

I. iPS 細胞研究の進展

京都大学 iPS 細胞研究所 所長
山中 伸弥

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は, 当初マウスまたはヒトの線維芽細胞に *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4* という 4 因子をコードする遺伝子をレトロウイルスベクターで導入することにより樹立された. この新しい多能性幹細胞は, 形態, 増殖, 遺伝子発現, 多能性などの点で胚性幹細胞 (ES 細胞) と類似している. iPS 細胞は, ES 細胞に比べ倫理的問題が少ないことに加え, 遺伝的背景や移植免疫に関わる HLA タイプなど個性の明らかにされている様々な個人から樹立可能であるという利点を持つ. このため, HLA ホモ接合体ドナーから構築したヒト iPS 細胞バンクは, 将来, 細胞移植療法など再生医療への応用が期待されている. また, 患者由来の疾患特異的 iPS 細胞は病態解明, 新薬探索, 毒性評価など創薬開発への利用が注目されている. しかし一方で, 移植時の腫瘍化の懸念はもちろん, ここ数年の研究により, 樹立された iPS 細胞は ES 細胞と比較して多様であることもわかってきており, 実用化にあたって解決すべき点は多い. 初期化のメカニズムも未だ未解明の部分が多い.

iPS 細胞は, 線維芽細胞のほか, 肝, 胃上皮, 神経, 歯髄, 末梢血, 臍帯血など様々な由来の体細胞から樹立できる. また, 細胞への因子導入方法も, レトロウイルスのほか, アデノウイルス, センダイウイルス, プラスミド, トランスポゾン等, 種々のベクターによる遺伝子導入や, 組み換えタンパク質, 合成 mRNA を用いた方法も報告されている. ここで, 我々は, エピソーマルベクターを用いることで, ゲノムへ挿入がない遺伝子導入系を構築し, 従来の樹立法より安全かつ効率的に iPS 細胞を樹立する方法を開発した. また, 導入因子についても, より安全かつ高効率な iPS 細胞の樹立を目指し, 上記 4 因子以外も含めた様々なバリエーションが考案されている. 最近では, *c-Myc* の代替因子を検索する過程で原がん性が弱い *L-Myc* や, さらに *Glis1* という受精卵で特異的に発現している遺伝子を見出し, これらを用いることで, iPS 細胞の樹立における効率と品質を向上させることに成功した. また, 化合物により iPS 細胞樹立効率を促進し得ることも明らかになりつつある.

このように, 樹立法が多様化するとともに, 毎回の実験では複数, 時には100以上の独立した iPS 細胞クローンが得られる. こうした状況下で, iPS 細胞の性質については, ES 細胞と比較し, 潜在的に極めて多様性に富むことが示唆される. これら多様な iPS 細胞は *in vitro* での特定の臓器や細胞への分化指向性における誘導効率または腫瘍形成傾向などの特性が異なることが確認されつつある. これらを踏まえ, iPS 細胞の臨床応用に際しては, 最も適切な由来細胞, 樹立方法および得られた iPS 細胞株の評価法を決定する必要がある. これら諸問題に対して, ゲノム解析や, メチローム, ヒストン修飾, インプリンティングなどのエピゲノム解析の重要性が増している. さらに, 単一の細胞から樹立した iPS 細胞におけるサブクローンにも不均一性が認められることにも留意する必要がある. ここでは核初期化の過程で複数回の細胞分裂が必要とされ, 外来の因子導入のみではその全過程が完結しないことが, その一因として考えられる. 例えば, *p53* や *Rb* 経路を含め他の要因が完全な核初期化に重要な役割を果たしていることを示唆する知見も得られている. 今後も核初期化機構に関する理解をさらに深めることが, 均一かつ完全に初期化された iPS 細胞の樹立法の開発につながると期待される.

II. iPS 細胞を用いた心臓の再生と心臓病の病態解明

慶應義塾大学医学部 循環器内科教室 教授

福田 恵一

難治性心不全治療では、心臓移植以外には有効な手段がない。iPS 細胞は倫理的問題がなく、免疫拒絶もないことから将来の再生医療のツールとして大きな期待が寄せられている。従来の iPS 細胞樹立法の問題点は、皮膚のバイオペシーが必要、樹立に時間が掛かる、ゲノムに挿入遺伝子が残存し、再活性化して腫瘍形成する可能性が有る等が挙げられていた。我々は血液中 T リンパ球とセンダイウイルスを用いて、0.1 ml の血液から 1 ヶ月でゲノムを損傷しない iPS 細胞樹立法を開発した。これらの iPS 細胞は *in vitro* でも心筋を含む 3 胚葉系に分化すること、残存ウイルスは完全に消滅すること、ゲノム染色体に異常のないこと、マウスに移植すると奇形腫を形成し、多分化能を有することを証明した。さらに、我々はマウス胎児胚の心臓予定領域に発現する液性因子をスクリーニングし、いくつかの心筋細胞分化過程に重要な働きを有する因子を同定した。これらの因子のうち、未分化幹細胞から前方中胚葉への誘導する過程に *Noggin* が有効であること、前方中胚葉から心筋細胞への分化誘導因子、早期心筋細胞の細胞分裂を誘導する因子として *G-CSF* を見出した。これらを用いることにより、マウス、サル、ヒトの ES 細胞および iPS 細胞は効率的に心筋細胞を分化誘導可能であった。さらに、ミトコンドリアに特異的に取り込ませる色素を利用することにより心筋細胞と混在する未分化幹細胞および非心筋細胞と分離する方法、細胞シートを作成する方法、再生心筋細胞を壊死させずに効率的に移植する方法を開発した。また、iPS 細胞は遺伝性心筋疾患の病態解明、治療法開発に有効であるとされている。また、細胞移植法として心嚢内視鏡の開発に関して最新の知見を紹介する。本講演ではこれらの心臓再生医療の現状、循環器疾患に対する iPS 細胞利用の現状を報告する予定である。

Ⅲ. iPS 細胞と網膜色素変性

理化学研究所発生再生科学総合研究センター

網膜再生医療研究チーム チームリーダー

高橋 政代

日本で発明された iPS 細胞は世界に衝撃を与えた。その応用範囲は再生医療に限らず広く疾患の理解や治療に役立つ。我々は ES および iPS 細胞由来の視細胞や網膜色素上皮 (RPE) 細胞を用いた網膜細胞移植治療開発を目指している。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」にもとづく臨床研究として加齢黄斑変性に対しては RPE 移植、そしてそれに続いて網膜色素変性に対しては視細胞移植と考えているが、視細胞と網膜色素上皮は相互に必要としており一方の細胞が障害されると 2 次的にもう一方が変性するので、将来的には両疾患とも視細胞、RPE の同時移植が必要となる。現在すでにヒト ES/iPS 細胞から視細胞および網膜色素上皮細胞の分化誘導には成功しているが、臨床応用のためにはそれぞれの細胞についていくつかの問題を解決する必要がある。

RPE 移植に関しては、自家 iPS 細胞由来 RPE をシート状に加齢黄斑変性に移植することを考えている。現在、iPS 細胞樹立、維持、分化誘導、RPE 細胞純化、RPE 細胞増幅、細胞シート作製のすべての工程で、臨床応用に適した方法を採用し、プロトコールを作成している。また、*in vivo* 造腫瘍性試験を 1 次、2 次、最終安全性試験の予定で進めている。

視細胞移植に関してはヒト ES 細胞由来細胞の移植で網膜変性モデルマウスを治療できることがすでに報告されているが、移植による効果判定はまだまだ確実な方法がなく不十分であり、今後検証が必要である。一方で、最近まで視細胞移植に際しては ES/iPS 細胞から作った視細胞の純化が最大の課題であったが、それを解決に導く研究成果が最近報告された。笹井らのグループは、マウス ES 細胞から *in vitro* で立体的な眼杯を作り、さらに網膜部分のみを培養することによって層構造を持った十分に大きな網膜の作成に成功した。この方法をヒト ES/iPS 細胞に応用すれば、純化された視細胞をシート状に移植することができる。視細胞移植治療がぐんと近づいたと考えられる。

また、iPS 細胞の出現で網膜色素変性患者の視細胞研究が初めて可能となり、変異遺伝子によって視細胞の分化、変性、有効薬剤が異なることがわかって来た。iPS 細胞の個別医療へと応用の可能性を示すものである。これら研究室での知見は日常診療にも生かされ、研究と臨床の間に相互作用が生まれている様子をご紹介します。

IV. iPS 細胞を用いた神経再生・疾患・創薬

慶應義塾大学医学部 生理学教室 教授
岡野 栄之

再生を誘導するために、色々な臓器を作るもとになる細胞である体性の「幹細胞」の操作と、初期胚由来の多能性幹細胞である ES 細胞やさらには体細胞から人工的に誘導した多能性幹細胞である iPS 細胞 (induced Pluripotent Stem Cell, iPS 細胞) を用いた手法に注目が集まっている。iPS 細胞は、皮膚の繊維芽細胞などの体細胞に Sox2, Oct3/4, Klf4, (c-Myc) などの少数の転写因子の遺伝子を導入するだけで、試験管内で誘導される多能性の幹細胞であり、細胞移植治療や疾患研究において大きな期待を集めている。一方、実際に iPS 細胞技術を細胞移植に用いるためには、腫瘍形成の問題等の安全性の問題をクリアする必要がある。我々は、京大の山中伸弥教授との共同研究により、体細胞の由来や c-Myc transgene の有無や遺伝学的な選択の有無などの観点から樹立法が異なる様々なマウス iPS 細胞を出発材料にして、ES 細胞と同様のプロトコール (Okada et al., 2008; Naka et al., 2008; Okano and Temple, 2009) にて神経系前駆細胞を分化誘導し、マウス脳へ移植する試験を行った。その結果、神経幹・前駆細胞細胞集団中に未分化な細胞が残存している場合は移植によりテラトーマが発生し、iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞 (ニューロスフェア) の腫瘍源性 (テラトーマ形成の危険性) は、iPS 細胞樹立時の起源細胞に依存することが示された (Miura et al., 2009)。

このようにして安全性についての厳格な評価により、すなわち iPS 細胞由来の神経幹・前駆細胞集団中に分化抵抗性の未分化細胞の含量が検出されず、iPS 細胞由来の神経幹・前駆細胞移植により腫瘍形成の危険性が低いことが示された事により、安全性の担保された iPS 細胞株 (38C2株) を同定した。同 iPS 細胞株から誘導された神経幹・前駆細胞移植の脊髄損傷への治療効果が証明された。また、成体線維芽細胞より樹立された iPS 細胞由来の神経幹・前駆細胞の損傷脊髄への移植により、安全な iPS 細胞株とそうでない細胞株の差が明瞭となった。このことは、iPS 細胞を用いた再生医療において安全な細胞株を前もって準備するという他家移植の重要性を示唆している (Tsuji et al., 2010)。また我々はヒト iPS 細胞由来神経幹・前駆細胞を用いたマウスおよびマーモセット脊髄損傷モデルの機能回復にも成功しており (Nori et al., 2011)、約 5 年後の臨床研究開始を念頭に、前臨床研究を推進している。

また、iPS 細胞技術は、ヒト疾患モデル細胞の提供により、疾患の原因の解明や創薬研究 (開発研究、毒性の検討) に大きく貢献し、医学研究の大きなパラダイムシフトを産む出すものと期待される。本講演では、網膜変性症、パーキンソン病、ALS、統合失調症などの難治性の精神・神経疾患、さらには Rett 症候群、Perizaeus-Merzbacher 病、Prader-Willi 症候群などの小児神経疾患、パーキンソン病、ALS、統合失調症疾患などの精神・神経疾患を対象とした疾患モデル細胞作出という観点からの iPS 細胞研究の最近の我々の研究成果や世界的動向について紹介する。さらには、iPS 細胞研究と並行して我々が開発を進める遺伝子改変霊長類モデル (Sasaki et al., 2009) とその活用について紹介したい。我々は、昨年遺伝子改変霊長類 (コモンマーモセット) の作出に成功した。ここで得られた個体では、遺伝子の導入された第一世代だけではなく、第二世代でも導入遺伝子の発現が認められており、次世代まで導入遺伝子が受け継がれた霊長類の作出は世界で初めてである。現在、この遺伝子改変技術を用いてヒトのパーキンソン病、などの神経難病のモデルマーモセットの作出を進めており、これら神経難病の治療法開発研究などへの貢献が期待される。さらに遺伝子改変マーモセット作成の技術開発を進めるとともに、ヒトあるいは霊長類に固有な脳の構造と機能の解析、さらにはこれらが障害されたヒト精神・神経疾患モデルの開発を行い、iPS 細胞技術と相補的な技術として発展させたいと考える。