

再生医療に向けた展望

ES細胞、iPS細胞研究の現状と、

東京大学医科学研究所 ヒト疾患モデル研究センター・遺伝子機能研究分野教授 吉田進昭



1 はじめに

下等生物においては未分化な幹細胞が存在しており、トカゲのしっぽやイモリの目のレンズの再生、あるいは池や川にいるプラナリアは裁断してもどの断片からも個体が再生してくることが知られている。ほ乳類においても各組織には幹細胞が存在することが知られており、骨髄の造血幹細胞を利用した骨髄移植などは古くから臨床で用いられている。一方、いったん損傷すれば再生しないと考えられてきた神経組織にも幹細胞の存在が明らかとなってきた。しかし下等生物のような多分化能を持つ幹細胞が存在すると脳組織に心臓の細胞ができてしまったりするリスクも持ち合わせているため、高等生物では限定した分化能をもつ幹細胞が存在すると考えられている。一方、臨床現場では臓器移植が盛んに行われてきたが、臓器不足の問題や小児における臓器移植の倫理問題など、現実には対応しきれない問題が大きくなってきている。損傷を受けた臓器、組織を新しい部品で置き換えられたら、という夢はES細胞（胚性幹細胞）やiPS細胞（人工多能性幹細胞）の登場で現実的になってきた。ここではES細胞研究について、またiPS細胞研究の現状と問題点などを書いてみたいと思う。

2 ES細胞について

受精卵は卵割を繰り返して、マウスでは3.5日で胚盤胞（プラストシスト）へと発生する。この胚盤胞の内部細胞塊（ICM, inner cell mass）あるいは4.5日目のエピプラストと呼ばれる部分には、将来胎子を構成する多分化能を有する細胞（原始外胚葉となる細胞）が含まれ、ES細胞（embryonic stem cell：胚性幹細胞）は、この内部細胞塊あるいはエピプラストから樹立される。ES細胞は生殖細胞を含む

すべての組織・細胞に分化し得る能力を持つ。マウスES細胞は、1981年に初めて報告されて以来in vitroでの分化研究やジーンターゲットングに用いられてきた。1998年にヒトES細胞が樹立されたことから、再生医学の応用への期待が一気に高まった。ヒトES細胞はマウスES細胞と比べて、細胞表面マーカーの違いや増殖速度などにおいて違いがみられるが、マウスにおいて子宮への着床後胚から樹立した細胞はヒトES細胞と似た増殖性や増殖因子依存性を持つことなどの近似性が、また一方でヒトES細胞にROCK阻害剤を投与することで増殖速度が速くなることも報告されている¹⁾。

ES細胞が未分化性を維持したまま増殖できる機構に関して、従来からさまざまな研究がなされてきた。マウスではIL-6ファミリーに属するサイトカインであるLIF（Leukemia Inhibitory Factor）およびその下流のgp130-Stat3シグナルが重要であることが知られているが、ヒトES細胞ではこのシグナル系は必要ではないことも事実である。一方、wntやBMP4などは両者で有効なシグナルであり、牛胎児血清非存在下ではLIFシグナルは無効、さらに3つのシグナル系（FGFR, MEK, GSK3）阻害剤を培地に添加することでマウスES細胞を未分化状態に維持できることも報告された²⁾。このことは外部からの因子で未分化性が維持されているのではないことを示唆している。またOct-3/4やNanog, Sox2といった分子も未分化性維持には必要であり、マイクロRNA（miRNA）との関係³⁾やiPS細胞との関連でも注目されている。

3 遺伝子改変（ノックアウト）マウス

ES細胞が有名になったのは、その多分化能とともに相同組換えが高頻度で生じること、それを用いての遺伝子改変個体作出が可能になったことによる。ジーンターゲットング法は、in vitroでES細胞に遺伝子改変を施し、

著者略歴

1977年 大阪大学医学部卒業
1983年 大阪大学医学部大学院博士課程卒業
1983-1988年 ドイツゲルン大学遺伝学研究所
1988-1991年 国立療養所近畿中央病院内科医長
1991-1998年 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 免疫部長

1998年～ 東京大学医科学研究所教授

学会活動

日本分子生物学会、日本免疫学会（評議員）、日本癌学会、日本内科学会

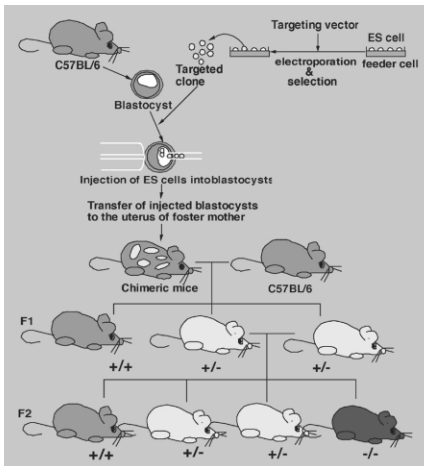


図1 遺伝子改変ES細胞を用いたノックアウトマウス作製

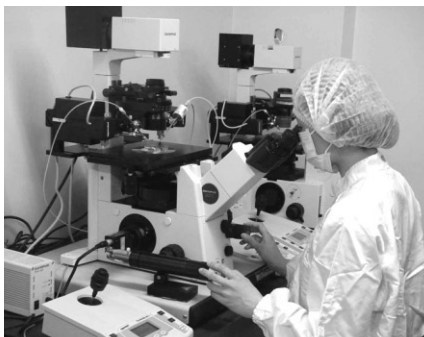


図2 ES細胞の胚盤胞へのマイクロインジェクション

その情報が次世代にまで伝達されることによって個体としての遺伝子改変動物が作成可能となる技術である。(図1) 通常はマウス個体において遺伝子を完全に不活化することからノックアウトマウスと呼ばれるが、ヒト遺伝子でマウス遺伝子を置換したり、点突然変異の導入なども可能である。遺伝子改変したES細胞を顕微鏡下でES細胞が由来した胚盤胞(プラストシスト)にマイクロインジェクション(図2)あるいは凝集法で混合してやると、キメラマウスを経て遺伝子情報が子孫に伝わり、目的の遺伝子改変個体が作成できる。ES細胞での相同組換えの機序としては、細胞分裂の際の姉妹染色分体交換(sister chromatid exchange)時にターゲティングベクターが内在性遺伝子と相同性領域で置き換わるためである。バクテリオファージや酵母の組換えシステムであるCre-loxP(図

3)やFLP-frtシステムを用いれば、薬剤などの投与により遺伝子欠損を生体で誘導したり、特定の組織でのみ遺伝子を不活化するといったコンディショナルジーンターゲティングも可能である。遺伝子は生体内で種々な時期、組織で機能を果たしていることがあり、単純な遺伝子ノックアウトでは胎生致死などによって遺伝子機能が解析しきれない欠点を補う技術である。具体的な方法としては、トランスジェニックマウスで組織特異的にCreを発現させたり、インターフェロンやエストロゲン誘導体であるタモキシフェン、あるいはテトラサイクリンなどでCreの発現を誘導することによって可能となる。Cre酵素はloxPサイトを認識して特異的にこの部位でDNAの組換えをおこなう。Cre酵素を発現させる方法としては、ES細胞で一過性に発現させる方法のほか、Cre発現ベクターを受精卵に注入する方法、アデノウイルスベクターを用いて静注あるいは組織に直接注入して発現させる方法などが報告されている。一方、組織特異的もしくは発現誘導可能なプロモーターの制御下にCre酵素を発現させたトランスジェニックマウスを用いることにより、コンディショナルジーンターゲティングが可能となる。マウスにおけるES細胞のソースとしては、これまで奇形腫好発マウスである129マウス由来のES細胞がジーンターゲティングに用いられてきたが、C57BL/6マウス由来のES細胞も免疫系や神経系の

研究分野を中心に用いられてきている。またゲノム情報が利用できる利点もあり、BACクローンをを用いたターゲティングベクターも利用されている。現時点で2万3千個あるといわれている遺伝子のどの程度がノックアウトされているかは不明であるが、米国や欧州、カナダや中国等においてKOMP(Knock-Out Mouse Project)やEUCOMM(European Conditional Mouse Mutagenesis)といわれるような網羅的に全遺伝子をノックアウトするプロジェクトが進行中である。ただ遺伝子の不活性化の方法により個体の変異に違いが見られたり、イントロンなど遺伝子のコード内外に存在するマイクロRNA(miRNA)をコードする領域が同時に変異している場合もあるため、十分な検証がなされる必要がある。一方、このようなジーンターゲティングはES細胞が樹立し得る生物種においては個体の遺伝子改変が可能であるものの、大部分の生物種においてはES細胞の樹立は困難である。そこで様々な方法が考案されているが、マウスと並んでモデル動物として地位を確立しているゼブラフィッシュにおいては、ZFN法(ゲノムDNAと部位特異的に結合するZinc-fingerドメインとヌクレアーゼの融合タンパク質を用いた遺伝子不活性化個体の作成)⁴⁾なども考案されている。

4 ES細胞の再生医療への期待

一方、ES細胞をin vitroで望む細胞系譜に分化させ、細胞移植として用いることができないか、という試みが広く研究されている。(図4)ES細胞はマウスだけでなく、ヒトでも血球系、筋肉や心筋、神経、膵臓のインスリン分泌細胞である細胞などにも容易に分化することが報告されている。パーキンソン病に対しては流産などの胎児からドーパミン産生細胞を取り出して移植する試みなども行われているが、複数の胎児を必要とすることなど倫理面以外にも問題点が多かった。ES細胞から大量にドーパミン産生細胞が作成でき

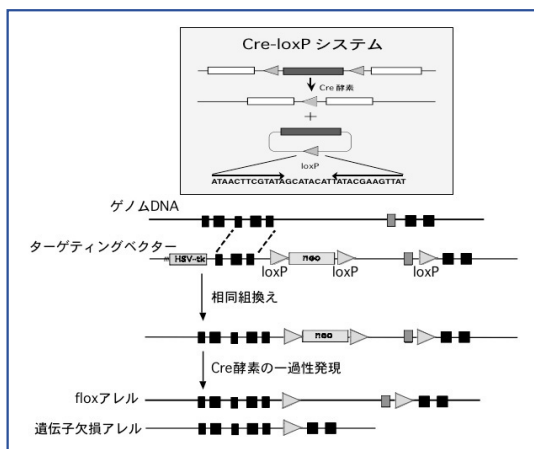


図3 Cre-loxPシステムを用いたコンディショナルターゲティング

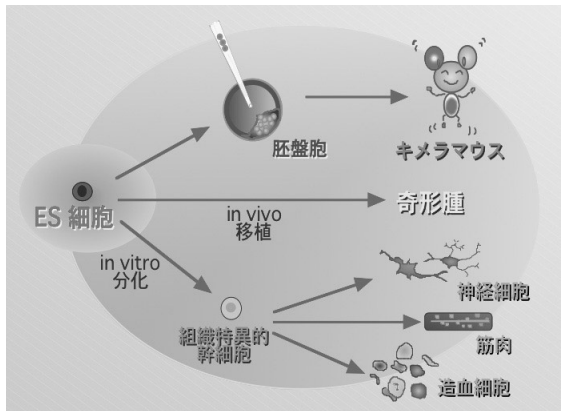


図4 ES細胞のin vivoおよびin vitro分化

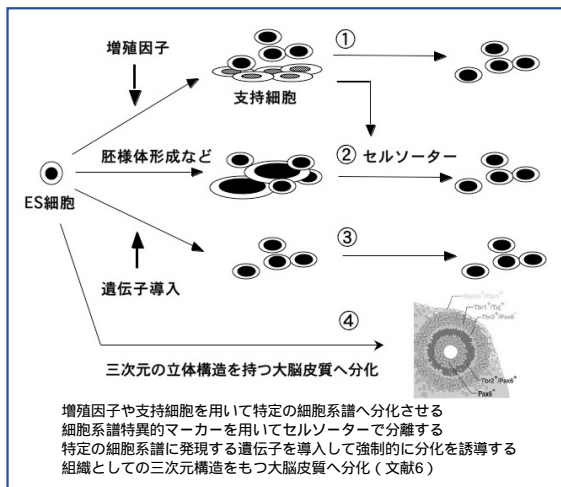


図5 ES細胞の特定の細胞系譜への分化誘導

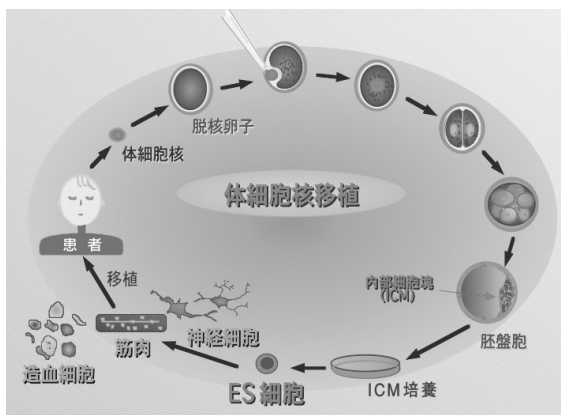


図6 体細胞核移植モデル図

ればパーキンソン病の治療に光明が見えてくる。また脊髄損傷で車椅子生活の患者に分化させた神経細胞を移植することにより歩行可能になる例や、心筋梗塞後の壊死組織に移植する、あるいは糖尿病患者にインスリン産生細胞である細胞を移植するなど、多くの組織での応用可能性が研究されている。試験管内でES細胞を目的の細胞、

組織に分化させる工夫に関しては激しい競争が行われている。培養条件の最適化や遺伝子導入による強制的分化、さらに分化した細胞をセルソーター（FACS）で選別していくという方法をセルソーター（FACS）で選別していくという方法が研究されている。（図5）たとえば、神経系細胞への分化にしても、神経細胞とグリア細胞といった大まかな系譜だけでなく、ドーパミン作動性神経やコリン作動性神経、最近では視床下部の神経細胞に特化して分化させることも報告されている⁵⁾。しかし、パーキンソン病の治療などのように細胞治療は可能になっても、臓器・組織としての移植が可能になるかどうかはまだハードルが高かった。しかし最近、培養方法を工夫することで、三次元の立体構造を持つ大脳皮質の組織ができたことが理研の笹井らのグループにより報告された⁶⁾。一方、赤血球や血小板などのように分化した細胞は作り得ても、元となる幹細胞の作成は難しいこと、また臨床応用までには、悪性化しないかどうかなどの安全性の検討や、倫理的な問題も解決されなければならない。拒絶反応に対処するシナリオとしては、骨髓移植のようにバンク化することのほか、核移植技術を用いて特定のヒトのES細胞を樹立し、in vitroで必要な系譜の細胞や組織に分化させた後、もとの生体に移植することが考えられている。（図6）分化した体細胞も未受精卵への核移植により初期化され未分化状態にリプログラミングされるが、核移植の研究の歴史は古く、体細胞へ分化した細胞が、はたしてすべての遺伝情

報を維持しているのかどうかは19世紀から興味のある話であった。Spemannが1938年に「核は発生の間に変化するのか」という疑問に答えるため初めての核移植を試み、その後1962年にGurdonがオタマジャクシの小腸細胞核をドナーとして核移植を行い生殖能力のあるカエルを得ることに成功したが、ほ乳類ではなかなか成功しなかった。試行錯誤の結果、1997年ついに成体の乳腺細胞からのクローン作成に成功したが、それがクローン羊、ドリーである。その後、多くの哺乳動物で成功例が報告され、愛玩ペットのクローン化産業も振興してきた。余談になるが、遺伝子情報が同じでも毛色は子宮内での発生環境にも影響を受けることから、元のペットそっくりの毛の模様のペットを得ることは難しいのも事実である。核移植のトピックスとしては、最近理研の若山らが16年間死体として保存してあったマウスの体細胞から核を取りだして卵母細胞に移植、そこからES細胞を樹立して胚盤胞へ移植し、最終的に死体の体細胞核の遺伝子情報を持ったマウスを誕生させることに成功した。これはシベリアの永久凍土に眠っているマンモスの死体から核を取りだして同様な方法でマンモスを現代に蘇らせるというジェラシック・パークのSF世界も夢ではなくなったとして注目されている。

5 iPS細胞

ES細胞との細胞融合によっても体細胞が初期化されることが示されたこと、および未分化なES細胞で特異的に発現する遺伝子の解析から、最終的にわずか4個の特定の遺伝子（Oct3/4, Sox2, c-MycおよびKlf4）を導入することにより、体細胞がリプログラミングされてiPS細胞が樹立できることが示され、大変な脚光を浴びることになったのは周知の通りである⁷⁾。iPS細胞の登場により、倫理的な問題が回避され、臨床応用への可能性が一段と高まったのは事実では

あるが, まだ解決すべき問題点も多い。ES細胞の場合と同様, あるいはそれ以上にどこかの遺伝子に「傷」があるかどうかの問題である。ES細胞では継代培養しているうちに染色体の数の変化, 突然変異の集積, エピジェネティックな変化が生じていくことが知られており, いかにも「傷」のない細胞が得られるか, またその検証方法が問われることになる。そのような遺伝子の「傷」が癌化につながる可能性と, 未分化なES細胞の残存による癌化の可能性も指摘されている。また遺伝子導入に用いられるレトロウイルスやレンチウイルスは, 内源性遺伝子近傍に挿入される可能性があり, 挿入変異が癌化につながる可能性も指摘されている。これを回避するために, リプログラミングの機構を解明することと並んで, 低分子化合物を併用することでc-mycなどの癌遺伝子の使用を避けられる方法も試みられているほか⁸⁾, 一過性に導入遺伝子を発現させ, 挿入変異を起こさないアデノウイルスの使用も試みられている。成功例も報告されたが⁹⁾, アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法はiPS細胞になる頻度が低く, これは導入遺伝子がある期間働いている必要があるためと考えられている。また山中らはプラスミドを用いた遺伝子導入によりiPS細胞の樹立が可能であることを報告し, 導入遺伝子が残存していないことから安全性が高まったとしている¹⁰⁾。iPS細胞の樹立効率が低いのが問題点ではあるが, 試験管内の問題なので大きなネックにはならないかもしれない。最近, これまで広く用いられてきた皮膚の線維芽細胞だけでなく毛髪角化細胞からのiPS細胞樹立が報告されたが¹¹⁾, まさに孫悟空が自身の毛を一吹きして分身を作るといふ世界が実現可能になったわけである。iPS細胞を移植細胞, 組織のソースとして用いるシナリオのほか, 遺伝子に変異を持つ患者さんの体細胞核をドナーとしてiPS細胞を樹立し, 相同組換えによりその変異を正常化させてから望む細胞に分化させて

移植のソースとして用いることも考えられており, 鎌状赤血球症モデルマウスを用いてその可能性が実証されている¹²⁾。また病気の患者さんから樹立したiPS細胞は, その病気の解明に試験管内での解析に用いることができ, さまざまな疾患の患者さんからのiPS細胞樹立の試みも始まっている。たとえばアルツハイマー病など, 大脳皮質に原因がある患者の皮膚細胞からiPS細胞を作成し, 脳組織ができる過程を調べれば発症メカニズムがわかり, 治療の糸口をつかめる可能性がある。さらにはヒトiPS細胞から分化した細胞を薬品(治療薬)の副作用検定に用いることも可能である。たとえばiPS細胞から分化させた肝細胞を用いて, 薬品の肝臓に対する副作用を試験管内でチェックできたり, あるいは向神経薬などの新薬を開発する際, ES細胞から作成した脳組織で反応を見れば, 動物実験より正確に効果や毒性を確かめられる。

iPS細胞は元の体細胞の種類や由来する個体の年齢によってその性質が異なることから, 遺伝子発現やエピジェネティクスの問題が重要であることが示唆されている。日本や多くの国で禁止されているヒト体細胞核を牛などの動物の卵子に移植するヒト性融合胚の研究は, 英国において2008年に激しい議論の末許可された。iPS細胞の臨床応用可能性のためにも, ES細胞とiPS細胞の比較やリプログラミング時の遺伝子発現制御の問題は今後の重要な研究課題である。

一方, iPS細胞作成と同様な考え方, 手段により近縁の細胞系譜を変更させることも最近報告された。ハーバード大学のグループは, 膵臓の外分泌細胞に, 細胞で働いている遺伝子3つをアデノウイルスベクターを用いて導入し, 消化液を分泌していた細胞をインスリン産生細胞に変えることに成功した¹³⁾。まだ初歩的な段階ではあるが, 今後はこうした方向性の研究が進展することが予想され, 望む細胞を容易に作り出すことができれば, 細胞移植を

中心とした再生医療がより身近になってくると考えられる。

6 おわりに

このようにES細胞やiPS細胞の登場によって, 臓器移植に用いる臓器不足の解消や, 拒絶反応のない理想的な移植治療の可能性が開けてきたことから, 再生医療への期待は非常に大きなものがある。一方, 臨床現場で行われていた遺伝子治療では, 用いたベクターの挿入変異により白血病という重篤な副作用が見られて臨床応用がストップした歴史もあることから, 過度な期待が先行することなく慎重な研究の継続が期待される。

文献

- 1) Watanabe, K. et al.: A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 25: 681 - 686, 2007
- 2) Yin, Qi-L. et al.: The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453: 519-523, 2008
- 3) Marson, A. et al.: Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. *Cell*, 134: 521-533, 2008
- 4) Xiangdong Meng, X. et al.: Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 26: 695 - 701, 2008
- 5) Wataya, T. et al.: Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 105: 11796-11801, 2008
- 6) Eiraku, M. et al.: Self-Organized Formation of Poraried Cortical Tissues from ESCs and its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell*, 3: 519-532, 2008
- 7) Takahashi, K. et al.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126: 663-676, 2006
- 8) Huangfu, D. et al.: Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotech.*, 26: 1269-1275, 2008
- 9) Stadtfeld, M. et al.: Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science*, 322: 945-949, 2008
- 10) Okita, K. et al.: Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*, 322: 949-953, 2008
- 11) Aasen, T. et al.: Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotech.*, 26: 1276-1284, 2008
- 12) Hanna, J. et al.: Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science*, 318: 1920-1923, 2007
- 13) Zhou, Q. et al.: In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 455: 627-632, 2008