

News Release



2025 年 9 月 8 日

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

大阪大学

ヒト末梢血細胞からの高効率な iPS 細胞作製法を開発 —p53 経路の調節により初期化効率を 10 倍以上に向上—

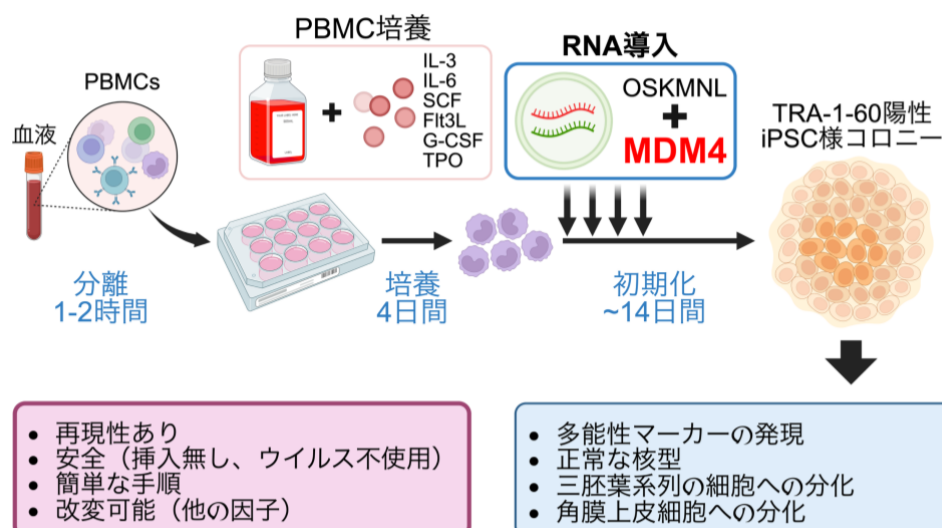
ポイント

- RNA による PBMC の初期化に成功
従来困難とされていた末梢血単核球 (PBMC) からの合成 RNA を用いた iPS 細胞の作製に初めて成功しました。
- p53 経路の抑制により初期化効率が劇的に向上
p53 の働きを抑制する MDM4 を導入することで、PBMC の RNA 初期化効率が顕著に向上することを示しました。特に、ユビキチン化分解を受けにくい変異を加えた MDM4 が最も高い効果を示しました。
- 作製した PBMC 由来 iPS 細胞は角膜細胞へ分化可能
合成 RNA を用いて初期化した PBMC 由来 iPS 細胞は、三胚葉すべてへの分化能をもち、特に角膜上皮様細胞への分化誘導にも成功し、その多能性を実証しました。

1. 要旨

中川誠人講師 (京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)、大阪大学ヒューマン・メタバース疾患研究拠点 (WPI-PRIME) 特任准教授 (常勤)) らの研究グループは、ヒト末梢血由来単核球 (PBMC) ^{注1)} から合成 RNA ^{注2)} を用いて高効率に iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) ^{注3)} を作製する方法を確立しました。本研究は、これまで困難とされていたヒト血液細胞からの非ウイルス的な iPS 細胞作製を実現するための解決策を提示するものであり、今後の再生医療や個別化医療への応用が期待されます。

この研究成果は 2025 年 9 月 8 日 (英国時間) に、Springer Nature 社のオープンアクセス科学雑誌『*Scientific Reports*』にオンライン公開されました。また、論文公開後、本研究で開発した合成 RNA を使った体細胞 (ヒト線維芽細胞 (HDF) および PBMC) 初期化プロトコール (日本語版および英語版) を CiRA ホームページに掲載しました。



概要図

(Biorender.com を利用して作成)

2. 研究の背景

iPS 細胞は、さまざまな体細胞を初期化（リプログラミング）^{注4)}して作製することができ、再生医療^{注5)}や創薬、疾患モデル^{注6)}に広く活用されています。なかでも、末梢血単核球（PBMC）は、採取が低侵襲かつ容易であり、患者さんから iPS 細胞を樹立するためのもととなる細胞として非常に有望です。しかし、PBMC は外部からの遺伝子導入に伴うストレスに弱く、多くの細胞が死んでしまうという課題があり、非ウイルス・非遺伝子組換えの安全な手法として注目されている RNA 導入法^{注7)}による初期化（RNA 初期化）は、技術的に困難とされてきました。しかし、RNA 初期化はゲノムに変異を残さず、臨床応用を見据えた安全性の高い技術として今後の標準化が期待されています。

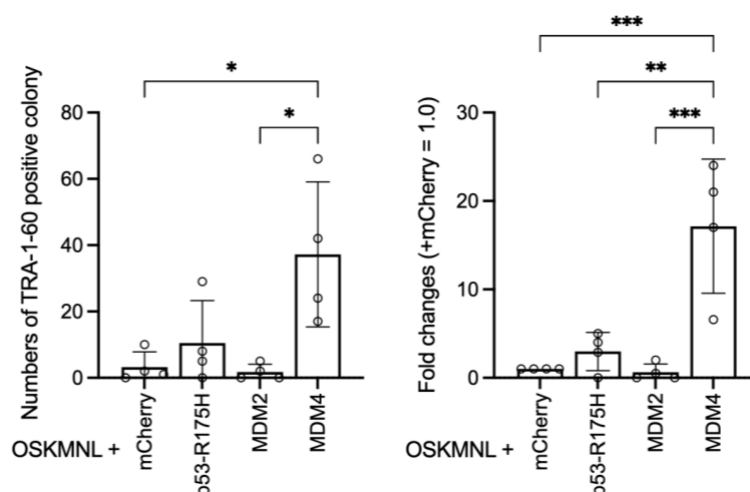
そこで本研究では、PBMC における RNA 初期化の障壁を明らかにし、その克服法を開発することを目的としました。特に、ストレス応答経路である p53^{注8)}経路の過剰活性化に注目し、その調節によって RNA 初期化の効率が改善できるかどうかを検討しました。

3. 研究結果

本研究では、合成 RNA を用いてヒト末梢血単核球（PBMC）から iPS 細胞を作製する新たな方法を開発しました。従来、PBMC は初期化効率が低く、特に合成 RNA を用いて iPS 細胞を作製することは困難とされていました。本研究では、以下の成果が得られました。

1) p53 の負の調節因子である MDM4 の導入により、初期化効率が劇的に改善

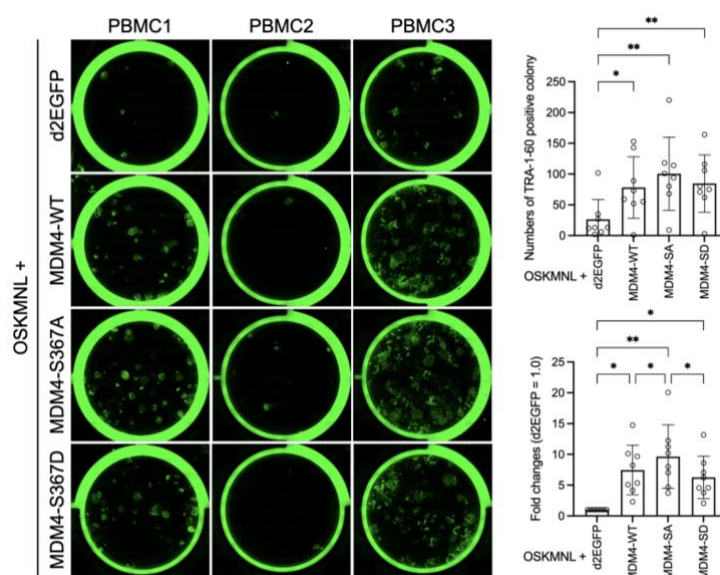
特に、ユビキチン化分解を回避する S367A 変異を導入した MDM4^{注9)}（MDM4-S367A）が最も高い効果を示し、初期化効率が約 10 倍以上に増加しました。



初期化因子（OSKMNL）に加えて mCherry、p53-R175H、MDM2、または MDM4 の合成 mRNA を PBMC に導入して初期化を行い、出現した iPS 細胞様コロニーを多能性マーカー（未分化マーカー）^{注10）} の TRA-1-60 抗体で染色し、コロニー数をカウントした結果（左のグラフ）。その値を元に mCherry を加えた場合を 1 としたときの倍加量を計算した（右のグラフ）。MDM4 を加えた場合に 10 倍以上の倍加量が確認された。

2) 複数ドナー由来の PBMC での再現性を確認

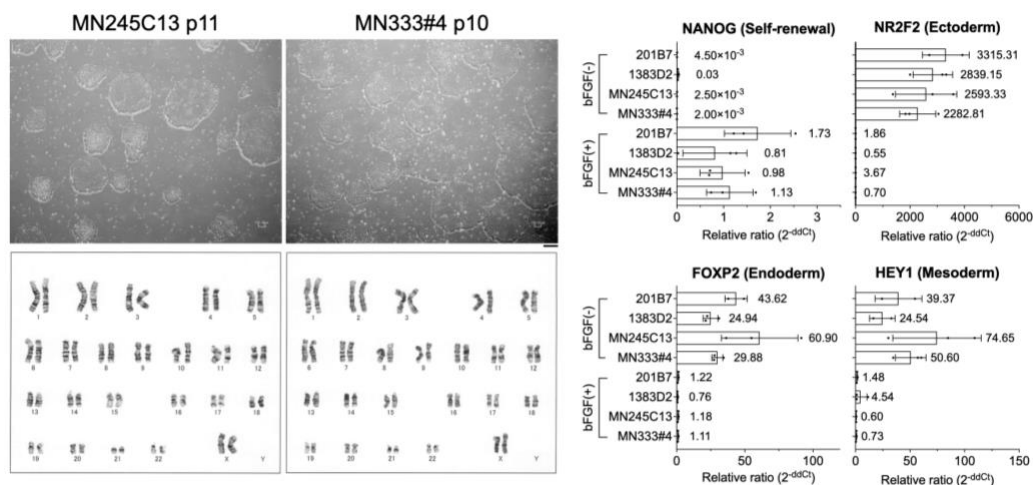
8 名の健常人ドナーの PBMC を用いた初期化でも、MDM4-S367A の効果が一貫して認められました。



初期化因子（OSKMNL）に加えて d2EGFP、MDM4-WT（野生型）、MDM4-S367A（非リン酸化型）、MDM4-S367D（リン酸化模倣型）の合成 RNA を PBMC に導入して初期化を行い、出現した iPS 細胞様コロニーを TRA-1-60 抗体で染色し（左の写真、緑色に見えるのが iPS 細胞様コロニー）、コロニー数をカウントした結果（右上のグラフ）。その値を元に d2EGFP を加えた場合を 1 としたときの倍加量を計算した（右下のグラフ）。免疫染色は 3 人分のドナー由来の結果を示した。コロニーカウントの実験は 8 人分のドナー由来のデータを用いた。

3) 樹立した iPS 細胞の品質を多面的に検証

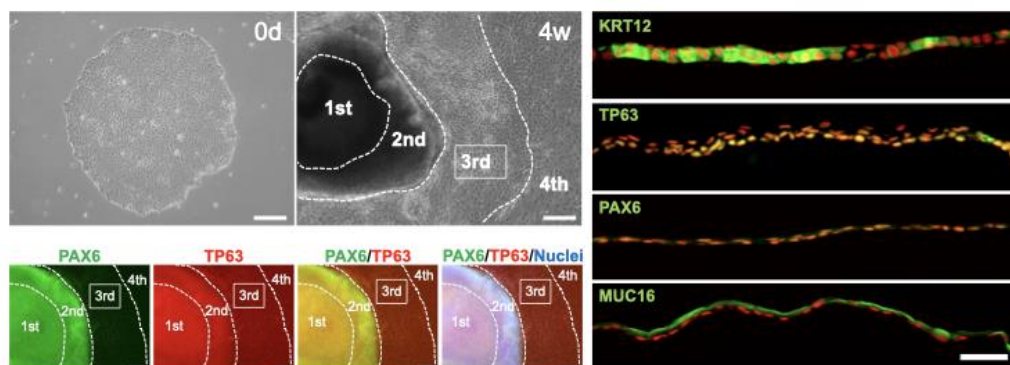
RNA 初期化により樹立した PBMC 由来 iPS 細胞は、未分化マーカーの発現、三胚葉^{注 11)} への分化能、正常な核型^{注 12)} を示し、多能性幹細胞としての性質を備えていることが確認されました。



PBMC から合成 RNA を使って樹立した iPS 細胞の写真（左上 2 枚）とそれらの核型解析結果（左下 2 枚）。ともに正常な核型であることを確認した。それらの iPS 細胞と以前に樹立済みで多数の論文で使用されている iPS 細胞（201B7、1383D2）を未分化維持条件で培養した場合（右グラフの bFGF(+)）と自発的に三胚葉系の細胞に分化する条件で培養した場合（右グラフの bFGF(-)）における遺伝子発現を RT-qPCR によって検証した結果（右のグラフ 4 つ）。bFGF(-)の条件で三胚葉マーカーの発現が確認できた。

4) 角膜上皮細胞への分化誘導を実施し、臨床応用の可能性を実証

樹立した PBMC 由来 iPS 細胞を角膜上皮細胞^{注 13)} へと分化誘導し、KRT12 や PAX6 などのマーカー発現を確認。視覚再生医療への応用可能性を示唆しました。



PBMC から合成 RNA を使って樹立した iPS 細胞を使って角膜上皮組織を作製。未分化状態の iPS 細胞（左上の写真、MN328）と分化誘導された角膜の 2 次元組織体（SEAM）（上・左から 2 枚目の写真、MN328）。SEAM の第 3 領域（3rd）に PAX6 陽性かつ TP63 陽性の角膜上皮前駆細胞が誘導されているのが確認できた（左下の 4 枚の写真、免疫染色データ）。その前駆細胞を単離し、KRT12 陽性かつ PAX6 陽性の角膜上皮組織を作製した（右の 4 枚の写真、免疫染色データ）。

4. 考察

- PBMC における RNA 初期化効率、p53 経路の過剰活性化によるアポトーシスの誘導によって大きく制限されている可能性が示唆された。
- MDM4 の変異体 (S367A) を併用することで、PBMC に特有な初期化バリアを乗り越えることができ、初期化効率が大幅に向上した。
- 本手法は再現性が高く、実用性のある技術である（他ラボ・施設にて確認済み）。
- RNA 初期化法の臨床適合性と MDM4 併用による安全性向上が確認されたことから、今後の再生医療応用にも適した手法であると考えられる。

5. まとめと展望

今後は、PBMC から得られる iPS 細胞を用いた疾患モデルの構築や、個別化医療への応用を進めていきます。また、今回のプロトコルが、より安全で実用的な iPS 細胞作製法として臨床現場でも活用されることが期待されます。

6. 論文名と著者

○ 論文名

MDM4 enables efficient human iPS cell generation from PBMCs using synthetic RNAs

○ ジャーナル名

Scientific Reports

DOI: 10.1038/s41598-025-16446-y

○ 著者

Masato Nakagawa^{1,2,#,*}, Mizuho Nogi^{1,#}, Hatsuki Doi¹, Ryuhei Hayashi^{3,4}, Tomohiko Katayama^{2,3}, Hirohisa Ohno¹, Megumi Mochizuki¹, Karin Hayashi¹, Hirohide Saito^{1,5}

#：共同筆頭著者

*：責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 大阪大学ヒューマン・メタバース疾患研究拠点 (WPI-PRiME)
3. 大阪大学大学院医学系研究科眼科学
4. 大阪大学大学院医学系研究科幹細胞応用医学
5. 東京大学定量生命科学研究所

7. 研究代表者のコメント

「PBMC から RNA だけで iPS 細胞を作製することは近々の課題でした。今回、p53 経路を制御する MDM4 の効果により、その壁を乗り越えることができました。このプロトコルは、研究用途だけでなく、今後の臨床応用にも大きく貢献すると考えています。」 — 中川誠人

8. 本研究への支援

本研究は、下記の支援を受けて実施されました。

- 日本医療研究開発機構（AMED）
 - ― 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「再生医療用 iPS 細胞ストック開発拠点」
 - ― 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム「次世代医療を目指した再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発拠点」
- iPS 細胞研究基金
- 科学技術振興機構（JST）
 - ― 創発的研究支援事業（JPMJFR210W）
- 日本学術振興会（JSPS）
 - ― 科研費（23H03060、23K27751）

9. 本研究に関する知財情報

本論文で用いた多能性幹細胞の製造法については日本出願が特許査定になっています。

特許公報：<https://patents.google.com/patent/JP7664656B2/ja?q=JP7664656>

10. 用語解説

注1) 末梢血単核球（PBMC）

Peripheral Blood Mononuclear Cell の略で、血液中に含まれる白血球の一部です。主に T 細胞や B 細胞、単球などからなり、免疫に関わる重要な働きをします。採血だけで手に入るため、患者ごとの iPS 細胞作製に利用しやすい細胞です。

注2) 合成 RNA

人工的に設計・合成された RNA 分子で、必要な遺伝子情報だけを一時的に細胞に届けることができます。合成 RNA は分解されやすく、体に長く残らないため、安全性の高い遺伝子導入法とされています。

注3) iPS 細胞（人工多能性幹細胞）

皮膚や血液などの体細胞に特定の遺伝子を導入してつくられる細胞で、体内のさまざまな細胞（神経、心筋、肝臓など）に変化する能力を持っています。再生医療や病気の研究、薬の開発などに広く応用が期待されています。

注4) 初期化（リプログラミング）

皮膚や血液などの分化した細胞に遺伝子を導入して、受精卵のような「未分化」で万能な状態に戻す操作です。iPS 細胞の作製にはこの初期化技術が不可欠です。

注5) 再生医療

失われた組織や臓器の機能を回復させる治療法で、iPS 細胞を使って体内の細胞を補ったり、修復したりすることが期待されています。将来的には神経疾患、心臓病、糖尿病などの治療に応用が見込まれています。

注6) 疾患モデル

ある病気の原因や進行メカニズムを詳しく調べるために作られた、病気を模した細胞や動物などのことです。患者さんの細胞から iPS 細胞を作り、それを病気の影響を受ける細胞（たとえば神経細胞や心筋細胞）に分化させることで、試験管の中で「病気の進行」を再現することができ、新しい薬の開発や治療法の発見に活用されています。

注7) RNA 導入法

合成した RNA（リボ核酸）を細胞に一時的に導入して、目的の遺伝子を働かせる方法です。ウイルスを使わないため、安全性が高く、ゲノムに傷をつけないのが特徴です。

注8) p53

がん抑制遺伝子の一つ。細胞に異常があると自動的に増えて細胞死を引き起こし、がん化を防ぐ重要なタンパク質です。しかし iPS 細胞をつくる時には、p53 が働きすぎると細胞が死んでしまうため、適度に抑える必要があります。

注9) MDM4

p53 の働きを制御するタンパク質の一つで、過剰な p53 の活動を抑える役割を果たします（負の調節因子）。本研究では、MDM4 の一部を改変した RNA を導入することで、p53 を安全に抑え、iPS 細胞の作製効率を高めました。

注10) 多能性マーカー（未分化マーカー）

iPS 細胞が「多能性（多くの細胞に分化できる能力）」を獲得したかどうかを判断するための目印となるタンパク質です。TRA-1-60 や OCT3/4、NANOG などがあり、免疫染色や PCR という方法などで確認します。

注11) 三胚葉

ヒトの体は発生の初期段階で、「外胚葉（がいはいよう）」「中胚葉（ちゅうはいよう）」「内胚葉（ないはいよう）」の3つの層（＝三胚葉）に分かれ、それぞれから神経、筋肉、内臓などさまざまな組織が作られます。iPS 細胞がこの三胚葉すべてに分化できるかどうかは、多能性（さまざまな細胞に変化できる能力）を確認するための重要な指標です。

注12) 核型

細胞の核の中にある染色体の数や構造のことです。ヒトの場合、正常な核型は46本（23対）の染色体からなり、iPS 細胞でもこれが保たれていることが、安全性や品質管理のうえで非常に重要です。核型に異常があると、がん化のリスクや分化異常の可能性があります。

注13) 角膜上皮細胞

目の最も外側にある透明な膜「角膜」を構成する細胞で、視力を保つうえで重要な役割を果たしています。iPS 細胞から角膜上皮細胞をつくる研究は、失明した患者への治療にもつながる最先端医療の一つです。