



2012年ノーベル生理学・医学賞受賞記念

人工万能幹細胞(iPS細胞)の樹立と課題

山中伸弥, 高橋和利 京都大学 iPS 細胞研究所

※京都大学 iPS 細胞研究所 山中伸弥先生のノーベル生理学・医学賞受賞を記念いたしまして、2006年 Cell 誌に iPS 細胞樹立の論文を発表された際にご寄稿いただいたショートレビューを再掲載いたします。

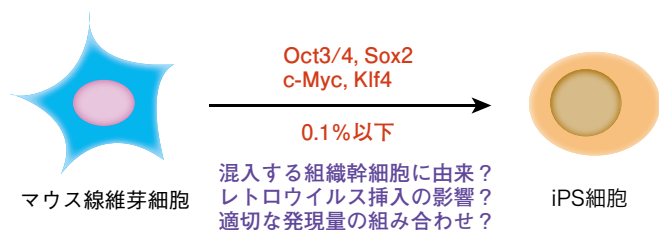
初期胚から樹立する胚性幹細胞 (ES細胞) は、様々な細胞へと分化する多能性とほぼ無限の増殖能を持つ。患者自身の体細胞から、ES細胞に類似した幹細胞を樹立できたら、拒絶反応のない細胞移植治療につながる。体細胞の核が、ES細胞と融合することにより多能性細胞の核と近い状態になることは、ES細胞の中に多能性誘導因子の存在することを示唆する¹⁾。これらの因子の多くは、ES細胞の多能性を維持する因子と同一であると仮説を立て、その探索を開始した。

マウスES細胞における多能性維持因子としては、サイトカインLIFの下流で作用する転写因子STAT3や、多能性細胞で特異的に働いている転写因子Oct3/4やSox2が知られている。また、c-Mycやβ-カテニンなどの腫瘍関連因子の重要性も報告されている。筆者らはこれらに加えて、ES細胞で特異的に働いている遺伝子群を同定し、ECAT (ES cell associated transcript) と名付けた。この中でECAT4 (Nanog) はホメオボックス転写因子であり、Oct3/4やSox2と同様にES細胞と初期胚の多能性維持に必須であることを報告した²⁾。NanogやSTAT3の下流因子を探索する過程で転写因子Klf4がマウスES細胞の多能性維持を促進することも見いだした(徳澤ら; 未発表)。これらの研究をもとに多能性誘導因子の候補として24因子を選んだ³⁾。

候補因子を評価するために、ECATの1つである*Fbx15*遺伝子を利用した。*Fbx15*はOct3/4とSox2による転写制御を受け、初期胚とES細胞で特異的に発現するが、多能性維持やマウス発生には必須でない⁴⁾。*Fbx15*遺伝子のコーディング領域を、βガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子(βgeo)と置き換えたホモ変異(*Fbx15*^{βgeo/βgeo}) ES細胞はきわめて高濃度(12mg/ml)のG418に耐性であった。一方、*Fbx15*^{βgeo/βgeo}マウスの体細胞はG418感受性であった。*Fbx15*^{βgeo/βgeo}マウスの体細胞に候補因子を導入して多能性が誘導されると、G418耐性を獲得すると期待した。

Fbx15^{βgeo/βgeo}マウス由来の胎児線維芽細胞(MEF)に初期化因子候補をレトロウイルスにより導入した。複数因子の組み合わせが必要である可能性も考えられたので、因子を1つずつ導入するのに加えて、24因子のレトロウイルスの混合投与も試みた。細胞によってまったくウイルスが入らないもの、1因子のみ入るもの、2因子が入るもの、3因子が入るもの……と様々な組み合わせでウイルスが入り、偶然にも必要な因子が揃って入った細胞が、ES細胞様になりG418耐性コロニーを形成することを期待した。

Fbx15^{βgeo/βgeo}MEFにウイルスを投与し、ES細胞培養の条件でG418による選択を行い、コロニーが形成されるかを



■ 図1 iPS細胞の誘導

*Fbx15*遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子をノックインしたマウスの線維芽細胞に、Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4の4因子をレトロウイルスで導入し、G418で選択することにより多能性幹細胞(iPS細胞)が樹立できる。しかし、4因子を発現する線維芽細胞のうち0.1%以下しかiPS細胞にならない。原因としてはいくつかの可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

■表1. 体細胞において多能性を誘導する3技術の比較

	卵子, 胚の利用	ヒトでの成功例	腫瘍化	特記事項
核移植	+	-	+	クローン人間
細胞融合	+	+	++	四倍体
iPS細胞	-	-	++	レトロウイルス, c-Myc

青は臨床応用にとって長所となる点を、赤は短所となる点を示している。

見守った。単独投与ではまったく形成されないが、24因子の混合投与では複数のG418耐性コロニーが形成された。これらのコロニーから樹立した細胞は、形態と増殖能においてES細胞に類似し、ES細胞マーカー遺伝子の発現も認められた³⁾。また、*Fbx15* 遺伝子プロモーター領域はES細胞と同様に低メチル化状態にあることがわかった。ヌードマウスの皮下に移植すると、神経、筋肉、消化管様組織など三胚葉系の各種組織を含む奇形腫を形成したことから、この細胞を誘導多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS cells) と名付けた。

次に必要な因子の絞り込みを行った。24因子の組み合わせ

せからOct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4の1つでも除外するとiPS細胞を樹立することはできなかった。一方、これら4因子をMEFやマウス成体皮膚由来の線維芽細胞培養に導入するとiPS細胞が樹立された(図1)。

iPS細胞は卵子や胚を用いないという利点がある。しかし、ヒト細胞で同じことが起こるかは不明であるし、c-Mycやレトロウイルスを使用することから安全面での課題も多い(表1)。各因子の作用機序は不明で、4因子を発現してもごくわずかの細胞しかiPS細胞にならない(図1)。これらの様々な問題点を1つずつ克服し、再生医学への応用を目指したい。

文献

- 1) Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T: *Curr Biol* (2001) 11: 1553-1558
Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.
- 2) Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S: *Cell* (2003) 113: 631-642
The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.
- 3) Takahashi K, Yamanaka S: *Cell* (2006) 126: 663-676
Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.
- 4) Tokuzawa Y, Kaiho E, Maruyama M, Takahashi K, Mitsui K, Maeda M, Niwa H, Yamanaka S: *Mol Cell Biol* (2003) 23: 2699-2708
Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development.

～ Special Comments ～

【貝淵弘三 教授 (名古屋大学)】

山中先生、ノーベル生理学・医学賞受賞、誠にありがとうございます。奈良先端科学技術大学院大学に同時期に在籍し、親しくさせていただいている者としてたいへん嬉しく、また誇りに思います。山中先生は、遺伝子教育研究センターの助教授として1999年12月に着任されましたが、そのジョブセミナーでのプレゼンテーションはとても印象深いものでした。内容がわかりやすく情熱が伝わるだけでなく、独特のユーモアを交えて話される姿は今と変わりません。この人にかけてみようと思わせるものがありました。着任後、ES細胞の研究に着手され、苦勞してERasとNanogの仕事を発表されました。その後、このiPS細胞樹立の論文を発表されたことは皆様もご存じの通りです。山中先生の優れたアイデアとリーダーシップはもちろんですが、学生・スタッフ、設備・機器、研究費に恵まれたことが大きな成果につながったと思います。若手研究者に大きな希望を与える受賞だと思えます。

【岡野栄之 教授 (慶應義塾大学)】

2012年のノーベル生理学・医学賞は、"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent", すなわち「体細胞の初期化と多能性の獲得」という授賞理由で、山中伸弥先生と英国のJohn Gurdon卿の御受賞が決定しました。Gurdon卿のクローンカエルの話は私が学生のころから知っていましたが、この現象の深さには計り知れないものがあると感じていました。一方、大胆かつ緻密な方法で遺伝子導入により成体の体細胞の初期化に成功したこの2006年のCell論文は、何回読み直しても感激します。今年のラボの新人勉強会でも近い将来のノーベル賞論文だと言って学生に紹介しましたが、来年はもっと背景をしっかりと説明して紹介していこうと思います。将来への臨床応用はもちろん大事ですが、iPS細胞における転写因子ネットワークとエピジェネティクス制御の解明など、まだまだ基礎研究でも、たった6歳のiPS細胞研究はさらに発展する成長株であります。