

ウイルスを使わないiPS細胞の樹立に成功!

沖田 圭介

マスメディアによって、連日のように報道されるiPS細胞の研究成果。今や、再生医療実現への期待が、広く一般市民にまで波及している。ただし、従来の手法で作ったiPS細胞には「がん化」の危険があり、医療への応用を阻む最大の壁として問題視されていた。このほど、京都大学iPS細胞研究センターの山中伸弥教授らのチームは、がん化の原因となっていたウイルス由来のベクターを使わずにiPS細胞を樹立することに成功。立役者となった同研究センターの沖田圭介助教に話を聞いた。

がん化の危険が高かった従来法

Nature Digest — これまでのiPS細胞研究の経緯は?

沖田 — 2006年に、私たちは、世界で初めてマウスの人工多能性幹細胞(iPS細胞)を作ることに成功しました¹。マウスの皮膚の細胞(線維芽細胞)に、多能性を維持するのに必要な遺伝子や細胞増殖を促す機能をもつ遺伝子を合計4つ(*Klf4*, *Sox2*, *Oct3/4*, *c-Myc*)導入し、すでにプロトコルが確立していたマウスのES細胞(胚性幹細胞)とほぼ同じ条件で培養したところ、うまく樹立できたのです。翌2007年には、ヒトの線維芽細胞に同じ4つの遺伝子を導入し、今度はヒトのES細胞の培養条件下で、ヒトiPS細胞を作ることも成功しました²。

ND — 「がん化の危険性」とは?

沖田 — 線維芽細胞は*Klf4*, *Sox2*, *Oct3/4*の3遺伝子に

よって分化の時計が逆戻りし(再プログラミングという)、残る*c-Myc*によって分裂・増殖のスイッチが入られると考えられます。実は、これらの遺伝子のうちの*c-Myc*は「がん原遺伝子」としても知られるもので、細胞中で過剰に活性化されるとさまざまながんを引き起こす可能性があるものです。問題なのは、この*c-Myc*を線維芽細胞に導入する際に、ウイルスのベクターを用いることでした。というのは、4つの遺伝子は細胞樹立の初期に機能すれば、その後は不要なのですが、ウイルスベクターは細胞に感染することで、これらの4遺伝子を線維芽細胞のゲノム中に組み込んでしまうからです。つまり、*c-Myc*は、細胞が再プログラミングを経て増殖・分化する過程で、常にゲノム中に存在することになります。偶発的に、どこかで不適切に活性化されると、細胞ががん化する可能性が極めて高いのです。

ND — 実際にどのようながんがみられたのでしょうか?

沖田 — 私たちは、がん化の危険性や頻度などを調べるために、マウスのiPS細胞を、別のマウスの受精卵(胚盤胞)に移植し、両方の細胞が混ざり合ったiPSキメラマウスを作製しました。このマウスの細胞の一部はiPS細胞由来なので、発生、成長する過程で高頻度にがんが認められるようなら、それは移植したiPS細胞に原因があることを示唆します。約50匹のiPSキメラマウスを作って観察したところ、頸部がん(ガングリオblastoma)などを発症するものが相次ぎ、ほかのがんもあわせると、生後3か月で約20%のマウスに、なんらかのがんができることがわかりました。

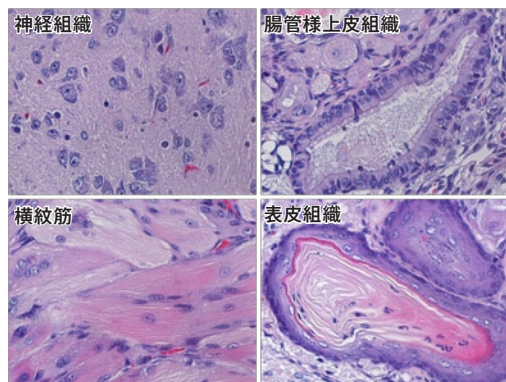


図1 従来どおりの多能性を示した、プラスミドによるiPS細胞。ウイルスベクター由来のiPS細胞と同様に、神経組織、腸管様上皮組織など、さまざまな細胞に分化・誘導することが示された。

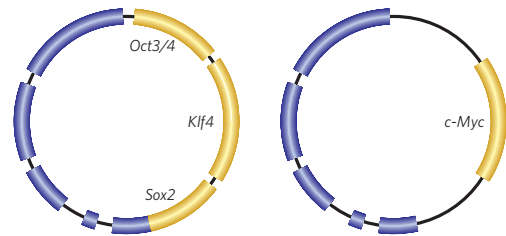


図2 プラスミドの設計図。「発現プラスミドベクター」とよばれるものを2つ用意し、1つには「*Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*」の3遺伝子をこの順番でつなぎ、間にそれぞれを効率よく発現させるための塩基配列を挟み込んだ。もう1つには、*c-Myc*だけを単独でつないだ。2つを同時に細胞に導入することで、それぞれの遺伝子から4種のタンパク質を作り出させることができた。

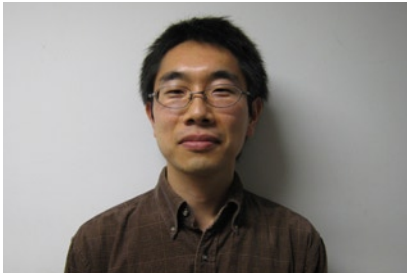
新手法のかぎは、プラスミド内での遺伝子のつなぎ方に

ND — それで、ウイルスベクターを使わない方法を考えられたのですね。

沖田 — そうです。ウイルスベクターの代わりにプラスミドを使って実験を行ったところ、同じようにマウスiPS細胞を作り出すことに成功したのです³(図1)。プラスミドは細菌などがもつ環状のゲノムで、すでに、ほ乳類の細胞などに外来の遺伝子を導入するために広く使われています。ただし、ウイルスベクターと異なり、プラスミドは導入先の細胞内で増殖したり、導入先のゲノム中に組み込まれることはほとんどありません。そして、しばらくすると自然に分解されてしまいます。

京都大学山中伸弥

京都大学沖田圭介



沖田 圭介(おきた・けいすけ)／京都大学物質—細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター助教。1975 年、奈良県生まれ。2000 年、北海道大学獣医学部卒。2004 年、熊本大学大学院医学研究科博士課程修了(田賀哲也教授)。2004 年、博士(医学)。2004～2006 年、独立行政法人科学技術振興機構研究員(山中伸弥教授)。2006～2008 年、独立行政法人日本学術振興会特別研究員(山中伸弥教授)。2008 年 3 月より現職。

2000 年に東京医科歯科大学大学院に入学し、教授の移動と共に熊本大学大学院へ転学する。造血組織の発生を研究し、*ELYS* という遺伝子の研究にて博士号を取得。2004 年には、当時の奈良先端科学技術大学院大学、山中研究室にポスドクとして参加し、ES 細胞の研究を始める。2007 年に ES 細胞のマーカー遺伝子である *Nanog* の発現を指標にして、マウス iPS 細胞が ES 細胞と同等の分化多能性をもつことを明らかにした。また、同時にレトロウイルスの使用によるがん化の問題を示した。現在は安全な iPS 細胞の作製方法の検討を続けている。

今回の成功のかぎは、プラスミド内で「Oct3/4、Klf4、Sox2」の 3 遺伝子をこの順番でつなぎ、間に特殊な塩基配列を挟み込んだ点にあるといえそうです。c-Myc だけは単独で別のプラスミドにつなぎ、計 2 個のプラスミドを線維芽細胞内に導入しました(図 2)。このようにしたのは、4 つの遺伝子を別々のプラスミドに入れてみたり、c-Myc 以外の 3 遺伝子のつなぎ方を変えたりと、試行錯誤した結果です。細胞内に入ったプラスミドは、それぞれの遺伝子を発現させ、独立した 4 つのタンパク質を作り始めることで、線維芽細胞を再プログラミングすることができました。しかも、遺伝子が発現してタンパク質が作られるのは短時間に限られるので、後になって c-Myc が突然活性化される可能性はなくなったわけです。

ND — がん化はみられなくなったのでしょうか？

沖田 — 今回も iPS キメラマウスを作り、経過観察しているところです。まだ未確定ですが、がんはほとんどみられないのではないかと考えています。生後 4 か月現在では、がんを発症したマウスはいません。

ND — 問題はほぼ解決したといえそうですか？

沖田 — 問題はまだまだいくつか残っています。例えばプラスミドを使うと、線維芽細胞がうまく iPS 細胞になる確率が大幅に減ります。ウイルスベクターを使っても iPS 細胞になる確率は 0.1% ほどしかありませんでしたが、プラスミドではさらにその 100 分の 1 ほどしかなく、100 万個の線維芽細胞を用意して 10 個の iPS 細胞ができるかどうかといった感じです。とはいえ、樹立の操作自体はむずかしいものではないので、同じ実験を 10 回繰り返し、そのうち 6 回で iPS 細胞を樹立することができました。今後は、プラスミドの代わりに何らかの化学物質を使ったり、「4 種のタンパク質そのもの」を導入する手法などが検討できるかもしれません。そのほかにも、iPS 細胞自体にまだ未説明のことがあり、ヒトに臨床応用するには、安全性に問題があります。例えば、iPS 細胞はさまざまな細胞や組織に分化できる「多能性」という点では ES 細胞とほぼ同じであるといえますが、両者には「ゲノム中でメチル化されている領域が異なる」といった、エピジェネティックな違いがあることがわかってきています。こうした点も解明し、より安全な iPS 細胞作りを進めたいと考えています。

自分の専門を生かせる iPS 細胞の利用を

ND — 山中研究室はどのような構成なのでしょう？ 入室希望者が殺到しているのでは？

沖田 — 現在は、山中教授の下に、30 歳代前半の助教が 3 人います。そのほか、ポスドク、大学院生、実験補助員、機材関連のスタッフなどで、総勢で 40 人強になります。各自が自分のテーマに沿って研究を続けており、私は、まず iPS 細胞を ES 細胞に近づける再プログラミングの研究をして成功し、続いて、がん化を防ぐためにウイルスベクターを使わない方法を開発したところです。研究室内では、時間が許す限り、週に一度各自のデータをもち寄ってディスカッションするようにしています。入室を希望する方は多いと聞いていますが、iPS 細胞研究センターの設立とともに、研究をサポートしてくれるスタッフが配置されたので、問い合わせやメディアの対応はそちらが担当してくれています。私たちの手法は、技術的にむずかしいということはないので、基本的な細胞培養技術をもつ方なら誰でも行えると思います。これから iPS 細胞を使おうと考えている方には、「自分の専門分野に、どのように iPS 細胞を生かせるか」を考えてほしいと思います。iPS 細胞自体の扱いや操作が容易だからこそ、確固たる自分の専門が必要だと感じます。

ND — 今後の目標は？

沖田 — iPS 細胞の利用は、2 つ考えられると思います。1 つは、患者さんの期待が大きい、再生医療への応用です。iPS 細胞から分化させた正常な細胞を補充することで、病気や事故で失った組織や臓器(心臓、脊髄、造血など)の機能を取り戻させようというものです。もう 1 つは、患者さんの iPS 細胞から病気の細胞を作り出し、それを使って、発病のメカニズム解明や創薬研究を行おうというものです。後者の方が早く実現すると思いますが、いずれにしても、私は患者さんを救うために使えるより安全な iPS 細胞作りをめざして研究を続けたいと考えています。

ND — ありがとうございます。 ■

聞き手は西村尚子(サイエンスライター)。

1. Takahashi K, Yamanaka S. *Cell* **126**, 663-676(2006)
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. *Cell* **131**, 861-872(2007)
3. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. *Science* **322**, 949-953(2008)