

特集 明日の診療に役立つ細胞分子生物学

## Topics 2

# 再生医療 — iPS 細胞の応用 —

齋藤 潤

要旨：人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、①すべての細胞・組織に分化できる多能性を有する、②体細胞より誘導できる、という利点があり、これを用いた再生医療の発展が期待されている。iPS 細胞の安全性を高める研究や、さまざまな分化細胞を用いた移植医療に関する研究が着々と進められている。HLA ホモ接合体ドナー由来の医療用 iPS 細胞ストック作製が開始されており、iPS 細胞を用いた再生医療の実現は近いと考えられる。

キーワード：iPS 細胞，再生医療，同種移植，細胞分化  
iPS cells, Regenerative medicine,  
Allogeneic transplantation, Cell differentiation

連絡先：齋藤 潤  
〒606-8507 京都市左京区聖護院河原町 53  
京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門  
(E-mail: msaito@cira.kyoto-u.ac.jp)

## iPS 細胞とは

人工多能性幹細胞 (inducible pluripotent stem cells : iPS 細胞) とは, 京都大学の山中らによって樹立された幹細胞の一種である (図 1). その特徴は, ①すべての細胞・組織に分化できる多能性 (pluripotency) を有する, ②体細胞より誘導できる, という点にある. 2006 年にマウス iPS 細胞<sup>1)</sup>, 2007 年にヒト iPS 細胞が樹立された<sup>2)3)</sup>.

iPS 細胞は, 形態, 自己複製能, 多分化能および遺伝子発現プロファイルなどからヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) にきわめて類似しているが, 樹立が非常に困難な ES 細胞と異なり, 手順に従えば, 基本的にあらゆるドナーの体細胞から作製できるという大きなメリットを有する. このため, ① iPS 細胞由来分化細胞を用いた薬物の毒性/有効性評価試験系の開発, ②疾患特異的 iPS 細胞の病態解明や創薬への応用, ③細胞移植治療用ソースとしての利用, などの幅広い医療分野への貢献が期待されている. 特に, 細胞移植治療用ソースとしての利用は, ES 細胞のもつ倫理的問題 (ヒトの胚を滅失して作製する) と免疫学的問題 (樹立された ES 細胞株が数株のみであり HLA 型の適合性が担保できない) を回避できることから, きわめて大きな期待がもたれている (図 2).

## 安全な iPS 細胞の作製

iPS 細胞の樹立は, 線維芽細胞などの体細胞に iPS 細胞化 (初期化という) のために必要な遺伝子を導入することにより行われるが, 当初導入された遺伝子は Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc の 4 種であった. これらをレトロウイルスで導入した iPS 細胞をマウスの胚に打ち込んで, 正常胚由来と iPS 細胞由来の細胞をもつキメラマウスを作製したところ, cMyc 遺伝子の再活性化により, 高率に腫瘍が発生することがわかった. 外来性 cMyc を用いずに iPS 細胞を樹立すると, キメラマウスの腫瘍発生頻度は野生型マウスと同程度になった<sup>4)</sup>. cMyc は癌遺伝子であり, この遺伝子を用いることが腫瘍化のリスクを上げることが考えられた. また, 従来の方法はレトロウイルスベクターを用いており, iPS 細胞のゲノムには上述の転写因子が組み込まれている. cMyc を使用しないとしても, レトロウイルスベクターを用いるとまた

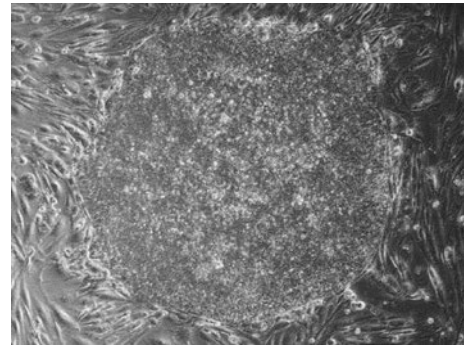


図 1 ヒト iPS 細胞.

ま遺伝子御挿入部位に存在した内在性の癌原遺伝子を活性化する可能性があった. 現在では, ① cMyc 遺伝子を使用しないで iPS 細胞を樹立する, ② iPS 化に必要な因子をゲノムに組み込まない, といった手法が開発され, 安全性が大きく向上している<sup>5)</sup>. さらに, 分化細胞の集団から未分化な細胞を注意深く取り除くこと, 分化抵抗性の iPS 細胞クローンを排除することなどにより, 実際に iPS 細胞由来細胞を移植した際の腫瘍発生リスクをきわめて低くすることができると考えられる.

## iPS 細胞の臨床試験へ向けた動き

文部科学省は「再生医療の実現化プロジェクト」という委託研究で, iPS 細胞を含む幹細胞を用いた再生医療を実現させるためのプラットフォームを推進してきた. 平成 25 (2013) 年度から新たに「再生医療実現拠点ネットワークプログラム」 (<http://www.jst.go.jp/saisei-nw/index.html>) が開始されており, 再生医療への応用へ向けた前臨床試験が加速することが期待される. このなかで, iPS 細胞研究中核拠点として京都大学が採択され, iPS 細胞を用いた再生医療の実現化のため, 再生医療に使用可能な iPS 細胞のストックの作製を推進することとなった. また, 網膜色素上皮, 神経, 心筋, 血小板など, iPS 細胞からの分化細胞を用いた再生医療実現化のための拠点が採択されている.

京都大学 iPS 細胞研究所では, iPS 細胞の再生医療応用に向けて, 規制化学部門に細胞調整センター (Facility for iPS cell Therapy : FiT) を設立し, Good Manufacturing Practice (GMP) 基準に合致した安全な iPS 細胞を

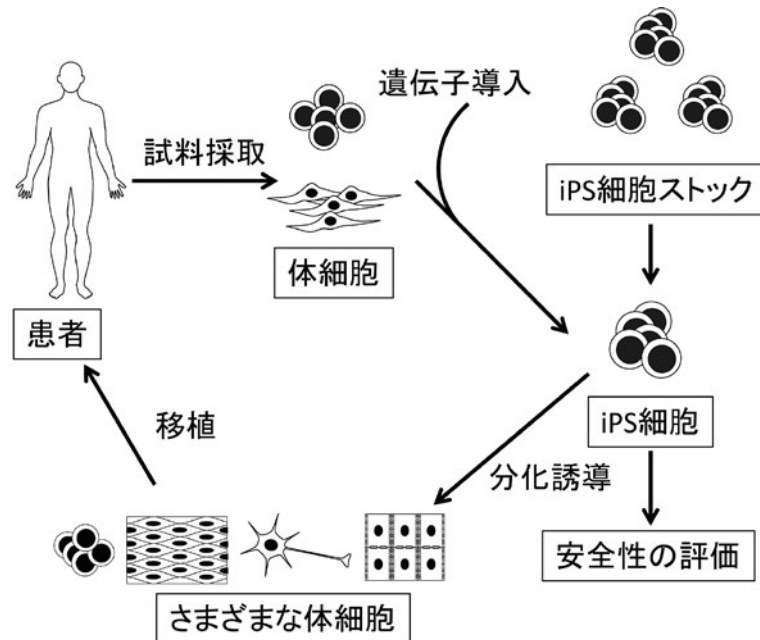


図2 iPS細胞を用いた移植医療の流れ.

樹立・維持するための研究事業を進めている。また、京都大学病院には2011年にiPS細胞臨床開発部が設立され、iPS細胞の疾患研究、再生医療に向けた連携を京都大学iPS細胞研究所と深めている。

## 再生医療用iPS細胞ストック構想

iPS細胞を用いた細胞移植医療を移植免疫の観点からみると、拒絶が回避できるので、患者のiPS細胞由来の目的細胞を患者本人に移植する自家移植が最も望ましい。しかし、自家移植にもいくつかの問題がある。たとえば、①iPS細胞の樹立および品質評価と目的細胞への分化に1年近くかかるので、疾病・創傷の発生後に速やかに細胞移植を行わないと効果が期待できない場合、発生後にiPS細胞を作製開始しても間に合わない、②患者が遺伝疾患をもっている場合、作製したiPS細胞も同じ遺伝子変異をもつので、細胞レベルでの遺伝子治療が必要になる、③すべての人に自家移植用のiPS細胞を作製するのは、コスト面から不可能である、といった理由である。このため、HLA適合ドナーからの同種（他家）移植を選択肢に入れる必要がある（図3）。

iPS細胞由来分化細胞が同種（他家）移植後に十分に

生着し機能を発揮するためには、患者/ドナー間HLA完全一致が理想的である。その場合、骨髄バンクやさい帯血バンクのようにHLAドナーからの細胞供与を受けたストックの整備が必要となるが、骨髄やさい帯血とは異なりiPS細胞の製造および品質管理には多くの時間とコストがかかるため、実現性に乏しい。このため、主要組織適合抗原をホモでもつ人をドナーとしたHLAホモiPS細胞を樹立し、これをストックしたうえで、他家移植のソースとして治療に用いるという構想がある<sup>5)~7)</sup>。京都大学iPS細胞研究所では、HLA-A、-B、-DRの3座においてホモ接合体のドナー（国民の約2%）から複数のiPS細胞株を樹立し、将来の細胞移植医療に利用可能な医療用iPS細胞ストックを確立することを計画している。日本人で高頻度に見られるHLAハプロタイプをホモ接合体としてもつドナー（HLAホモドナー）（表1）からiPS細胞を樹立すると、このiPS細胞由来の細胞は同じハプロタイプをもつヘテロ接合体レシピエントにも拒絶のリスクが少なく移植できる。HLA（3座）ホモドナー由来のiPS細胞を50株樹立し、ストックとして供給できれば、国民の7割へ3座一致により拒絶反応のリスクを低減した移植が可能と試算される<sup>5)</sup>。このような形でドナーをリクルートし、iPS細胞を樹立して、ストックしておくことにより、迅速に分化細胞を得て、治療に応用すること

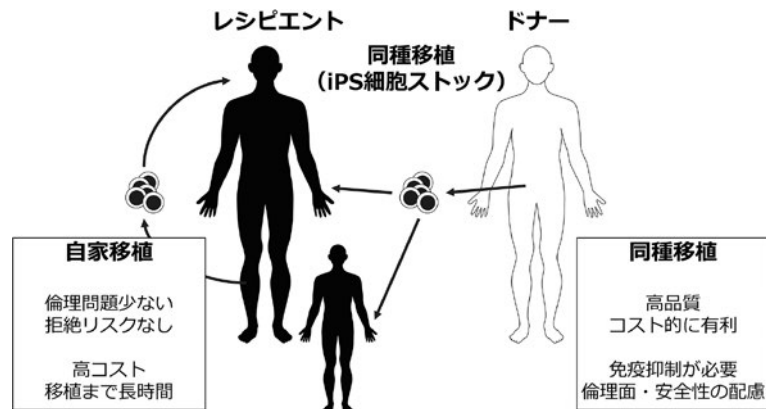


図3 自家移植と同種移植.

表1 日本人 HLA ハプロタイプ頻度

順位	A	B	DRB1	ABR	ハプロタイプ頻度
1	*24:02	*52:01	*15:02	*24:02-*52:01-*15:02	8.275%
2	*33:03	*44:03	*13:02	*33:03-*44:03-*13:02	4.248%
3	*24:02	*07:02	*01:01	*24:02-*07:02-*01:01	3.769%
4	*24:02	*54:01	*04:05	*24:02-*54:01-*04:05	2.695%
5	*02:07	*46:01	*08:03	*02:07-*46:01-*08:03	1.940%
6	*11:01	*15:01	*04:06	*11:01-*15:01-*04:06	1.391%
7	*24:02	*59:01	*04:05	*24:02-*59:01-*04:05	1.097%
8	*11:01	*54:01	*04:05	*11:01-*54:01-*04:05	0.995%
9	*24:02	*40:06	*09:01	*24:02-*40:06-*09:01	0.857%
10	*26:01	*40:02	*09:01	*26:01-*40:02-*09:01	0.797%

[HLA研究所 (<http://www.hla.or.jp/haplo/haplodl.php?lang=ja>)より引用]

が可能になると期待される。

上述のように、免疫拒絶の観点からは、同種移植よりは自家移植のほうが望ましく、iPS細胞を用いた細胞移植治療においても、同様の考え方がありうる。しかし、現状の技術では、iPS細胞の株ごとに質のばらつきが生じるため、1株の品質管理・保証には大きなコストや時間を要する。一方、iPS細胞はほぼ無限の自己複製能を有する。したがって、できるだけ汎用性の高い株を樹立し、徹底した品質管理のもと供給できる体制を構築することが現実的な方策である。この観点からも、オーダーメイドでiPS細胞を作製し品質管理を行うより、HLAホモ接合体ドナー由来の医療用iPS細胞ストックを作製し、厳密な品質管理を行うほうが望ましいと考えられる。ただ、同種iPS細胞ストックを用いた場合、HLAに関連し

た拒絶のリスクは減るが、おそらくマイナー組織適合性抗原の不一致やNK細胞免疫による拒絶を防ぐため、いずれにせよレシピエントへの免疫抑制剤投与は必要と考えられる。

## 呼吸器系の再生へ向けた研究

最後に、呼吸器上皮細胞の多能性幹細胞を用いた再生医療に向けた研究を紹介したい。肺の初期発生を概観すると、以下のとおりとなる。まず、胚体内胚葉 (definitive endoderm) から原腸が生じる。続いて、原腸の前部前腸腹側内胚葉 (ventral anterior foregut endoderm) より肺芽 (lung bud) が生じるが、これが肺や気管支などの呼吸器の原基となる。胚芽では、臓器特異的転写因子NKX2.1が発現する。ヒト多能性幹細胞から肺・気管支構成細胞への分化は、基本的にこの発生過程を *in vitro* でトレースする、定方向性分化 (directed differentiation) 法で試みられている。近年、ヒト多能性幹細胞よりの定方向性分化により、NKX2.1陽性の肺芽細胞を経て、肺胞および気管支上皮細胞を分化誘導することに成功した、とする報告が複数なされている。マウスモデルでは、脱細胞化したマウス肺にマウスES細胞から誘導したNkx2.1<sup>+</sup>前駆細胞を注入する実験により、脱細胞肺を足場にして前駆細胞が生着し、上皮様構造を維持することが示されている<sup>8)</sup>。Huangらは、ヒトES細胞より、NKX2.1<sup>+</sup>FOXA2<sup>+</sup>前方前腸内胚葉細胞を高効率に誘導し、これらの細胞より基底細胞、杯細胞、クララ細胞、線毛細胞、I型およびII型肺胞上皮細胞などの肺・気道上皮細胞を誘導でき

ることを示した<sup>9)</sup>。この方法で誘導した II 型肺胞上皮細胞は SP-B 蛋白を取り込み、刺激に応じて分泌することができたという。

## おわりに

iPS 細胞の出現が再生医療分野に与えた影響は、きわめて大きい。そのアプローチは従来型の幹細胞医療と全く異なっていることから、安全性の証明や制度面の整備に課題があるものの、着実に問題は解決されつつある。近い将来、さまざまな細胞を医療用 iPS 細胞ストックから分化誘導し、実際に細胞移植に用いることになるだろう。多能性幹細胞からの分化誘導法とそれを細胞治療に用いる戦略は驚異的な速度で発展しており、多くの傷病に対する再生医療が提供される日も遠くないと想像される。一人でも多くの患者に安全かつ有効な治療が提供されるよう、引き続き研究の発展を祈念したい。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特に申告なし。

## 引用文献

- 1) Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast

cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.

- 2) Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
- 3) Yu J, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-20.
- 4) Nakagawa M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 101-6.
- 5) Okita K, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011; 8: 409-12.
- 6) Nakatsuji N, et al. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 739-40.
- 7) Turner M, et al. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell* 2013; 13: 382-4.
- 8) Longmire TA, et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 398-411.
- 9) Huang SX, et al. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 84-91.

## Abstract

### Regenerative medicine: An application of iPS cells

Megumu K. Saito

Department of Clinical Application, Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University

Human inducible pluripotent stem cells (iPSC) are pluripotent cell lines that have the potential ability to differentiate into all cell types of human body. iPSCs can be established from somatic cells of each individual. iPSC-based cell therapy among the most promising applications for the field of regenerative medicine. Several ongoing studies are available regarding establishment of a safe and effective cell transplantation therapy by using iPSC-derived differentiated somatic cells. The construction of a clinical-grade iPSC stock library from donors with homozygous HLA allele is also now in progress. Overall, iPSC-based regenerative medicine will soon be provided.