

News Release

2008年10月10日
国立大学法人 京都大学

ウイルスを用いずに人工多能性幹細胞（iPS細胞）樹立に成功

山中 伸弥 教授（物質－細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター/再生医科学研究所）らの研究グループは、ウイルスベクターを用いずに人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を樹立することに成功しました。

従来、iPS 細胞（用語説明 1）は、体細胞に 4 因子（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、）を、それぞれレトロウイルスやレンチウイルスなどのウイルスベクター（用語説明 2）で導入することで樹立されてきました。しかし、再生医療への応用に際して、ゲノムへのウイルスベクター挿入に起因する腫瘍形成が危惧されておりました。またウイルスベクターは実験のたびに厳密に管理された実験室で作製する必要があり、iPS 細胞技術の普及の障害となっています。

研究グループは、今回、マウス胎仔線維芽細胞に、3 因子（Oct3/4、Klf4、Sox2）をこの順で搭載したプラスミド（用語説明 3）と、c-Myc のみを搭載したプラスミドを同時に導入し、iPS 細胞を樹立しました。この新しい方法で誘導された iPS 細胞は従来通り分化多能性を持ちますが、今回、調べたところでは外来遺伝子のゲノム挿入は認められませんでした。この成果は、iPS 細胞を、難治性疾患に対する細胞移植治療へ応用する際の安全性向上につながるものと期待されます。

<本文>

京都大学（総長 松本 紘）は、ウイルスベクター用いずに人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の樹立に成功しました。

iPS 細胞は、2006 年、本研究グループが、マウス線維芽細胞に 4 因子（Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4）を、それぞれレトロウイルスベクターで導入することで世界に先駆けて樹立しました。同様にして、2007 年にヒト iPS 細胞も樹立しております。iPS 細胞は胚性幹細胞（ES 細胞）に似た形態、遺伝子発現様式を持ち、また、高い増殖能とさまざまな細胞へと分化できる多能性も ES 細胞に匹敵します。採取に差し支えない組織の細胞から樹立できる iPS 細胞は、ES 細胞の抱える倫理的問題や移植後免疫拒絶を回避し、細胞移植治療への応用が期待されております。

しかし、4 因子をレトロウイルスベクターで導入した iPS 細胞に由来するキメラマウスで腫瘍形成がみられ、その原因はゲノムに導入された c-Myc レトロウイルスの再活性化と考えられました。またウイルスベクターは実験のたびに厳密に管理された実験室で作製する必要があり、iPS 細胞技術を普及する上で障害となっています。これらの問題を解決するために、本研究グループは、樹立方法を改良し、c-Myc を除いた 3 因子での iPS 細胞を作製し、腫瘍形成リスクを大きく低下させることができました。しかし、依然として c-Myc3 以外の 3 因子のレトロウイルスはゲノムに挿入されおり、挿入部位近傍の遺伝子発現に変化をもたらして、

腫瘍形成を起こす可能性がありました。iPS 細胞の技術を着実に細胞移植治療に応用するためには、抜本的改良を行い、ウイルスベクターを用いずに iPS 細胞を樹立する方法を検討する必要があります。

研究グループは、今回、マウス胎仔線維芽細胞に、3 因子 (Oct3/4、Klf4、Sox2) をこの順で搭載したプラスミドと c-Myc のみを搭載したプラスミドを導入し、iPS 細胞を樹立しました。この方法で誘導された iPS 細胞は従来通りの分化多能性を持ち、また、ゲノムを調べたところ、今回調べたところでは外来遺伝子の挿入は認められませんでした。この研究成果は、iPS 細胞の誘導には、ゲノムへの遺伝子挿入は必要なく、体細胞における多能性誘導因子の一過的発現で十分であることを示すとともに、この樹立方法は、ウイルスベクターを用いず、脊髄損傷や若年型糖尿病などの難治性疾患に対する細胞移植治療へ応用する上で理想的な細胞を提供するものと期待されます。

本研究は、JST 戦略的創造研究推進事業チーム型研究 (CREST) の「免疫難病・感染症等の先進医療技術」研究領域 (研究総括: 岸本 忠三 大阪大学大学院生命機能研究科 教授) における研究課題「真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立」 (研究代表者: 山中伸弥 京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター/再生医科学研究所 教授)、JST 戦略的創造研究推進事業「山中 iPS 細胞特別プロジェクト」、および N I B I O の「保健医療分野における基礎研究推進事業」における研究課題「人工万能幹細胞の創薬および再生医療への応用」 (総括研究代表者 山中伸弥 同上) の一環として、山中伸弥 (同上) や沖田圭介 (京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター 助教) らによって行われました。今回の研究成果は、2008 年 10 月 9 日正午 (米国東部時間) に米国科学雑誌「Science」のオンライン速報版で発表されます。

<研究の内容>

現在、世界的に様々な方法によって iPS 細胞の樹立が進められておりますが、ゲノムに外来遺伝子の挿入がない遺伝子導入方法としてアデノウイルスベクターがあり、9 月 25 日号の Science 誌でハーバード大学のグループによりアデノウイルスベクターを用いた iPS 細胞作製の報告がありました。今回、研究チームは、外来遺伝子のゲノム挿入を回避し、再生医療に真に応用できる iPS 細胞を樹立するため、ウイルスベクターとは異なる、プラスミドを用いた iPS 細胞の樹立に成功しました。即ち、Oct3/4、Sox2、Klf4 を全て、単一の 2A プラスミドに搭載し、その搭載順および遺伝子導入タイミングの詳細な検討の結果、Oct3/4、Klf4、Sox2 の順番で搭載した 2A プラスミドと c-Myc のみを搭載した 2A プラスミド (図 1) を同時にマウス胎仔線維芽細胞に導入、一過的にこれらの因子をそれぞれ細胞内に一定レベル発現させることで、ウイルスベクターを用いることなく iPS 細胞を樹立しましたプラスミドを用いて樹立された iPS 細胞は、今回調べたところでは、外来から導入した遺伝子はゲノムに挿入されておりました。この方法で誘導された iPS 細胞は従来の iPS 細胞と同様に、腸管様上皮、表皮、横紋筋、神経組織など、様々な細胞へと分化することができました (図 2)。

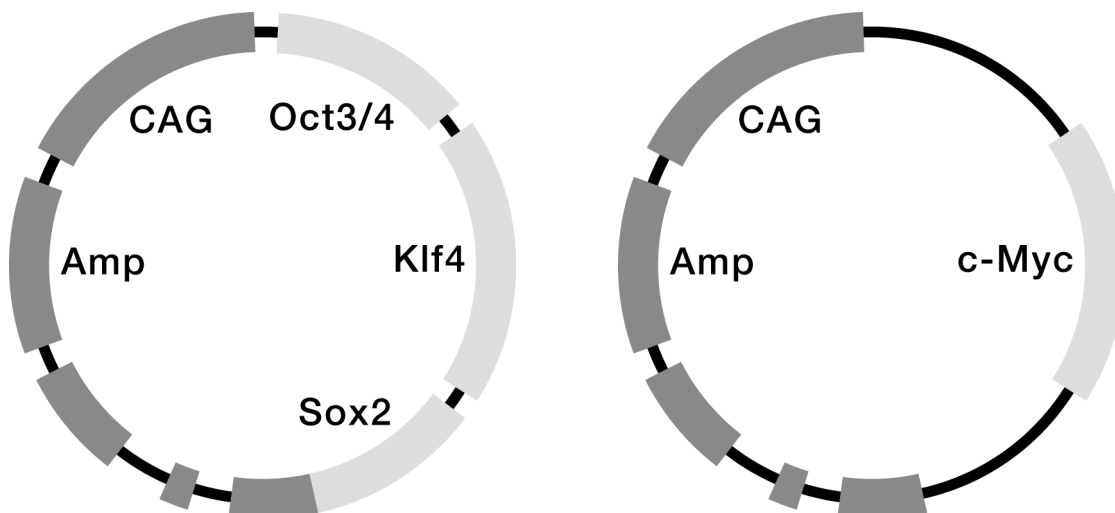


図1. 2A プラスミド設計図

単一の2A プラスミドに Oct3/4、Klf4、Sox2 の順番で搭載。細胞に導入されたこのプラスミドから、3 因子が切り離されたタンパク質として発現する。c-Myc は単独で同プラスミドに搭載。

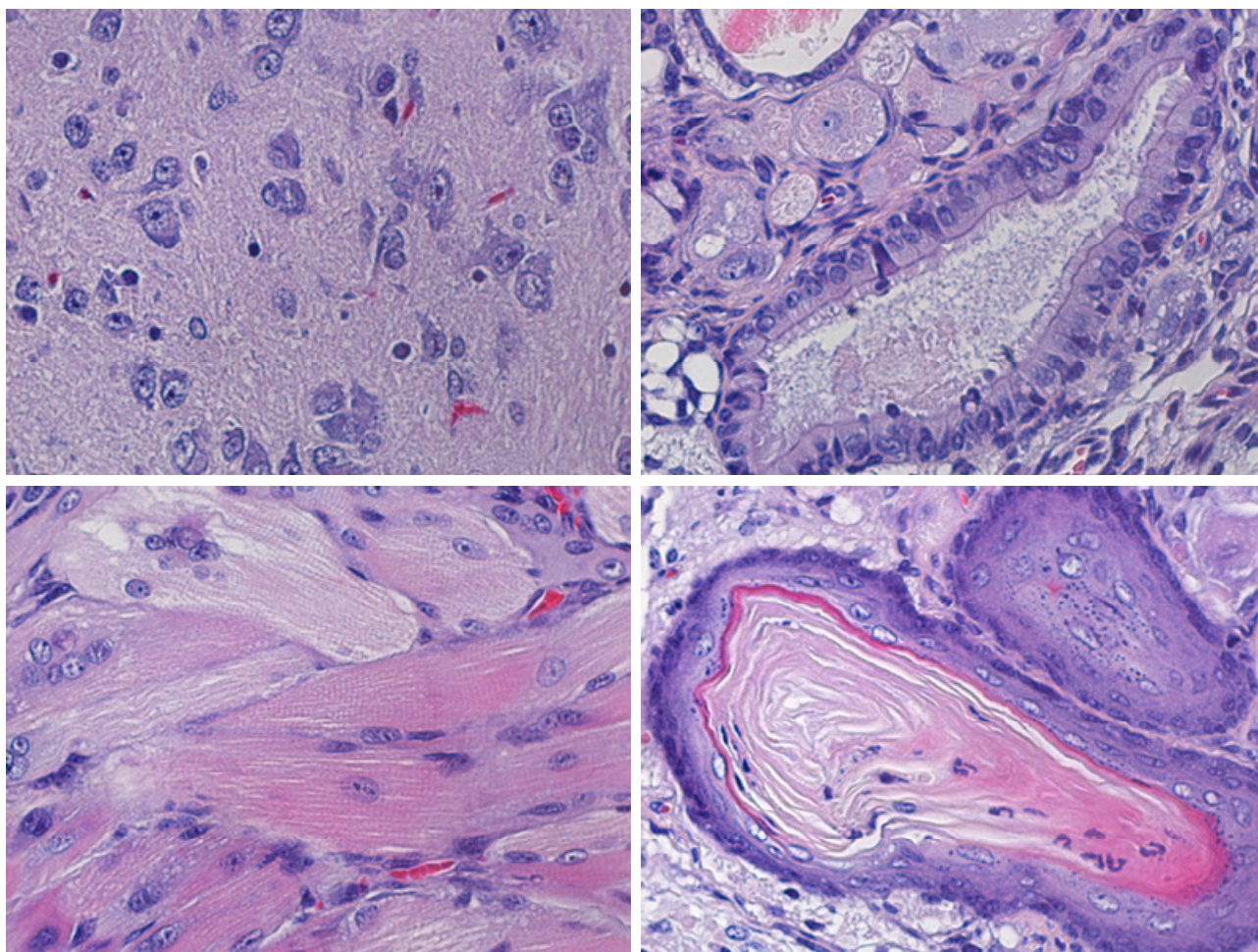


図2. 外来遺伝子のゲノム挿入がない iPS 細胞の多能性

神経組織（左上）、横紋筋（左下）、腸管様上皮組織（右上）、表皮組織（右下）などに分化することが示された。

<今後の展開>

今回の成果により、ウイルスベクターを用いなくてもマウス iPS 細胞の樹立ができることが分かりました。プラスミドで導入した外来遺伝子は、今回の解析では、ゲノムに挿入されていなかったため、今後、細胞移植治療に用いる理想的な細胞の創出へ向けた大きな前進であると考えております。しかし、この方法の iPS 細胞樹立効率は、レトロウイルスの場合よりも低いため、今後、樹立効率向上をめざすとともに、成体マウスやヒト体細胞でも検討し、細胞移植治療への応用に向けた iPS 細胞樹立方法の標準化を鋭意、進めていきます。

<論文名>

「Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cell Without Viral Vector」

(ウイルスベクターを用いないマウス人工多能性幹細胞の樹立)

K. Okita, M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka

解禁日 ; 2008 年 10 月 9 日午後 2 時 (米国東部時間)

<本研究の支援状況等>

J S T 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)

研究領域 : 「免疫難病・感染症等の先進医療技術」
 (研究総括 : 岸本 忠三 大阪大学大学院生命機能研究科 教授)
 研究課題名 : 「真に臨床応用できる多能性幹細胞の樹立」
 研究代表者 : 山中 伸弥
 (京都大学 物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター
 /再生医科学研究所 教授)
 研究期間 : 平成 15 年 10 月 - 平成 21 年 3 月

J S T 戦略的創造研究推進事業

山中 iPS 細胞特別プロジェクト
 研究総括 : 山中 伸弥 同上
 研究期間 : 平成 20 年 4 月 - 平成 25 年 3 月

N I B I O 「保健医療分野における基礎研究推進事業」

研究課題 : 人工万能幹細胞の創薬および再生医療への応用
 総括研究代表者 : 山中 伸弥 同上
 研究期間 : 平成 19 年 1 月 - 平成 23 年 3 月

<用語解説>

(1) 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) (induced pluripotent stem cell)

体細胞に特定因子を導入することにより樹立される、ES 細胞に類似した多能性幹細胞。2006 年に本研究グループにより世界に先駆けてマウス体細胞を用いて樹立されました。

(2) レトロウイルスベクター

ベクターとは、細胞外から内部へ遺伝子を導入する際の「運び屋」を指します。ウイルス由来のベクターは、遺伝子導入効率の高さから盛んに開発されてきました。ここでは、目的遺伝子をウイルスに組み込み、細胞に感染させることにより遺伝子を導入します。レトロウイルスベクターは、このウイルスベクターの 1 種類として確立されたもので、宿主の細胞に感染したあと、宿主の DNA のなかに入り込み、自らのウイルスを増殖させる性質を利用するものです。レトロウイルスなどのウイルスベクターは不安定であるため実験のたびに作成する必要があります。またウイルス作製時には、実験者へも感染する可能性があるため、厳密に管理された実験室で作製する必要があります。

(3) プラスミドベクター

プラスミドベクターは、試薬や電気穿孔などの方法で宿主の細胞に導入され、外来遺伝子を染色体外で発現させます。導入効率は、一般にレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターの方が高いとされます。本研究では、2A プラスミドという複数の遺伝子を同レベルで導入、発現させるシステムを利用しています。プラスミドベクターは安定で、一度作製すると長期間にわたって保存することができます。また通常の実験室で作成することができます。

本件担当

京都大学 物質－細胞統合システム拠点

iPS 細胞研究センター 支援室

TEL : 075-751-4842

FAX : 075-751-0691

Email : ips-contact@icems.kyoto-u.ac.jp