

報道解禁日時：日本時間 7 月 2 日午前 1 時

この論文は、日本時間 7 月 2 日（金）午前 1 時（米国東部時間：7 月 1 日正午）に科学誌 Cell Stem Cell のオンライン速報版で発表されることになりました。



末梢血中の終末分化したヒト T 細胞から iPS 細胞の樹立に成功 Cell Stem Cell に掲載

平成 22 年 6 月 24 日

慶應義塾大学医学部

1. 要旨

iPS 細胞(1)は、人工的に作製した、生体内のどのような細胞にでも分化できる「多能性幹細胞」です。これまでの報告では、皮膚などの人体を構成するさまざまな組織の細胞から iPS 細胞が作製されてきましたが、1) 出発点となる細胞を患者の身体から採取しなければならず、その際に痛みを与えてしまうこと、2) iPS 細胞を樹立する際、ウイルスによって 4 つの遺伝子を組み込むために、患者の細胞が持つゲノムを損傷してしまう可能性があること、という 2 つの危険性がありました。

今回、慶應義塾大学医学部の福田恵一教授、湯浅慎介特別研究講師、関倫久研究員（大学院生）らの研究グループは、この 2 つ問題を解決するために、センダイウイルスという特殊な遺伝子の運び屋を用いて末梢血液中に豊富に存在しているリンパ球から iPS 細胞を作ることを計画し、リンパ球のひとつであるヒト T 細胞から、ゲノム遺伝子を傷害することなく iPS 細胞を作製することに成功しました。T 細胞はリンパ球の中の一種で、細胞分化の過程で遺伝子が再構成を起こすため、通常のヒト iPS 細胞と異なった性質を持つ可能性も考えられてきましたが、T 細胞由来の iPS 細胞はこれまでの報告と同じようにヒトの身体を構成するあらゆる細胞へと分化できることが確かめられました。この方法は(1)患者に苦痛を与えずに細胞を採取できること、(2)細胞のゲノムを損傷することがないこと、(3)挿入した遺伝子がゲノムに残らないこと、(4)採血から 25 日間という短期間（世界最短）で iPS 細胞を樹立できること等の利点があり、これまでの iPS 細胞樹立の際に問題とされた多くの課題を一気に解決することが出来ました。また、このセンダイウイルスは共同研究先である（株）ディナベック社から提供を受けたものであります。

T 細胞は体外で簡単に培養・増幅させることができ、血液検査などで採取された血液などを利用することで患者に苦痛を与えることなく iPS 細胞を樹立することが出来るようになりました。皮膚生検を必要としないため、女性や乳幼児等これまで iPS 細胞を樹立することが比較的困難であった方からでも容易に iPS 細胞を樹立できるようになりました。再生医療のリソースとして有望であることはもちろん、遺伝子の再構成後の細胞でも iPS 細胞の樹立ができたことから、そのリプログラミングの機構を明らかにするためにも期待が持てる成果であるといえます。

この発表に関する**報道解禁は、新聞については日本時間 7 月 2 日（金）朝刊以降、新聞 Web 版と放送は 7 月 2 日（木）1 時以降**としますので、各位におかれましては、本情報の取り扱いにご留意いただきますようお願いいたします。

2. 研究の背景

2006 年に京都大学の山中伸弥教授らがマウスで、そして 2007 年にヒト iPS 細胞の樹立を成功

させ、体細胞を直接的に初期化することが可能であることを示しました。それ以降、iPS 細胞が持つ高い増殖能と、成体を形成する様々な組織の細胞に分化できる多能性によって、ES 細胞(2)同様に不可逆的な変性疾患に対する細胞移植治療、いわゆる再生医療への応用が期待されてきました。

2007年、山中教授らによる最初のヒト iPS 細胞の報告では成人の皮膚由来の線維芽細胞を用いていましたが、最近の研究では造血幹細胞や神経幹細胞、ケラチノサイト(角化細胞)など、さまざまな体細胞を用いる iPS 細胞の樹立が報告されています。しかし、これらの細胞を得るためには、生検(バイオプシー)などの外科的な手法を用いて患者から組織を採取しなければならず、ごくわずかとはいえ外科的な侵襲を与えなければなりません。

また、山中教授らが確立したレトロウイルスベクター(3)を用いて OCT3/4, SOX2, KLF4, and c-MYC という4つの遺伝子を導入する方法では、導入される細胞の染色体に外来遺伝子がランダムに組み込まれるため、遺伝情報が損傷される可能性もあり、移植を受けた患者の体内で腫瘍化する危険を持っていました。

iPS 細胞からさまざまな細胞への分化成功が報告されていますが、ソースの確保や安全性の向上という問題をクリアすることも、再生医療の実現化の大きな障壁の一つとなっています。

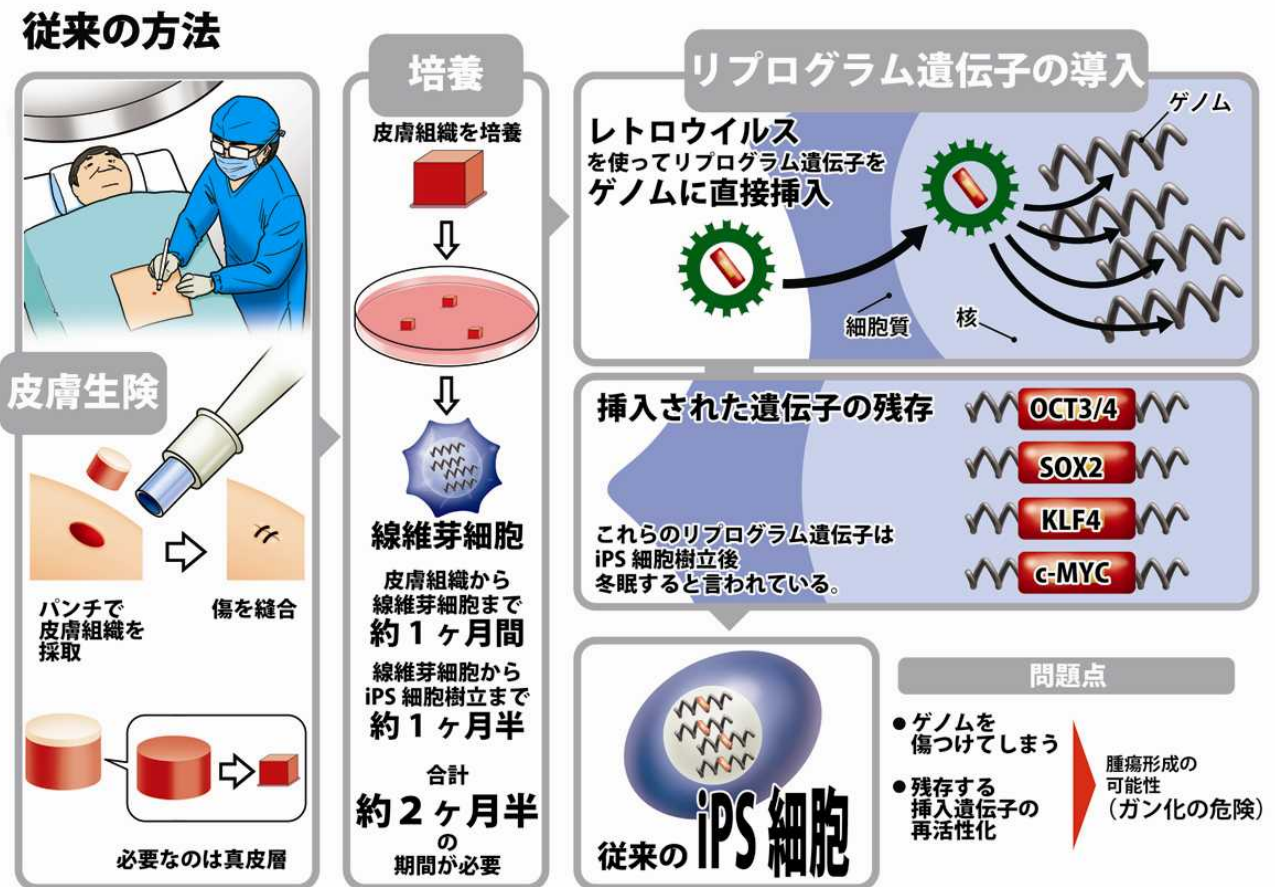


図1：これまでの方法の問題点として、(1)皮膚生検には患者に苦痛を与えること、(2)レトロウイルスではゲノムに損傷を与えるため、遺伝子破壊や腫瘍形成の可能性があること(3)ゲノムに残った遺伝子が再活性化される可能性が否定できず、奇形腫形成の可能性があったこと(4)iPS細胞の樹立に2ヶ月以上の時間がかかること等が挙げられていた。

3. 研究成果

日常、臨床の現場では広く採血が行われ、さまざまな検査が行われています。しかし、検査で使われなかった分は廃棄されています。今回の研究では、こうした廃棄される血液に着目し、その血液の中に豊富に含まれる単核細胞であるT細胞を用いてiPS細胞の樹立を試みました。

T細胞は、抗CD3モノクローナル抗体を培養皿の表面に定着させ、IL-2を添加した培養液を用いることで体外において培養や増幅が行えることが知られています。その一方、T細胞は免疫を司る細胞であり、その表面にあるT細胞抗原レセプター(TCR)によって抗原を特異的に認識する機構を持つことも広く知られています。T細胞はTCRが様々なレパートリーを持つことで抗原への特異性を持つのですが、このレパートリーを獲得する際に、1)抗原との結合に参与する遺伝子セグメントの組換え、2)遺伝子セグメント組換えの際に起こる鋳型遺伝子に存在しない塩基の挿入という2つの機構によってダイナミックに遺伝子が再構成されてしまいます。このため、T細胞の核の中に存在する遺伝情報は、他の体細胞と異なっており、正常なヒトiPS細胞が樹立できるかどうか明らかになっていませんでした。

今回開発された方法

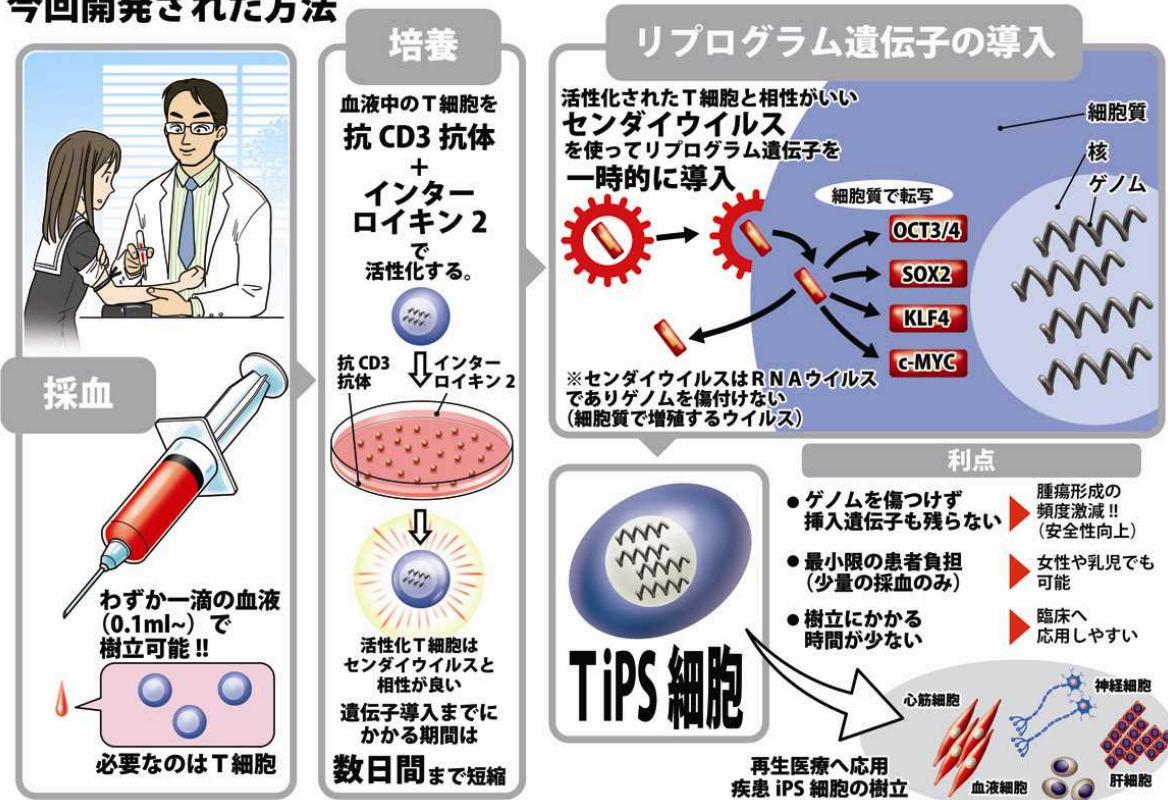


図2：今回の技術開発により、(1)少量の採血で細胞を確保出来るため、患者の苦痛が最小限で済む、(2)ゲノムに遺伝子が挿入されないため、遺伝子の破壊がなく、腫瘍形成等の可能性が低くなる、(3)挿入遺伝子の再活性化がなく、奇形腫等の心配がない、(4)短時間でiPS細胞が樹立できる等の多くの利点があります。

今回、このT細胞を対象に、センダイウイルスを用いて4つの遺伝子、すなわちOCT3/4、SOX2、KLF4、そしてc-MYCの導入を行いました。センダイウイルスは、細胞質にとどまって、RNAを転写、複製して蛋白質を合成することから、導入された細胞の染色体に影響を与えず、挿入による遺伝子の変異や染色体構造変化の危険性もないなどの特徴を持っています。また、哺乳類の多

くの細胞、組織に効率良く遺伝子を導入できるため、iPS 細胞の臨床応用に向けて非常に期待される技術とされています。

まず採血された 1ml (最小では 0.1ml) の末梢血から遠心分離により赤血球や顆粒球を除き、T 細胞用の培養皿で培養・増幅を行いました(セルソーター(4)で T 細胞のみを単離し培養・増幅をおこなったものと外見的には、T 細胞のみのもと同様であることを確認しました)。次いで、前掲の 4 遺伝子をセンダイウイルスベクターによって T 細胞へ導入したところ、ウイルス感染後 20 日後、採血した日から起算して 25 日目には ES 細胞様のコロニーが出現し、こうした細胞を T 細胞由来 iPS 細胞、すなわち TiPS 細胞と名付けました。詳細な解析を行ったところ、センダイウイルスによって導入された 4 つの外来遺伝子は数回の継代を行うことで完全に消失していました。一方で NANOG、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC、GDF3、REX1、DPPA2、DPPA4 といった内在的な ES 細胞のマーカーが mRNA レベルで発現していることが確認され、免疫染色レベルでも Nanog、Oct3/4、SSEA3、SSEA4、Tra-1-60、Tra-1-81 といった ES 細胞特異的なタンパク質が作られていることが確認されました。また、分子的マーカーによる確認のほか、テロメラーゼの活性も高まっていることが確認されました。加えて、他の体細胞からつくられた iPS 細胞と同様に TiPS 細胞もテラトーマ(5)作成能をもっており、ヒトの体を構成するほとんどの細胞へと分化可能であることが示されました。

興味深いことに、TiPS 細胞では、由来となった T 細胞で起こった TCR 関連遺伝子の組み替えパターンがそのまま維持されており、TiPS 細胞から分化した細胞にもそのパターンが引き継がれることも分かりました。

4. 今後の展開

これまで、iPS 細胞から分化させた組織を動物モデルに移植する場合、GFP のような標識を組み込むことで体内での動態を追跡し、腫瘍原性などの研究を行ってきましたが、標識そのものが持つ細胞毒性や抗原性といった要因を完全に排除することができませんでした。しかし、TiPS 細胞由来の細胞や組織には TCR 関連遺伝子の組み替えパターンがそのまま維持されるため、宿主に影響を与えずに細胞を追跡できるものと期待されています。また、T 細胞は体外で簡単に培養・増幅させることができることから、血液検査などで採取された血液などを利用することで患者に必要な以上の苦痛を与える必要がないため、再生医療のリソースとして有望であることはもちろん、遺伝子の再構成後の細胞でも iPS 細胞の樹立ができたことから、体細胞リプログラミングの機構研究にとっても、重要な知見を与えるものと期待されます。

5. 論文名

“ Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells ”

「末梢血中に存在する終末分化したヒト T 細胞から iPS 細胞の樹立に成功」

Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Mayumi Oda, Toru Egashira, Kojiro Yae, Dai Kusumoto, Hikari Nakata, Shugo Tohyama, Hisayuki Hashimoto, Masaki Kodaira, Yohei Okada, Hiroyuki Seimiya, Noemi Fusaki, Mamoru Hasegawa, Keiichi Fukuda

6. 本研究への支援

本共同研究は、下記機関より資金的支援を受け実施されました。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)

「iPS細胞等幹細胞から心筋細胞への高効率な分化誘導技術の開発」

文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト」

<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年に山中教授の研究グループにより世界で初めてマウス体細胞を用いて樹立された。
- (2) 胚性幹細胞 (ES細胞: embryonic stem cell)
ES細胞は受精後6、7日目の胚盤胞から細胞を取り出し、それを培養することによって作製される多能性幹細胞の一つで、あらゆる組織の細胞に分化することができる。しかし、受精卵を破壊する必要があり、患者自身の細胞から作製することが困難なため、免疫拒絶の問題が指摘されている
- (3) 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た。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する。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ある。
- (4) セルソーター
レーザー光を用いて光散乱や蛍光測定を行うことにより、水流の中を通過する単一細胞の大きさ、DNA量など、細胞の生物学的特徴を解析し、1細胞レベルで選別することができる。
- (5) テラトーマ
ES細胞やiPS細胞を免疫不全マウスに注射すると、形成される腫瘍のこと。この腫瘍の中には生体を構成する様々な種類の組織が混在している。一般的には皮膚や神経などの外胚葉由来、骨や筋肉などの中胚葉由来、肝臓・すい臓などの内胚葉由来といった三胚葉由来の組織が含まれることを確認することが、細胞の分化多能性を調べる一般的な方法の一つとなっている。

<お問い合わせ先>

慶應義塾大学医学部循環器内科 福田恵一
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地
Tel 03-5363-3874 FAX 03-5363-3875
E-mail kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp