

ヒト型 iPS 細胞の品質を改善することに成功
ーiPS 細胞を分化誘導が困難な目的細胞へ変化させる方法を開発ー

平成 25 年 8 月 1 日
国立大学法人宮崎大学
独立行政法人理化学研究所

■本研究成果のポイント

- ヒト型のウサギ ES 細胞と iPS 細胞で分化効率を比較
- iPS 細胞が ES 細胞よりも分化効率が低い場合があることを発見
- ヒト型より分化能力が高いと考えられているマウス型に変換して、iPS 細胞の品質を改善

■概要

国立大学法人宮崎大学（菅沼龍夫学長）は、ヒト型 iPS 細胞をより質の高いマウス型様細胞に変換し、目的細胞への分化誘導効率^{*1}を向上させることに成功しました。これは宮崎大学テニュアトラック（TT）推進機構の本多新^{あらた}TT 准教授（理化学研究所バイオリソースセンター（理研 BRC）客員研究員兼任）、理研 BRC 遺伝工学基盤技術室の小倉淳郎^{あつお}室長による研究成果で、科学技術振興機構さきがけ「iPS 細胞と生命機能」研究の一環で実施されました。

ヒトの医療や基礎研究で大きな期待が寄せられている iPS 細胞には、ヒトから樹立される「ヒト型^{*2}」と、マウスなどの小動物から樹立される「マウス型^{*2}」に分けられることが知られています。「マウス型」はキメラ^{*3}個体を作出する能力や精子や卵子などの生殖細胞に分化する能力が高いことから、「ヒト型」よりも質的に優れていると考えられています。また iPS 細胞の質を評価するためには、同じ多能性幹細胞^{*4}である ES 細胞と比較することが大切であるため、「ヒト型」の ES 細胞と iPS 細胞を樹立できる動物で研究を進展させ、ヒト再生医療や創薬などに役立つ研究が求められています。研究グループはヒト型の ES 細胞と iPS 細胞を樹立できる、小型で扱いやすいモデル動物のウサギを利用し、ES 細胞と比較しながら iPS 細胞の質を評価し改善させる技術の開発を検討しました。

研究グループは以前、ウサギ成体の胃と肝臓の細胞から iPS 細胞を樹立し、それらがヒト型を示すことや、この iPS 細胞を ES 細胞と比較すると遺伝子発現状況に相違があることを確認していました。今回の研究では、これら iPS 細胞と ES 細胞を試験管内で神経系の細胞に分化誘導してその効率を比較したところ、iPS 細胞の方で明らかに分化能力が低い場合があることを確認しました。次に、質の低い「ヒト型」のウサギ iPS 細胞を、より質の高

いと考えられている「マウス型」に変換することができれば、ES細胞と同じように分化誘導出来るのではないかと考え、*OCT3/4* という遺伝子を過剰発現させ、細胞培養環境を変化させることで、「マウス型様」のiPS細胞に変換することに成功しました。このように変換したマウス型様のiPS細胞は、神経への分化誘導効率も有意に上昇し、部分的にはES細胞より質の高い状態であることが判明しました。

iPS細胞は医療や基礎研究に革新的な発展をもたらす可能性を秘めています。今回の成果により、ヒトのiPS細胞の質を改善させれば、分化誘導が困難な細胞などにも効率よく分化誘導するような研究に発展することが期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌「*The Journal of Biological Chemistry*」(10月号)に掲載されるに先立ち、オンライン版(7月23日付け)に掲載されました。

■背景

人工多能性幹細胞(iPS細胞: induced Pluripotent Stem Cells)は夢の万能細胞とも呼ばれ、自分自身の細胞に4つの外来遺伝子(山中因子)^{*5}を導入するだけで樹立できることから、受精卵や胚を利用する必要が無く、また免疫拒絶も起こらないため、再生医療研究などへの展開が期待されています。一方、胚から樹立される多能性幹細胞である胚性幹細胞(ES細胞: Embryonic Stem Cells)は、倫理や拒絶の問題があるものの、質的には非常に優れていると考えられています。また、iPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞には、キメラとして個体に寄与することが可能で生殖細胞などにも分化できる質の高い「マウス型」と、多くの組織に分化可能ではあるものの、その分化能力に制限がある「ヒト型」という二つのタイプに分けられることが知られています(図1)。ヒトを含む多くの動物から樹立されるiPS/ES細胞は、そのほとんどがヒト型であり、マウスとラットなど限られた小動物でのみマウス型の多能性幹細胞が樹立できます。現在は、ヒト型のiPS細胞をマウス型に変換する技術開発が世界中で盛んに行われています。多能性幹細胞は分化誘導した後に様々な研究に利用されることが多いため、マウス型に変換したiPS細胞の質が本当に高まっているのか否かについて、分化能力に焦点を当てて調べるような研究が求められました。

■研究手法と成果

研究グループは、ヒト型多能性幹細胞であるウサギES細胞、成体ウサギ肝臓由来iPS細胞、および成体ウサギ胃由来iPS細胞には遺伝子発現相違があることから、その相違が実際に体外で目的の細胞に分化誘導した場合に、影響を及ぼすのか否かを検討しました。iPS細胞を神経系細胞(神経幹細胞、神経繊維、アストロサイト)に分化誘導したところ、肝臓から樹立されたiPS細胞や樹立初期のiPS細胞はES細胞に比べて、その効率が低い場合があることが判明しました。しかしながら、一定期間以上培養し、幹細胞として安定させれば、肝臓由来のiPS細胞でもES細胞と同じように分化誘導できることが明らかにな

りました。次に、より分化誘導が困難な神経系細胞、オリゴデンドロサイトについて ES 細胞と iPS 細胞で比較しました。その結果、iPS 細胞はそのドナー細胞差や培養期間の長短にかかわらず、ES 細胞よりも分化効率が低いことがわかりました (図 2)。そこで研究グループは、ヒト型であるウサギ iPS 細胞をマウス型に変換することができれば、ES 細胞よりも低い iPS 細胞の分化能力を改善することができるのではないかと考え、ウサギ iPS 細胞のマウス型化に挑みました。山中因子の一つでもある *OCT3/4* 遺伝子を過剰に発現させて、さらに培養環境を変化させることにより、部分的にマウス型の特徴を示すウサギ iPS 細胞を樹立することに成功し、マウス型様 (Naïve-like) iPS 細胞と名付けました。マウス型様に変換した iPS 細胞をオリゴデンドロサイトに分化誘導したところ、予想どおりオリゴデンドロサイトへの分化効率が向上しただけでなく、ES 細胞でさえ分化誘導が困難であった、成熟オリゴデンドロサイトにまで分化させることに成功しました (図 3)。以上の結果から、マウス型様変換することにより、ES 細胞に比べて分化能力の低い iPS 細胞であっても、その分化効率を改善できることがわかりました。

■今後の期待

より品質の高い iPS 細胞を作り出す技術改良は、今後 iPS 細胞が様々な分野で有効利用されるためにも必要不可欠と言えます。今回開発された技術は、マウス型化という iPS 細胞自体の品質を高めることにより、分化誘導が困難な細胞へも分化させることに成功したもので、部分的にヒト型 ES 細胞よりも質の高い iPS 細胞の樹立に至りました。しかしながら、今回の研究発表では、まだ iPS 細胞に不安定性が残存していることも判明しています。今後は、マウス型“様”ではなく、真のマウス型 iPS 細胞への変換を目指し、さらに iPS 細胞の質を高めることで iPS 細胞の不安定性を克服し、その技術をヒトの iPS 細胞へ橋渡しするような研究展開が期待されます。

■論文情報

Honda, A., et al. Naïve-like conversion overcomes the limited differentiating capacity of induced pluripotent stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013 (in press)

■問い合わせ先

(研究に関する問い合わせ先)

宮崎大学 テニユアトラック (TT) 推進機構 TT 准教授

本多 新 (ほんだ あらた)

電話・FAX : 0985-85-9866

e-mail: a-honda@med.miyazaki-u.ac.jp

(広報に関する問い合わせ先)

宮崎大学 企画総務部 秘書広報課

〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1

電話 : 0985-58-7114

FAX : 0985-58-2818

e-mail: kouhou@of.miyazaki-u.ac.jp

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

電話 : 048-467-9272

FAX : 048-462-4715

e-mail: ex-press@riken.jp

<補足説明>

※1 分化（誘導）

多能性幹細胞が皮膚や筋肉など、他の細胞に変化することを分化といい、人為的に試験管内などの体外で目的の細胞に変化させることを分化誘導といいます。

※2 ヒト型・マウス型

ES/iPS 細胞には大きく分けて、キメラとして個体に寄与することが可能で生殖細胞などにも分化できる質の高い「マウス型」と、多くの組織に分化可能ではあるものの、その分化能力に制限がある「ヒト型」という二つのタイプに分けられることが知られています。ヒトを含む多くの動物から樹立される iPS/ES 細胞は、そのほとんどがヒト型であり、マウスとラットなど限られた小動物でのみマウス型の多能性幹細胞が樹立できます。

※3 キメラ

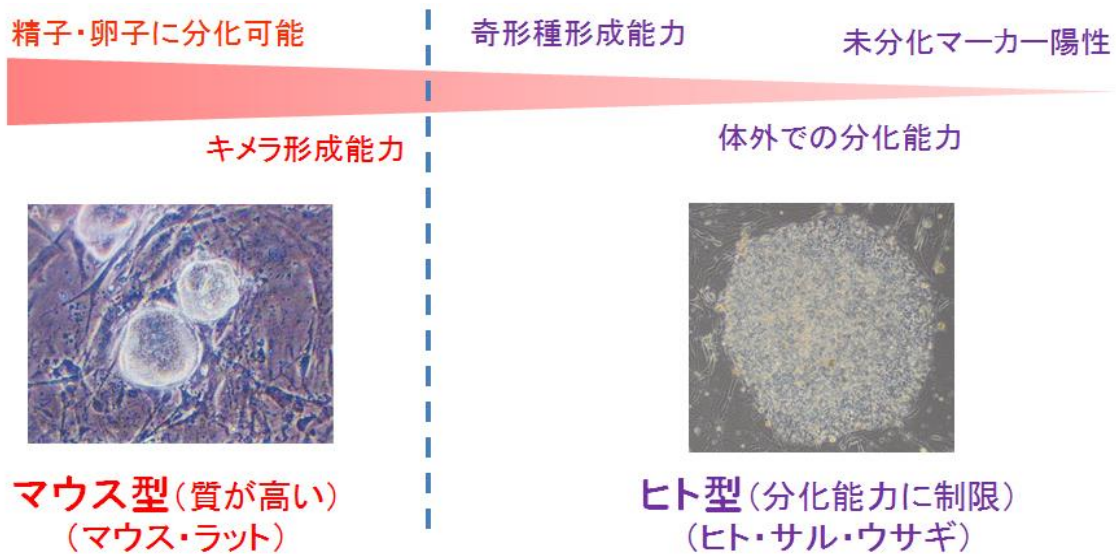
一つの個体内に異なる遺伝情報をもつ細胞が混ざりあった状態、あるいはその個体のこと。マウス型の ES/iPS 細胞は、胚と混ざり合いキメラ個体として体に寄与する能力を有する。

※4 多能性幹細胞

さまざまな組織・細胞に変化（分化）する能力を保持したまま増殖し、特定の条件下で刺激を受けることにより、体を構成するさまざまな細胞に分化させることができる細胞で、ES 細胞や iPS 細胞がその代表例です。特に ES 細胞は受精卵から作製されることから、iPS 細胞の質的な比較対象として適しています。

※5 山中因子

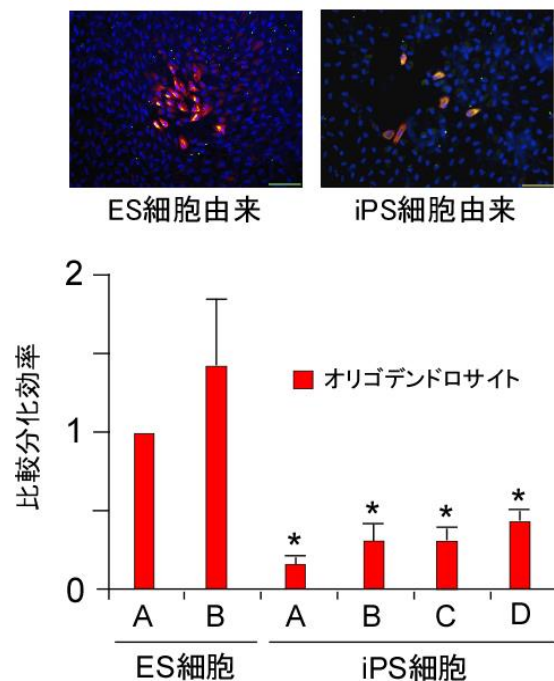
京都大学 iPS 細胞研究所所長の山中伸弥教授の研究グループが、2006 年に世界で初めて iPS 細胞を樹立した際に用いた 4 つの遺伝子群（*OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, *c-MYC*）のことを山中因子といいます。



(図1) 動物種別の ES/iPS 細胞タイプ (型) とその分化能力

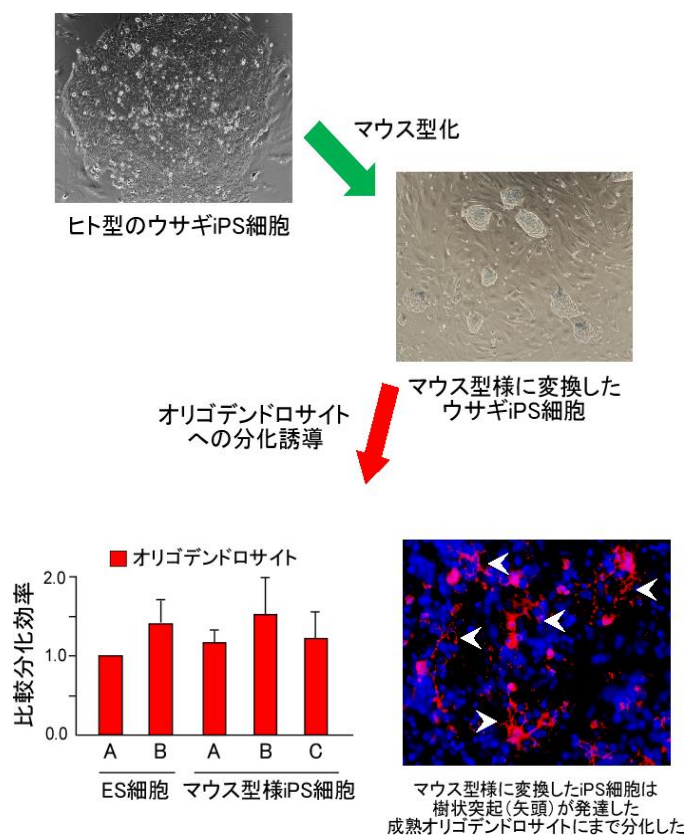
ES/iPS 細胞の質は、その分化能力で表すことができる。マウスやラットから樹立されるマウス型 ES/iPS 細胞はキメラ形成能や精子・卵子への分化能があるが、ヒトなどの動物の ES/iPS 細胞はその分化能力に制限がある。

分化誘導したオリゴデンドロサイト(赤・黄)



(図2) ヒト型 ES/iPS 細胞をオリゴデンドロサイトに分化誘導した際の相違

ES 細胞をオリゴデンドロサイトに分化させた場合に比べて、iPS 細胞ではその効率が低いことが明らかになった。



(図3) マウス型様に変換した iPS 細胞における分化能力の向上

ヒト型のウサギ iPS 細胞をあらかじめマウス型様 iPS 細胞に変換し、その後にオリゴデンドロサイトへ分化誘導したところ、その効率が向上しただけでなく (左)、樹状突起が発達した成熟オリゴデンドロサイトにまで分化させることができた (右:矢頭)。