

子導入法の方がより安全なiPS細胞を樹立できると考えられる。2008年に、アデノウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現によるiPS細胞誘導が報告された²⁴⁾。

(3) ウイルスベクターなしiPS細胞

上記アデノウイルスによる報告のわずか1週間後、ウイルスベクターを用いずプラスミドのみによるiPS細胞誘導法が山中らにより同じくサイエンス誌に報告されている²⁵⁾。さらにその後、トランスポゾンを用いた方法²⁶⁾やEBウイルスをベースにしたベクター²⁷⁾を用いて導入遺伝子がゲノムに残らない方法によるヒトiPS細胞の誘導も報告された。このように、iPS細胞が報告されてからわずか3年足らずであるが、iPS細胞の改良は急速に進んでいる。

(4) トランスジーンなしiPS細胞

ウイルスを用いない場合でも、遺伝子操作をした細胞のヒトへの移植応用は慎重に行われるべきと考えられている。遺伝子操作を行わず、タンパクを作用させたり²⁸⁾、低分子化合物²⁹⁾を用いてiPS細胞を誘導しようとする試みが盛んに行われている。しかし、たとえば低分子化合物の多くは催がん性を有していることは古くから知られている。誘導に成功しても誘導された細胞のiPS細胞としての機能および安全性は厳密に評価される必要がある。

(5) 誘導効率の改善

患者特異的iPS細胞バンクの構築など、将来的には多数の安定したiPS細胞株を樹立できることが必要となる。そのために、現在数%以下であるiPS細胞誘導効率をあげて、さまざまなヒトや組織からiPS細胞を樹立可能にしておく必要がある。最近、がん抑制遺伝子p53がiPS細胞誘導に関与しており、p53の機能を抑制することによりiPS細胞誘導効率を20倍以上増加させたことが報告された³⁰⁾。同様の報告が5報同時にNatureに掲載され、この領域の競争の激しさが象徴的に示された。

(6) 培養方法の改善

ヒトへの細胞移植応用に用いるiPS細胞の場合は、血清やフィーダー細胞を用いずに樹立し、GMP基準を満たすレベルのiPS細胞を用意する必要がある。

2. iPS化(リプログラミング)機構の解析

3個または4個の特定の遺伝子を導入することにより、線維芽細胞などからiPS細胞が誘導されるという事実は明らかとなったが、その分子メカニズムはまったく不明である。遺伝子を導入された細胞のうち、iPS細胞化するのはいったいどの細胞で、iPS細胞化される細胞の条件は何か？導入遺伝子の発現量やその組み合わせはどのように影響するのか？実際、導入遺伝子がどのように働いてiPS細胞化させているのか？等々、解決すべき問題は尽きない。

3. iPS細胞の医療応用

iPS細胞化のプロセスやメカニズムの解析とはまったく独立して、iPS細胞として樹立させたものを出発点とし、これをさまざまな形で利用する方法の開発もiPS細胞研究の大きな柱である。上で述べた心血管細胞をはじめ、神経細胞、膵β細胞など、さまざまな臓器・組織がiPS細胞を用いた再生医学研究のターゲットとなる。

4. その他

「いったん分化した細胞を簡便にリプログラミングしてもとに戻すことができる」という新しい技術は、さまざまな研究に新しいストラテジーを提供する。リプログラミングそのものに関する研究はもちろんのこと、分化/脱分化におけるエピジェネティクス研究やがん化メカニズムの解析など、iPS細胞研究が新しい展開をもたらすと考えられる研究領域は数多く存在する。

おわりに

ほ乳類の成体の細胞がリプログラミングされて未分化なものに戻りうることはクローン羊ドリーによってすでに示されていたが、その後10年を経て報告されたヒトiPS細胞樹立の報告がそれを上回る反響を持って迎えられたのは、iPS細胞の持つ応用範囲の広さによるであろう。「世界中どこでも施行可能な簡単な方法で成人由来の分化細胞から未分化幹細胞を誘導できる」ということが、将来的に科学や社会に及ぼす影響は計り知れない。そこには当然、功罪両面が生まれてくることになる。それはすべて科学者と社会が自ら責任を負うものである。極端な熱狂や批判に走ることなく、冷静にかつ良識と叡知を持つ

てiPS細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。

文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861.
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007 ; 318 : 1917.
- 4) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al. Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000 ; 408 : 92.
- 5) Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al. Prospective identification of cardiac progenitor potentials by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 2005 ; 19 : 1534.
- 6) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al. Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ; 26 : 1977.
- 7) Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al. Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 ; 26 : 2070.
- 8) Narazaki G, Uosaki M, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008 ; 118 : 498.
- 9) Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008 ; 118 : 507.
- 10) Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 2008 ; 26 : 1537.
- 11) Xie C, Huang H, Wei S, et al. A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2008 ; 18 : 741.
- 12) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003 ; 107 : 2733.
- 13) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009 ; 104 : e30.
- 14) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al. *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 385 : 497.
- 15) Yokoo N, Baba S, Kaichi S, et al. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 387 : 482.
- 16) Taura D, Sone M, Homma K, et al. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 ; 29 : 1100.
- 17) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007 ; 25 : 1015.
- 18) Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2009 ; 120 : 408.
- 19) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009 ; 27 : 743.
- 20) Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2007 ; 1 : 39.
- 21) Nishikawa SI, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 ; 9 : 725.
- 22) Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, et al. Evaluation

- of antiangiogenic activity of azumamides by the *in vitro* vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2008 ; 18 : 2982.
- 23) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008 ; 26 : 101.
- 24) Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008 ; 322 : 945.
- 25) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008 ; 321 : 699.
- 26) Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009 ; 458 : 771.
- 27) Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009 ; 324 : 797.
- 28) Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 381.
- 29) Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009 ; 4 : 16.
- 30) Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 2009 Aug 9. [Epub ahead of print]

* * *

iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導とその応用

山下 潤¹⁾

KEYWORDS 心筋前駆細胞, 動静脈リンパ管, サイクロスボリン A

はじめに

虚血性心疾患を中心とする心疾患および脳血管障害は日本における死因のそれぞれ第2位(10万対126)と3位(10万対102)を占め、両者を合わせると第1位の悪性新生物(癌)(10万対254)に肉薄する。一方、国民医療費では、虚血性心疾患と脳血管障害を合わせると悪性新生物を上回り(2兆5千億 vs 2兆3千億円)(以上、厚生労働省「平成16年度国民医療費の概況」), 心血管系疾患は、現在および未来にわたり日本の医療が取り組むべき最重要研究課題の一つと考えられる。

また、心筋症は原則的に心移植しか根治療法がなく、かつ日本における移植待機患者の9割を占める非常に重要な心再生医療のターゲットである。本国以外での臓器移植を原則禁止する方向のWHOの方針や日本における臓器移植法改正なども相俟って、幹細胞による心筋再生は医学的にも政治的にも重要性が増している。

近年の幹細胞生物学の発展を背景とした再生医療研究において、血管および心臓は最も急速に研究の進展が認められる臓器である。すなわち、様々な新しい心血管幹細胞・前駆細胞の発見や心血管分化機構の解析、さらには前駆細胞をヒトに用いた再生医療の試みまで、基礎研究から臨床応用に至る幅広い知見が蓄積されてきた。なかでも血管は、骨髄細胞や末梢血細胞の虚血組織への移植、という細胞移植治療がすでに臨床の場にも応用され成果を挙げており、近年の再生医療の発展

において先駆的役割を果たしている。

本稿はそのなかで万能の幹細胞として期待されるES細胞および最近樹立された新しい多能性幹細胞、iPS細胞からの心血管細胞分化誘導とその応用に関する知見を中心に概説する。

iPS 細胞からの心血管細胞分化

筆者らはこれまでマウスおよびヒトES細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。すなわち、マウス未分化ES細胞から血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)の受容体の一つであり、血管内皮・血球の前駆細胞や中胚葉細胞のマーカーでもあるFlk1(2型VEGF受容体: VEGF receptor-2)を発現する細胞を誘導し、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している^{1,2)}。この新しい分化誘導システムを用いて、ES細胞由来の心筋前駆細胞の同定²⁾や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれES細胞から誘導することにも成功している^{3,4)}。ヒトES細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している^{5,6)}(京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科との共同研究)。

このマウスES細胞の系統的な心血管細胞分化システムをマウスiPS細胞に導入し、筆者ら⁷⁾はいち早くiPS細胞からのこれら心血管細胞の分化誘導に成功した。すなわち、未分化マウスiPS細胞

1) YAMASHITA Jun 京都大学再生医科学研究所幹細胞分化制御研究領域・准教授

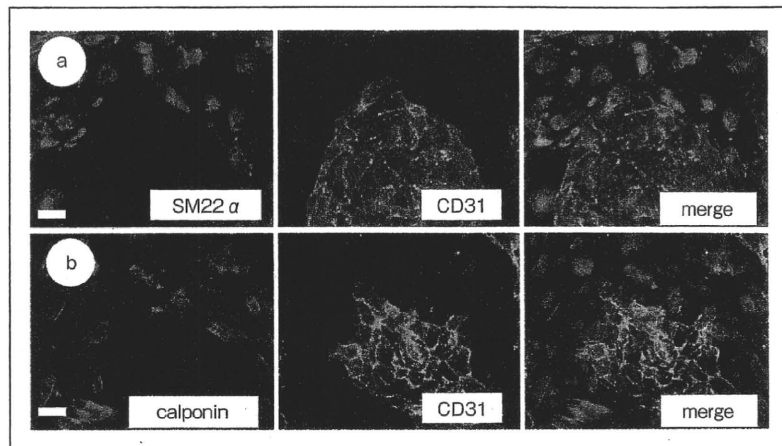


図1 マウス iPS 細胞からの血管内皮・壁細胞分化

マウス iPS 細胞由来 Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下で培養することにより、CD31 陽性内皮細胞(緑)と SM22 α (a)または calponin(b)陽性壁細胞(赤)が選択的に誘導される。スケールバー：50 μ m. [文献7)より改変引用]

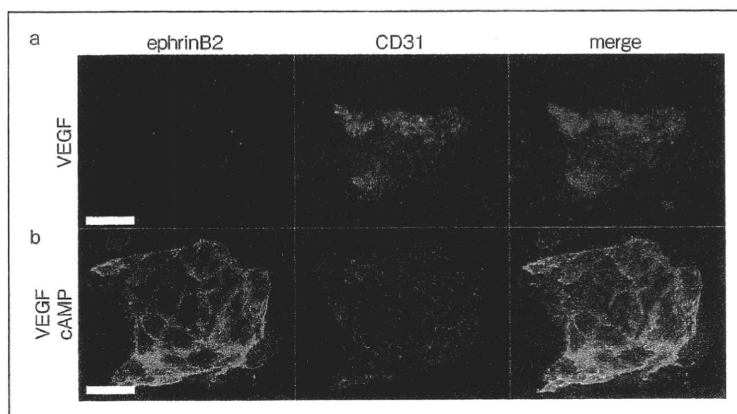


図2 マウス iPS 細胞からの動静脈内皮細胞分化

Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下で培養した場合、その大部分が CD31 陽性/ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となる(a)。VEGF に加え 8-bromo-cAMP を投与し cAMP シグナルを活性化すると CD31 陽性/ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が出現する(b)。スケールバー：100 μ m. [文献7)より改変引用]

を LIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下に培養することにより Flk1 陽性細胞が誘導された。

Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下に培養することにより主に静脈を中心とする内皮細胞および壁細胞が(図1), VEGF に加えて cAMP シグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が(図2), OP9 ストロマ細胞上で培養することにより血球, リンパ管内皮細胞(図3), および心筋細胞が(図4), それぞれ誘導された。マウス iPS

細胞からの Flk1 陽性細胞, (動静脈リンパ管)内皮細胞, 壁細胞の分化様式, 分化効率などはほとんどマウス ES 細胞と変わりがなかった。心筋細胞の誘導効率はややばらつきがみられたが, 従来マウス ES 細胞の株間に認められたばらつきと同程度以下であった。

このように, マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し, マウス ES 細胞と同様に系統的に心血管細胞

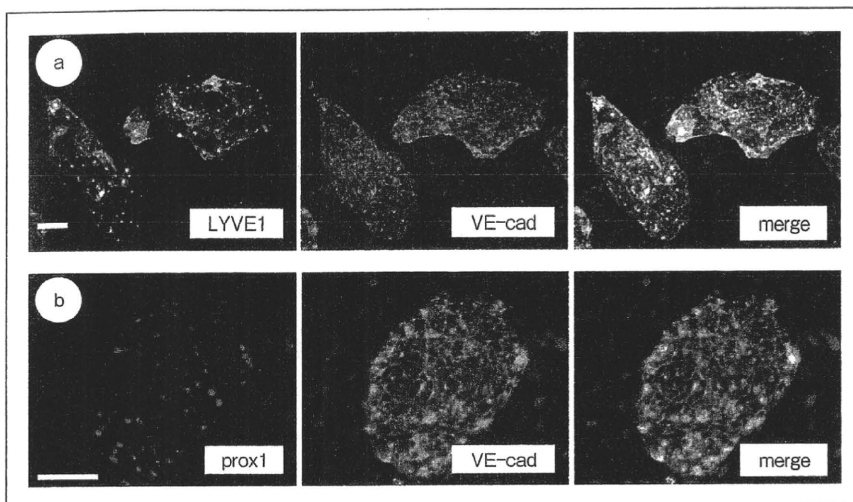


図3 マウス iPS 細胞からのリンパ管内皮細胞分化
Flkl1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養することにより, LYVE1 陽性(a)または prox1 陽性(b)かつ VE-cad 陽性のリンパ管が誘導される。スケールバー: 100 μm 。
〔文献 7) より改変引用〕

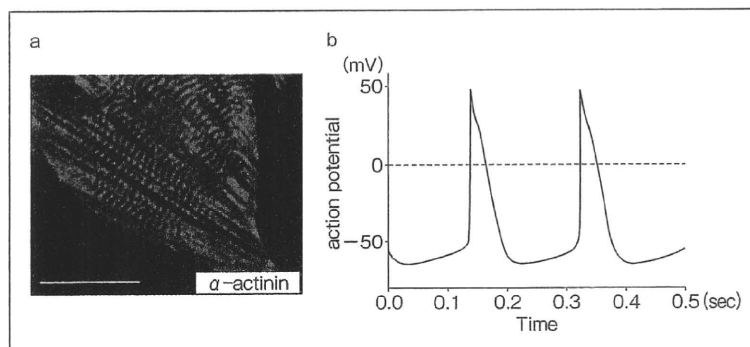


図4 マウス iPS 細胞からの心筋細胞分化
Flkl1 陽性細胞を OP9 ストロマ細胞上で培養することにより, 拍動心筋細胞が出現する。拍動細胞は sarcomere 構造を示し(a: 赤; α -actinin 染色), ベースメーカー細胞様の活動電位を示す(b)。スケールバー: 25 μm 。〔文献 7) より改変引用〕

を分化誘導することが可能であった(図 5)。また, iPS 細胞由来細胞の胆癌ヌードマウスへの細胞移植実験により, iPS 細胞由来血管細胞が内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与しうることも確認している(未発表)。

ただし, マウス iPS 細胞を樹立する際に外来性に導入された遺伝子群の発現が長期分化培養中に再上昇したようにみえる例が観察された。明らかに癌化したような細胞や未分化になった細胞が出

現することはなかったが, ES 細胞とは異なり iPS 細胞独特の問題である導入遺伝子の影響については慎重に対応する必要があると考えられた。

その後, 山中らにより開発された c-myc を含まない iPS 細胞⁸⁾や導入遺伝子コピー数の少ない内臓由来 iPS 細胞⁹⁾, プラスミドのみで誘導された iPS 細胞¹⁰⁾でも同様に心血管細胞の誘導が可能であった(未発表)。すなわち, 誘導方法が異なってもいったん iPS 細胞として樹立されれば, それ

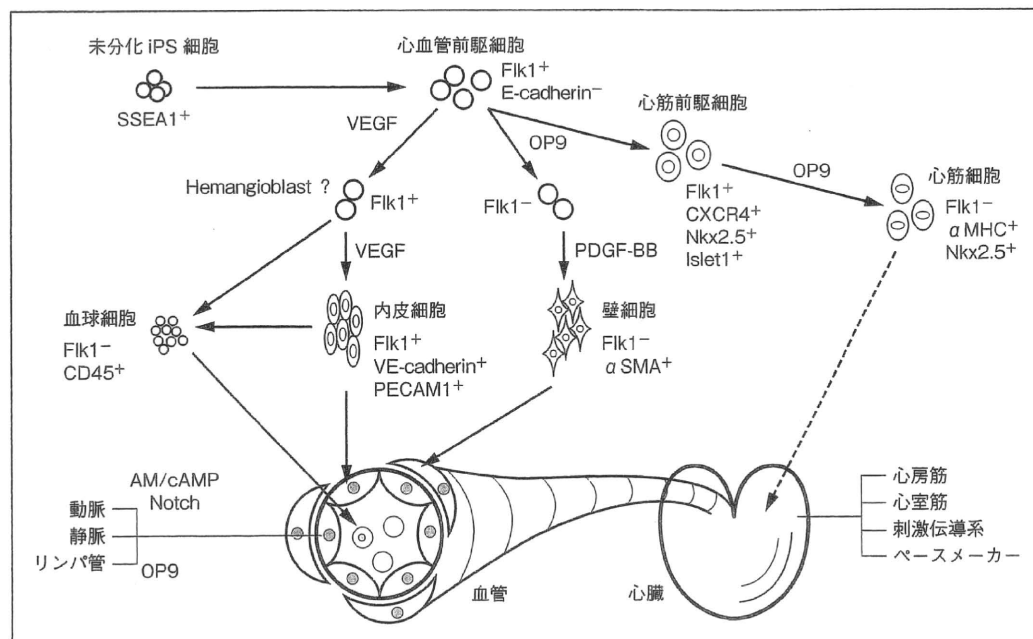


図5 マウス iPS 細胞からの系統的心血管細胞分化
マウス iPS 細胞から誘導した Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮、壁細胞、心筋細胞、さらには動脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。
〔文献7〕より改変引用〕

らの細胞はいずれも ES 細胞と同様の分化特性を示した。ほかにマウス iPS 細胞からの心血管細胞分化に関しては、心筋細胞を誘導したとの報告¹¹⁾および筆者らに類似した分化システムを用いた心血管細胞分化の報告¹²⁾と血管平滑筋分化の報告¹³⁾などがある。

ヒト iPS 細胞からの 心血管細胞分化

ヒト ES 細胞の維持培養条件に準じた環境で誘導・樹立されたヒト iPS 細胞は、その維持および分化誘導においてもヒト ES 細胞に類似した動態を示す。ヒト ES 細胞におけるノウハウを用いてヒト iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導が行われている。京都大学のグループ¹⁴⁾は、同グループおよび筆者らがマウス ES 細胞の方法をヒト ES 細胞に応用したのと同様の方法を用いて、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞および壁細胞を誘導す

ることに成功した。ウィスコンシン大学のグループ¹⁵⁾も類似の方法で血球および内皮細胞の誘導を報告している。心筋に関しては、ウィスコンシン大学のグループ¹⁶⁾が胚様体法を用いて誘導した報告が最初である。慶応大学の Tanaka ら¹⁷⁾も胚様体を用いて誘導した心筋細胞を心筋の薬理学的検討に用いる試みを報告している。また、リプロセル社(東京)はヒト iPS 細胞から誘導した心筋細胞をキットとして販売するサービスを 2009 年より開始している。筆者らは、ヒト ES 細胞において報告されている心筋分化誘導法¹⁸⁾に準じて培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的な sarcomere の形成や自己拍動に同調した Ca^{2+} の取り込みなど形態的機能的特性も確認している(投稿中)。

最近筆者ら¹⁹⁾は、免疫抑制剤サイクロスポリン A が強力な心筋および心筋前駆細胞誘導作用を有することを見だし、マウス ES 細胞由来純化

Flk1 陽性細胞を OP9 細胞と共培養する際にサイクロスポリン A を加えることにより、心筋細胞および前駆細胞を約 10~20 倍効率的に誘導できることを示した。同方法をマウスおよびヒト iPS 細胞に応用することにより、心筋細胞を約 5 倍効率的に誘導することにも成功している(投稿中)。

マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞、ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有していると考えられる。今後の iPS 細胞研究においては、マウスおよびヒト ES 細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のゴールドスタンダードとなると考えられる。iPS 細胞の出現によって、ES 細胞研究はさらにその重要性を増していると考えられる。

iPS 細胞研究の循環器領域における意義

ES 細胞、iPS 細胞研究の循環器領域における意義はやはり心血管再生治療への応用が中心的に期待されると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることにより、病態解明や創薬治療応用など様々な形で臨床面への貢献が可能である。

1. 誘導細胞の細胞移植応用

ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞に存在した倫理面の問題、および患者特異的 iPS 細胞を樹立できることにより移植免疫の問題も回避できるため、細胞移植による再生医療応用が期待されている。循環器領域においても、心筋再生による心筋梗塞や心筋症その他の心不全治療、血管再生による虚血性疾患の治療、生物学的ペースメーカーによる洞不全症候群などの治療などが細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、ヒト iPS 細胞を用いたこれら細胞治療の実現に至るまでには数多くの乗り越えるべきハードルが残っている。

1) 効率的な心血管分化誘導法および純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては 10^9 個オーダーに至る心筋細胞が死ぬともいわれている。そのレベル

の細胞数を用意することが可能な効率的誘導法を開発する必要がある。現在までで最も効率がよいと考えられるヒト ES 細胞からの心筋分化誘導法において、ヒト ES 細胞 1 個から心筋細胞 3 個と報告されている²⁰⁾。筆者らのマウス ES 細胞の系では、ES 細胞 1 個から約 200 個の心筋細胞誘導が可能であり、マウスに比してヒト細胞からの分化誘導効率はかなり低い。また、ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒト iPS 細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。

2) 移植用細胞の開発

最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、単に細胞を誘導して純化するというだけでは不十分で、GMP 基準の医薬品と同様な品質管理の元に移植用細胞を用意できるようにする必要がある。元になる iPS 細胞から血清やフィーダー細胞なしで一貫して培養して、分化誘導・純化が行えるようにする必要がある。1) から 2) の間には実は大きな隔たりがある。

3) 細胞移植法の開発

1), 2) を経て用意された細胞をヒトに移植する際に、いかなる細胞群をどのような方法をもって移植すれば、有効かつ安全であるかをサルなどの大型動物を含めたスタディで評価する必要がある。

4) ヒトにおける評価

1)~3) を経てようやくヒトへの応用が可能となると考えられる。実験的医療としての患者への細胞移植例や有効例などは比較的早く数年単位で報告されるかも知れない。しかし、1 つの細胞治療法が安全性と有効性の確認を経て一般的に使用される治療法として確立されるまでには通常の薬剤と同等以上の多大な労力と時間を要する可能性がある。

2. 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的な iPS 細胞を樹立できるという iPS 細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、全く新しい形で病態の解明や創薬への応用が可能である^{21,22)}。

1) 病態解明

心筋症、QT 延長症候群、洞不全症候群など心臓を構成する細胞そのものに起因すると考えられる疾患が中心となると思われるが、患者自身の細胞から iPS 細胞を樹立し、そこから該当する細胞を分化誘導し種々のモデル細胞を構築できることは、病態解明に全く新しい手段を提供する。すなわち、これまではごく少量の生検サンプルの解析に限局されていたものが、個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより、標的細胞の遺伝子解析、機能解析や薬剤の効果判定などを、実際の症例に関して繰り返し行うことが可能となる。原因遺伝子不明の症例においてもモデル細胞が構築できるので、モデル細胞を用いた原因遺伝子探索も可能となる。このように病態解明に向けたアプローチの方法は飛躍的に増大すると考えられる。

2) 創薬応用

iPS 細胞の創薬応用には大きく、新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の 2 つが考えられる。疾患モデル細胞を用いて、同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる。また培養下における分化モデルを用いることにより、心筋分化促進物質などの新たな生理活性物質の探索も可能となる。筆者ら²³⁾は、マウス iPS 細胞を用いて 3 次元培養下における血管構造形成モデルを構築し、新規海洋生物由来ヒストン脱アセチル化酵素(histon deacetylase; HDAC)阻害物質 azumamide の血管形成抑制作用を示すことに成功した。同モデルを用いた血管形成抑制または促進物質の探索が可能と考えられる。さらにこうしたシステムを患者特異的 iPS 細胞を用いて構築することにより、疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる。

受精卵を用意することが必要であるヒト ES 細胞と比べて、iPS 細胞は数多くの細胞株を樹立しやすく iPS 細胞バンクが構築しやすい。そこから細胞を誘導して array (アレイ) 化することにより、種々のヒトモデル細胞パネルのようなものを構築することができる。こうしたヒトモデル細胞

パネルは、薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる。例えば、千人分や万人分などの心筋細胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより、稀に発生する心毒性や肝障害などを事前に検出できるかもしれない。さらには障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより、副作用を起こす症例を事前に特定し投薬を避ける「テーラーメード医療」に貢献しうる可能性もある。

3. その他動物モデルへの応用

循環器病関係のモデル動物には、マウスモデルばかりでなくマウス以外の動物種のものが多い(高血圧自然発症ラット、糖尿病モデルラット、心筋症ハムスターなど)。これらモデル動物からの iPS 細胞の樹立が可能となれば、モデル動物と同動物由来細胞を用いて、動物モデルと細胞実験を相互対応させながら新しい病態の解析を行うことなどが可能となると考えられる。またマウスと同様に遺伝子組み換えによる新たな動物モデルの作製も可能となる。長らく不可能であったラットからの ES 細胞樹立が 2008 年によくなされたが²⁴⁾、iPS 細胞の樹立は種々の動物で盛んにすすめられ、ラット、ネコ、ゾウ、ミニブタなどにおける樹立がすでに報告されている^{25, 26)}。

おわりに

このように、心血管の発生・分化・再生機構に関して様々な知見が蓄積されてきているが、心血管再生治療はまだ開発初期段階にあると考えられる。臓器を構成する細胞を誘導して移植するあるいは前駆細胞を移植するというだけで臓器の再生が進むというほど単純ではないことがようやく学習されてきたというのが実情に近いであろう。iPS 細胞の出現は、これまでの ES 細胞をはじめとする再生医学研究に数多くの新たな可能性を与えた。しかし、iPS 細胞の出現が解決した問題は、ヒト ES 細胞樹立に際する倫理的問題と移植免疫を受けない細胞を準備しうる、ということだけであり、その他すべてのハードルは残されたままである。ここで述べた iPS 細胞の新しい可能

性も含め研究はスタートしたばかりであり，地道
なしかし迅速な研究を真摯に進めていくことが求
められる。

文 献

- 1) Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, et al : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 : 92-96, 2000
- 2) Yamashita JK, Takano M, Hiraoka-Kanie M, et al : Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 19 : 1534-1536, 2005
- 3) Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Schroeder T, et al : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 1977-1984, 2006
- 4) Kono T, Kubo H, Shimazu C, et al : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 2070-2076, 2006
- 5) Sone M, Itoh H, Yamahara K, et al : Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 : 2127-2134, 2007
- 6) Yamahara K, Sone M, Itoh H, et al : Augmentation of neovascularization [corrected] in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS One* 3 : e1666, 2008
- 7) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 498-506, 2008
- 8) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26 : 101-106, 2008
- 9) Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al : Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321 : 699-702, 2008
- 10) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322 : 949-953, 2008
- 11) Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, et al : Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 507-517, 2008
- 12) Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al : Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 26 : 1537-1546, 2008
- 13) Xie C, Huang H, Wei S, et al : A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 18 : 741-748, 2009
- 14) Taura D, Sone M, Homma K, et al : Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 : 1100-1103, 2009
- 15) Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, et al : Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27 : 559-567, 2009
- 16) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al : Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104 : e30-41, 2009
- 17) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, et al : In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 385 : 497-502, 2009
- 18) Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107 : 2733-2740, 2003
- 19) Yan P, Nagasawa A, Uosaki H, et al : Cyclosporin-A potently induces highly cardiogenic progenitors from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379 : 115-120, 2009
- 20) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al : Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25 : 1015-1024, 2007
- 21) Yamanaka S : A fresh look at iPS cells. *Cell* 137 : 13-17, 2009
- 22) Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR : The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 : 725-729, 2008
- 23) Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, et al : Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett* 18 : 2982-2984, 2008
- 24) Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al : Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135 : 1299-1310, 2008
- 25) Trounson A : Rats, cats, and elephants, but still no unicorn : induced pluripotent stem cells from new species. *Cell Stem Cell* 4 : 3-4, 2009
- 26) Esteban MA, Xu J, Yang J, et al : Generation of induced pluripotent stem cell lines from tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 284 : 17634-17640, 2009

iPS 細胞研究の現状と展望

山下 潤*

YAMASHITA Jun

*京都大学再生医科学研究所・幹細胞分化制御研究領域

SUMMARY

iPS 細胞（人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells）は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群を導入することにより、ES 細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells）様の万能の幹細胞の性質をもたせることに成功したまったく新しい幹細胞である。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞における倫理的問題、すなわち i) ヒト ES 細胞樹立時にヒト受精卵を壊す必要、と ii) 免疫拒絶を受けない ES 細胞の樹立のためヒト体細胞クローン胚をつくる必要、の 2 点を一気に回避できる画期的発明である。しかし、iPS 細胞には依然として「未分化 iPS 細胞が移植されると奇形腫を形成する」という問題は存在しているし、iPS 細胞特有の「遺伝子導入による癌化の問題」などもある。極端な熱狂や批判に走ることなく冷静にかつ良識と叡知をもって iPS 細胞の今後に対応することが必要であろう。

POINTS

- iPS 細胞は成体組織から誘導された ES 細胞様の万能幹細胞である。
- iPS 細胞は ES 細胞と同様に心血管細胞に分化する。
- iPS 細胞は、再生医療・病態解明・創薬研究などさまざまな形で臨床に貢献する。
- iPS 細胞は、臨床応用以外にも幅広い研究に応用が可能である。
- 良識と叡知をもって冷静に iPS 細胞の今後に対応することが必要である。

KEY WORDS

ES 細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells）、iPS 細胞（人工多能性幹細胞：induced pluripotent stem cells）、regeneration, differentiation

はじめに；iPS 細胞登場の背景と意義

ES 細胞（胚性幹細胞：embryonic stem cells）は、マウスやヒトの早期胚（胚盤胞：blastocyst）の段階において、将来胎仔を形成する内細胞塊（inner cell mass）と呼

ばれる部位を取り出して樹立した細胞株であり、体中すべての種類の細胞に分化することのできる、いわゆる万能の幹細胞と考えられている。マウス ES 細胞の樹立は 1981（昭和 56）年であり、マウス ES 細胞から拍動心筋細胞が誘導されることは 1985（昭和 60）年には報告されているが、ES 細胞の医学・生物学における大きな貢献

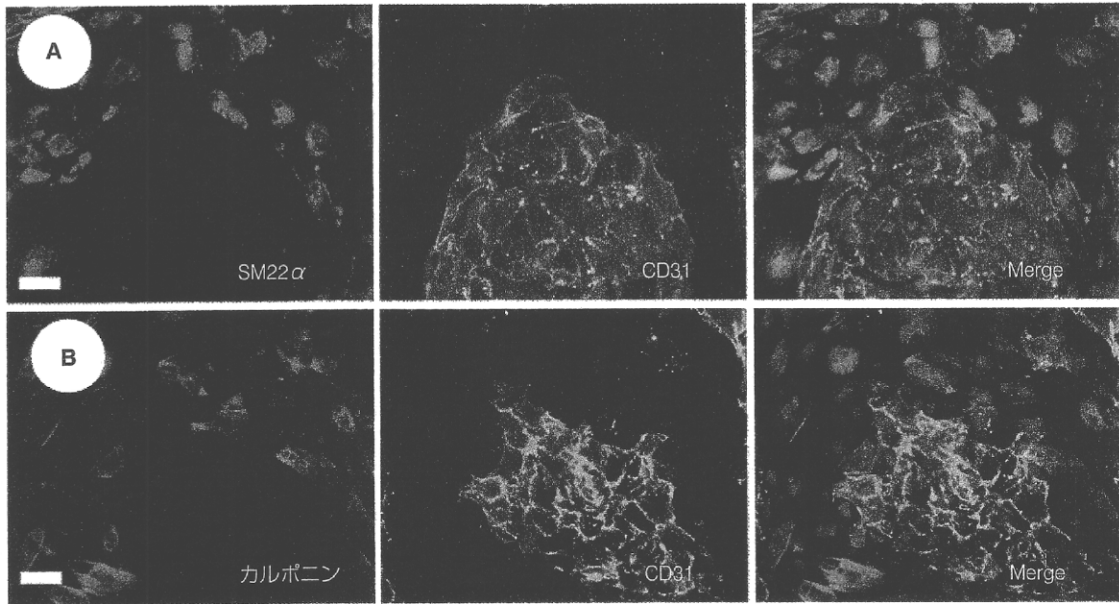
は、再生医学ではなくノックアウト (KO) マウスなどのさまざまな遺伝子改変マウスの樹立を可能にしたことであった。実際マウス ES 細胞を樹立した Sir Martin Evans は、2007 (平成 19) 年のノーベル医学生理学賞を KO マウスの開発をおこなった研究者らと共同受賞している。1990 年代後半から、神経幹細胞の発見など成体の中に存在する体性幹細胞/組織幹細胞に関する研究とともに ES 細胞を含めた幹細胞の再生医学応用に関する研究が急速に盛んになってきた。1998 (平成 10) 年末のヒト ES 細胞樹立により、幹細胞の再生医療応用はさらに現実味を帯びて語られるようになってきた。しかし、ヒト ES 細胞においては、①技術・安全面の問題、とくに未分化 ES 細胞が誤って移植されると奇形腫を形成する可能性がある、ということに加えて、②倫理面の問題、すなわち i) ヒト ES 細胞の樹立の際にヒト受精卵を壊す必要がある、ii) 免疫による拒絶を受けない ES 細胞を樹立するためにヒト体細胞クローン胚 (成体細胞の核を除核した未受精卵に核移植したクローン胚) をつくる必要が考えられる、ということが実際の応用への大きな障壁になっていた。こうした状況を背景に生まれてきた新しい幹細胞が iPS 細胞 (人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cells) である。

iPS 細胞は、線維芽細胞など分化した細胞に特定の遺伝子群 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc など) を導入することにより、ES 細胞様の万能の幹細胞の性質をもたせることに成功した細胞であり、形態、遺伝子発現パターンに加えて、分化能力や iPS 細胞をもとに最終的に iPS 細胞由来のマウス個体を作製できることなど、ES 細胞としての大きな特性を満たしている。最初の iPS 細胞は 2006 (平成 18) 年京都大学の Yamanaka らによって報告された¹⁾。2007 年には Yamanaka らおよび Thomson ら²⁾³⁾、その後さらに多くの他のグループによりヒト iPS 細胞の樹立が報告された。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞において認められた倫理的問題、上述の②-i), ii) を一気に回避できる画期的発明であり、「iPS 細胞を用いてすぐにも再生医療が実現できるのではないか」というようなある種の熱狂を生み出した。しかし、iPS 細胞には依然として上述①の奇形腫の問題は存在しているし、iPS 細胞特有の「遺伝子導入による細胞変異・癌化の問

題」など新たな問題もあり、今後地道に解決すべき課題は多い。これら iPS 細胞を巡る可能性と問題点について、循環器領域との関連を中心に述べることにする。

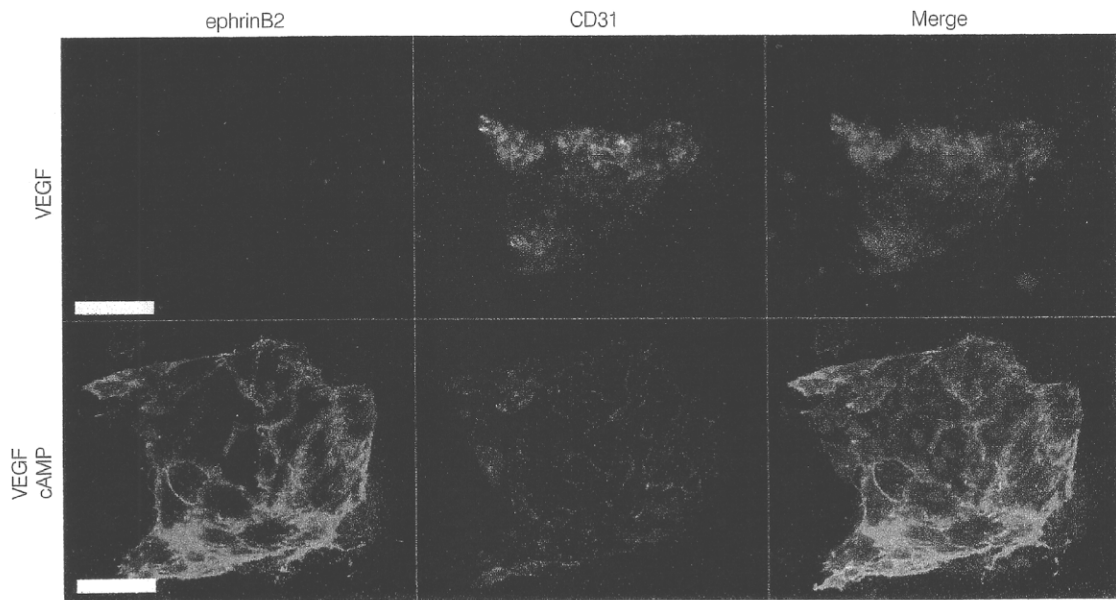
■ I. マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞と同様に心血管細胞に分化する

われわれはこれまでマウスおよびヒト ES 細胞を用いて心血管細胞の分化再生研究をおこなってきた。すなわち、マウス未分化 ES 細胞から血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の受容体の 1 つであり、血管内皮・血球の前駆細胞や中胚葉細胞のマーカーでもある Flk1 (2 型 VEGF 受容体: VEGF receptor-2) を発現する細胞を誘導し、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、血管内皮細胞、血管壁細胞、血球細胞、心筋細胞といった循環器系細胞を系統的に分化誘導することに成功している⁴⁾⁵⁾。この新しい分化誘導システムを用いて、ES 細胞由来の心筋前駆細胞の同定⁶⁾や動静脈リンパ管内皮細胞をそれぞれ ES 細胞から誘導すること⁶⁾⁷⁾にも成功している。ヒト ES 細胞からの血管細胞の誘導や虚血モデルへの移植実験などにも関与している⁸⁾⁹⁾ (京都大学内分泌代謝内科との共同研究)。このマウス ES 細胞の系統的な心血管細胞分化システムをマウス iPS 細胞に導入し、われわれはいち早く iPS 細胞からのこれら心血管細胞の分化誘導に成功した¹⁰⁾。すなわち、未分化マウス iPS 細胞を LIF (leukemia inhibitory factor) 非存在下に培養することにより Flk1 陽性細胞が誘導された。Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下に培養することによりおもに静脈を中心とする内皮細胞および壁細胞が (図①)、VEGF に加えて cAMP シグナルを刺激することにより動脈内皮細胞が (図②)、OP9 ストロマ細胞上で培養することにより血球、リンパ管内皮細胞 (図③)、心筋細胞が (図④)、それぞれ誘導された。マウス iPS 細胞からの Flk1 陽性細胞、(動静脈リンパ管) 内皮細胞、壁細胞の分化様式、分化効率などはほとんどマウス ES 細胞と変わりがなかった。このように、マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞はほぼ完全に同等な心血管分化能と分化動態を示し、マウス ES 細胞と同様に系統的に心血管細胞を分化誘導することが可能で



図① マウス iPS 細胞からの血管内皮・壁細胞分化

マウス iPS 細胞由来 Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下で培養することにより, CD31 陽性内皮細胞(緑)と SM22 α (A)またはカルボニン陽性壁細胞(B)(赤)が選択的に誘導される.
(Narazaki G *et al*, 2008¹⁰⁾より改変引用)



図② マウス iPS 細胞からの動静脈内皮細胞分化

Flk1 陽性細胞を VEGF および血清存在下で培養した場合, その大部分が CD31 陽性/ephrinB2 陰性の静脈内皮細胞となる (上段). VEGF に加え 8bromo-cAMP を投与し cAMP シグナルを活性化すると CD31 陽性/ephrinB2 陽性動脈内皮細胞が出現する (下段).
(Narazaki G *et al*, 2008¹⁰⁾より改変引用)

あった(図⑤). また, iPS 細胞由来細胞の担癌ヌードマウスへの細胞移植実験により, iPS 細胞由来血管細胞が内皮および壁細胞として生体内血管新生に寄与しうこ

とも確認している(未発表). ただし, マウス iPS 細胞を樹立する際に外来性に導入された遺伝子群の発現が長期分化培養中に再上昇したように見える例が観察された.

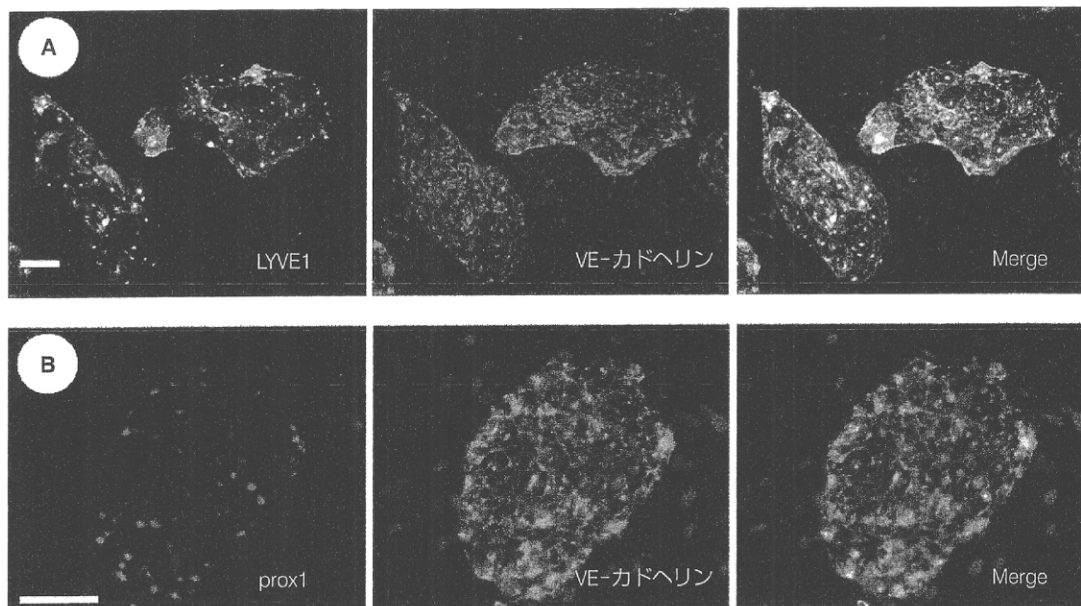


図3 マウス iPS 細胞からのリンパ管内皮細胞分化
Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより, LYVE1 陽性 (A) または prox1 陽性 (B) かつ VE-カドヘリン陽性のリンパ管が誘導される.
(Narazaki G *et al.*, 2008¹⁰)より改変引用)

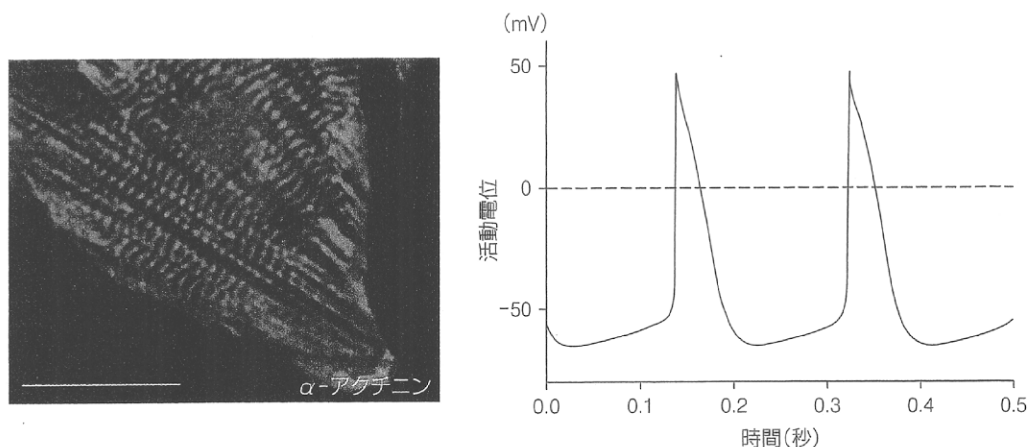


図4 マウス iPS 細胞からの心筋細胞分化
Flk1 陽性細胞を OP9 ストローマ細胞上で培養することにより, 拍動心筋細胞が出現する. 拍動細胞は sarcomere 構造を示す (左: 赤; アクチニン染色), ベースメーカー細胞様の活動電位を示す (右).
(Narazaki G *et al.*, 2008¹⁰)より改変引用)

明らかに癌化したような細胞や未分化になった細胞が出現することはなかったが, ES 細胞とは異なり iPS 細胞独特の問題である導入遺伝子の影響については慎重に対応する必要があると考えられた. 他にマウス iPS 細胞からの心血管細胞分化に関しては, 心筋細胞を誘導したとの報告¹¹⁾およびわれわれに類似した分化システムを用いた心血管細胞分化の報告¹²⁾と血管平滑筋分化の報告¹³⁾のそ

れぞれ1報ずつがあるのみである (2008 年 10 月末現在).

■ II. ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様の特性を示す

われわれはヒト iPS 細胞の心血管細胞分化にも取り組んでいる. ヒト ES 細胞の維持培養条件に準じた環境で

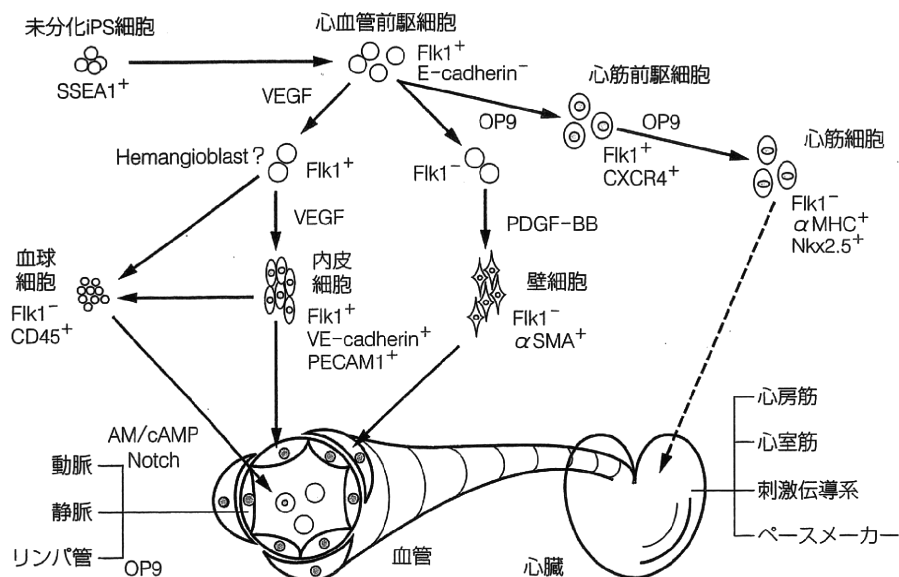


図6 マウス iPS 細胞からの系統的心血管細胞分化

マウス iPS 細胞から誘導した Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、心血管系の構成細胞である血管内皮細胞、壁細胞、心筋細胞、さらには動静脈リンパ管内皮細胞や種々の心筋細胞を系統的に分化誘導することができる。
(Narazaki G *et al*, 2008¹⁰⁾より改変引用)

誘導・樹立されたヒト iPS 細胞は、その維持および分化誘導においてもヒト ES 細胞に類似した動態を示した。われわれは、ヒト ES 細胞において報告されている心筋分化誘導法¹⁴⁾に準じて培養することにより、自己拍動する心筋細胞コロニーの誘導にすでに成功している。心筋に特徴的な sarcomere の形成や自己拍動に同調した Ca^{2+} の取り込みなど形態的機能的特性も確認している (未発表)。

マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞、ヒト ES 細胞とヒト iPS 細胞はそれぞれ維持培養法、分化誘導法などにおいてほとんど同等の特性を有していると考えられる。今後の iPS 細胞研究においては、マウスおよびヒト ES 細胞研究がその土台となり、また常に比較対象のスタンダードとなると考えられる。iPS 細胞の出現によって、ES 細胞研究は衰退するどころかさらにその重要性を増していると考えられる。

■ Ⅲ. iPS 細胞研究は、再生医療・病態解明・創薬研究などさまざまな形で臨床に貢献する

ES 細胞、iPS 細胞研究の循環器領域における意義はやはり心血管再生治療への応用が中心的に期待されると考えられるが、それ以外にも患者特異的モデル細胞の構築という新しいアプローチができることにより、病態解明や創薬治療応用などさまざまな形で臨床面への貢献が可能である。

1) 誘導細胞の細胞移植応用

ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞に存在した倫理面の問題、および患者特異的 iPS 細胞を樹立できることにより移植免疫の問題も回避できるため、細胞移植による再生医療応用が期待されている。循環器領域においても、心筋再生による心筋梗塞や心筋症その他の心不全治療、血管再生による虚血性疾患の治療、生物学的ペースメーカーによる洞不全症候群などの治療などが細胞治療ターゲットとして想定される。しかし、ヒト iPS 細胞を用いたこれら細胞治療の実現に至るまでには数多くの乗り越

えるべきハードルが残っている。

a) 効率的心血管分化誘導法および純化法の開発

ヒトの心筋梗塞においては 10^9 個オーダーに至る心筋細胞が死ぬともいわれている。そのレベルの細胞数を用意することが可能な効率的誘導法を開発する必要がある。現在までで最も効率が良いと考えられるヒト ES 細胞からの心筋分化誘導法において、ヒト ES 細胞 1 個から心筋細胞 3 個と報告されている¹⁵⁾。また、ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に奇形腫を形成するので、未分化ヒト iPS 細胞を厳密に除去できる細胞純化法が必要である。

b) 移植用細胞の開発

最終的にヒトに対して細胞を移植するためには、単に細胞を誘導して純化するというだけでは不十分で、GMP 基準（医薬品および医薬部外品の製造管理および品質管理の基準）の医薬品と同様な品質管理のもとに移植用細胞を用意できるようにする必要がある。もともとなる iPS 細胞から血清やフィーダー細胞なしで一貫して培養して、分化誘導・純化がおこなえるようにする必要がある。a) から b) の間には実は大きな隔りがある。

c) 細胞移植法の開発

a) b) を経て用意された細胞をヒトに移植する際に、いかなる細胞群をどのような方法をもって移植すれば、有効かつ安全であるかをサルなどの大型動物を含めたスタディで評価する必要がある。

d) ヒトにおける評価

a) から c) を経てようやくヒトへの応用が可能となると考えられる。実験的医療としての患者への細胞移植例や有効例などは比較的早く数年単位で報告されるかもしれない。しかし、1つの細胞治療法が安全性と有効性の確認を経て一般的に使用される治療法として確立されるまでには通常の薬剤と同等以上の多大な労力と時間を要する可能性がある。

2) 患者特異的モデル細胞

患者自身から細胞を採取し患者特異的な iPS 細胞を樹立できるという iPS 細胞にしかない特性は、移植免疫を回避した細胞治療ということだけでなく、まったく新しい形で病態の解明や創薬への応用が可能である¹⁶⁾¹⁷⁾。

a) 病態解明

心筋症、QT 延長症候群、洞不全症候群など心臓を構成する細胞そのものに起因すると考えられる疾患が中心となると思われるが、患者自身の細胞から iPS 細胞を樹立し、そこから該当する細胞を分化誘導し種々のモデル細胞を構築できることは、病態解明にまったく新しい手段を提供する。すなわち、これまではごく少量の生検サンプルの解析に限局されていたものが、個々の症例から生きた細胞を潤沢に得られることにより、標的細胞の遺伝子解析、機能解析や薬剤の効果判定などを、実際の症例に関してくり返しおこなうことが可能となる。原因遺伝子不明の症例においてもモデル細胞が構築できるので、モデル細胞を用いた原因遺伝子探索も可能となる。このように病態解明に向けたアプローチの方法は飛躍的に増大すると考えられる。

b) 創薬応用

iPS 細胞の創薬応用には大きく新規薬剤の探索と薬剤安全性試験への応用の 2 つが考えられる。疾患モデル細胞を用いて、同細胞の異常を改善する新規薬剤や疾患特異的に作用する薬剤などの探索が可能となる。また培養下における分化モデルを用いることにより、心筋分化促進物質などの新たな生理活性物質の探索も可能となる。われわれは、マウス iPS 細胞を用いて 3 次元培養下における血管構造形成モデルを構築し、新規海洋生物由来 HDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）阻害物質 Azumamide の血管形成抑制作用を示すことに成功した¹⁸⁾。同モデルを用いた血管形成抑制または促進物質の探索が可能と考えられる。さらにこうしたシステムを患者特異的 iPS 細胞を用いて構築することにより、疾患特異的作用物質の探索などにも展開可能と考えられる。

受精卵を用意することが必要であるヒト ES 細胞とくらべて、iPS 細胞は数多くの細胞株を樹立しやすく iPS 細胞バンクが構築しやすい。そこから細胞を誘導して array（アレイ）化することにより、種々のヒトモデル細胞パネルのようなものを構築することができる。こうしたヒトモデル細胞パネルは、薬剤の安全性試験に応用可能と考えられる。たとえば、千人分や万人分などの心筋細胞や肝細胞を並べたパネルを用いて薬剤の細胞毒性をスクリーニングすることにより、稀に発生する心毒性

や肝障害などを事前に検出できるかもしれない。さらには障害を起こす細胞を解析し原因を明らかにすることにより、副作用を起こす症例を事前に特定し投薬を避ける「テーラーメイド医療」に貢献しうる可能性もある。

3) その他動物モデルへの応用

循環器病関係のモデル動物には、マウスモデルばかりでなくマウス以外の動物種のものが数多くある（高血圧自然発症ラット、糖尿病モデルラット、心筋症ハムスターなど）。これらモデル動物からのiPS細胞の樹立が可能となれば、モデル動物と同動物由来細胞を用いて、動物モデルと細胞実験を相互対応させながら新しい病態の解析をおこなうことなどが可能となると考えられる。

■ IV. iPS細胞研究は今後、細胞の改良を中心にさまざまな基礎・臨床研究への応用へ進む

iPS細胞に関する研究は今後、iPS化（初期化）機構に関するもの、iPS細胞そのものを利用したもの、iPS化という現象を利用したものなど多岐にわたって進められると思われる。

1) iPS細胞の改良

iPS細胞は当初、3～4個の遺伝子をレトロウイルスを用いて導入することにより誘導されているが、細胞治療に用いることができるレベルのiPS細胞を樹立するためには、誘導法、誘導効率などの改良が必要である。

a) c-myc トランスジーンなし iPS細胞

iPS細胞誘導に用いた4因子の1つであるc-mycは癌遺伝子の1つであり、実際mycありiPS細胞由来のマウス個体では高率に癌が発生した。その後mycを除いた3因子でもiPS細胞誘導が可能となったが、mycなしiPS細胞由来マウス個体では癌の発生がほとんど認められなくなった¹⁹⁾。

b) レトロウイルスなし iPS細胞

現在iPS細胞誘導にはレトロウイルスによる遺伝子導入がおこなわれている。レトロウイルスにより導入された遺伝子はゲノム上のどこかに組み込まれることになる

ので、導入遺伝子が組み込まれた場所によっては、癌化を含む種々の細胞の変異をもたらす可能性がある。レトロウイルスを用いずゲノムをintactに保ったままの遺伝子導入法の方がより安全なiPS細胞を樹立できると考えられる。2008（平成20）年9月に米国よりアデノウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現によるiPS細胞誘導が“Science”誌に報告された²⁰⁾。

c) ウイルスベクターなし iPS細胞

上述アデノウイルスによる報告のわずか1週間後、ウイルスベクターを用いずプラスミドのみによるiPS細胞誘導法がYamanakaらにより同じく“Science”誌に報告されている²¹⁾。このように、iPS細胞が報告されてからわずか2年であるがiPS細胞の改良は急速に進んでいる。

d) トランスジーンなし iPS細胞

ウイルスを用いない場合でも、遺伝子操作をした細胞のヒトへの移植応用は慎重におこなわれるべきと考えられている。遺伝子操作をおこなわず、蛋白を作用させたり低分子化合物を用いてiPS細胞を誘導しようとする試みが盛んにおこなわれている。しかし、たとえば低分子化合物の多くは癌性を有していることは古くから知られている。誘導に成功しても誘導された細胞のiPS細胞としての機能および安全性は厳密に評価される必要がある。

e) 誘導効率の改善

患者特異的iPS細胞バンクの構築など将来的には多数の安定したiPS細胞株を樹立できることが必要となる。そのために現在数%以下であるiPS細胞誘導効率を上げて、さまざまなヒトや組織からiPS細胞を樹立可能にしておく必要がある。

f) 培養方法の改善

ヒトへの細胞移植応用に用いるiPS細胞の場合は、血清やフィーダー細胞を用いずに樹立し、GMP基準を満たすレベルのiPS細胞を用意する必要がある。

2) iPS化（リプログラミング）機構の解析

3個または4個の特定の遺伝子を導入することにより、線維芽細胞などからiPS細胞が誘導されるという事実は明らかとなったが、その分子メカニズムはまったく不明である。遺伝子を導入された細胞のうち、iPS細胞化するのはいったいどの細胞で、iPS細胞化される細胞

の条件は何か？導入遺伝子の発現量やその組み合わせはどのように影響するのか？実際導入遺伝子がどのようにはたらいて iPS 細胞化させているのか？など解決すべき問題は尽きない。

3) iPS 細胞の医療応用

iPS 細胞化のプロセスやメカニズムの解析とはまったく独立して、iPS 細胞として樹立させたものを出発点とし、これをさまざまな形で利用する方法の開発も iPS 細胞研究の大きな柱である。上で述べた心血管細胞をはじめ、神経細胞、膵β細胞など、さまざまな臓器・組織が iPS 細胞を用いた再生医学研究のターゲットとなる。

4) その他

「一旦分化した細胞を簡便にリプログラミングして元に戻すことができる。」という新しい技術は、さまざまな研究に新しいストラテジーを提供する。リプログラミングそのものに関する研究はもちろんのこと、分化/脱分化におけるエピジェネティクス研究や癌化メカニズムの解析など iPS 細胞研究が新しい展開をもたらすと考えられる研究領域は数多く存在する。

■ おわりに

ほ乳類の成体の細胞がリプログラミングされて未分化なものに戻りうることはクローン羊ドリーによってすでに示されていたが、その後 10 年を経て報告されたヒト iPS 細胞樹立の報告がそれを上回る反響をもって迎えられたのは、iPS 細胞のもつ応用範囲の広さによるであろう。「世界中どこでも施行可能な簡単な方法で成人由来の分化細胞から未分化幹細胞を誘導できる」ということが将来的に科学や社会に及ぼす影響は計り知れない。そこには当然功罪両面が生まれてくることになる。それはすべて科学者と社会が自ら責任を負うものである。極端な熱狂や批判に走ることなく冷静にかつ良識と叡知をもって iPS 細胞の今後に対応していくことが必要と考えられる。



文 献

- 1) Takahashi K *et al* : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 2) Takahashi K *et al* : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007
- 3) Yu J *et al* : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318 : 1917-1920, 2007
- 4) Yamashita J *et al* : Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408 : 92-96, 2000
- 5) Yamashita JK *et al* : Prospective identification of cardiac progenitors by a novel single cell-based cardiomyocyte induction. *FASEB J* 19 : 1534-1536, 2005
- 6) Yurugi-Kobayashi T *et al* : Adrenomedullin/cyclic AMP pathway induces Notch activation and differentiation of arterial endothelial cells from vascular progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 1977-1984, 2006
- 7) Kono T *et al* : Differentiation of lymphatic endothelial cells from embryonic stem cells on OP9 stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 : 2070-2076, 2006
- 8) Sone M *et al* : Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 : 2127-2134, 2007
- 9) Yamahara K *et al* : Augmentation of neovascularization in hindlimb ischemia by combined transplantation of human embryonic stem cells-derived endothelial and mural cells. *PLoS ONE* 3 : e1666, 2008
- 10) Narazaki G *et al* : Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 498-506, 2008
- 11) Mauritz C *et al* : Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118 : 507-517, 2008
- 12) Schenke-Layland K *et al* : Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 26 : 1537-1546, 2008
- 13) Xie C *et al* : A Comparison of Murine Smooth Muscle Cells Generated from Embryonic versus Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* 2008 [Epub ahead of print]
- 14) Mummery C *et al* : Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107 : 2733-2740, 2003
- 15) Laflamme MA *et al* : Cardiomyocytes derived from human

- embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25 : 1015-1024, 2007
- 16) Yamanaka S : Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 1 : 39-49, 2007
- 17) Nishikawa S *et al* : The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 : 725-729, 2008
- 18) Nakao Y *et al* : Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the *in vitro* vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett* 18 : 2982-2984, 2008
- 19) Nakagawa M *et al* : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26 : 101-106, 2008
- 20) Stadtfeld M *et al* : Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322 : 945-949, 2008
- 21) Okita K *et al* : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322 : 949-953, 2008

YAMASHITA Jun

京都大学再生医科学研究所・幹細胞分化制御研究領域准教授

やました・じゅん

1965 年, 京都府生まれ.

1990 年, 京都大学医学部卒業.

1998 年, 京都大学医学博士.

2000 年, 京都大学大学院医学研究科分子遺伝学・助手.

2002 年, 京都大学大学院医学研究科分子遺伝学・助教授.

2003 年, 京都大学再生医科学研究所・幹細胞分化制御研究領域・助教授 (独立).

2007 年, 京都大学再生医科学研究所・幹細胞分化制御研究領域・准教授 (名称変更).

現在に至る.

専門: 幹細胞生物学, 再生医学, 循環器内科学.

研究テーマ: ES 細胞, iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究.

趣味: 音楽鑑賞 (最近はおもにクラシック), ワイン, 子守.



ES 細胞および iPS 細胞からの血管細胞分化

Vascular cell differentiation from ES and iPS cells

Keywords

ES 細胞 (Embryonic stem cells)
iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells)
分化
血管再生

山下 潤

京都大学再生医科学研究所 幹細胞分化制御研究領域

Summary

We have been investigating molecular mechanisms of vascular development and regeneration using embryonic stem (ES) cells. Previously, we established an ES cell differentiation system that reproduces early vascular development using vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk1) -positive cells as common vascular progenitors. Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (ECs) from ES cells. More recently, a novel pluripotent stem cell line, induced pluripotent stem (iPS) cells, was established from mouse and human somatic cells. We applied our ES cell differentiation system to mouse iPS cells, and succeeded in systematically inducing cardiovascular cells from iPS cells. Time course and efficiency of the mouse iPS cell differentiation were all comparable with those of mouse ES cells. This study would largely contribute to novel understanding for iPS cell biology and the development of novel cardiovascular regenerative medicine. Here I discuss perspectives for vascular biology and medicine using ES and iPS cells.

はじめに

虚血性心疾患を中心とする心疾患および脳血管障害は日本における死因のそれぞれ第2位(10万対126)と3位(10万対102)を占め、両者を合わせると第1位の悪性新生物(がん)(10万対254)に肉薄する。一方国民医療費では、虚血性心疾患と脳血管障害を合わせると悪性新生物を上回り(2兆5千億 vs 2兆3千億円)(以上厚生労働省「平成16年度国民医療費の概況」)、心血管系疾患は、現在および未来にわたり日本の医療が取り組むべき最重要研究課題の1つと考えられる。近年の幹細胞生物学の発展を背景とした再生医療研究において、血管および心臓は最も急速に研究の進展が認められる臓器である。すなわち、さまざまな新しい心血管幹細胞・前駆細胞の発見や心血管分化機構の解析、さらには前駆細胞をヒトに用いた再生医療の試みまで、

Yamashita, Jun K

Laboratory of Stem Cell Differentiation, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University
E-mail : juny@frontier.kyoto-u.ac.jp