

03-4410

## ES細胞における分化多能性と高い増殖性の維持機構

代表研究者 京都大学再生医科学研究所教授 山中伸弥  
協力研究者 京都大学再生医科学研究所助手 中川誠人

### 研究の目標

幹細胞を利用した細胞移植が、パーキンソン病、1型糖尿病、白血病など様々な疾患に対して期待されている。胚性幹 (ES) 細胞は高い増殖能と分化多能性を有することから、移植療法の資源としての価値が高い。しかしヒトES細胞は培養がマウスの場合より困難であり、また受精卵の利用という致命的な倫理的問題を有する。さらにES細胞を生体に移植すると奇形腫と呼ばれる特殊な須葉を形成するという問題点もある。これらを解決しない限り、真の臨床応用はあり得ない。私たちは最近、ES細胞の分化多能性を決定する転写因子Nanog (Cell 113: 631-642, 2003) や奇形腫形成における重要因子ERas (Nature 423: 541-545, 2003) をはじめとして、ES細胞で特異的に発現する遺伝子群を複数同定した。本研究においてはこれら遺伝子群の解析によりES細胞における特性維持機構を解明し、ヒトES細胞の培養法の改善、成体からの多能性幹細胞の分離もしくは樹立、および腫瘍形成抑制に関する技術開発を目指す。

### 研究経過および成果

初期胚から樹立される胚性幹 (ES) 細胞は、分化多能性を維持したまま長期培養が可能であり、細胞移植療法の資源として期待されている。さらに核移植技術と組み合わせることにより拒絶反応の無い患者専用のES細胞を樹立できる可能性がある。しかし、ヒト胚利用に対して慎重な運用が求められている。胚を用いることなく、分化細胞からES細胞に類似した多能性幹細胞を直接に樹立することができたなら、倫理的問題や移植後の拒絶反応を回避することができる。そのためには分化細胞を初期化する因子の同定が重要である。ES細胞と体細胞を融合すると分化細胞ゲノムが初期化されることから、ES細胞に初期化因子が存在していることは確実である。私たちはES細胞に存在する初期化因子は、ES細胞の分化多能性や高い増殖能を維持する因子とかなりの部分が重複していると考え、ES細胞の特性維持の分子機構を解析した。その結果、ES細胞における多能性の長期維持には、多能性細胞で特異的に発現している転写因子 (Oct3/4,

Sox2, Nanogなど) に加えて、複数の癌関連遺伝子 (STAT3,  $\beta$  カテニンなど) が関与していることが明らかになってきた。これらの因子は初期化因子の有力な候補と考えられた。

さらに私たちは、初期化現象を薬剤への耐性に置換する実験系を構築した。初期胚とES細胞で特異的に発現するが、機能的には必須では無いFbx15遺伝子のコーディング領域を、 $\beta$  ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子 ( $\beta$  geo) と置き換えたノックインマウスを樹立した。ホモ変異ES細胞 (Fbx15 <sup>$\beta$  geo/ $\beta$  geo</sup>細胞) は高濃度 (12mg/ml) のG418に耐性であった。一方、Fbx15 <sup>$\beta$  geo/ $\beta$  geo</sup>マウスの体細胞はG418感受性であり、初期化が誘導されES類似細胞となると薬剤耐性を獲得することが期待された。

Fbx15 <sup>$\beta$  geo/ $\beta$  geo</sup>マウス由来の胎児線維芽細胞に初期化因子候補をレトロウイルスにより導入し、G418を含むES細胞培地で培養した。各因子を単独で導入してもG418耐性コロニーは出現しなかった。しかし、いくつかの因子を組み合わせることにより、耐性コロニーを再現性良く得ることができた。これらのコロニーから樹立した細胞は、形態と増殖能においてES細胞に類似し、Oct3/4, NanogなどES細胞マーカー遺伝子の発現も認められた。さらにES類似細胞をヌードマウスの皮下に移植すると、三胚葉系の各種組織を含む奇形腫を形成した。これらの実験から、線維芽細胞培養から、少数の因子の組み合わせにより、ES細胞に類似した多能性幹細胞 (iPS細胞) を樹立しうることが明らかとなった。なお、iPS細胞誘導においては高い感染効率をもったレトロウイルスを用いることが重要であり、本研究費で購入したデスクトップ・セルソーターによる解析が必須であった。

今後は、ヒト体細胞からもiPS細胞を樹立し、安全面での課題を克服することにより、薬効や毒性の評価、細胞移植療法への利用など、医学応用を行っていきたい。

### 主な発表や論文

論文 (原著論文) 発表

1) K. Nimura, C. Ishida, H. Koriyama, K. Hata, S.

- Yamanaka, E. Li, K. Ura and Y. Kaneda : Dnmt3a2 targets endogenous Dnmt3L to ES cell chromatin and induces regional DNA methylation. *Genes Cells*, **11**, 1225-1237 (2006).
- 2) K. Takahashi and S. Yamanaka : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
  - 3) T. S. Tanaka, I. Lopez de Silanes, L. V. Sharova, H. Akutsu, T. Yoshikawa, H. Amano, S. Yamanaka, M. Gorospe and M. S. Ko : Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos, germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets. *Dev Growth Differ.*, **48**, 381-390 (2006).
  - 4) M. Imamura, K. Miura, K. Iwabuchi, T. Ichisaka, M. Nakagawa, J. Lee, M. Kanatsu-Shinohara, T. Shinohara and S. Yamanaka : Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *BMC Dev Biol.*, **6**, 34 (2006).
  - 5) H. Amano, K. Itakura, M. Maruyama, T. Ichisaka, M. Nakagawa and S. Yamanaka : Identification and targeted disruption of the mouse gene encoding ESG1 (PH34/ECAT2/DPPA5). *BMC Dev Biol.*, **6**, 11 (2006).
  - 6) K. Takahashi, M. Nakagawa, S. G. Young and S. Yamanaka : Differential membrane localization of ERas and Rheb. Two Ras-related proteins involved in the PI3 kinase/mTOR pathway. *J Biol Chem.*, **280**, 32768-32774 (2005).
  - 7) M. Maruyama, T. Ichisaka, M. Nakagawa and S. Yamanaka : Differential roles for SOX15 and SOX2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem.*, **280**, 24371-24379 (2005).
  - 8) X. Wang, A. Beugnet, M. Murakami, S. Yamanaka and C. G. Proud : Distinct signaling events downstream of mTOR co-operate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol.*, **25**, 2558-2572 (2005).
  - 9) K. Takahashi, M. Maruyama, Y. Tokuzawa, M. Murakami, Y. Oda, N. Yoshikane, K. W. Makabe, T. Ichisaka, and S. Yamanaka : Evolutionarily conserved non-AUG translation initiation in *NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2)*. *Genomics*, **85**, 360-371 (2005).
  - 10) K. Takahashi, T. Ichisaka, and S. Yamanaka : Identification of Genes Involved in Tumor-Like Properties of Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol.*, **329**, 449-458 (2006).
  - 11) K. Takahashi, T. Ichisaka, and S. Yamanaka : Identification of Genes Involved in Tumor-Like Properties of Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol.*, **329**, 449-458 (2006).
  - 12) Y. Tokuzawa, M. Maruyama, and S. Yamanaka : Utilization of Digital Differential Display to Identify Novel Targets of Oct 3/4. *Methods Mol Biol.*, **329**, 223-231 (2006).
  - 13) K. Takahashi, M. Murakami and S. Yamanaka : Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans.*, **33**, 1522-1525 (2005).
  - 14) 山中伸弥 : ES細胞の長期自己複製能と腫瘍形成能, 最新医学, **60**, 1677-1682 (2005).
  - 15) 山中伸弥 : 奇形腫形成によるES細胞の評価法, *BIOバイオテクノロジージャーナル*, **5**, 543-546 (2005).
  - 16) 山中伸弥 : ES細胞による心血管系治療への展望と課題, *血管*, **28**, 33-38 (2005).
  - 17) 中川誠人, 山中伸弥 : 胚性幹細胞と内部細胞塊における分化多能性維持機構, *蛋白質核酸酵素 (増刊 発生システムのダイナミックス)*, **50**, 546-550 (2005).
  - 18) 山中伸弥 : Nanog/ERas (私の名付けた遺伝子5), *実験医学*, **23**, 1236-1238 (2005).
  - 19) 山中伸弥 : ES細胞臨床応用への障壁とその克服に向けた基礎研究, *BIO INDUSTRY*, **22**, 24-28 (2005).
  - 20) 高橋和利, 村上未玲, 一阪朋子, 山中伸弥 : ERasによるES細胞の腫瘍形成制御機構, *細胞工学*, **24**, 17-19 (2005).
- 総説
- 1) 山中伸弥 : オーダーメイド万能幹細胞への挑戦, *実験医学*, **25**, 450-454 (2007).
  - 2) 高橋和利, 山中伸弥 : 特定因子による多能性幹細胞の誘導, *実験医学*, **25**, 479-483 (2007).