

## プレスリリース

本プレスリリースはカラー版となっております。本リリースは、以下のURLでもご覧いただけます。  
[http://www.keio.ac.jp/ja/press\\_release/](http://www.keio.ac.jp/ja/press_release/)



2011年1月14日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部

### ヒト iPS 細胞から、色素細胞の誘導に成功 科学誌 PLoS ONE (オンライン版) に掲載

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 細胞情報研究部門(河上裕教授、大多茂樹特別研究講師)および生理学教室(岡野栄之教授)の共同研究グループは、ヒト iPS 細胞(人工多能性幹細胞)を色素細胞に分化誘導することに成功しました。この研究成果は、ヒト色素幹細胞や悪性黒色腫幹細胞の解析を介したさまざまな色素異常症の解明、そして、自家人工皮膚の作製、白斑症など色素減少症の再生医療、白髪の予防治療、悪性黒色腫の診断・治療法の開発などの臨床応用にも貢献できると考えられます。

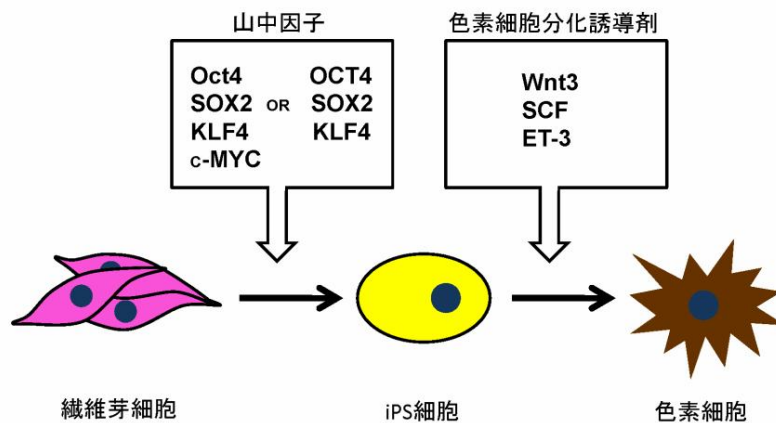
本研究の論文は、科学誌 PLoS ONE オンライン版(<http://www.plosone.org>)に1月14日(日本時間)に掲載されました。

#### 1. 要旨

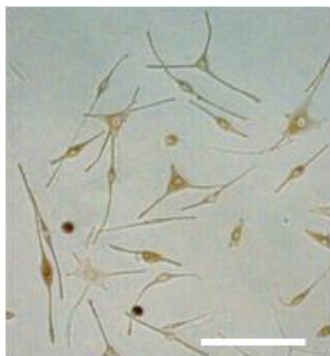
人工多能性幹細胞(iPS細胞)(注1)は、体細胞に多能性誘導因子を導入することで樹立され、多様な組織細胞に分化する能力を有すると考えられています。また、免疫拒絶や倫理的な問題が回避されると考えられ、将来、細胞移植治療などの再生医療への応用が期待されています。今回、岡野栄之教授・河上裕教授(共に、慶應義塾大学医学部)らの共同研究グループ(研究論文筆頭著者 大多茂樹 慶應義塾大学医学部特別研究講師)は、ヒト iPS 細胞を色素細胞に分化誘導することに成功しました。

本研究では、ヒト線維芽細胞に、山中4遺伝子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)(注2)またはc-Myc(山中伸弥教授らの研究グループによるとc-Mycの再活性化が腫瘍形成の一因と確認されている)を除く3遺伝子を導入、細胞選抜作業の条件下、iPS細胞株を新たに樹立しました。これらのiPS細胞から胚様体(注3)を形成させたのち、色素細胞分化誘導因子を加えさらに選択培養することにより、ヒト色素細胞(注4)が誘導できることが明らかとなりました。また、c-Mycの有無に関わらず、色素細胞が効率よくiPS細胞から誘導されることも明らかとなりました。これら誘導された色素細胞は各種の色素細胞マーカー(SILV, S100, TRYP1, TYR, MITF)を発現するとともに、網羅的遺伝子発現プロファイリング解析によっても、きわめて表皮由来色素細胞と類似性が高いことが明らかとなりました。さらに、iPS細胞から色素細胞への分化誘導過程において、神経堤細胞(注5)の出現を見出すとともに、色素幹細胞候補マーカー陽性細胞の出現も見出しました。これらのことは、試験管内において、生体における色素細胞の分化誘導過程を模倣して、色素細胞が誘導された可能性を示しています。成人由来の色素細胞を調製することは難しく、今回の成果により、研究が十分に進んでいないヒト色素細胞の分化生成機構の解明が期待されるとともに、白皮症・白斑症・白髪化などの色素減少症、母斑などの色素過剰症、さらに色素細胞の腫瘍である悪性黒色腫(注6)などの様々な色素異常症の病態解明と、その結果に基づいた新規診断法や治療法の開発が期待されます。特に、色素減少症

に対する色素細胞幹細胞の自家移植や白髪予防剤の開発、色素細胞幹細胞の遺伝子異常により発生する悪性黒色腫に対して、化学療法耐性で再発の原因になる悪性黒色腫幹細胞の解明により、難治癌である悪性黒色腫の新規治療法の開発などが期待されます。今回の研究成果は、iPS細胞の分化能の多様性を証明するとともに、iPS細胞の応用利用の可能性の大きさを示すものと言えます。本研究は、文部科学省科学研究費補助金、「再生医療の実現化プロジェクト」および、「グローバル COE プログラム」による支援等を受け実施されました。



本研究の概略図



本研究でヒト iPS 細胞より  
分化誘導したヒト色素細胞



悪性黒色腫

## 2. 研究の背景

iPS細胞は、2006年に山中伸弥京都大学教授らの研究グループがマウスの線維芽細胞に4転写因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) をレトロウイルスベクター (注7) で導入することにより、世界で初めて樹立されました。同様に2007年には、ヒト iPS細胞の樹立にも成功しています。iPS細胞は、ES細胞 (胚性幹細胞) に似た形態、遺伝子発現様式をもち、また、高い増殖能性と様々な組織の細

胞に分化できる多能性を併せ持ちます。採取に差し支えない組織細胞から樹立できる iPS 細胞は、ES 細胞が直面する倫理的問題や移植後の免疫拒絶を回避し、細胞移植治療への応用が期待されています。また、iPS 細胞の多分化能が明らかとされており、iPS 細胞が神経細胞、膵細胞、肝細胞、心筋細胞や種々の免疫担当細胞等に分化することも明らかとなりました。

本研究では、長年悪性黒色腫や色素異常症の研究に携わってきた先端医科学研究所細胞情報研究部門の河上グループ (<http://esi-topics.com/melanoma/interviews/YutakaKawakami.html>) と iPS 研究で実績のある生理学教室の岡野グループ (<http://www.okano-lab.com/ja/>) との共同研究により、皮膚や眼ブドウ膜などに豊富に存在する色素細胞の誘導をヒト iPS 細胞から試みました。色素細胞は、メラニン色素顆粒を生産し、UV 等のダメージから皮膚を防護するだけでなく、眼や内耳や脳脈絡叢などで、様々な機能を持つことが分かっており、先天性・後天性の色素細胞異常により、様々な疾患が生じることが分かっていますが、まだ、病態が不明の病気も多く、診断法や治療法も十分に確立されていません。その原因として、成人からヒト色素細胞を多量に樹立することが困難なこと、ヒト色素細胞の分化過程の解明が技術的に困難であったことがあげられます。本研究では、試験内でヒト色素幹細胞や色素細胞を iPS 細胞から誘導することに成功しました。この培養系を用いて、今後ヒト色素幹細胞や悪性黒色腫幹細胞に関する研究がより進展する可能性が考えられます。したがって、本研究は、各種色素細胞異常症の病態解明と診断・治療・予防法の開発に非常に有用であると考えられます。

### 3. 研究成果

本研究では、山中 4 遺伝子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) または c-Myc (山中伸弥教授らの研究グループによると c-Myc の再活性化が腫瘍形成の一因と確認されている) を除く 3 遺伝子をヒト線維芽細胞にレトロウィルスを用いて導入し、新たに iPS 細胞株を樹立するとともに、それぞれの iPS 細胞から色素細胞をそれぞれ色素細胞分化誘導剤を用いた選択的培養法により誘導することに成功しました。

#### 結果 ヒト iPS 細胞の樹立について

ヒト線維芽細胞より山中 4 遺伝子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) または 3 遺伝子 (Oct3/4, Klf4, Sox2) を用いて、iPS 細胞株を樹立しました。また、これらの iPS 細胞株における多能性幹細胞マーカーの発現を確認するとともに、in vitro および in vivo における 3 胚葉系への分化能を検証しました (図 1)。

#### 結果 iPS 細胞からヒト色素細胞への分化誘導

次に、樹立した 2 つのクローンの iPS 細胞をそれぞれ胚様体にさせたのち、色素細胞分化誘導剤を加えた培養液中で選択培養することにより、ヒト色素細胞への分化誘導がおきることを確認しました。山中 4 因子または 3 因子で樹立した iPS クローンからの色素細胞への誘導効率に顕著な差は認められませんでした (図 2)。

#### 結果 iPS 由来ヒト色素細胞の性状解析

iPS 細胞から誘導されたヒト色素細胞は SILV, S100, TRYP1, TYR, MITF といった色素細胞マーカーを発現するとともに、電子顕微鏡による観察により色素顆粒を細胞内に発現していることが明らかとなりました。また、ヒト表皮由来培養色素細胞との DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現プロファイル比較によっても、2 者間で相同性が非常に高いことが明らかとなりました (図 2)。

さらに、iPS 細胞から色素細胞への分化誘導過程において出現する細胞を解析したところ、神経堤

細胞マーカーを発現する細胞の存在が免疫細胞染色解析やフローサイトメトリー解析により明らかとなり、これら神経堤細胞から色素細胞が生体内同様に分化誘導したことが示唆されました。同様に色素幹細胞マーカー候補である PAX3 陽性細胞の出現も確認できました。これらのことは、今回の試験管内色素細胞誘導系が生体内での事象を模倣していることを示唆しています(図 3)。

#### 4. 今後の展開

今回確立したヒト iPS 細胞からヒト色素細胞の in vitro 培養形成システムを用いて、その過程で形成される神経堤細胞や色素幹細胞などの分離と性質解明を進めます。また、各種色素異常症の患者から得た iPS からのこれらの細胞の樹立と解析は、その分子病態の解明につながり、新規診断・治療・予防法の開発が可能になると考えられます。特に、このシステムを用いて、河上グループが長年研究してきた難治癌である悪性黒色腫を作成する試みは、悪性黒色腫幹細胞の解明を通じて、画期的な悪性黒色腫に対する診断・治療法の開発に結びつく可能性があります。また、GMP 規格(注 8)のヒト色素幹細胞の調製は、色素減少症の再生医療につながる可能性があります。皮膚の主要構成細胞である表皮細胞の培養系の確立とともに、より完全な自家人工皮膚の作製が可能になると考えられます。今後、この共同研究チームにより、このような臨床応用を目指した研究を展開する予定です。

#### 5. 論文名

“Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cell”

「ヒト iPS 細胞からの色素細胞の誘導」

Shigeki Ohta, Yoichi Imaizumi, Yohei Okada, Wado Akamatsu, Reiko Kuwahara, Manabu Ohyama, Masayuki Amagai, Yumi Matsuzaki, Shinya Yamanaka, Hideyuki Okano, Yutaka Kawakami

#### 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。

文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト」

文部科学省「グローバルCOEプログラム」

文部科学省「科学研究費補助金」

## <用語解説>

注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。

注2 山中4因子

山中らが線維芽細胞から iPS 細胞を細胞にするために用いた4遺伝子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)をさす。

注3 胚様体 (はいようたい)

試験内においてES細胞から形成しうる初期胚と似た構造を持つ細胞塊

注4 色素細胞

神経堤に由来し、多数の偽足状の細胞質突起を有する不定形の細胞であり、多数の球形顆粒を有する。虹彩、真皮などに存在する。

注5 神経堤細胞 (しんけいていさいぼう)

発生期において、神経管が形成される時期に神経管と表皮の間に位置する組織の名称。末梢神経、シュワン細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、骨格筋、色素細胞等を生産する。

注6 悪性黒色腫

皮膚、眼窩内組織、口腔・消化管粘膜上皮などに発生する色素細胞由来の悪性腫瘍である。

注7 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。

注8 GMP

Good Manufacturing Practiceの略。薬事法に基づいた医薬品等の品質管理基準。

ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

本リリースは文部科学省記者会、科学記者会、厚生労働記者クラブ等に送信させていただいております。

本発表資料のお問い合わせ先：

<お問い合わせ先>

慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所  
細胞情報研究部門 教授

河上 裕 (カワカミ ユタカ)

Tel : 03-5363-3778 Fax : 03-5362-9259

E-mail : [yutakawa@sc.itc.keio.ac.jp](mailto:yutakawa@sc.itc.keio.ac.jp)

慶應義塾大学 医学部 生理学教室 教授  
岡野 栄之 (オカノ ヒデユキ)

Tel : 03-5363-3746 Fax : 03-3357-5445

E-mail : [hidokano@sc.itc.keio.ac.jp](mailto:hidokano@sc.itc.keio.ac.jp)

< 図表 >

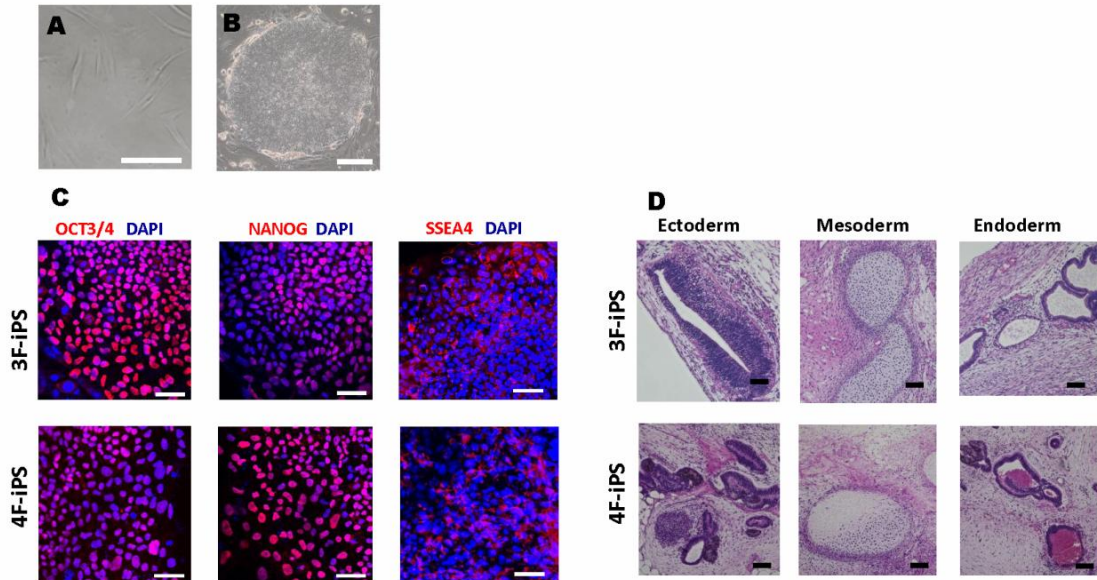


図 1. iPS細胞の樹立およびその多分化能の証明

(A,B)ヒトiPS細胞の樹立。線維芽細胞(A)に山中4因子(4F: SOX2, OCT3/4, KLF4, c-MYC)または3因子(3F: SOX2, OCT3/4, KLF4)をレトロウイルスにより導入することによりヒトiPS細胞(B)をそれぞれ樹立した。(C)樹立したヒトiPS細胞での多能性幹細胞マーカーの発現解析。3Fおよび4F-iPS細胞において多能性幹細胞マーカー(OCT3/4, NANOG, SSEA4)の発現を免疫細胞染色法で確認した。(D)3Fおよび4FiPS細胞の多分化能を検証するために、それぞれのiPS細胞をマウス精巢内に移植し、移植8週間後、各3胚葉系細胞への分化能を検証した。

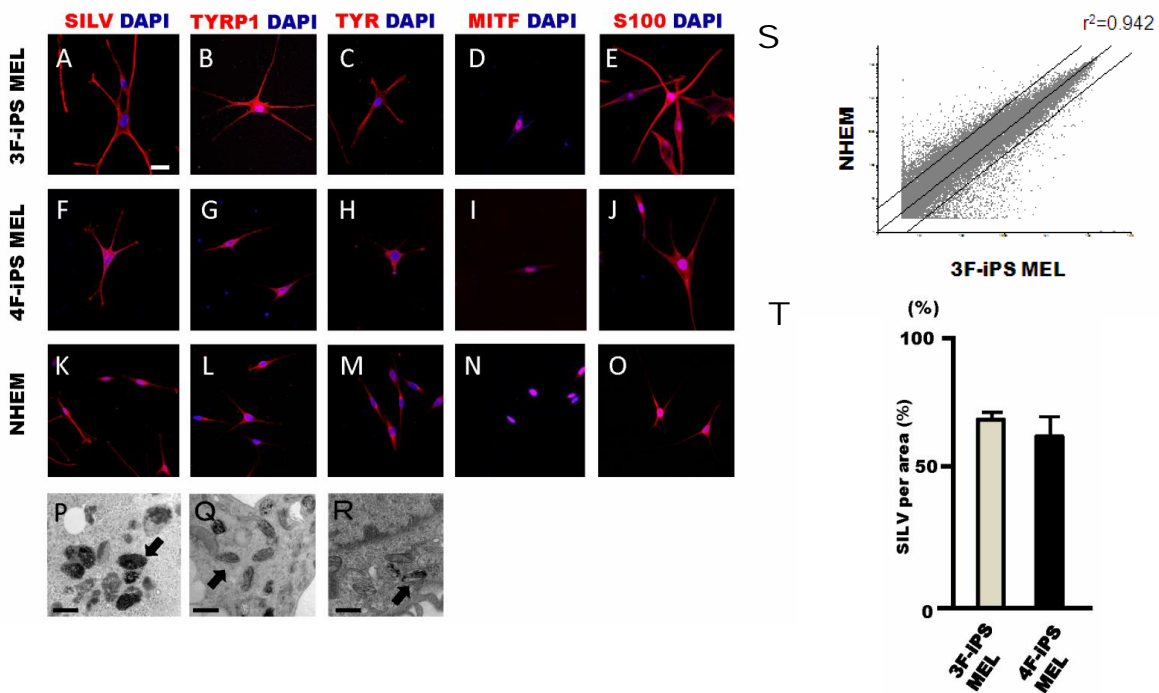


図2 ヒトiPS細胞由来色素細胞の性状解析

(A-D) 3因子(3F)または4因子(4F)で樹立した各iPS細胞由来胚様体を、色素細胞分化誘導剤で8週間培養した後、出現した色素細胞を各色素細胞マーカー(SILV, TYRP1, TYR, MITF, S100)で免疫細胞染色した。また、比較対象としてヒト表皮由来色素細胞(NHEM)も同時に解析した。(P-R) 3因子iPS細胞(P)、4因子iPS細胞から分化誘導させた色素細胞およびヒト表皮由来色素細胞(R)における色素顆粒の電子顕微鏡による発現解析。(S) 3因子iPS細胞由来色素細胞および表皮由来色素細胞の遺伝子発現プロファイルの比較解析。(T) 3因子iPS細胞および4因子iPS細胞からの色素細胞の誘導効率の比較解析。

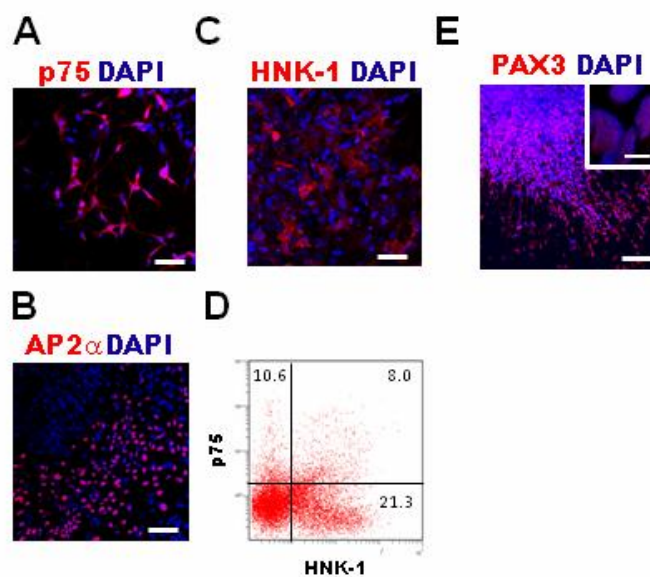


図3 iPS細胞から色素細胞への分化誘導過程で出現する細胞

(A-D)色素細胞分化誘導培地で選択培養中に出現する神経堤細胞。神経堤細胞マーカー(p75, HNK-1, AP2a)での細胞染色解析(A-C)およびフローサイトメトリーでの神経堤細胞(P75<sup>+</sup>HNK-1<sup>+</sup>)解析(D)。(E)ヒト色素幹細胞マーカー(PAX3)陽性細胞の同分化誘導過程における発現。