

FAST AND FURIOUS

疾走するiPS細胞研究

Nature Vol. 458(962-965)/23 April 2009

iPS細胞の研究はスタートして3年あまりが経過し、まさに疾走・爆走状態となっている。Monya Bakerが、これまでの経過と今後の課題をさぐる。

2007年初春、山中伸弥・京都大学教授は、iPS細胞（人工多能性幹細胞）の研究レースで、余裕をもって好スタートが切れたと感じていた。ありふれたマウスの体細胞からES細胞（胚性幹細胞）によく似た細胞を世界で初めて作製し¹、まだ半年も経っていなかった。山中の成果に対しては、畏敬の念と疑念が相半ばしていた。それでも、細胞のアイデンティティがこれほど柔軟に変化すること、具体的には、わずか4種類の胚性遺伝子を挿入するだけで、ほぼすべての体組織に分化しうる細胞に再プログラム化できることを、心から信じる者は当時ほとんどいなかった。

山中たちが樹立した細胞が正真正銘の多能性細胞であるためには、これがどんな種類の細胞にも分化でき、したがって、精細胞や卵細胞の形成にも寄与し、新たな世代の動物の発生に関与しうることを示さ

なければならない。多くの人々に納得してもらうためには、さらに成果を積み重ねる必要があることは、山中自身にもわかっていた。そして実際、山中は、作製方法に改良を加えて2007年6月6日に次の論文を発表した²。彼にとって予想外だったのは、同じ日に別の2つの研究室が同じ成果を発表したことだった^{3,4}。「最初の論文発表から10か月足らずのことだったので、ものすごく驚きました。同時にとても恐ろしくなりました」と当時を思い起こす。

2006年の8月にiPS細胞という研究分野を開拓した時、この研究に携わっていたのは、京都大学の山中の研究室だけだった。しかしその後、Addgene社（米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）が製造する再プログラム化用の各種ベクター製品に対して、実に1000以上の研究室から6000件以上の注文が寄せられた。ハー

バード大学は、トロント大学や京都大学と同様、iPS研究の専用施設を設立した。こうして現在（2009年）は、研究がさらに急ピッチで進展し、競争もさらに激化すると予想されている。この3月だけでも、再プログラム化技術の大きな改良を報告する4本の論文が*Nature*、*Cell*、*Science*に掲載されている⁵⁻⁸。

研究を加熱させるiPS細胞のメリット

こうした熱気には無理からぬ事情がある。iPS細胞では、ES細胞と同じ幹細胞治療・薬剤スクリーニング・疾患モデルの作製などができ、しかもES細胞に伴う倫理的・技術的問題の大半を回避できるとみられているからだ。初期のヒトES細胞研究の多くは、ヒトの胚を入手できる科学者だけが進めていた、とシェフィールド大学（英国）の幹細胞科学者 Peter Andrews は

指摘する。それが iPS 技術の発明によって「有能な分子生物学者や細胞生物学者であれば誰でも参入できる研究分野になった」のだ。1981年に初めてマウス ES 細胞が単離されてからヒト ES 細胞の単離までに 17 年の歳月を要したが、iPS 細胞の場合、マウスからヒトまで、わずか 15 か月だった。注目すべきことは、患者と適合するヒト ES 細胞は作られていないが、iPS 細胞では、既にそれに相当する目標が達成されている点だ。糖尿病、ハンチントン病、筋ジストロフィー症の患者から iPS 細胞が作られているのである⁹。

次の目標は、より多くの疾患に対して疾患特異的 iPS 細胞を作製することであり、より安全でより効率の高い作製法を開発することである。この明確な目標に向かって、生物学者はしのぎを削っているわけだ。しかし「この状況は健全ではありません。過熱しすぎです。研究室では、来る日も来る日も、先を越されないかびくびくしているんですから」。こう話すのは、ES 細胞と iPS 細胞研究の第一人者であるホワイテッド生物医学研究所（米国マサチューセッツ州ケンブリッジ）の Rudolf Jaenisch だ。研究者は準備もそこそこに

論文を大急ぎで発表し、成果を共有することには消極的である。「どの研究者も似たような研究をしているため、投稿した論文や印刷中の論文について、あまりオープンな話をしません」と Jaenisch は話す。

その結果、「再プログラム化の作用機構や、再プログラム化された細胞の正確な治療効果など、重大な問題点を見失うおそれがあります」とスクリプス研究所再生医学センター（米国カリフォルニア州ラホーヤ）の Jeanne Loring センター長は警告する。「細胞を作製することが終着点なのではありません。新たな知見が得られないなら、そんな細胞に価値はないことを知るべきです」と Loring。

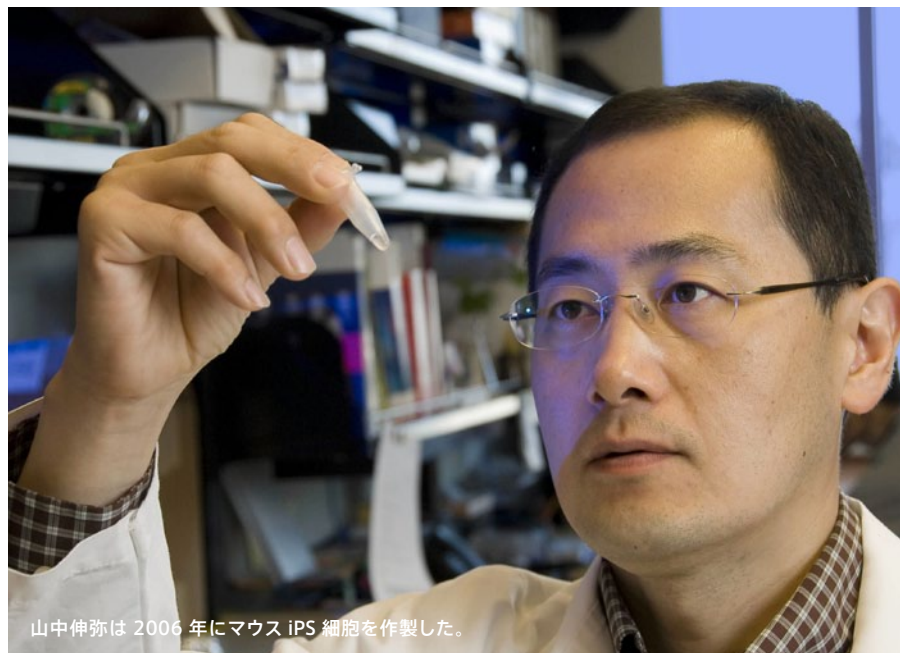
ヒトの疾患研究と治療に関して、iPS 細胞は、ES 細胞よりもはるかに有用なものとなる可能性が高い。iPS 細胞を使えば、究極的には、患者の体から細胞を取り出し、それを処理して治療用細胞に変え、拒絶反応のリスクなしに同じ患者の体内に戻す方法が考えられるからだ。既に、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症などの神経変性疾患の患者から作製された iPS 細胞がニューロンに転換されている^{10,11}。マウスの実験では、その先の段

階に進んでおり、血液細胞や神経細胞が作製され、それを利用して、鎌状赤血球貧血とパーキンソン病のマウスモデルの症状が改善された^{12,13}。一方の疾患研究の面では、より直接的な恩恵が期待される。例えば脳や心臓疾患の研究者は、厳密な実験を行うには十分な量の組織を生検や死体から得なければならないが、もちろん現実には限りがある。しかし、患者から作製された iPS 細胞であれば、供給量に制限はなく、シャーレで疾患過程の研究ができると期待されているわけだ。

より安全で効果的な作製法をめざして

しかし当初の 2 年間、研究者は、iPS 細胞の作製法の改良にかかりつきりだった。山中は、ウイルスを用いて遺伝子を成体細胞のゲノムに挿入し、成体細胞の再プログラム化に必要な遺伝子を探索した。具体的には、ES 細胞で発現する 24 種類の遺伝子を使って実験を進め、4 種類の遺伝子 (*c-Myc*, *Klf4*, *Oct4*, *Sox2*) を突き止めた。細胞が多能性を備えると、こうした遺伝子の活性は弱まるが、一方で、遺伝子の挿入により、iPS 細胞には ES 細胞よりも予想外のことが起こりやすくなり、危険性も高まると考えられている。例えば、がん遺伝子 *c-Myc* を使って再プログラム化された細胞をマウス胚に組み込んだ実験では、マウスはがんを発症して死んだ¹。また、山中の未発表研究では、*c-Myc* を使わずに再プログラム化された細胞から作製したマウスは、寿命が短くなることが示されている。

より安全性が高く、より効果的な細胞再プログラム化の方法を開発するための研究が急ピッチで進められている。それに伴い、傑出した研究論文も相次いで発表されることが多くなった (p.14 「画期的な研究成果」参照)。研究の目標は、ゲノム損傷の危険を伴う遺伝子挿入をせずに、細胞の再プログラム化を達成することだ。去る 3 月、複数の研究グループが、役目を終えた再プログラム化用遺伝子を切除する方法を発表したが、その 1 つが



山中伸弥は 2006 年にマウス iPS 細胞を作製した。

Jaenisch をリーダーとする研究グループだった⁷。その3週間後には、ウィスコンシン大学マディソン校の James Thomson らが、遺伝子挿入を全く必要としない方法で、ヒト細胞の再プログラム化に成功し、*Science* に報告した⁸。これは、染色体に組み込まれないプラスミドという環状 DNA を使って、多能性遺伝子を細胞に組み込む方法である。

それでも、さらにすぐれた方法をめざして、研究は続けられている。現在の再プログラム化の方法では、細胞が、生理的に正常な状態から相当にかけ離れた状態に無理やり変えられている可能性があり、細胞が病的状態に陥ることを研究者は心配している。再プログラム化の過程では、腫瘍抑制経路が阻害され、発がん経路が活性化される、とスクリプス研究所の化学者 Sheng Ding は説明する。また、この過程では、遺伝子の活性化を個別的に制御する「エピジェネティックな」目印をつける細胞過程も阻害される。「細胞は、非常にストレスのかかる条件下に置かれています。それなのに、この隠れた問題が議論されていないのです」と Ding は言う。

Ding をはじめ多くの研究者は、現在の方法を改良して、多能性状態へゆるやかに移行させる研究を進めている。その中から、薬剤に近い分子を添加し、また、特定のタイプの細胞に絞って再プログラム化を行うことで、再プログラム化に使用する遺伝子のタイプと数が減らせること、再プログラム化率を上げられることがわかった。2009 年末までには、再プログラム化用遺伝子を全く使わず、その代わりに小型の分子とタンパク質を組み合わせ使用し、iPS 細胞を作製する方法が複数発表されるだろう、と多くの研究者は予想する。

それでも、治療目的に使う細胞の安全性を確保するには不十分だ、と Thomson は言う。どのような方法による場合でも、再プログラム化には、突然変異や厄介なエピジェネティック変化の危険性がある。「再プログラム化を化学的に行うか、遺

伝学的に行うかにかかわらず、作製された細胞のゲノムを徹底的に調べなければならぬのです」と Thomson は話す。この点は山中も同じ考えで、次のように説明する。「iPS 細胞を作る時に使う遺伝子の数を減らし、あるいはゼロにして、その代わりに化学物質を使えば、iPS 細胞の安全性が高まると誰もが考えがちですが、本当にそうなのかどうかはわかりません。結局は1つ1つのクローンを調べなければならぬのです。iPS 細胞を誘導する方法を改良するのは大事ですが、確立された iPS 細胞の評価法の方がはるかに重要なのです。この点は、いくら強調してもしすぎることはないと思います」。

研究ターゲットがこの種の評価法にシフトを始めるだろう、と研究者は予想する。「いろいろな方法を比較して、最もうまくいく方法を採用することになると思います」とハーバード幹細胞研究所の Konrad Hochedlinger。ただし「最良の方法」は、用途によって異なると考えられる。再プログラム化用遺伝子の挿入による iPS 細胞作製法は、所要時間が短く、技術的難易度も低い。したがって、他の再プログラム化法を持たない研究室であれば、当然、選択肢の1つとして残るであろう。

iPS 細胞の比較・評価法をめざして

研究者は、iPS 細胞どうしの比較や、iPS 細胞と ES 細胞の比較もめざしている。ES 細胞は「真の標準」と見なされている。ES 細胞は10年以上も研究されてきており、すべて胚が起源であることから、さまざまなタイプの組織から樹立された iPS 細胞よりもばらつきが少ない、と考えられるからだ。

Jaenisch が最近 *Cell* に発表した論文では、再プログラム化用遺伝子が切除される前と後で、iPS 細胞の特性がどう変わっているか、解析結果を報告している⁷。再プログラム化用遺伝子が残存する iPS 細胞では、271 個の遺伝子の発現が ES 細胞と異なっていたが、一方、再プログラ

ム化用遺伝子が除去された iPS 細胞では、発現の異なる遺伝子は48個に減っていた。理由はわかっていない。「iPS 細胞は ES 細胞ほどには成果が得られないとか、iPS 細胞は ES 細胞とは違う、といった事例はすいぶんあるのですが、いずれも未発表です」と Jaenisch。iPS 細胞は胚に由来していないので、もともと独自の存在なのかもしれない。あるいは、現在の iPS 細胞作製法が不適切なために iPS 細胞と ES 細胞が異なっているとも考えられる。

今のところ、iPS 細胞の評価法については研究者の意見は一致していない。最も厳格な再プログラム化の検証方法は、再プログラム化されたマウス細胞を胚に挿入し、その胚を代理母に移植して、生まれたキメラマウスを成体になるまで育て、その体内で産生された精子や卵で健康な子孫が生まれるかどうかを調べることである。つまり iPS 細胞から全く新しい胚が生じれば、当初の細胞の生物学的設定が初期化されたことが確認されるわけだ。

しかし、このような検証をヒトで行うことは倫理的に認められない。そこで、ヒト ES 細胞のアッセイを借用したものが、現在の標準的なアッセイとなっている。すなわち、ヒト iPS 細胞を免疫不全マウスに注入し、6～8週間後に奇形腫という腫瘍を形成するかどうかを調べるのである。自然発生する奇形腫の中には、分化した組織の塊（例えば毛髪や骨）に成長するものがあるが、このアッセイで移植された細胞が iPS 細胞と認定されるには、主要な種類の組織すべてに分化している細胞の塊を観察できることが要件となっている。ただし、外観と表面マーカーの点で完全に再プログラム化されたように見える細胞でも、奇形腫を形成しない事例は決して珍しくない、と研究者は話している。

一部の研究者は、iPS 細胞の認定と言うからには、奇形腫形成能の実証を要件とすべきだ、と考えている。この分野の第一人者であるボストン小児病院（米国マサチューセッツ州）の George Daley は「あ

画期的な研究成果



2006年8月

山中伸弥が、4種類の遺伝子を用いて、マウス iPS 細胞 (人工多能性幹細胞) を初めて作製した¹。



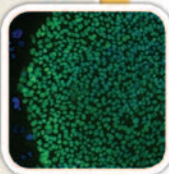
2007年6月

マウス iPS 細胞をもとに全種類の細胞を作製できることが実証された²⁻⁴。



2007年11~12月

ヒト細胞に多能性が誘導された¹⁶⁻¹⁸。



がん遺伝子 c-Myc なしでも再プログラム化できることが実証された^{19,20}。

著作権等の理由により画像を掲載することができません。

iPS 細胞でマウスの鎌状赤血球貧血が治癒した¹²。

2008年8月

ヒト iPS 細胞が複数種類の疾患の患者から作製された^{9,10}。

著作権等の理由により画像を掲載することができません。

著作権等の理由により画像を掲載することができません。

2008年9~10月

2つの研究グループが、検出可能な DNA 組込みなしにマウス細胞の再プログラム化を行った^{21,22}。

2008年12月

神経変性疾患患者由来の iPS 細胞により、シャーレ上での疾患モデル作製が可能なが示唆された¹¹。



2009年3月

再プログラム化用遺伝子が iPS 細胞から除去された⁵⁻⁷。

遺伝子組込みを行わずにヒト iPS 細胞が再プログラム化された⁸。

著作権等の理由により画像を掲載することができません。

る一定の水準を確保しなければ、文献が混乱する」と言う。特に、この分野は始まったばかりだし、手法も開発段階にある状態なので、“ES 細胞に典型的な何々のマーカーを発現しているから iPS 細胞だ”と認定するのは危険だ、と彼は言う。「幹細胞性 (stemness) の性質を何かしら備えていれば iPS 細胞と呼ぶとすれば、どういふことになると思いますか。iPS 細胞という用語が高潔さを失い始めます」と Daley は警告する。

実用化をめざした課題

一方、現実問題として、1つの細胞株からすべてのタイプの細胞に分化できるかどうか問題とされない場合もある。例えば、奇形腫を形成できないが、肝細胞に分化する傾向が非常に強い iPS 細胞は、肝疾患モデルの作製には適切で、臨床使用における安全性も高い可能性がある。それに奇形腫アッセイは多額の費用もかかる、とオンタリオ・ヒト iPS 細胞研究所 (カナダ、トロント) の William Stanford は言う。彼の研究グループは、トロント小児病院の患者から疾患特異的な細胞株を作製しており、細胞株を作製するための試料より、再プログラム化のために提出される試料の方が多くなることを既に予想している。「作製する細胞株を減らして、すべての細胞株について奇形腫試験を行うべきか、それとも、作製する細胞株を増やすべきなのかを議論しました」と彼は言う。その結果、作製する細胞株を増やすことに決めた。Stanford らは、分化初期における遺伝子発現試験と *in vitro* 試験を用いて再プログラム化細胞の多能性を評価するが、それ以上の特性分析については、原則として、後にその細胞を使用する個々の研究室に委ねることにしたのだ。

iPS 細胞自体の評価のほかにも、iPS 細胞から作製され、細胞治療、薬剤スクリーニングやその他の用途に利用できる可能性のある分化細胞を、厳格かつ長期的に評価することをめざした研究も進められて

いる。均一な分化細胞試料を入手するのが難しいため、この種の評価に関する研究論文はいまだに発表されていない、と Jaenisch は話す。それでも、薬剤スクリーニングや疾患モデルの作製の際に、研究者は、iPS 細胞由来のニューロンや心筋細胞が、正常な脳や心臓の細胞と同じように老化し、病気にかかることを覚悟しておく必要はあるだろう。また、細胞治療の際には、研究者は、細胞が安定しており、腫瘍を形成する恐れのある iPS 細胞の残りが含まれていないことを確認できなければならない。この腫瘍形成の可能性については、ES 細胞でも評価が行われている。

このような評価が行われた iPS 細胞であっても、臨床使用までには、いくつかの非常に厄介な問題が残る。規制当局者に対しては、iPS 細胞のリスクが許容できる程度に低く、しかも移植された細胞が体内で生存し、疾患に冒された脳や脾臓の機能を実際に増進する可能性があることを、納得させる必要があるわけだ。この1月にヒト ES 細胞に由来する細胞の臨床試験が承認されたが、ヒト ES 細胞が初めて作製されてから10年以上の時間が流れている。遺伝子組換えをせずに iPS 細胞を作製できるようになった今、臨床試験承認までの期間は相当に短縮されるかもしれない。山中は、iPS 細胞が3~4年以内に薬剤スクリーニングと薬剤毒性試験に広く用いられるようになって考えており、10年後には臨床試験が行われることを期待している。

こうした研究の相当部分は、主として企業が手がける可能性が高く、既に数社が、iPS 細胞の実用化分野で市場独占を狙っている。新興のバイオテクノロジー企業 iZumi Bio 社 (米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) の最高経営責任者 John Walker は、多くを語らないが、現状では、細胞治療ではなく薬剤の試験に重点を置いた事業展開を行うことを明らかにした。同社は、ウィスコンシン大学卒業生研究財団 (米国マディソン) などと

もに、iPS細胞とiPS細胞作製法に関する知的財産権訴訟を提起した。iPS細胞の作製法が次々と発表されるにつれて、知的財産権の状況は「ヒトES細胞の10倍も複雑化している」とカリフォルニア大学バークレー校法律・経営・経済センター（米カリフォルニア州）のディレクター Ken Taymor は明かす。

科学の状況もますます複雑化している。生物学者は、ある1つのタイプの分化細胞を別の分化細胞に転換するには、いったんES細胞のような多能性状態に戻さなければならない、と長い間考えてきた。ところが、最近の研究報告では、多能性状態に戻らずに1つのタイプの細胞から別のタイプの細胞に直接転換することが可能だとされた。この2008年の研究成果で大いに称賛されたのが、ハーバード大学の発生生物学者 Doug Melton である。彼は、膵臓細胞にいくつかの膵臓遺伝子を挿入すると、インスリン産生β細胞の外観を帯び、その機能を果たすように変わることを実証した¹⁴。

再プログラム化の進む方向が「逆向き」か「横向き」はさておき、研究者は、その過程の解明をめざしている。そもそもこの点が未解明だったので、功成り名を遂げた科学者の多くが、iPS細胞の分野に参入したのだった。1950年代の核移植によるカエルのクローン作製や1996年のクローンヒツジの「ドリー」がなければ、再プログラム化の実験に取り組もうとは思わなかった、と山中は述懐している。それ以前は、遺伝子が不可逆的に不活化し、あるいは細胞の発生が進むと切除されるのではないかと一部の研究者は考えていた。成体細胞から作られたクローンであるドリーの研究で、たとえば哺乳類の分化細胞であっても、遺伝子が無傷のまま保持され、再プログラム化できることが明らかになったのだった。

再プログラム化過程の解明がカギ

再プログラム化の概要は、既に判明している。細胞内のクロマチンというDNAと

タンパク質の複合体においてDNAとタンパク質のもつれがほどかれ、そしてエピジェネティックな目印が再編成されて、分化細胞で活性化していた遺伝子の発現が抑制され、ES細胞で活性化する遺伝子が発現するようになる。こうして発現した遺伝子は、大量のタンパク質を動員し、細胞内機構を別の状態に変化させる。これらの各段階が、いつどのように起こるのかについては、精力的な研究活動にもかかわらず、なお解明には至っていない。iPS細胞の研究が成熟して、この点の研究が重点的に進められるようになることを、多くの研究者が望んでいる。iPS細胞を使えば、「再プログラム化の実際の仕組みを探究できます。この論点は、今から50年前に提起されたものですが、今も手かぎはありません」とHochedlingerは話す。

iPS細胞があるからといって、問題の解明が楽になるわけではない。一例をあげれば、目的の細胞を正しく単離することが難しいのである。一般に、iPS細胞の作製実験で、再プログラム化の成功率は細胞1000個中1個にも満たない。たとえば多能性遺伝子が活性化していても、一部の細胞は、分化状態にとどまっている¹⁵。「中間的な状態が解明されていないことが問題なのです」。こう話すのは、カリフォルニア大学ロサンゼルス校の細胞生物学者 Kathrin Plath である。彼女は、遺伝子発現解析と細胞形態解析によって、完全な再プログラム化の途中で立ち往生しているように見える細胞の一部を調べている。「部分的に再プログラム化された細胞は、その由来にかかわらず、どれも非常によく似ています。これが実際の再プログラム化過程で生じる正真正銘の中間体なのか、それとも脇道にそれってしまったものなのか、誰にもわかりません」とPlath。

再プログラム化過程の解明は、単なる学究活動ではない。さまざまな細胞状態や細胞が1つの状態から別の状態に移行する過程を解明すれば、こうした細胞の移行を支障なく誘導する方法や、治療に

必要なタイプの細胞を作製する方法の改良に役立つかもしれないからである。

組み換えDNAやRNA干渉といった生物学の研究分野がスタートした時も、今回のように息もつけぬ時期があった。こうした時期を知る研究者は、現在のすさまじいペースや激しい競争が徐々におさまる可能性が高いと予想している。再プログラム化の方法を大急ぎで最適化しようという動きはなくなり、科学者の関心は、特定のタイプの疾患やより基礎的な研究テーマに枝分かれしていくだろう、と南カリフォルニア大学幹細胞・再生医療研究所（米ロサンゼルス）のMartin Pera所長はみている。「研究活動は多様化し、共同研究が多くなると思います」と彼は言う。

共同研究が多くなるかどうかは別として、iPS細胞をめぐる競争は、新たな、そして、より知的に報われるかもしれない段階へと向かって進んでいる。これまでは「とにかく技術、技術、技術でした。でも興味深い研究テーマの解明に取り組む段階が近づいています。特に難題となるのは、生物学的な論点だと思います」とJaenischは話している。（菊川要 訳）

Monya Baker は、Nature Reports Stem Cells のエディター。

1. Takahashi, K. & Yamanaka, S. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
2. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. *Nature* **448**, 313-318 (2007).
3. Wernig, M. et al. *Nature* **448**, 318-324 (2007).
4. Maherali, N. et al. *Cell Stem Cell* **1**, 55-70 (2007).
5. Woltjen, K. et al. *Nature* **458**, 766-770 (2009).
6. Kaji, K. et al. *Nature* **458**, 771-775 (2009).
7. Soldner, F. et al. *Cell* **136**, 964-977 (2009).
8. Yu, J. et al. *Science* advance online publication doi:10.1126/science.1172482 (26 Mar 2009).
9. Park, I. H. et al. *Cell* **134**, 877-886 (2008).
10. Dimos, J. T. et al. *Science* **321**, 1218-1221 (2008).
11. Ebert, A. D. et al. *Nature* **457**, 277-280 (2009).
12. Hanna, J. et al. *Science* **318**, 1920-1923 (2007).
13. Wernig, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5856-5861 (2008).
14. Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. & Melton, D. A. *Nature* **455**, 627-632 (2008).
15. Mikkelsen, T. S. et al. *Nature* **454**, 49-55 (2008).
16. Yu, J. et al. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
17. Takahashi, K. et al. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
18. Park, I.-H. et al. *Nature* **451**, 141-146 (2008).
19. Wernig, M., Meissner, A., Cassidy, J. P. & Jaenisch, R. *Cell Stem Cell* **2**, 10-12 (2008).
20. Nakagawa, M. et al. *Nature Biotechnol.* **26**, 101-106 (2008).
21. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. & Hochedlinger, K. *Science* **322**, 945-949 (2008).
22. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. *Science* **322**, 949-953 (2008).