

最近のトピックス

iPS 細胞樹立の新しいアプローチ New approaches for generating induced pluripotent stem (iPS) cells

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生化学分野

天谷 吉宏

Division of Biochemistry, Niigata University School of Medical
and Dental Sciences

Yoshihiro Amaya

1. はじめに

山中らのグループは分化能の無いマウスの胎児繊維芽細胞に 4 種類の遺伝子調節タンパク質の遺伝子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) をレトロウイルスを用いて導入して「初期化」(reprogramming) することにより、さまざまな細胞に分化することのできる多能性分化能 (pluripotent) をもつ細胞株を樹立し、iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) と名づけた (図 1)¹⁾。引き続き、彼らはヒトの繊維芽細胞でも同様の方法で iPS 細胞株を樹立できることも明らかにした²⁾。これ以降、iPS 細胞を再生医療や新規医薬品開発に実用化することに大きな期待が高まり、我が国では文部科学省、厚生労働省、経済産業省を中心にオールジャパンの研究体制をバックアップして研究を推進している。一方、ガン遺伝子である c-Myc の導入や遺伝子の導入に用いるレトロウイルスの染色体への挿入による発ガンの危険性が強く指摘されており、安全な臨床応用への大きな問題点となっている。本稿ではこれらの問題点を回避するための新しいアプローチについて紹介する。

2. c-Myc は初期化に必須ではない

山中らの最初の報告では iPS 細胞から生まれたマウスの約 40% に腫瘍が生じていた¹⁾。彼らはその後、c-Myc を用いないで iPS 細胞を樹立することに成功し、この iPS 細胞由来のマウスでは腫瘍が認められない³⁾。これを突破口として、c-Myc が初期化に必須ではないとする結果が相次いで報告された (表 1)^{4,6)}。c-Myc を用いない場合、マウス胎児繊維芽細胞から iPS 細胞に初期化される効率は大きく低下し、1/10 以下である。Huangfu らはヒストンデアセチラーゼの阻害剤である

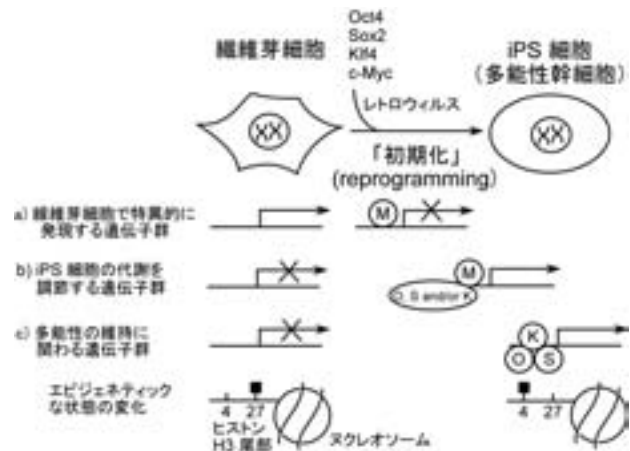


図 1 繊維芽細胞から iPS 細胞への「初期化」
iPS 細胞への初期化に必要な 4 種類の遺伝子調節タンパク質の機能について、最近の知見を簡略化して模式的に示した¹⁵⁾。M, O, S, K はそれぞれ c-Myc, Oct4, Sox2, Klf4 遺伝子調節タンパク質をあらわす。■はトリメチル基をあらわす。(本文参照)

valproic acid (VPA) を添加することにより、c-Myc なしでも効率よくヒト繊維芽細胞を初期化できることを示した⁴⁾。この結果はエピジェネティクス (染色体の DNA やタンパク質の化学修飾などによるクロマチン構造の変化をとともなう遺伝子の発現制御) が初期化の過程で影響を及ぼしていることを強く示唆している。さらに彼らは VPA が存在すれば、効率はきわめて低いものの c-Myc と同時に Klf4 を除いても初期化できることも明らかにした。Feng らは Klf4 の代わりにエストロゲン受容体ホモログの Esrrb を導入してもマウス胎児繊維芽細胞を iPS 細胞に初期化できることを示した⁵⁾。これらの結果は Klf4 も c-Myc と同様に、初期化に必須の因子ではないことを示している。ごく最近、Kim らは Oct4 のみでマウス神経幹細胞を初期化できることを示した⁶⁾。完全に分化していない神経幹細胞はもともと Sox2 を発現しており、完全に分化した繊維芽細胞にくらべて iPS 細胞に初期化しやすい状態になっていると推定される。

腫瘍形成の原因は c-Myc とレトロウイルスだけではない。たとえば、今のところすべての細胞種の初期化に必要なとされている Oct4 は通常の発生分化の過程において発現のタイミング、場所、量が厳密に調節されている⁷⁾。事実、Oct4 の異所発現は前駆細胞の分化を阻害し、上皮の異形成や腫瘍化を引き起こす⁸⁾。導入した遺伝子が必要のないところで発現してしまった場合に起こる影響を明らかにしておくことは iPS 細胞の臨床応用におけ

表1 iPS細胞の樹立法と効率

導入遺伝子	導入方法	薬剤	細胞種	効率	文献
Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	レトロウイルス		マウス胎児線維芽細胞	0.1%	3
Oct4, Sox2, Klf4	レトロウイルス		マウス胎児線維芽細胞	0.01%	3
Oct4, Sox2, Klf4	レトロウイルス		ヒト線維芽細胞	0.001%	4
Oct4, Sox2, Klf4	レトロウイルス	VPA	ヒト線維芽細胞	1%	4
Oct4, Sox2	レトロウイルス	VPA	ヒト線維芽細胞	0.001%	4
Oct4, Sox2	レトロウイルス		ヒト線維芽細胞	樹立不能	4
Oct4, Sox2, Esrrb	レトロウイルス		マウス胎児線維芽細胞	0.005%	5
Oct4	レトロウイルス		マウス神経幹細胞	0.014%	6
Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	アデノウイルス		マウス線維芽細胞	樹立不能	10
Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	アデノウイルス		マウス培養肝細胞	0.0006%	10
Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	プラスミド		マウス胎児線維芽細胞	0.0015%	3

るリスクを正確に把握するためにも重要である。

3. レトロウイルスを用いない遺伝子導入

レトロウイルスでマウスの胎児線維芽細胞に初期化に必要な4種類の遺伝子を導入した場合、それぞれ約10コピーずつ、であわせて40箇所程度、導入した遺伝子が染色体DNA上に挿入されている¹⁾。前述のように、c-Mycを使わなければ導入にレトロウイルスを用いても腫瘍形成は認められない。一方、マウスの肝臓や胃由来のiPS細胞ではc-Mycを含めた4種類の遺伝子をレトロウイルスで導入しても腫瘍形成は認められない⁹⁾。腫瘍のできない肝臓および胃由来のiPS細胞では染色体DNAに挿入される遺伝子のコピー数が、腫瘍ができてしまう繊維芽細胞由来のiPS細胞のおよそ1/5程度であった。線維芽細胞由来のiPS細胞で腫瘍形成の頻度が高いのは、染色体に挿入された遺伝子が本来必要のないところで発現して分化のプログラムを乱す確率が、挿入されるコピー数に比例して高くなるからかもしれない。レトロウイルスによって導入した遺伝子の挿入される場所を解析したところ、特定部位への挿入は観察されなかった。レトロウイルスが常に特定のガン関連遺伝子の近傍に特異的に挿入されることによってガン関連遺伝子を活性化させて腫瘍形成を引き起こす可能性は低そうである。

遺伝子の導入に用いたレトロウイルスが原因となる腫瘍形成の可能性がかなり低くなったとはいえ、iPS細胞の臨床応用には原理的により安全な方法の確立を求める意見は多い。Stadtfieldらは導入された遺伝子が染色体DNAに挿入されないアデノウイルスベクターを使って、きわめて低い効率ながらマウス培養肝細胞をiPS細胞に初期化することに成功した(表1)¹⁰⁾。アデノウイルスは細胞腫によって感染効率大きく異なるため、マウス線維芽細胞を初期化することはできなかった。山中らのグループはウイルスベクターを使わずにプラスミドを繰り返し導入する方法によって、マウス線維芽細胞を

iPS細胞に初期化することに成功している³⁾。

ごく最近、レトロウイルスを使わないベクターで遺伝子を導入してiPS細胞を樹立した後、導入した遺伝子をすみやかにほぼ完全に除去することに成功したという報告が相次いだ¹¹⁻¹³⁾。これらの方法はこれまで述べてきたiPS細胞の安全性にかかわる問題点のうち、遺伝子の導入にレトロウイルスを用いること、および初期化に必要な遺伝子がiPS細胞に過剰なコピー数存在してしまうことをあわせて解決しており、iPS細胞の安全な臨床応用に大きく貢献するものと思われる。

低分子化学物質による初期化の試みも活発に行われている。前述のVPAのように直接エピジェネティックな状態に影響を及ぼすものだけでなく、リン酸化酵素の阻害剤など細胞内シグナル伝達に影響を及ぼす物質も、iPS細胞の樹立に寄与できることが明らかになってきた¹⁴⁾。iPS細胞を樹立する効率を上げたり所要時間を短縮したりするためには、このような化学物質の力も借りなければならぬかもしれない。我が国でも約10万種に及ぶ天然化合物ライブラリーを活用したiPS細胞の効率的な作製法開発が行われている(NEDOプロジェクト「化合物等を活用した生物システム制御基盤技術開発」)。多くの化学物質の中から初期化に有効な物質を低いコストで選別するには、より確実に効率のよいスクリーニング系を確立する必要があると考えられる。

4. 導入した遺伝子の役割

導入した4種類の遺伝子調節タンパク質の初期化における役割を明らかにすることは、より効率のよい初期化条件の発見や安全なiPS細胞の実用化、特に医療の安全基準の策定にとってきわめて重要である。Sridharanらは初期化の過程におけるこれらの遺伝子調節タンパク質の動態と機能をゲノムワイドで解析した(図1)¹⁵⁾。c-Mycはまず単独でiPS細胞になる準備をするために繊維芽細胞に特異的に発現している遺伝子群の発現を抑圧する(図1a)。次にOct4, Sox2, Klf4の一部と複合体

を形成して、主に iPS 細胞の代謝調節を行う遺伝子群の発現を促進し、iPS 細胞になった後もこの状態を維持する (図 1b)。

一方、iPS 細胞になった後、多能性を維持するのに必要な遺伝子群の発現は Oct4, Sox2, Klf4 の3種類の遺伝子調節タンパク質が揃ってプロモーター (転写調節) 領域に結合することによって促進されている (図 1c 上)。これら3種類の遺伝子は初期化の指標としている Nanog なども含めた制御回路を形成して iPS 細胞での発現を維持している¹⁶⁾。この遺伝子群のプロモーター領域の DNA に結合するヒストン H3 の尾部は、線維芽細胞では27番目のリジンがトリメチル化されているのに対し、iPS 細胞では4番目のリジンがトリメチル化されるというエピジェネティックな状態の変化が生じている (図 1c 下)。3種類の遺伝子調節タンパク質が揃ってプロモーター領域に結合するためにはクロマチン構造の変化が必要らしい。前述のようにヒストンデアセチラーゼの阻害剤である VPA が初期化に影響を及ぼすことからヒストンアセチル化のパターンも初期化にともなって大きく変化しているものと考えられる。この他にも iPS 細胞への初期化の過程で、ES (embryonic stem, 胚性幹) 細胞と同様に DNA の脱メチル化、雌性 X 染色体の再活性化、テロメラーゼの活性化などが起こっているものと考えられる。また、Oct4, Sox2, Nanog とともに RNA のプロセシングに必要な Lin 28 を組み合わせても初期化が可能なることから、非コード RNA による初期化制御の重要性も強く示唆されている¹⁷⁾。初期化の機構の解明はまだ始まったばかりで、安全な iPS 細胞の実用化のためにも今後の進展が期待される基礎研究分野のひとつである。

5. おわりに

以上述べてきたように、患者様が iPS 細胞による再生医療を安心して受けられるようになるためには基礎研究を含めてまだまだ多くの努力が必要とされている状況だが、最近歯科の臨床においても iPS 細胞の研究に貢献できる可能性がでてきた。大串らは抜歯後凍結保存した親知らずの歯胚由来間葉系細胞に Oct4, Sox2, Klf4 をレトロウィルスで導入することにより iPS 細胞を樹立したことを広報している¹⁸⁾。手塚らもごく最近、同様の報告をしている (第8回再生医療学会総会)。間葉系幹細胞は完全に分化していないためか、前述の神経幹細胞と同様に初期化に c-Myc はいらないようである。これらの方法が確実なものになれば、捨てている親知らずを凍結保存しておいて、必要な時に iPS 細胞を樹立できるということになる。このようなシステムが確立すれば真のオーダーメイド再生医療の可能性は大きく前進す

ると思われる。ひょっとしたら近い将来、ごくあたりまえの歯科診療が iPS 細胞を使った再生医療の最前線のひとつになるかもしれない。

【参考文献】

- 1) Okita K, Ichisaka T and Yamanaka S: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317, 2007
- 2) Takahashi K, et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872, 2007.
- 3) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T and Yamanaka S: Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322: 949-953, 2008.
- 4) Hangfu D, et al.: Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 26: 1269-1275, 2008.
- 5) Feng B, et al.: Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol*, 11: 197-203, 2009.
- 6) Kim JB, et al.: Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136: 411-419, 2009.
- 7) Pesce M, Gross MK and Scholer HR: *BioEssays*, 20: 722-732, 1998.
- 8) Hochedlinger K, et al.: Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 121: 465-477, 2005.
- 9) Aoi T, et al.: Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321: 699-702, 2008.
- 10) Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal M, Weir G and Hochedlinger K: Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322: 945-949, 2008.
- 11) Yu J, et al.: Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, DOI:10.1126/science.1172482, 2009.
- 12) Wolten K, et al.: piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458: 766-770, 2009.
- 13) Kaji K, et al.: Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458: 771-775, 2009.

- 14) Silva J, et al.: Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal Inhibition. PLoS Biol, 6: e253, 2008.
- 15) Sridharan R, et al.: Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. Cell, 136: 364-377, 2009.
- 16) Kim J, et al.: An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. Cell, 132, 1049-1061, 2008.
- 17) Yu, J, et al.: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 318, 1917-1920, 2007.
- 18) 大串 始, 小田泰昭: 産業技術研究所 広報記事, http://www.aist.go.jp/aist_j/new_research/nr20080825/nr20080825.html