

iPS 細胞のメカニズムと安全で効率のよい樹立・維持法を追究

京都大学 iPS細胞研究所 初期化機構研究部門

中川 誠人 講師

iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell、人工多能性幹細胞) は、分化した細胞が初期化されて、ES 細胞 (embryonic stem cell、胚性幹細胞) と同様の多能性 (他の細胞に分化する能力) を獲得した人工の細胞である。2006 年、京都大学の山中伸弥教授らの研究によって、まずマウスの iPS 細胞が樹立され、また、翌 2007 年にはヒトの iPS 細胞の樹立が報告されている。京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA : Center for iPS Cell Research and Application) 初期化機構研究部門の中川誠人講師は、山中教授が奈良先端科学技術大学院大学に在籍していた頃からの研究室メンバーとして、この大きな発見の一端を担ってきた。現在、iPS 細胞が誘導されるメカニズムの解明に取り組み、臨床応用に向けて、安全で効率の良い樹立方法を研究している。

安全性と効率の向上に成功

iPS 細胞は、レトロウイルスを用いて 4 つの転写因子 (Sox2, Oct3/4, Klf4、および c-Myc) を皮膚の線維芽細胞に導入することで樹立された。

再生医療などへの応用を考えた場合、ES 細胞に比べると、胚が不要で、倫理的問題が少ない、また自己細胞からの樹立が可能であるため、移植した際の拒絶反応が少ないと推測されるというメリットがある。

一方で、iPS 細胞自体が無限に増殖する可能性があること、遺伝子導入が必要であること、c-Myc ががん遺伝子であることなどから、がん化の危険性が指摘されてきた。

実際、マウス iPS 細胞由来のキメラマウスを作製すると、60%程度と高頻度で、がんができることがわかっている。そして、その原因の一つは、レトロウイルスによって染色体に挿入された c-Myc の再活性化であることが明らかになった。

安全な iPS 細胞の樹立に向けて研究を進めた中川講師らは、早くも 2008 年にヒトとマウスの線維芽細胞から、それぞれ c-Myc を導入せずに iPS 細胞を樹立した。そして、その c-Myc を使わない iPS 細胞由来のキメラマウスには、がんがほ

とんどできないことも報告している。

「安全な iPS 細胞を高効率に樹立・維持するための理想的な因子の組み合わせを探索する目的で、4 因子のうち 3 つの因子を固定して使い、1 つを入れないというコントロール実験を行っていたら、c-Myc



“再生医療への応用は、神経細胞のような分化の研究が進んでいる細胞を使う方法から始まる” 中川 誠人 講師

を入れなくても iPS 細胞ができることがわかった」と中川講師。c-Myc はヒトやマウスでは、ほぼすべての細胞で発現しており、そのため、c-Myc を外から入れなくても iPS 細胞は誘導できたというわけだ。

ただ、外から c-Myc を導入する場合と比べると樹立の効率が低いというデメリットがあった。さらに、c-Myc の過剰発現と、がん抑制遺伝子 p53 の発現抑制が iPS 細胞の誘導を亢進させることも明らかになった。「c-Myc は不活性型のゲノムに結合して、遺伝子を活性化する働きがあるといわれている。Sox2 や Oct3/4 がゲノムに結合する際にも、c-Myc が介在するため、iPS 細胞の樹立には大きな役

割を果たしている。一方で、c-Myc には細胞分裂などを抑制し、細胞増殖を促進する働きがあり、がん化を進める可能性が考えられる。

このような研究結果から、中川講師らは、質の高い iPS 細胞を効率よく作るには Myc が必要と判断し、がん化のリスクを避けて、安全性を担保するために、c-Myc 代替因子の探索を行った。

そこで、Myc ファミリー遺伝子を調べたところ、マウスとヒトの両方に存在しているのは、c-Myc、N-Myc、L-Myc で、それぞれ主要な機能ドメインは共通しており、それ以外の領域には違いがあった。それぞれを導入して比較すると、ヒト iPS 細胞の樹立においては、

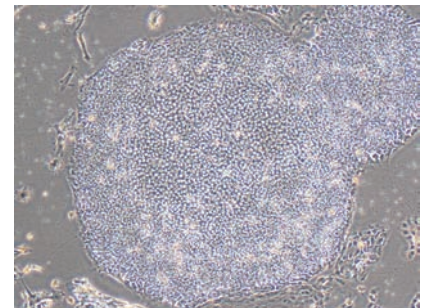


図 1 c-Myc に替え、L-Myc を用いて樹立したヒト iPS 細胞

提供：京都大学 iPS 細胞研究所 講師 中川誠人



図2 L-Mycを導入して樹立したiPS細胞をマウス初期胚の中に移植して誕生したキメラマウス

L-Mycではc-Mycよりも余分なコロニーが作られず、効率がよいことがわかった¹(図1)。また、キメラマウスを作製して観察しても、がん化はほとんど起こらなかった(図2、3)。L-Mycを用いて樹立したiPS細胞は臨床応用に一步近づいたといえるだろう。

現在、L-Mycの研究をさらに進めているところで、野生型L-MycはiPS細胞を効率よく作るが、あるアミノ酸を置換したL-Mycの変異体では効率が落ちるなど、新たな知見が出てきている。

最近、自身が関わったCiRA内での研究からも、「Sox2、Klf4、L-MycとLin28あたりが標準的な因子になるのではないかと予想する²。

ヒト以外の動物由来材料を使わない樹立・維持法を研究

iPS細胞の臨床応用に向けては、樹立や維持培養の過程で、ウシ血清やマウス由来フィーダー細胞など、ヒト以外の動物由来の材料を使わないことも重要になる。

CiRAではフィーダー細胞そのものを使わないヒトiPS細胞の樹立システムが出来上がりつつあり、今後、20世代30世代といった長い継代培養で、機能が維持されているのかを確かめるのは、中川講

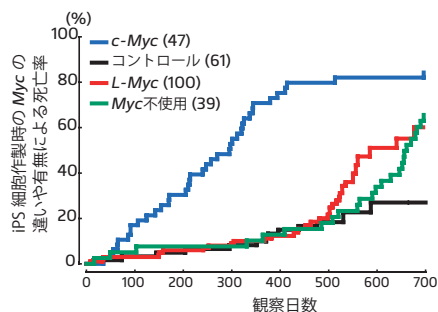


図3 L-Myc iPS細胞を用いて作製したキメラマウスの解析

出典：Proc Natl Acad Sci U.S.A. 10: 14152-14157, 2010. Masato Nakagawa et al.



ベックマン・コールター社『MoFlo™ Astrios™』と中川講師

iPS細胞の樹立のメカニズムの解明には、細胞ソーティングが欠かせない。iPS細胞になる可能性が高い細胞は細胞膜表面に現れる分子に特徴があり、それに対する抗体を入れてマーキングし、目的の細胞だけをソーティングする。「iPS細胞になる細胞は、1つの培養皿で培養した細胞中の0.01～0.1%程度で、マイクロアレイなどでの遺伝子解析をする際にも効率が悪い。ソーティングによって、iPS細胞になりそうな細胞だけを集めて解析すれば、今までわからなかった遺伝子発現などを効率よく発見できる可能性がある」。

中川講師は、世界最速の高速型自動細胞解析分取装置 MoFlo™ Astrios™ の第1号機のユーザー。「iPS細胞は通常の細胞よりも脆弱であるため、ソーティング中にダメージを受けやすい。“MoFlo”シリーズは細胞にやさしいのが特徴で、このMoFlo™ Astrios™はスピーディでセットアップも簡単に助かっている」と話す。最大7本のレーザーを搭載できるため、複数の表面抗原を同時に検知できるのも大きなメリットになっている。

師の役目になる。

「再生医療への応用は、神経細胞のような分化の研究が進んでいる細胞を使う方法から始まるのではないかと見ており、「iPS細胞樹立方法は次々開発されるが、ある程度の段階で樹立方法をいったん決めて、CiRA内にある細胞調整施設(Facility for iPS Cell Therapy: FiT)を稼働させるのが、今年度の目標」と語る。

また、患者さん由来の疾患特異的iPS

細胞の作製を進めて、疾患の解明、医薬品の薬効や毒性の試験などにも使うことも想定されており、樹立方法の標準化が待たれている。

中川講師らのiPS細胞の基礎研究は、多能性細胞の神秘の解明とともに、多くの患者さんへの福音につながっていく。

1. Masato Nakagawa et al. Promotion of Direct Reprogramming by Transformation deficient Myc. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 10: 14152-14157, 2010.
2. Keisuke Okita et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nature Methods 8: 409-412, 2011

お問い合わせ：
ベックマン・コールター株式会社
TEL: 0120-826-777
www.beckmancoulter.co.jp

