーマを形成し、またキメラマウスの作製が可能であった。

### 末梢B細胞からのiPS細胞の誘導



### 末梢B細胞からのiPS細胞の誘導



Wada H, et al. *Int Immunol* 2011

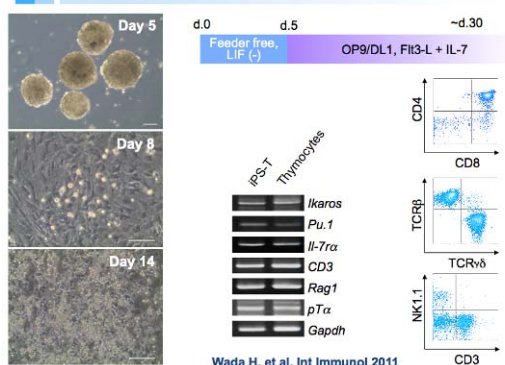
Wada H, et al. *Int Immunol* 2011

これより以前、山中4因子にC/EBPαなどを加えることでマウスB細胞からiPS細胞誘導が可能であることは米国の研究グループから報告があったが、山中4因子のみで誘導できることを報告したのは初めてであった。一方、T細胞からはiPS細胞の誘導は我々の手では困難であった。同時期、p53を欠失したT細胞からはiPS細胞は誘導できたが正常T細胞からはできないとする報告があった。

### 2-2 iPS細胞（皮膚由来又はB細胞由来）からのリンパ球分化誘導

次に、OP9フィーダー細胞を用い、iPS細胞からリンパ球系細胞への分化誘導を試みた。OP9にNotchリガンドdelta-like1を発現させたフィーダー上でFlt3L、IL-7を用いて培養すると、T細胞の特徴を持った（遺伝子発現、細胞表面分子発現）細胞の分化誘導が可能であった。これは、iPS細胞の由来細胞（皮膚またはB細胞）に関わらず可能であった。生成されたT細胞の抗原受容体ベータ鎖の発現を見ると偏りはなく、多様なT細胞が生成されているようであった。

### iPS細胞からのT細胞分化誘導



Wada H, et al. *Int Immunol* 2011

一方、OP9をフィーダーとして用いたB細胞の分化誘導の条件では、ES細胞からのB細胞の誘導は可能であったが、iPS細胞からのそれは非常に困難であった。それは、iPS細胞の由来がB細胞である場合でも同様であった。遺伝子発現を検討すると、分化初期からB細胞の分化誘導に必須のPax5の発現が見られなかった。このことは、現在確立されている試験管内のB細胞分化誘導系はマウスiPS細胞に取っては不十分であること

を示している。

### 2-3 iPS 細胞または ES 細胞由来 T 細胞の機能解析

iPS 細胞または ES 細胞から上記のように試験管内で誘導した T 細胞を IL-2 で増殖させた後 PMA/ionomycin で刺激し、IFN-g を産生することを見出した。また、TGF-b で刺激し、Foxp3 陽性の細胞が得られることを見出した。この Foxp3 陽性細胞を含む分画は他に調製した T 細胞の増殖を抑制した。さらに、iPS 細胞から誘導した T 細胞をマウス生体に移入し機能するかどうか検討した。ヒトにおける donor lymphocyte infusion を想定し、マウスで白血病再発モデルを作製した。ここにドナーと同系の iPS 細胞から誘導した T 細胞を移入したところ、生存期間の延長が見られた。即ち、iPS 細胞由来リンパ球を治療目的に応用する可能性が示された。

### 3. 今後の展開

再生医療において、患者自身の iPS 細胞を用いない限りアロの移植拒絶反応の問題が発生することが予想される。そこで、これらの問題点を解決するべく、ES 細胞や iPS 細胞から効果的な免疫抑制細胞を誘導する方法について検討を行う。この点については移植免疫学の拠点研究室の一つである Oxford 大学の Fairchild 博士も同様の主張をされており、早期に小動物を用いてコンセプトを示して行く。

また、免疫細胞以外の細胞種においては iPS 細胞の段階を経ないでも直接目的の細胞を誘導する方法 (direct reprogramming) の開発が進んでいる。同様のコンセプトで有用な免疫細胞、特に professional antigen-presenting cell である樹状細胞への直接誘導が可能であるか検討している。

### 4. 自己評価

当初の目標である抗原特異的 T 細胞の iPS 細胞化は他のグループがいち早く論文で発表したこと、また我々が主に用いていたマウス細胞では困難であることが判明し、方針を変更せざるをえなくなったことは非常に残念でありまた反省点も多い。そんな中、マウス iPS 細胞を用いリンパ球分化等に関する上記成果を上げることができたのは幸いであった。また、これらの研究を進める中でリンパ球のリプログラミングの再現性や分化効率の低さ等を実感することができ、真に腫瘍免疫等の効果を高めるために別の方向でリプログラミング技術を生かすという新しい発想を持つことができたのは収穫であった。また、なんとと言っても西川研究総括はじめ多くの指導者の先生方、同年代の優れた多くの研究者と協力関係が築けたことは大きい。今後研究を進めて行く上で、貴重な財産となることは間違いなく、このさきがけに参加させていただき心から感謝している。

### 5. 研究総括の見解

iPS を用いたがん治療を構想し、その実証をマウスモデルで得るという研究であり、当初計画の 7-8 合目までは到達したのではと評価する。ただ、これまでの研究は他に追従を許さない研究者独自のものかという点では、まだまだその領域には達し得てないと言える。今後は本成果の上に、iPS と彼なくしては不可能であるという分野を見だし、発展させる事を期待



する。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Kobayashi Y, <u>Seino K</u> , Hosonuma S, Ohara T, Itamochi H, Isonishi S, Kita T, Wada H, Kojo S, Kiguchi K. Side population is increased in paclitaxel-resistant ovarian cancer cell lines regardless of resistance to cisplatin. <b>Gynecol Oncol</b> 121:390-394, 2011.
2. Hosonuma S, Kobayashi Y, Kojo S, Wada H, <u>Seino K</u> , Kiguchi K, Ishizuka B. Clinical significance of side population in ovarian cancer cells. <b>Human Cell</b> 24:9-12, 2011.
3. Wada H, Kojo S, Kusama C, Okamoto N, Sato Y, Ishizuka B, <u>Seino K</u> . Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. <b>Int Immunol</b> . 23:65-74, 2011.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:1件

出願番号:12/845,178(米国)

発明者:清野研一郎、和田はるか

発明の名称:PRODUCTION METHOD OF IMMUNE CELLS

出願日:2010年7月28日

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### <招待>

1. 清野研一郎. 移植免疫、免疫寛容の現状と展望、第9回北関東移植研究会、東京、2010年3月27日
2. 清野研一郎. 膝島移植の基礎研究と将来展望—iPS細胞、幹細胞と再生医療—、藤田保健衛生大学医学部 臓器移植再生医学講座、2010年5月7日
3. 清野研一郎. NKT細胞とiPS細胞. 炎症・再生学会シンポジウム、2010年8月5日、東京
4. Ken-chiro Seino. Approach to new immune cell therapy in the age of regenerative medicine. Luncheon Seminar, 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 2010.
5. 清野研一郎. 免疫寛容のメカニズムと臨床応用の一例. 日本免疫治療学研究会、東京、2011年2月
6. 清野研一郎. 再生医学時代における新しい免疫制御法の考え方. 第91回北海道医学大会病理分科会(第44回北海道病理談話会)、旭川、2011年9月10日
7. 清野研一郎. 再生医学の最前線—iPS細胞から癌の最新治療まで— 日経懇話会、札幌ホテルオークラ、2011年10月11日

<その他>

1. Wada H, Kojo S and Seino K. In vitro T, B or NK cell lineage differentiation from mouse splenic B cell-derived induced pluripotent stem cells. 12th Meeting of the Society for Natural Immunity & NK2010. Croatia. September, 2010
2. Wada H and Seino K. Generation of T cells from iPS cells and their anti-tumor effect in vivo. The Second Workshop of Synthetic Immunology, Kyoto, Dec. 2010
3. 和田はるか、細井亮宏、垣見和宏、清野研一郎. iPS テクノロジーを導入した新しいがん免疫細胞療法の確立に向けた取り組みと現状. 第40回日本免疫学会、幕張、2011年11月
4. 工藤浩也、和田はるか、香城諭、力石辰也、清野研一郎. 多能性幹細胞を用いた新しい免疫制御法に関する研究. 第40回日本免疫学会、幕張、2011年11月

# 研究報告書

## 「任意細胞の樹立法開発」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：升井 伸治

### 1. 研究のねらい

分化は、何が決めるのだろうか？ 近年の報告から、少数の転写因子が大きな役割を果たすことがわかってきた。例えば、Oct3/4 を含む4因子の強制発現は誘導多能性幹(iPS)細胞を誘導し、Hnf4a を含む2因子の強制発現は誘導肝細胞(iHep)を誘導する。こうした誘導活性をもつ転写因子(誘導因子)を様々な細胞で同定できれば、試験管内作出法につながり、再生医療や疾患モデリングに大きく貢献するだろう。

そこで本研究では、任意細胞に適用可能な機能アッセイを構築し、これを用いた誘導因子同定法の開発を行った。

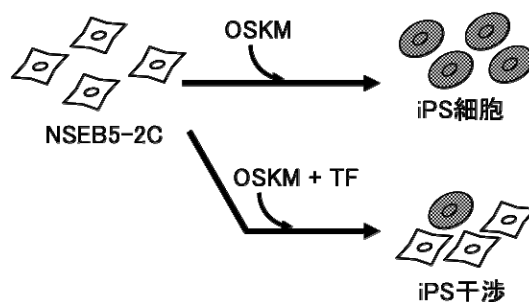
### 2. 研究成果

#### 2-1 iPS 化を用いた機能アッセイ

ES/iPS 細胞は、分化すると、ES/iPS 細胞特異的な発現プロファイルを失う。逆に、分化細胞は、iPS 化すると、その特異的な発現プロファイルを失う。このことから、ES/iPS 細胞と分化細胞の発現プロファイルは、共存できないと考えられる。したがって、iPS 化と同時に、分化細胞の発現プロファイルを維持する因子を強制発現すると、iPS 化の効率を下げると予想できる(iPS 干渉)。逆に考えれば、iPS 干渉を指標に、分化細胞の発現プロファイルを維持する因子がとれるだろう。ちなみに、iPS 化を阻害する分子として、p53 や Ink4a/Arf など様々なものが既に知られていたが、本研究ではあらかじめそれらを除いて、細胞種特異的に発現する転写因子のみについて解析した。

まず扱いやすいセルライン(NSEB5-2C; neural progenitors に似た性質を部分的にもつ)を用いて、比較的高発現している転写因子158個を、1因子ずつ、iPS 化と同時に強制発現を行い、iPS コロニーの変動を解析した(OSKM; Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)。

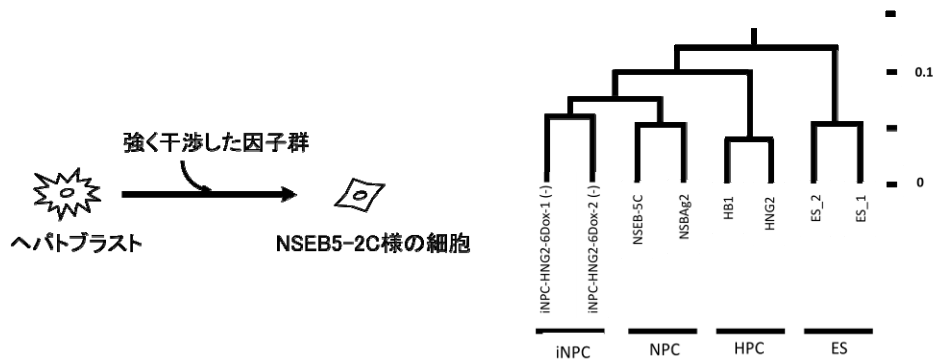
他の様々な実験の結果も合わせると、iPS 干渉の度合いによって、発現プロファイルの維持活性が測定できると考えられた。すなわち、最も強く干渉する因子は、最も強く発現プロファイルを維持すると予想できる。



#### 2-2 NSEB5-2C における干渉因子は NSEB5-2C 様発現プロファイルを誘導できる

強い干渉がみられた因子は、発現プロファイルを強く維持するのならば、誘導因子として機能するのではないだろうか？これを調べるために、最も強く干渉した6因子を別の細胞(胎児肝由来ヘパトブラスト; HPC)へ共導入し、NSEB5-2C 様の発現プロファイルが誘導されるかを解析

した。結果として、NSEB5-2C 様の網羅的発現プロファイルをもつ細胞が誘導された(下図右: NSEB5-2C は NPC、誘導された細胞は iNPC と略記)。したがって、6因子は誘導因子として機能したと考えられる。



### 2-3 HPC における干渉因子は肝細胞系譜の誘導因子を含む

iPS 干渉法を用いて、NSEB5-2C の誘導因子を同定できた。ではこの手法は、他の細胞にも使えるのだろうか？これを調べるために、HPC を用いて iPS 干渉アッセイを40因子について行い、強く干渉する4因子を同定した。この4因子には、Hnf4a などの iHep 誘導因子が含まれていた。すなわち、肝細胞系譜の細胞において iPS 化に干渉する因子は、肝細胞系譜の誘導因子を含むといえる。まとめると、発現プロファイルが大きく異なる二種類の細胞で誘導因子を同定できたから、その他多くの細胞において、iPS 干渉法を用いて誘導因子を同定できると示唆される。

### 3. 今後の展開

iPS 干渉法は、転写因子の機能知見の増大に貢献し、分化が関与する広い分野の研究を加速できるだろう。

誘導された細胞のエピゲノムを解析すれば、誘導因子の作用をエピゲノム変化で定義できるだろう。様々な細胞種を用いて誘導因子同定とエピゲノム解析を行えば、分化一般法則の構築につながり、誘導因子の予測法開発にもつながる。

転写因子以外の遺伝子についても iPS 干渉アッセイを行えば、分化維持への貢献度を測定できると考えられる。これを全てのシグナル伝達分子について行えば、分化維持に重要なシグナル経路が多く明らかになるだろう。誘導因子と共に用いれば、より高効率な分化法開発につながる。

がん細胞の誘導因子やシグナル伝達分子(の組み合わせ)を同定すれば、その阻害剤(の組み合わせ)を用いた除去法開発も期待できる。

### 4. 自己評価

転写因子の種類は1000以上あり、これらの組み合わせが様々な細胞の発現プロファイル構築に大きな役割を果たす。ターゲットの数は転写因子によって異なるから、「誘導(分化転換/ダイレクトリプログラミング)」としてみている現象は、発現プロファイルへのコントリビューションが大きい転写因子の、累積的な作用と考えられる。すなわち、誘導/分化転換/ダイレクトリプログラミングにおいては、より強力な誘導因子を、より多く導入すれば、目的の細胞により近づくと考えられる。実際、MEF への OKM 導入では、iPS 細胞の発現プロファイルを部分的に

もつ細胞が得られる。そのため、本研究では「誘導された細胞を得ること」を目的とせず、発現プロファイル誘導活性(部分的にでも)をもつ因子の同定法開発に集中した。そのため、材料として(割り切って)扱いやすいセルラインを用いたが、これが功を奏し、当初目的を達成できた。

## 5. 研究総括の見解

良く言えば論理的、悪く言えば独断的な計画で、実際にどこまで研究が進むか懸念したが、予想以上の成功を収めたと評価している。残念ながら、論文を然るべき雑誌に発表するのに大変苦勞しているようであるが、彼なしには成し得ないオリジナルな研究であり、今後とも持論を大いに展開してってもらいたい。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Konno M, Masui S, Hamazaki TS, Okochi H. Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain. J Biotechnol. 154:298-303, 2011  |
| 2. Ura H, Murakami K, Akagi T, Kinoshita K, Yamaguchi S, Masui S, Niwa H, Koide H, Yokota T. Eed/Sox2 regulatory loop controls ES cell self-renewal through histone methylation and acetylation. EMBO J. 30:2190-204, 2011   |
| 3. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. J Biol Chem. 286:11593-603, 2011 |
| 4. Masui S. Pluripotency maintenance mechanism of embryonic stem cells and reprogramming. Int J Hematol. 91:360-372, 2010  |
| 5. Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. Stem Cells 27:1066-1076, 2009                               |

### (2)特許出願

研究期間累積件数:2件

発 明 者: 升井伸治、大河内仁志、浜崎辰夫

発明の名称: 複数の遺伝子発現を行うための発現ベクター

出 願 人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出 願 日: 2008年10月7日

発 明 者: 升井伸治、引地貴亮

発明の名称: コアネットワーク構成転写因子の同定方法

出 願 人: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出 願 日: 2009年10月14日

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. Masui S. Functional analysis of Sox2 in differentiation of extra-embryonic endoderm

lineages, 2nd International SOX meeting, Japan, 2008.9.16.

2. 升井 伸治、「iPS 細胞が再生医療の扉を開く」、シーアンドアール研究所、2009 年 10 月 5 日(単行本)

# 研究報告書

## 「非ウイルス的手段によるiPS誘導法の確立」

研究期間：平成20年6月～平成24年3月

研究者：松田 修

### 1. 研究のねらい

エプスタイン・バール・ウイルス(EBV)エピゾーマル・ベクターは、EBVのoriP配列とEBNA1(EBV nuclear antigen 1)遺伝子を含むプラスミドベクターである。EBVエピゾーマル・ベクターを用いると、ヒト細胞に対する非ウイルス的遺伝子導入の効率が飛躍的に向上し、また強力な発現が達成できる。さらに導入されたDNAは染色体に組み込まれず、エピゾームとして核内に安定的に維持される。これはヒト細胞内において、EBNA1遺伝子産物がoriP内のコンセンサス配列に特異的に結合し、プラスミドの核内移行と核内保持、染色体の複製に同期したプラスミドの複製等の機能を発揮することに起因する。そこでEBVエピゾーマル・ベクターを用いれば、ホストのゲノムに異常をもたらさずに外来遺伝子を強発現させ、さらに薬剤選択圧をコントロールすることによって、導入した遺伝子を必要な期間だけ維持し、不要になってから除去することができる。そこで本研究では、この利点を生かして非ウイルス的な体細胞リプログラミング誘導法を開発し、ゲノムのintegrityが保持されたiPS細胞を樹立することを当初のねらいとした。

さらにこれらの系を応用し、ゲノム領域特異的なエピジェネティック修飾の新しい解析システムの樹立を目指した(京都大学iPS細胞研究所 升井伸治博士(JSTさきがけ研究者)との共同研究)。すなわち、解析目的とするゲノム領域を有するEBVエピゾーマル・ベクター(エピゲノソーム)を構築し、細胞内に導入後長期に渡って維持することで、分化に伴うエピジェネティクス構築活性を染色体上の位置効果を受けずに解析できると考えられる。さらに、解析対象とするゲノム配列に自在に欠失や変異を導入し、エピジェネティック修飾に及ぼす影響を解析できると考えられる。そこでこのようなエピゲノソームを実際に構築し、解析システムの妥当性を検証するとともに、モデルとしてエピゲノソーム上に挿入したnanog遺伝子領域のエピジェネティック修飾を解析した。

またエピジェネティック修飾の解析のモデル系に適した細胞系譜に着目し、樹立したiPS細胞からの機能細胞への分化誘導法を開発することとした。

### 2. 研究成果

#### 2-1 EBVエピゾーマル・ベクターを用いた体細胞リプログラミングとその応用

ヒトケラチノサイトに電気穿孔法にてEBVエピゾーマル・ベクターを導入する方法を最適化した。これを用いてOct-4、Klf-4、SOX2を有するEBVエピゾーマル・ベクターを単独で、あるいはc-MycとLIN28を有するEBVエピゾーマル・ベクターと共導入することによって、iPS細胞を誘導した。また、マウスiPSについても、同様のベクターを異なる手法で体細胞に導入することで、iPS細胞の樹立に成功した。得られたiPS細胞の幹細胞マーカーの発現プロファイル、in vitroにおける種々細胞への分化能、テラトマ形成能等の解析を行うとともに、導入した初期化遺伝子の染色体へのインテグレーションがないことを確認した(Fig. 1)。

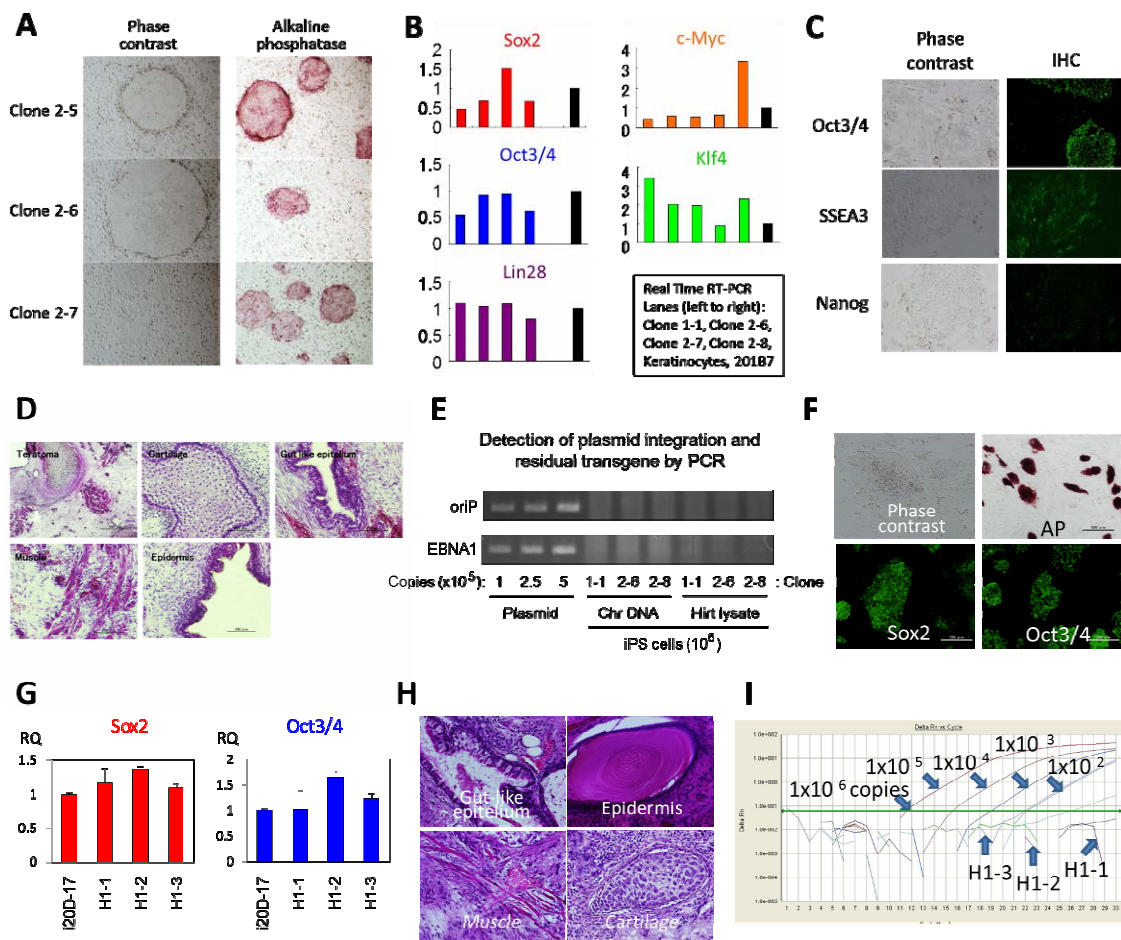


Fig. 1 EBV エピゾーマル・ベクターを用いて樹立した iPS 細胞。A-E、ケラチノサイト由来ヒト iPS 細胞クローン。これらは典型的な iPS 細胞のコロニー形状を示し (A 左)、アルカリフォスファターゼ陽性である (A 右)。幹細胞マーカーの発現を mRNA レベル (B) と蛋白レベル (C) で認め、そのレベルは、レトロウイルスベクターで樹立された iPS 細胞株 201B7 と同程度である。SCID マウス精巣に移植すると 3 胚葉由来組織を含むテラトーマを形成する (D)。染色体 DNA (Chr DNA) と Hirt lysate (エピゾームが含まれる抽出液) を調整し、ベクター配列特異的なプライマーで PCR を行うと、いずれも検出されず、これらの iPS 細胞クローンには導入したベクターは存在していない (E) (Plasmid はコピー数を算定するためのコントロールであり、検出感度は 1 細胞あたり 0.1 コピー以下である)。F-I、マウス iPS 細胞クローン。上記のヒト細胞と同様、典型的なコロニー像 (F 左上) を呈し、アルカリフォスファターゼ陽性である (F 右上)。Sox2 と Oct3/4 を、レトロウイルスベクターで樹立された iPS 細胞株 i20D-17 と同レベル発現する (F 下、G)。3 胚葉由来組織を含むテラトーマ形成能を有し (H)、また染色体 DNA からベクター配列は検出されない (I) ( $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$  はコピー数を算定するための plasmid DNA のコントロールであり、検出感度は 1 細胞あたり 0.1 コピー以下である)。



## 2-2 EBV エピゾーマル・ベクターを用いたゲノム領域特異的エピジェネティック修飾の新しい解析システム

解析目的とするゲノム配列を有する BAC クローンに、insulator を隔てて EBNA1 発現ユニットと oriP を挿入する、エピゲノソームを開発した (Fig. 2A)。このエピゲノソームの有用性を検証する目的で、Tet-on 制御ユニットを含むベクターを HeLa 細胞等の細胞株、およびヒト iPS 細胞に導入後、doxycycline を添加することで、挿入配列とベクターバックボーンの発現制御の独立性を確認した (Fig. 2B、C)。また、oriP の上流と下流に loxP を組み込むことで、導入後早期に脱落させることが可能なエピゲノソームを作成し、CreERT2 導入後に Tamoxifen を添加することでその有効性を確認した。そこで EGFP-IRES-Puro を Nanog 遺伝子の転写開始点直下にノックインしたマウスのゲノム配列約 210 kb を有する BAC クローンにこのベクターを挿入し、エピゲノソームを構築した。これらを種々のヒト由来培養細胞に導入後、薬剤選択下で培養することで、エピゲノソームを安定的に維持させることができた。HeLa 細胞では、エピゲノソームは細胞あたり約 20 コピー維持することができ、その 100% がヒト細胞内で複製したものであることが、dam メチル化のパターン (DpnI 耐性、MboI 感受性) から示された (Fig. 2D)。Nanog 遺伝子の proximal promoter の CpG メチル化をバイサルファイト法で解析したところ、ヒト細胞内で de novo のメチル化が加わったことが分かった。エピゲノソームはヒト細胞のみならず、本来 EBV が non-permissive であるマウス細胞においても複製された。以上から、エピゲノソームは染色体の位置効果に依存せず、細胞環境に応じたエピジェネティック修飾を解析できる実験系として有用であると考えられる。

## 2-3 iPS 細胞から機能細胞の分化誘導系の開発

2-1 で樹立した iPS 細胞を用い、2-2 のシステムを検証するのに適した細胞系譜の分化誘導を試みた。モデルとなる細胞としては、①環境 (栄養、温度等) に応じたエピジェネティックな影響を受け得る、②個体差がある、③これまで分化誘導がなされておらず、基礎研究上の重要性が高い、④ヒト疾患の治療上の意義があり、再生医療上の重要性が高い、細胞が望ましい。また解析対象とする遺伝子としては、①その細胞への分化に伴って発現し、その細胞の機能に重要な遺伝子、②その細胞の活性化に伴い発現量に変化する遺伝子、③疾患素因との関連がある、④発現レベルに影響する SNP が知られており、その SNP に臨床的な意義がある、ものが適していると考えられる。

そこでこのようなキャラクターを有するある細胞に着目し、マウスとヒトの iPS 細胞からその分化誘導に成功した。さらにそのキャラクター化と機能解析を in vitro および in vivo の移植実験で行った。また、マウス線維芽細胞からのダイレクト・リプログラミングにも成功した。

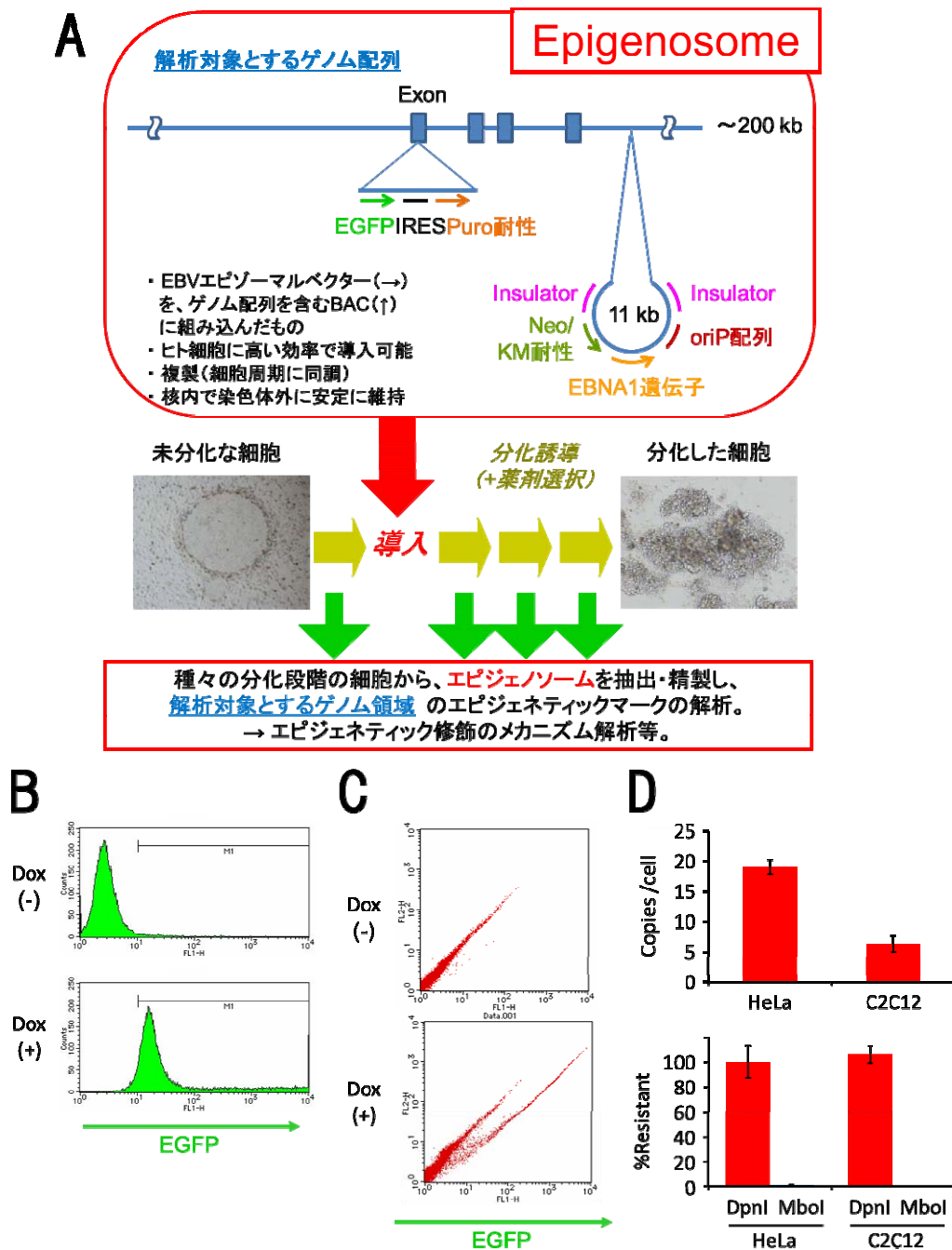


Fig. 2 エピゲノソームとそれを用いたエピジェネティック修飾の解析システム。A、解析系の模式図。B-D、解析系の検証。TetOn プロモーターの下流に EGFP を挿入した EBV エピゾーマル・ベクターを HeLa(B)またはヒト iPS 細胞(C)に導入後、Doxycycline を  $0 \mu\text{g}/\text{mL}$ (-)または  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (+)添加して培養し、EGFP の発現を FACS で解析した。また、Nanog 領域 210 kb を含むエピゲノソームを HeLa または C2C12 に導入後、カナマイシン選択して耐性クローンを得、細胞あたりのエピゲノソームのコピー数(D 上)、DpnI または MboI 耐性コピー数の率(D 下)を Real time PCR で測定した。

### 3. 今後の展開

EBV エピゾーマル・ベクターを用いて、ゲノムの完全性を保持したヒトおよびマウスの iPS 細胞を樹立することができた。Yu らは同様の EBV エピゾーマル・ベクターを用いているのが、Oct3/4、Klf-4、Sox2 の 3 因子に加えて c-Myc、Nanog、LIN28 と SV40 large T が必須であると述べているので (Science 324:797, 2009)、3 因子のみを用いる我々の方法は、細胞の異常や負荷が少ない可能性がある。また感染性を有するウイルスベクターを用いないので、使用上の制約が少なく、また導入遺伝子の脱落も速やかであるので、iPS 細胞バンクの樹立など、応用の範囲が広い技術であると考えられる。

エピゲノソームのシステムは、幹細胞特異的な遺伝子のみならず種々の細胞種に特異的に発現する遺伝子のゲノム領域に、細胞分化あるいはリプログラミングに伴ってエピジェネティック修飾が誘導される過程とその機構を解明するための強力な実験手段を提供する可能性が期待できる。さらに、挿入するゲノム断片をトランケートし、あるいはミューテーションを加えることで、特定の配列がゲノム領域特異的なエピジェネティック修飾に及ぼす影響を解析し、その分子基盤の解明につなげることが可能であろう。

このような基礎的技術と知見を、応用的に展開することで、再生医療において最も求められているテクノロジー、すなわち幹細胞から特定の細胞種に、特異的かつ完全な制御下に分化誘導する技術、あるいは高効率なリプログラミング技術の樹立に資するものと期待できる。たとえば上記のようなゲノム領域特異的エピジェネティック修飾をもたらす因子を解明すれば、細胞の分化の方向性と速度を制御する薬剤の開発等に繋がる可能性がある。一方で、種々の疾患、たとえばメタボリック症候群や悪性腫瘍等に対する新しい分子治療技術の開発、発症素因の診断法、モニタリング法等の創出をもたらす可能性があり、医療の進歩と新産業の創出に寄与できると期待される。

### 4. 自己評価

EBV エピゾーマル・ベクターによる非ウイルス的 iPS 細胞の誘導という目標に関しては、残念ながら他のグループに遅れをとったが、上記のような利点を有する技術が樹立できたと考えている。細胞分化に伴うエピジェネティック修飾の新しい解析システムの樹立、また iPS 細胞から機能細胞への分化誘導では、当初の目標以上の成果を得ることができ、今後のさらなる基礎的、応用的展開につながるものと考えている。

### 5. 研究総括の見解

当初心配した通り、EB ウイルスベクターを用いて iPS を樹立するという研究については、完全に遅れをとった。ただ、アドバイザー等の意見を聞いて、エピジェネティックな遺伝子修飾を検討するためのベクターシステム開発へと方向転換を試み、成果が出るところまで到達できたことは評価する。このベクターシステムはオリジナルであり、また iPS 研究にとっても有用なツールとなる可能性を秘めており、是非とも汎用されるシステムへと発展させる事を期待する。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Matsui M, Kishida T, Nakano H, Yoshimoto K, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Yoshimoto T, Hisa Y, & Mazda O. Interleukin-27 activates natural killer cells and suppresses NK-resistant head and neck squamous cell carcinoma through inducing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Res.* 69(6): 2523-30, 2009.
2. Mazda O, & Kishida T. Molecular therapeutics of cancer by means of electroporation-based transfer of siRNAs and EBV-based expression vectors. *Frontiers in bioscience*, 1:316-31, 2009.
3. Inoue A, Takahashi KA\*, Mazda O, Arai Y, Saito M, Kishida T, Shin-Ya M, Morihara T, Tonomura H, Sakao K, Imanishi J, & Kubo T. Comparison of anti-rheumatic effects of local RNAi-based therapy in collagen induced arthritis rats using various cytokine genes as molecular targets. *Mod Rheumatol.* 19(2): 125-33, 2009.
4. Yoshimoto K, Kishida T, Nakano Hi, Matsui M, Shin-Ya M, Shimada T, Nakai S, Imanishi J, Takeuchi M, Hisa Y, & Mazda O. Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. *J Immunother.* 34(2):139-48, 2011.

### (2)特許出願

なし

### (3)その他の成果

1. Pleiotropic Functions of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 (EBNA-1) and oriP Differentially Contribute to the Efficacy of Transfection/expression of Exogenous Gene in Mammalian Cells.  
Kishida T, Asada H, Kubo K, Sato Y, Shin-Ya M, Imanishi J, Yoshikawa K, & Mazda O\*.  
*J Biotechnol.* 133(2): 201-207, 2008.
2. Effects of heat stimulation via microwave applicator on cartilage matrix gene and HSP70 expression in the rabbit knee joint.  
Tonomura H, Takahashi KA\*, Mazda O, Arai Y, Shin-Ya M, Inoue A, Honjo K, Hojo T, Imanishi J, & Kubo T.  
*J Orthop Res.* 26(1): 34-41, 2008.
3. Nanogel DDS Enables Sustained Release of IL-12 for Tumor Immunotherapy  
Shimizu T, Kishida T, Hasegawa U, Ueda Y, Imanishi J, Yamagishi H, Akiyoshi K, Otsuji E, & Mazda O\*.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 367(2): 330-335, 2008.

4. Enhanced expression of interleukin-6, matrix metalloproteinase-13, and receptor activator of NF-kappaB ligand in cells derived from osteoarthritic subchondral bone.  
Sakao K, Takahashi KA\*, Mazda O, Arai Y, Tonomura H, Inoue A, Saito M, Fujioka M, Takamiya H, Imanishi J, & Kubo T.  
J Orthop Sci. 13(3): 202-10, 2008.
5. Induction of chondrogenic phenotype in synovium-derived progenitor cells by intermittent hydrostatic pressure.  
Sakao K, Takahashi KA\*, Arai Y, Inoue A, Tonomura H, Saito M, Yamamoto T, Kanamura N, Imanishi J, Mazda O, & Kubo T.  
Osteoarthritis Cartilage 16 (7): 805-814, 2008.
6. Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8 and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis  
Sakao, K., K.A. Takahashi\*, Y. Arai, M. Saito, K. Honjo, N. Hiraoka, H. Asada, M. Shin-Ya, J. Imanishi, O. Mazda, & T. Kubo.  
J Bone Miner Metab. 27(4): 412-23, 2009.
7. Raspberry-like assembly of cross-linked nanogels for protein delivery.  
Hasegawa U, Sawada SI, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O, & Akiyoshi K\*.  
J Control Release. 140(3): 312-7, 2009.
8. Asporin and transforming growth factor- $\beta$  gene expression in osteoblasts from subchondral bone and osteophytes in osteoarthritis  
Sakao K, Takahashi KA\*, Arai Y, Saito M, Honjo K, Hiraoka N, Kishida T, Mazda O, Imanishi J, & Kubo T.  
J Orthop Sci. 14(6): 738-47, 2009.
9. N-acetylcysteine prevents nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in an experimental model of osteoarthritis.  
Nakagawa S, Arai Y\*, Mazda O, Kishida T, Takahashi KA, Sakao K, Saito M, Honjo K, Imanishi J, & Kubo T.  
J Orthop Res. 28(2):156-63, 2010.
10. Early-stage blocking of Notch signaling inhibits the depletion of goblet cells in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice  
Shinoda M, Shin-Ya M\*, Naito Y, Kishida T, Ito R, Suzuki N, Yasuda H, Sakagami J, Imanishi J, Kataoka K, Mazda O\*, & Yoshikawa T  
J Gastroenterol. 45(6):608-17, 2010.
11. Effects of mechanical stress on cytokine production in mandible-derived osteoblasts.  
Yamamoto K, Yamamoto T, Ichioka H, Akamatsu Y, Oseko F, Mazda O, Imanishi J, Kanamura N, & Kita M.  
Oral Dis. 17(7): 712-9, 2011.

12. Intra-articular injection of hyaluronan restores the aberrant expression of matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritic subchondral bone.  
Hiraoka N\*, Takahashi KA, Arai Y, Sakao K, Mazda O, Kishida T, Honjo K, Tanaka S, & Kubo T.  
J Orthop Res 29(3):354-60, 2011.