

況および今後の課題について述べる (図 1)。

I. *in vitro* での iPS 細胞の活用

I. 疾患モデリング

iPS 細胞技術が開発されて以来、さまざまな疾患特異的 iPS 細胞を用いた *in vitro* での疾患モデリング (疾患再現) が報告されている。それらの中で神経・精神疾患に関する報告を表 1 にまとめた。

早発性疾患は原因遺伝子の影響が大きいと考えられ、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA)⁵⁾・家族性自律神経失調症 (familial dysautonomia: FD)⁶⁾ などではいち早く疾患再現が報告された。SMA では疾患 iPS 細胞由来運動神経細胞の減少や患者由来線維芽細胞・iPS 細胞での核ジェム数の減少が示された。また、FD では疾患特異的 iPS 細胞由来神経堤細胞の移動度の減少が示された。

その後、晩発性疾患であるパーキンソン病⁷⁾ で、疾

患特異的 iPS 細胞由来ドーパミン作動性神経細胞を酸化ストレスの一種である過酸化水素や 6-OHDA に曝露すると、コントロール細胞と比較し神経細胞死が誘導されやすい、つまり酸化ストレスに対し脆弱であることが示された。

また、精神疾患である統合失調症⁸⁾ の疾患再現が報告された。細胞レベルでの表現型が不明な疾患ではあるが、コントロール iPS 細胞および疾患特異的 iPS 細胞からシナプシン陽性神経細胞を分化誘導し、疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞のシナプス結合が減少していることを示した。さらに、抗精神病薬の一つであるロキサピンを培養液に添加することにより、減少していたシナプス結合がコントロール細胞と同程度にまで増加した。このように、多因子で生じる疾患や細胞レベルでの表現型が不明な疾患であっても、疾患 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞をコントロールと比較することでモデルを構築することが可能であることが示された点で iPS 細胞の有用性が大きく

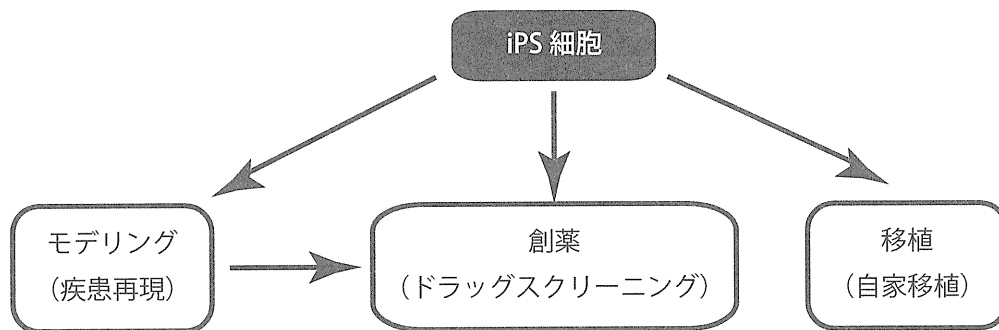


図 1 iPS 細胞の活用法

表 1 神経精神疾患特異的 iPS 細胞を用いた疾患モデリング

	報告年	疾患名	解析対象の細胞種	疾患モデル	
神経変性疾患	早発性疾患	2009	家族性自律神経失調症	神経堤細胞	遊走異常
		2009	脊髄性筋萎縮症	下位運動神経細胞	運動神経細胞死
	晩発性疾患	2011	パーキンソン病	中脳ドーパミン神経細胞	酸化ストレスに対する脆弱性
精神疾患	2010	レット症候群 ⁹⁾	神経細胞	(形態的)シナプスの減少	
	2011	統合失調症	神経細胞	(機能的)シナプス結合の減少	

示された。

II. 創薬

疾患モデリングが成功した神経疾患の中で、薬剤スクリーニングが進んでいる疾患が先述した SMA である。SMA は SMN1 (survival motor neuron 1) 遺伝子の変異が原因で、重症度の高い患者ほど SMN たんぱく質の産生量が著しく低下している。SMN2 遺伝子は SMN1 遺伝子と非常に相同性が高いものの、一部の塩基配列の置換が原因で、SMN2 遺伝子から産生されるたんぱく質の約 90% はエキソン 7 が欠失した SMN たんぱく質である。エキソン 7 のスキッピングを修正する薬物は SMA 患者での全長 SMN たんぱく質の産生量を増加させ、SMA の治療薬になり得る可能性がある。

実際に、SMA で疾患再現・核ジェム数の減少を報告した論文では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を有するパルプロ酸およびトブラマイシンが疾患 iPS 細胞での全長 SMN たんぱく質量を増加させることを示している。

III. 今後の課題

創薬開発を目的とした薬剤スクリーニングを行うためには、同時に多数のサンプルを高速で解析する必要

がある。また、疾患の標的細胞への高効率な分化誘導法を確立し、各疾患のモデルを構築する必要がある。そのことによって、今後、他の疾患においても、薬剤スクリーニングのためのプラットフォームの創出が可能になるであろう。

さらに、晩発性疾患の大部分は原因遺伝子が不明の孤発性が大部分を占める。家族性疾患から得られた知見を孤発性疾患に応用することが iPS 細胞作製技術を最大限に活用することになると考えられる。そのためには、均一な iPS 細胞株を使用する必要がある。現在ではホストのゲノムへの遺伝子挿入がない方法での iPS 細胞の樹立が行われている。しかしながら、iPS 細胞は ES 細胞と類似の性質を有しているものの、DNA のメチル化の状態は ES 細胞と異なることが示されている¹⁰⁾。また、iPS 細胞は体細胞コード領域の変異の起こる頻度が高いこと¹¹⁾、オリジナルの細胞とは異なったコピー数の多型が検出されること¹²⁾が報告された。これらが、iPS 細胞のクローン間や iPS 細胞株間の多様性の原因であると考えられる(表 2)。今後、これらの課題を克服する技術が開発されるであろう。

表 2 iPS 細胞技術の課題

	体細胞コード領域変異	コピー数多型 (copy number variation: CNV)	エピジェネティック修飾
頻度	線維芽細胞と比較し、iPS 細胞での変異は高頻度に起こる	オリジナルの細胞では検出されない CNV が iPS 細胞で検出される	ES 細胞と iPS 細胞で異なる CG-メチル化領域から体細胞由来のメチル化領域を差し引いた iPS 細胞に特異的な割合が 51~56%
検出方法	たんぱく質をコードする領域の全ゲノムシーケンス	affymetrix genome-wide human SNP array 6.0	バイサルファイト・ショットガン・シーケンス法
原因	少数の線維芽細胞に既存の変異 リプログラミング 培養	リプログラミング 培養	リプログラミング 培養

II. *in vivo* での iPS 細胞の活用

I. 移植

ファンconi貧血の論文¹³⁾では、患者から採取した線維芽細胞の遺伝子変異を修復することでiPS細胞の樹立が可能となったことが示された。このことは、患者自身から採取した細胞を*in vitro*で治療した後、患者に移植するという自家移植の可能性を強く支持するものである。

現在、iPS細胞を使用したヒトへの移植治療や治験はまだ行われていない。しかしながら、ES細胞由来の細胞をヒトに移植する治験や、iPS細胞由来の細胞を動物モデルに移植する研究が進められている。

米国では、ES細胞由来の網膜色素上皮細胞を用いたスターガルト病・加齢性黄斑変性治療が第一相臨床治験として開始されている¹⁴⁾。また、移植を目的とし、ヒトiPS細胞から網膜色素上皮および視細胞が異種成分不含の分化方法により誘導されている¹⁵⁾。ブタiPS細胞由来の視細胞を、ヨード酢酸塩投与により視細胞を除去したブタに移植し、移植した視細胞が外顆粒層に生着することが示された¹⁶⁾。

パーキンソン病ではカニクイザルのES細胞から分化誘導したドーパミン作動性神経細胞をパーキンソン病モデルのカニクイザルの脳に移植し、移植された細胞が脳内で生着し神経症状の改善をもたらすことが報告されている¹⁷⁾。ヒトiPS細胞を用いた研究では、分化誘導したドーパミン作動性神経細胞をパーキンソン病モデルのラットに移植し、運動疾患が改善されることが示された¹⁸⁾。

脊髄損傷や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) モデルでは主としてグリア細胞が移植実験に利用されている¹⁹⁾。脊髄損傷モデルではヒトES細胞から分化誘導したオリゴデンドロサイトを脊髄損傷モデルのラットに移植し行動が改善されることを示している²⁰⁾。グリア前駆細胞をALSモデルマウスに移植した実験では、正常なアストロサイトの運動神経細胞保護効果が示唆されている²¹⁾。

II. 今後の課題

iPS細胞由来細胞の移植については、未分化な細胞から生じる奇形腫や移植する目的細胞が過剰に増殖す

るといった腫瘍形成の問題がある。これらの問題を回避するために未分化細胞の除去や目的細胞の*in vivo*での長期にわたる観察が必要である。

おわりに

近年、中枢神経系の治療に対する研究は、神経幹細胞・iPS細胞・ES細胞からの神経細胞の発生・分化に基づき進められてきた。一方で、神経細胞が機能を有するためには、神経細胞の機能再生も重要であり、軸索伸長に関する研究が重ねられてきている^{22, 23)}。軸索伸長には微小管やアクチンフィラメントといった細胞骨格の再構築が必須で、それらを制御しているシグナル伝達経路として、低分子量Gタンパク質Rhoファミリー (Rho, Rac および Cdc42) があげられる。神経細胞において、Rhoの活性化は神経突起の退縮に必要であり、RacとCdc42はそれぞれ成長円錐における葉状仮足および糸状仮足形成を制御し、神経突起の伸長に必要であることがわかっている²⁴⁾。さらに、Rho/ROCK経路は神経細胞のアポトーシスに関与しており、ROCK阻害剤であるY-27632を移植細胞に加えることにより移植細胞である神経幹細胞のアポトーシスが抑制されることが示されている²⁵⁾。以上のことから、神経細胞またはグリア細胞の移植時に低分子量Gタンパク質Rhoファミリーに作用する薬剤を使用することで移植細胞の生存率を上げ、神経細胞の突起伸長を促すことなどが期待される。これまでの中枢神経の研究を統合した手法により、神経系の再生医療においてさらなる発展が期待される。

参考文献

- 1) Desnuelle C, et al : A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol study group. *Amyotroph. Lateral scler. Other Motor Neuron Disord* 2 : 9-18, 2001.
- 2) Shefner JM, et al : NEALS Consortium. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology* 63 : 1656-1661, 2004.
- 3) Takahashi K, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007.
- 4) Yu J, et al : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318 : 1917-1920, 2007.
- 5) Ebert AD, et al : Induced pluripotent stem cells from a

- spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457 : 277-280, 2009.
- 6) Lee G, et al : Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461 : 402-406, 2009.
 - 7) Nguyen HN, et al : LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 8 : 267-280, 2011.
 - 8) Brennand KJ, et al : Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473 : 221-225, 2011.
 - 9) Marchetto MCN, et al : A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143 : 527-539, 2010.
 - 10) Gore A, et al : Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471 : 63-67, 2011.
 - 11) Hussein SM, et al : Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471 : 58-62, 2011.
 - 12) Lister R, et al : Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471 : 68-73, 2011.
 - 13) Raya A, et al : Disease-corrected haematopoietic progenitors from fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460 : 53-59, 2009.
 - 14) Zhu D, et al : Polarized secretion of PEDF from human embryonic stem cell-derived RPE promotes retinal progenitor cell survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 : 1573-1585, 2011.
 - 15) Osakada F, et al : In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* 122 : 3169-3179, 2009.
 - 16) Zhou L, et al : Differentiation of induced pluripotent stem cells of Swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. *Stem Cells* 29 : 972-980, 2011.
 - 17) Takagi Y, et al : Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* 115 : 102-109, 2005.
 - 18) Rhee YH, et al : Protein-based human iPSC cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease. *J Clin Invest* 121 : 2326-2335, 2011.
 - 19) Kumagai G, et al : Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 4 : e7706, 2009.
 - 20) Erceg S, et al : Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells* 28 : 1541-1549, 2010.
 - 21) Lepore AC, et al : Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci* 11 : 1294-1301, 2008.
 - 22) Fujita Y, et al : Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *EMBO J* 30 : 1389-1401, 2011.
 - 23) Inoue H, et al : Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 : 14430-14435, 2007.
 - 24) Luo L : Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18 : 601-635, 2002.
 - 25) Koyanagi M, et al : Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors. *Journal of Neuroscience Research* 86 : 270-280, 2008.

精神科専門医・研修医待望のアドバンスクラスレベルの教科書

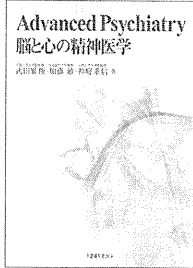
Advanced Psychiatry

脳と心の精神医学

大阪大学大学院教授 自治医科大学教授 九州大学大学院教授
武田雅俊・加藤 敏・神庭重信 著

NBM と EBM が統合されたわが国独自の精神医学の確立をゴールにすえて、内外の重要誌 (AGP, AJP, BJP, 精神経誌等) の最新の知見に目を通した上でのオリジナリティあふれる書下ろし。

A5変型判・440頁 定価 7,140円(本体 6,800円+税5%) ISBN978-4-7653-1299-8



株式会社金芳堂 京都市左京区鹿ヶ谷西寺ノ前町 34 番地 〒606-8425
 Tel 075-751-1111 Fax 075-751-6858
 E-mail (営業部) : eigyo@kinpodo-pub.co.jp
<http://www.kinpodo-pub.co.jp/>

4) iPS 細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究

京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門 今村恵子

同 臨床応用研究部門 井上治久

key words iPS cell, disease modeling, drug screening, neurodegenerative disease, psychiatric disease

要 旨

人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell (iPS細胞) は、体細胞に胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES細胞) で発現している数種類の遺伝子を導入することにより作製され、ES細胞と同様に様々な系譜の細胞に分化させることができる。iPS細胞作製技術の開発により、患者自身の遺伝子情報を有した疾患標的細胞の作製が可能となった。また、原因遺伝子が同定されている疾患だけでなく、遺伝歴のない孤発性疾患においても疾患標的細胞の作製が可能である。本稿では、2007年にヒトiPS細胞作製が可能となってから現在までのiPS細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究について述べる。

動 向

中枢神経は体の深部に位置すること、再生が難しいことなどから、ヒトにおける神経疾患の直接的な病態の解析は困難である。そのため、神経・精神疾患の研究では動物モデルや細胞モデルによる間接的な解析が中心である。近年、様々な遺伝子操作された疾患モデル動物が作製され、神経・精神疾患の病態解明が急速に進んでいる。しかし、疾患モデル動物で有効であると証明された薬剤が

ヒトにおける臨床研究で有効性を認めないことも少なくはない¹⁾。その原因として、ヒトとモデル動物の遺伝子発現の違いや解剖学的な違いが関与していることなどが考えられる²⁾。

2006年にマウス³⁾、2007年にヒト⁴⁾人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cell (iPS細胞) が作製された。ヒトiPS細胞は、胚性幹細胞 embryonic stem cell (ES細胞) で発現している4つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) をレトロウイルスベクターを用いてヒト線維芽細胞に導入することで体細胞を初期化し (リプログラミング)、多能性幹細胞が樹立された。iPS細胞はES細胞に匹敵する多能性を獲得した多能性幹細胞であり、ほぼ無限に増殖し、内胚葉・中胚葉・外胚葉への分化能力を有している。移植後に腫瘍化がみられることがあるため、近年では、より腫瘍化しにくいiPS細胞の樹立方法が開発されている^{5,6)}。

iPS細胞作製技術の開発により、患者自身の体細胞からiPS細胞を樹立することで、患者の遺伝子情報を有した神経細胞の作製が可能となった。iPS細胞はすでに原因遺伝子が同定された疾患だけでなく、原因遺伝子が明らかにされていない疾患においてもモデル細胞となり得る利点がある。

A. 疾患特異的iPS細胞の樹立と疾患モデルの作製

iPS細胞作製技術を用いて、様々な神経・精神疾患患者の体細胞から疾患iPS細胞が作製されている(表1)。iPS細胞を樹立後、疾患標的細胞への分化誘導が行われる。例えば、筋萎縮性側索硬化症 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) 患者由来iPS細胞では、retinoic acid, sonic hedgehogの添加により神経前駆細胞から脊髄運動神経細胞

が誘導される⁷⁾。また、パーキンソン病患者由来iPS細胞からは, sonic hedgehog, fibroblast growth factor (FGF) 8の添加によりドパミン神経細胞が誘導されている⁸⁾。現在, iPS細胞が作製されている主な神経・精神疾患を以下に記載する。

1. パーキンソン病(Parkinson's Disease)

2009年にSoldnerらは50歳代から80歳代の5人の孤発性パーキンソン病患者の線維芽細胞より

表1 主な神経・精神疾患患者由来iPS細胞を用いた論文報告

疾患	遺伝形式	遺伝子異常	再現された表現型	reference
パーキンソン病	孤発性	-	-	Soldner 2009 ⁸⁾
パーキンソン病	常染色体劣性遺伝	<i>LRRK</i> (G2019S)	酸化ストレス下で caspase-3の増加, ドパミン神経細胞死の増加	Nguyen 2011 ¹⁰⁾
パーキンソン病	常染色体劣性遺伝	<i>PINK1</i> (Q456X, V170G)	ストレス下でドパミン神経細胞における Parkin 蛋白のミトコンドリア移動の障害	Seibler 2011 ¹¹⁾
筋萎縮性側索硬化症	常染色体優性遺伝	<i>SOD1</i> (L144F)	-	Dimos 2008 ⁷⁾
筋萎縮性側索硬化症	常染色体優性遺伝	<i>SOD1</i> (L144F, G85S)	-	Boulting 2011 ¹²⁾
脊髄性筋萎縮症1型	常染色体劣性遺伝	<i>SMN1</i> deletion	運動神経細胞の減少, 細胞体の小型化, SMN 蛋白の発現量低下	Ebert 2009 ¹³⁾
ハンチントン病	常染色体優性遺伝	<i>IT15</i> (72CAG repeats)	-	Park 2008 ¹⁴⁾
フリードライヒ運動失調症	常染色体劣性遺伝	<i>FXN</i> (GAA expansion)	-	Ku 2010 ¹⁵⁾ Liu 2011 ¹⁶⁾
家族性自律神経失調症	常染色体劣性遺伝	<i>IKBKAP</i> (homozygous 2507+6T>C)	スプライシング異常, 神経細胞数の減少および遊走能の低下	Lee 2009 ¹⁷⁾
統合失調症	孤発性	<i>DISC1</i> (4bp deletion at the exon-intron 12 region)	-	Chiang 2011 ¹⁸⁾
統合失調症	孤発性	-	synaptic connectivityの低下	Brennand 2011 ¹⁹⁾
レット症候群	X染色体優性遺伝	<i>MeCP2</i> (I155 del32; Q244X)	神経細胞体の小型化, シナプス数の減少, 電気生理学的機能の異常	Marchetto 2010 ²⁰⁾
レット症候群	X染色体優性遺伝	<i>MeCP2</i> (Δ exon 3-4; T158M)	神経細胞体の小型化	Cheung 2011 ²¹⁾

iPS細胞を樹立した⁸⁾。2011年, Nguyenらは遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子のひとつである *Leucine Rich Repeat Kinase-2 (LRRK2)* 遺伝子にG201S変異を有する患者からiPS細胞を作製し, ドパミン神経細胞に分化させた。これまでのパーキンソン病研究から, 変異*LRRK2*の過剰発現により α -synucleinが蓄積することが示されている⁹⁾。線維芽細胞やiPS細胞には α -synucleinの蓄積はみられなかったが, 神経細胞に分化誘導することにより, 細胞内に α -synuclein蛋白の蓄積を生じた。また, *LRRK2*遺伝子異常を有する患者由来iPS細胞から分化させた神経細胞では, 酸化ストレス関連遺伝子の発現増加がみられた。さらに, hydrogen peroxide, MG132, 6-hydroxydopamineによるストレスに対して, caspase-3の活性化や細胞死がコントロールよりも有意に惹起された¹⁰⁾。

Seiblerらは, *PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)* 遺伝子異常を有する遺伝性パーキンソン病患者3人からiPS細胞を作製した。これらのiPS細胞をドパミン神経細胞に分化させたところ, ストレス下でのParkin蛋白のミトコンドリアへの輸送の障害がみられた。この所見はレンチウイルスでPINK1蛋白を過剰発現することにより改善した¹¹⁾。

2. ALS

Dimosらは, 遺伝性ALSの原因遺伝子のひとつである*SOD1*遺伝子のL144F変異を有する82歳と89歳の高齢患者の線維芽細胞からiPS細胞を作製し, 下位運動神経細胞のマーカーであるHB9およびISLET1/2陽性を示す運動神経細胞へ分化誘導を行った⁷⁾。Boultingらは, *SOD1*遺伝子のG85S変異, L144F変異を有する患者由来のiPS細胞を作製した。運動神経細胞へ分化誘導し, 免疫染色法および電気生理学的手法を用いて, 作製した運動神経細胞の評価を行っている¹²⁾。し

かし, 現時点ではALSにおけるiPS細胞を用いた病態再現は報告されていない。

3. 脊髄性筋萎縮症 spinal muscular atrophy (SMA)

SMAは下位運動神経細胞が障害される疾患で, 乳児期に発症する重症型のtype1, 中間型のtype2, 18カ月から思春期の間に発症する軽症型のtype3がある。Ebertらは, 3歳のtype1患者由来のiPS細胞を作製し, 脊髄運動神経細胞に分化させた。コントロールに比較して脊髄運動神経細胞数の減少と細胞体の小型化がみられた。また, SMN蛋白の発現低下がみられた。このSMN蛋白の減少は, histone deacetylase阻害薬であるvalproic acidやtobramycinによって改善した¹³⁾。

4. ハンチントン病 Huntington disease

Parkらは, *IT15*遺伝子に伸長CAG repeatを有する20歳の患者からiPS細胞を樹立し, 作製したiPS細胞におけるCAG repeatの伸長を示した¹⁴⁾。

5. 脊髄小脳変性症 spinocerebellar degeneration

脊髄小脳変性症のひとつである, フリードライヒ運動失調症患者由来のiPS細胞が作製されている。フリードライヒ運動失調症は常染色体劣性遺伝を呈し, 神経変性と心筋障害などを呈する。原因遺伝子*frataxin*のイントロンのGAAリピート伸長がみられる。Kuらは, フリードライヒ運動失調症患者由来iPS細胞を樹立したところ, クローンによるCAGリピートの不安定性がみられた¹⁵⁾。Liuらは, 2人の患者からiPS細胞を作製した。作製されたiPS細胞では, GAAリピートの伸長と*frataxin* mRNAの減少を認めた¹⁶⁾。

6. 家族性自律神経失調症 familial dysautonomia

家族性自律神経失調症は *I- κ -B kinase complex-associated protein (IKBKAP)* 遺伝子の変異によって末梢神経障害を生じる稀な疾患である。Leeらは、10歳の家族性自律神経失調症患者由来のiPS細胞を作製した。このiPS細胞から分化させた神経堤細胞においてスプライシングの異常を認めた。また、自律神経細胞の数の低下や遊走能の低下が認められた。一方、これらの所見は植物ホルモンの一種であるkinetin投与により改善した¹⁷⁾。

7. 精神疾患

Chiangらは、統合失調症やうつ病などの精神疾患発症の危険因子と考えられている *Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DIS1)* 遺伝子の変異を有する統合失調症患者からiPS細胞を樹立した¹⁸⁾。Brennandらは、4人の統合失調症患者由来のiPS細胞を樹立し、神経細胞に分化させた。統合失調症の患者由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞は、コントロールに比較して、神経突起数の減少、シナプス蛋白の減少を呈し、synaptic connectivityの低下を示した。これらの所見は、抗精神病薬のひとつであるloxapineによって改善がみられた¹⁹⁾。

メチル化制御に関連する遺伝子 *MeCP2* の変異で生じるレット症候群患者のiPS細胞由来神経細胞は、神経細胞体の小型化がみられた^{20,21)}。

B. iPS細胞を用いた神経・精神疾患モデル研究の課題と今後の展望

iPS細胞を用いた疾患モデリングにおいて、いくつかの克服すべき点がある。iPS細胞では同じ患者体細胞由来であっても分化誘導効率がクローンによって異なる場合がある。ES細胞でも同様

のクローンによる分化能の違いが報告されている²²⁾。疾患解析で生じた差がクローン間の差であるのか、個体間あるいは疾患による差であるのか、慎重に解析する必要がある。よって、iPS細胞を用いた疾患モデル研究では、クローン間のばらつきを超えた病態再現が必要となる。また全ゲノム関連解析 genome wide association studies (GWAS) などにより、疾患関連single nucleotide polymorphisms (SNPs) を全く有さない人がいることは考えにくく、疾患に応じてコントロールの設定を選択する必要がある²⁾。

多くの神経・精神疾患、特に神経変性疾患は比較的高齢になってから発症すること、孤発性疾患の場合には遺伝的背景以外の環境要因が発症に関連していることから、神経変性疾患の病態再現を行うには、加齢変化を短縮させ、環境要因と関連する因子の導入を行う必要があるかもしれない。

むすび

近年、遺伝子変異を有する神経・精神疾患の病態解明の急速な進歩により、神経・精神疾患の知見が深まってきている。iPS細胞を用いた研究の重要な特徴は、原因遺伝子が同定されている疾患だけでなく、原因遺伝子が不明な遺伝性疾患や孤発性疾患における病態解明や創薬への応用が期待できる点である。神経・精神疾患患者の多くは孤発性であり、iPS細胞を用いた神経・精神疾患病態解明への研究の発展と一日も早い治療開発への応用が望まれる。

文献

- 1) Shefner JM, Cudkovic ME, Schoenfeld D, et al. NEALS Consortium. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology*. 2004; 63: 1656-61.
- 2) Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2011; 89: 655-61.
- 3) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of

- pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
- 4) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
 - 5) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011; 8: 409-12.
 - 6) Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, et al. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature*. 2011; 474: 225-9.
 - 7) Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008; 321: 1218-21.
 - 8) Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009; 136: 964-77.
 - 9) Cookson MR. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11: 791-7.
 - 10) Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*. 2011; 8: 267-80.
 - 11) Seibler P, Graziotto J, Jeong H, et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci*. 2011; 31: 5970-6.
 - 12) Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, et al. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011; 29: 279-86.
 - 13) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 2009; 457: 277-80.
 - 14) Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008; 134: 877-86.
 - 15) Ku S, Soragni E, Campau E, et al. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA · TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 631-7.
 - 16) Liu J, Verma PJ, Evans-Galea MV, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev*. 2011; 7: 703-13.
 - 17) Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*. 2009; 461: 402-6.
 - 18) Chiang CH, Su Y, Wen Z, et al. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol Psychiatry*. 2011; 16: 358-60.
 - 19) Brennand KJ, Simone A, Jou J, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 473: 221-5.
 - 20) Marchetto MC, Carroneu C, Acab A, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010; 143: 527-39.
 - 21) Cheung AY, Horvath LM, Grafodatskaya D, et al. Isolation of MECP2-null Rett syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*. 2011; 20: 2103-15.
 - 22) Osafune K, Caron L, Borowiak M, et al. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2008; 26: 313-5.

再生医学

iPS細胞を用いた腎臓再生と
新規腎疾患モデルの作製

Kidney regeneration and disease modeling using iPS cell technology

全身のすべての細胞に分化しうる多能性幹細胞であるES細胞(embryonic stem cell: 胚性幹細胞)とほぼ同等の性質を有するiPS細胞(induced pluripotent stem cell: 人工多能性幹細胞)がヒトにおいて作製可能となった¹⁾. iPS細胞は患者由来の体細胞から樹立できるため、それから作製された組織や細胞を患者本人に移植した際に拒絶反応が生じない。また、ヒトES細胞と異なり、その樹立にヒト胚を必要としないため倫理的問題が少ない。これらの利点により、再生医療の実現化に向けてiPS細胞を用いた研究がますます盛んに行われている。

本稿では、iPS細胞技術を用いた腎臓領域における再生医学研究の現状と今後の展望について概説する。

iPS/ES細胞から
腎臓への分化誘導

幹細胞から作製された腎臓細胞を移植することによって、疾患腎の機能回復をはかる細胞療法(cell therapy)の開発が期待されている。その目的のためにES細胞の樹立以降、腎臓系譜への選択的な分化誘導法の開発研究が行われてきた²⁾. マウスES細胞に増殖因子などの処理を行い、発生期および成体腎臓のマーカー遺伝子発現細胞を誘導可能であることが報告された。また、それらの細胞が*in vitro*で管状の構造を形成することや、発生中のマウス腎臓に移植した際にホストの腎臓に組み込まれることを示した報告もある。ヒトES細胞やiPS細胞を用いた報告は非常に少ないが、マウスES細胞と同様の処理を施し、腎臓系

譜マーカー遺伝子の発現が誘導されることが示されている。しかし以上の報告において、腎臓マーカー発現細胞の誘導効率や、それらが腎臓としての生理機能を有するのかどうかは不明のままである。今後のさらなる研究の進展が期待される。

難治性腎疾患に対する
新規疾患モデル作製

難治性疾患の患者体細胞から疾患の遺伝情報を有するiPS細胞を樹立し、試験管内で罹患臓器に分化誘導することによって病態を模倣する系を構築し、詳しい病態解析や治療薬探索を行う疾患モデル作製研究(disease modeling)が盛んに行われている³⁾. 筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)にはじまり、現在までに20以上の難治性疾患からのiPS細胞樹立が報告されている。著者らは、腎臓をはじめとする多数の臓器に嚢胞を形成する難治遺伝性腎疾患である常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease: ADPKD)からiPS細胞を樹立した(図1)。現在、ヒトiPS細胞から同疾患で障害される腎臓の尿細管や集合管への分化誘導法の開発を並行して行っており、ADPKD特異的iPS細胞の分化系を用いた新規疾患モデルを開発し、同疾患の病態解析と治療薬探索を行うことをめざしている。

iPS細胞を用いた
その他の腎臓領域の研究

iPS細胞から分化誘導された特定臓器細胞種を用いて、治療薬を探索する研究(drug discovery)や試験管内で薬剤の毒性を評価する方法の開発研究(toxicology)が行われている。腎臓の生理機能を制御する薬剤や再生を促す薬剤の探索、薬剤の腎毒性を検証する系の開発が期待される。

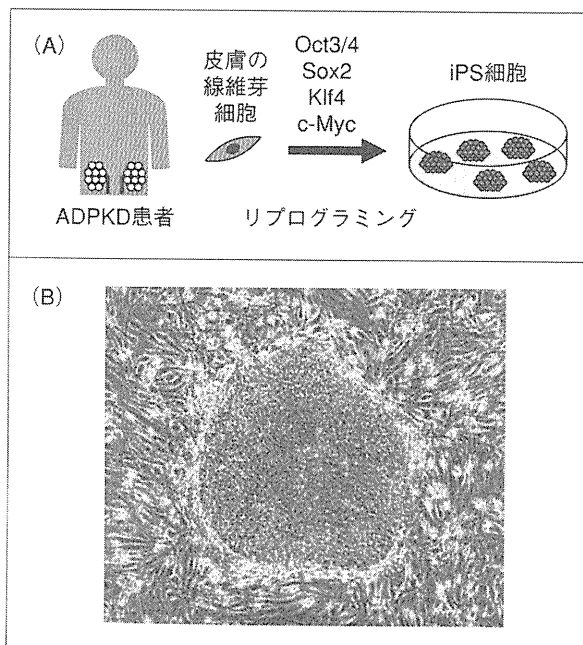


図1 iPS細胞の樹立法(A)と常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)患者から樹立された疾患特異的iPS細胞(B)

以上、本稿で述べた研究や技術開発が進展するために、ヒト iPS 細胞から腎臓への分化誘導法の 1 日も早い確立が望まれる。

- 1) Takahashi, K. et al. : *Cell*, **131** : 861-872, 2007.
- 2) Osafune, K. : *Exp. Cell Res.*, **137** :

- 13-17, 2010.
- 3) Saha, K. et al. : *Cell Stem Cell*, **5** : 584-595, 2009.

長船健二 / Kenji OSAFUNE
 京都大学 iPS 細胞研究所,
 科学技術振興機構 (JST) さきがけ,
 JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト

循環器内科学

骨格筋由来分泌因子マイオカインによる心血管系の制御機構

Role of a muscle-derived secreted factor myokine in regulation of cardiovascular disorders

骨格筋が運動機能に対し重要な役割を果たしていることは明らかであり、また運動により肥満を基盤とした代謝異常あるいは心血管病のリスクが軽減することがよく知られている。最近の研究成果によると、運動トレーニングなどによって骨格筋が生理活性物質を分泌することで、近傍あるいは遠隔臓器に影響を与え、代謝や心血管制御を行っていることが明らかとなりつつある^{1,2)}。これらマイオカイン(myokine)とよぶべき骨格筋由来分泌蛋白の同定と、その生理機能を明らかにすることは、運動により制御されるさまざまな病態生理の解明に結びつく。とくに、マイオカインの心血管系に対する作用とその機序を解明することは、心血管病の治療法の開発につながる可能性がある。

本稿ではマイオカインのひとつである follistatin-like 1 (Fstl1) による心血管制御機構について概説する。

マイオカインである Fstl1

全身の代謝、心血管機能を改善することが知られている運動トレーニングは、一般的に推奨されている。I 型骨格筋の線維数増加とミトコンドリアの生合成亢進を伴う持久性運動トレーニングと、

II 型骨格筋の筋肥大を伴うレジスタンス運動トレーニングに分類することができる。最近、II 型骨格筋の肥満関連疾患に対する影響を詳細に検討する目的のため、レジスタンストレーニングにより活性化されるシグナル伝達分子である Akt1 を骨格筋特異的にスイッチオン・オフすることで、II 型骨格筋の筋肥大を可逆的に誘導できるマウスモデルが確立された³⁾。高カロリー食で肥満モデルを作製した後、II 型骨格筋肥大を誘導すると、インスリン抵抗性の改善、脂肪細胞肥大の減少、肝での脂肪酸酸化亢進を伴う脂肪肝の改善といった全身代謝の著明な改善を認めた。また、骨格筋肥大に伴って筋肉における毛細血管床の増加、つまり血管新生が促進され、筋傷害による筋サテライト細胞の誘導増加を認めた。したがって以上を考え合わせると、筋肉肥大に伴い骨格筋よりマイオカインが産生され、脂肪、肝、血管といった他の組織に直接作用し、代謝や血管機能を調節する可能性が示唆される。この骨格筋肥大モデルマウスを用いた、心血管系に作用するマイオカインのスクリーニングの過程で Fstl1 が見出された⁴⁾。骨格筋肥大あるいは筋肉虚血傷害により骨格筋での Fstl1 は著明に増加し、それに伴い血中濃度も増加し

ていた(図 1)。Fstl1 は follistatin ファミリーに属する蛋白として知られているが、心血管系に及ぼす影響については明らかではなかった。

Fstl1 と血管機能

Fstl1 の血管反応性に対する作用について、アデノウイルスベクターによる発現系を用いて解析されている⁴⁾。Fstl1 をマウスの骨格筋に過剰発現すると、下肢虚血状態における血流の改善と毛細血管床の増加を認めた。さらに、虚血筋肉において Fstl1 は Akt とその下流シグナル分子である eNOS の活性化を誘導し、eNOS 欠損マウスにおいては血流改善効果が消失したことより、Fstl1 の血管新生促進作用は eNOS を介していることが明らかとなった。また、培養血管内皮細胞を用いた検討では、Fstl1 は Akt/eNOS を活性化することにより内皮細胞の管状形成能、遊走能を促進し、アポトーシスを抑制していた。したがって、Fstl1 は血管内皮細胞に作用し、Akt/eNOS シグナルを活性化することにより内皮機能を促進するマ

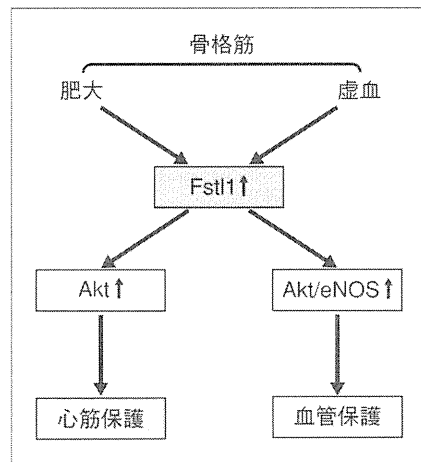


図 1 Fstl1による心血管保護作用

Fstl1 は骨格筋における肥大や虚血で増加するマイオカインであり、内皮細胞においては Akt/eNOS の活性化を介した血管保護作用、心筋細胞においては Akt の活性化を介した心筋保護作用を有する。

iPS細胞技術を用いた腎再生と臨床応用

Kidney regeneration and its clinical application using iPS cell technology



長船 健二

Kenji OSAIFUNE

京都大学 iPS 細胞研究所増殖分化機構研究部門, 科学技術振興機構 (JST) さきがけ,
JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト

◎医学的および医療経済的な問題となっている末期慢性腎不全と慢性腎臓病の解決策のひとつとして、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた腎再生医療の開発が期待されている。実験動物を用いた腎発生や腎構成細胞の運命決定機構を解明する研究も進展し、それらの知見に基づいたマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から腎系譜の細胞を分化誘導する多くの試みもなされてきた。今後、マウス ES 細胞で蓄積された経験と腎発生機構のさらなる解明に基づく、ヒト iPS 細胞から腎構成細胞への高効率の分化誘導法の開発により細胞療法 (cell therapy)、疾患モデル作製 (disease modeling)、治療薬探索 (drug discovery)、薬剤毒性評価系開発 (toxicology) などの臨床応用をめざした研究の発展が期待される。



iPS細胞, ES細胞, 腎再生, 腎発生, 疾患モデル

末期慢性腎不全とその原因となる慢性腎臓病の解決は、医学的のみならず医療経済的にも大きな課題であるが、その解決策のひとつとして幹細胞を用いた腎再生医療の開発があげられる。近年、全身のすべての細胞種に理論上分化しうる多能性幹細胞である胚性幹細胞 (embryonic stem cell : ES 細胞)¹⁻³⁾ とほぼ同等の性質を有する人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) が、マウスに続いてヒトにおいても樹立可能となった⁴⁻⁶⁾。iPS 細胞は個々の患者由来の体細胞から樹立できるため、それから作製された細胞や組織を患者本人に移植した際に拒絶反応が生じない。また、ヒト ES 細胞と異なり、その樹立にヒト胚を必要としないため倫理的な問題が少ない。これらの利点を有する iPS 細胞の誕生によって、再生医療がより現実のことととらえられ、より精力的に研究が進められるようになった。

また iPS 細胞の開発当初には、レトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いて Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc などのリプログラミング因子をゲノムに導入する樹立方法が用いられていた

ため、iPS 細胞の医療応用には導入遺伝子による癌遺伝子の活性化を介した癌化の危険性が危惧されていた。しかし、リプログラミング因子の合成 mRNA 導入⁷⁾ やエピゾーマルベクターを用いた遺伝子導入⁸⁾ などゲノムを傷つけない iPS 細胞樹立法もつぎつぎと開発され、癌化の問題も克服可能となったため、iPS 細胞を用いた再生医療がますます実現化に近づいた。

一方、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、ニワトリ、マウスなどの実験動物を用いた遺伝学的手法による腎発生の研究も盛んに行われており、20 種類以上もの機能的に分化した細胞から構成される腎臓の発生機構も解明が進みつつある。それら腎臓発生の知見をもとに、マウス ES 細胞を用いた報告がほとんどであるが、幹細胞から腎臓への分化誘導法開発に関してすでに多くの試みが行われてきた。

本稿では、発生機構に基づいた ES 細胞や iPS 細胞から腎臓への分化誘導研究のこれまでの知見と今後の展望を概説し、iPS 細胞の特徴をいかに腎臓領域におけるさまざまな臨床応用研究への発

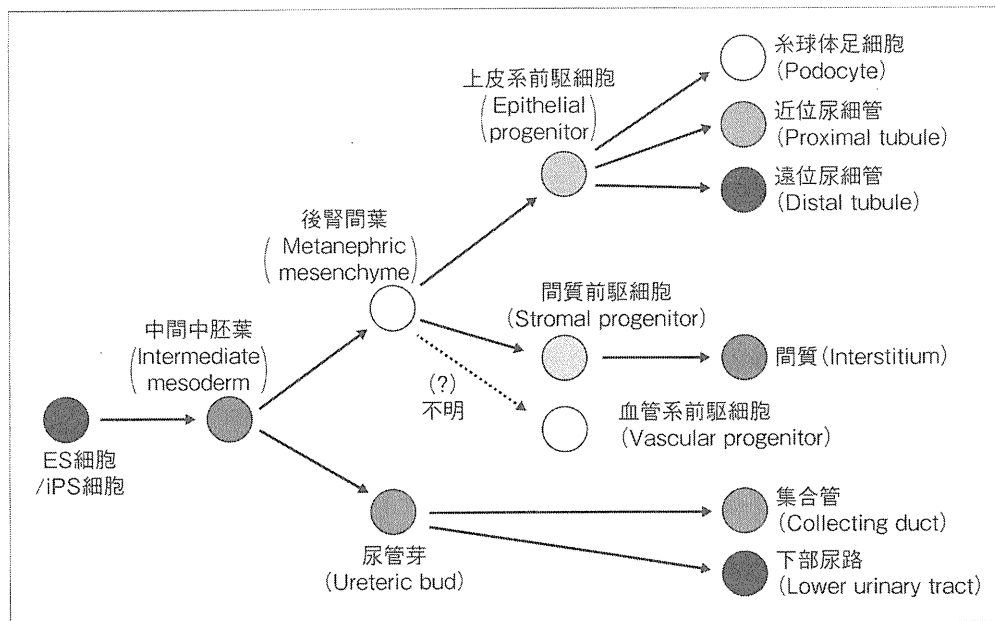


図 1 発生過程を模倣したES/iPS細胞から腎系譜細胞への分化誘導ストラテジー

展性についても述べてみたい。

脊椎動物の腎発生

幹細胞からの臓器再生研究は、その臓器の発生機構の知見に基づくことが多い。たとえば、ES細胞やiPS細胞から膵β細胞への分化誘導法開発には膵発生過程を模倣し、胚体内胚葉、前腸内胚葉、膵前駆細胞、内分泌前駆細胞、β細胞の順に多段階分化誘導法の開発が行われている⁹⁾。腎臓への分化誘導法開発も同様のストラテジーの適用が考えられるため、腎臓の発生機構を理解することは重要である。

腎臓は胎生初期の胚葉組織のひとつである中間中胚葉に由来し、脊椎動物は発生段階を通じて前腎、中腎、後腎の3つの腎臓を順に形成する¹⁰⁾。もっとも初期に形成される前腎は、腎臓の機能単位であるネフロン1つからなる単純な構造である。中腎はその尾側に発生し、数十のネフロンからなる。われわれ哺乳類の成体の腎臓である後腎は、中腎管のもっとも尾側に出現する尿管芽とよばれる突起と、その周囲に生じる間葉との相互作用によって発生し、片側で数百万ものネフロンを有する腎臓を完成させる。哺乳類と爬虫類、鳥類の成体腎は後腎であり、前腎、中腎は発生段階の途中で形成されるが、性腺に分化する中腎の一部

を除いて退行する。一方、魚類、両生類では成体腎は中腎であり、初期に形成される前腎も排泄器官としての機能を発揮する。

古典的な発生生物学の知見によると、後腎の間葉は糸球体、近位から遠位までの尿細管に、尿管芽は集合管から膀胱の一部までの下部尿路系へと分化し、後腎が完成すると考えられていたが、詳しくは不明であった¹⁰⁾。著者らは新規の培養系を確立し、マウス後腎間葉の中に単一細胞から糸球体足細胞、近位尿細管、Henleのループ、遠位尿細管などの数種類の上皮細胞に分化しうる多能性の上皮系前駆細胞が存在することをはじめて明らかにした¹¹⁾。この結果は、腎発生に必須の転写因子Six2発現細胞のマウスを用いたlineage tracing実験にて*in vivo*でも確認された¹²⁾。しかし、その前駆細胞から糸球体足細胞や複数種の尿細管上皮への運命決定機構に関してはNotch2シグナルが足細胞や近位尿細管上皮の発生に、また、POUドメインを有する転写因子Brn1がHenleのループや遠位尿細管の発生に必須であることを除いて未解明のままである^{13,14)}。

後腎の間葉は、上皮系前駆細胞以外にすくなくとも別の2種類の前駆細胞分画を含んでいる可能性がある。間質細胞に分化する間質前駆細胞と糸球体や腎内の血管を構成する内皮細胞や平滑筋細

胞に分化する血管系前駆細胞のことである。また、中間中胚葉は腎以外に副腎皮質と生殖腺を派生させることが知られている。中間中胚葉がそれら3つの臓器系譜に分化する機構、後腎の尿管芽や間葉内の前駆細胞を派生させる機構、前述の上皮系前駆細胞が糸球体や尿細管などネフロン内の数種類の上皮へ分化する運命決定機構はほぼ不明のままである。これらの機構の解明が発生過程を模倣したES細胞やiPS細胞から腎系譜細胞への分化誘導法開発に必須である(図1)。

● ES/iPS細胞から腎臓への分化誘導

ES細胞の樹立以降、他の多くの臓器と同様に腎系譜への分化誘導法の開発研究も行われてきた^{13,14)}。ES細胞の免疫不全マウスへの移植によって、胎生初期の三胚葉成分を含む腫瘍である奇形腫が形成される。マウスおよびヒトES細胞由来の奇形腫のなかに、糸球体や尿細管様の構造物が認められることが示されている。この結果は、マウスおよびヒトES細胞から実際に腎臓への分化誘導が可能であることを示唆する。さらに、腎系譜の細胞を選択的に作製する試みもなされている。マウスES細胞に、①HGF(hepatocyte growth factor)、activin A、Wnt4の組合せ処理、②activin A、BMP(bone morphogenetic protein)7、レチノイン酸の組合せ処理、③activin A、BMP7またはGDNF(glial cell line-derived neurotrophic factor)の組合せ処理、④activin A、レチノイン酸、マウス胎児腎の尿管芽の調整培養液の組合せ処理、⑤activin A単独、⑥BMP4単独、⑦4種の化合物の組合せの処理にて中間中胚葉や発生期の腎臓、そして最終分化した腎臓のマーカーを発現する細胞を誘導した報告がある。また、いくつかの報告ではそれら誘導された細胞が管状の構造を*in vitro*で形成することや、発生中のマウス腎に移植した際にホストの腎組織に組み込まれることも示されている。

一方、ヒトES細胞を用いた報告は非常に少ないが、ヒトES細胞にさまざまな増殖因子処理を試したところ、複数の因子がWT1やrenninなど糸球体マーカー遺伝子の発現を誘導することや、activin A、レチノイン酸、BMP4またはBMP7の

組合せ処理で中間中胚葉や腎系譜のマーカー遺伝子発現細胞を誘導できることが報告された。iPS細胞を用いた報告も少なく、マウスES細胞と同様にマウスiPS細胞にactivin A、BMP7またはGDNFの組合せ処理を施し、腎系譜のマーカー遺伝子発現細胞を誘導した報告が存在するのみである。

以上の報告がなされているが、腎系譜の細胞がどれくらいの効率で形成されているのか、それらのマーカー遺伝子発現細胞が実際に腎臓としての生理機能を有するのか、また、前腎、中腎、後腎のいずれの細胞であるのかは不明である。今後、それらの疑問に対する答えが明確にされ、さらに、ヒトES細胞やiPS細胞を用いた研究の進展が期待される。

● 腎分化誘導法の確立に向けて

ES細胞やiPS細胞から腎系譜の細胞を選択的に分化誘導する方法を確立するうえで参考になるいくつかの知見が存在する。著者らは異なる個体由来のヒトES細胞には細胞株間で分化能の顕著な差が認められ、細胞株によって特定の系譜に分化しやすい傾向を示す指向性があることを明らかにした¹⁵⁾。また最近、ヒトiPS細胞も同様に細胞株間で分化能が顕著に異なることが報告された¹⁶⁾。よって、腎系譜の細胞を高効率に分化誘導するためには、至適分化誘導プロトコルを確立することに加え、腎分化に適した幹細胞株を用いることも重要である。

また、ES細胞にはなくiPS細胞に特有の性質として、iPS細胞には由来となる細胞種の“エピゲノム状態の記憶(epigenetic memory)”が残っており、由来細胞種によってiPS細胞の分化能が異なり、由来細胞種により分化しやすい傾向があることが示されている^{17,18)}。具体的には、マウス血液細胞由来のiPS細胞において血液系譜への分化に関連した遺伝子のプロモーター領域は低メチル化状態のまま残っているが、血液以外の系譜への分化関連遺伝子は高メチル化の不活化状態にあることが示された。そして、血液由来iPS細胞は他の組織由来のiPS細胞に比較して血液細胞への分化効率がより高かった。また、マウス血液細胞と

同様に、ヒト膵β細胞由来のiPS細胞樹立も報告されている¹⁹⁾。そして、β細胞由来のiPS細胞はインスリン産生細胞により効率よく分化し、さらにβ細胞様の内分泌機能を有する細胞により早く成熟する傾向を有することが示された¹⁹⁾。

以上の結果より、腎構成細胞から作製されたiPS細胞は、その由来である腎系譜により効率よく分化する可能性が考えられる。実際に最近、ヒトの腎メサンギウム細胞と尿中の脱落尿細管細胞からiPS細胞の樹立が報告された^{20,21)}。

これまでのES/iPS細胞から特定細胞種への分化誘導研究では増殖因子、特定のシグナル経路の促進剤・抑制剤である化合物、細胞外マトリックスなどによる処理、不死化細胞株あるいは初代培養細胞との共培養、cDNA, shRNA, siRNAの強制発現による遺伝子操作などの方法が用いられてきた^{13,14)}。一方、著者らは生物学的活性がすでに知られている約5,000種類の低分子化合物ライブラリーの高速スクリーニングを行い、ヒトES細胞を効率よく膵系譜に分化誘導する化合物(−)-indolactam Vを同定した²²⁾。そして化合物の網羅的探索を用いるストラテジーによって特定細胞種への分化誘導法開発が可能であることを示した。

また、(−)-indolactam VがPKC(protein kinase C)シグナルの活性化剤であることに着目して検討した結果、他のPKC活性化剤も膵分化を促進し、逆にPKC抑制剤が膵分化を阻害することをつきとめた。よって化合物スクリーニングを発端として、それまで未知であったPKCシグナルが膵分化に関与するという機構をはじめて明らかにした²²⁾。同様のストラテジーはES/iPS細胞から腎臓への分化誘導にも適用可能である。スクリーニングにより腎系譜への分化誘導能を有する化合物を同定し、高効率の分化誘導法を確立する。加えて、その化合物の標的分子の情報をもとに、腎臓の発分化機構を解明することも可能であると考える。

東京大学の中内らは“胚盤胞補完法”という実験手法にてES/iPS細胞から完全な三次元構造を有する膵臓を作製することに成功した²³⁾。中内らは、膵臓を欠失するPdx1遺伝子のノックアウトマウスの受精卵胚盤胞に正常なラットES細胞ま

たはiPS細胞を注入することによってキメラ動物を作製し、ホストの体内で欠失するはずの膵臓が注入されたラットES/iPS細胞に補完され、形成されることを示した。逆にラットの胎内においてマウスES/iPS細胞由来の膵臓の作製にも成功した。さらに、作製された膵臓から酵素処理で単離した膵島組織を糖尿病モデルマウスに移植したところ、血糖値の低下を示し、治療効果があることも示された。同様の手法を用いて腎臓を欠失するように遺伝子組換えの施された異種動物の胎内でヒトES/iPS細胞から腎臓を作製し、腎移植のドナー臓器に用いる再生医療の開発も今後期待される。

ダイレクトコンバージョン

近年、iPS細胞樹立の報告に触発され、3つ以上の複数の遺伝子を同時に導入することによって、ある最終分化細胞種から別の細胞種へ発生過程の中間段階を経ないで直接に転換(ダイレクトコンバージョンあるいはダイレクトリプログラミングとよばれている)させる成功例が立て続けに報告されている。具体的には、膵外分泌細胞からβ細胞への転換、線維芽細胞から神経細胞、心筋細胞、血液細胞、軟骨細胞、肝細胞などへの転換が報告されている¹⁴⁾。その多くの例において、作製しようとする標的細胞種の発生に必須な転写因子の3つ以上の組合せが用いられている。そして線維芽細胞から神経細胞への転換に使用したのと同じ組合せの転写因子を導入することで、ES/iPS細胞から神経細胞が分化誘導できることも示されている²⁴⁾。同様に、腎発生に必須の転写因子の組合せをES/iPS細胞に導入することによって、発生の過程を経ずにダイレクトに生体内のものと同じ生理機能を有する腎細胞を分化誘導できる可能性がある。

腎領域におけるiPS細胞技術を用いた臨床応用研究

ヒトiPS細胞の登場により、難治性疾患の患者体細胞から疾患の発症に関与する遺伝情報を有する疾患特異的iPS細胞(disease-specific iPS cell)が簡便な遺伝子操作によって樹立可能となった。

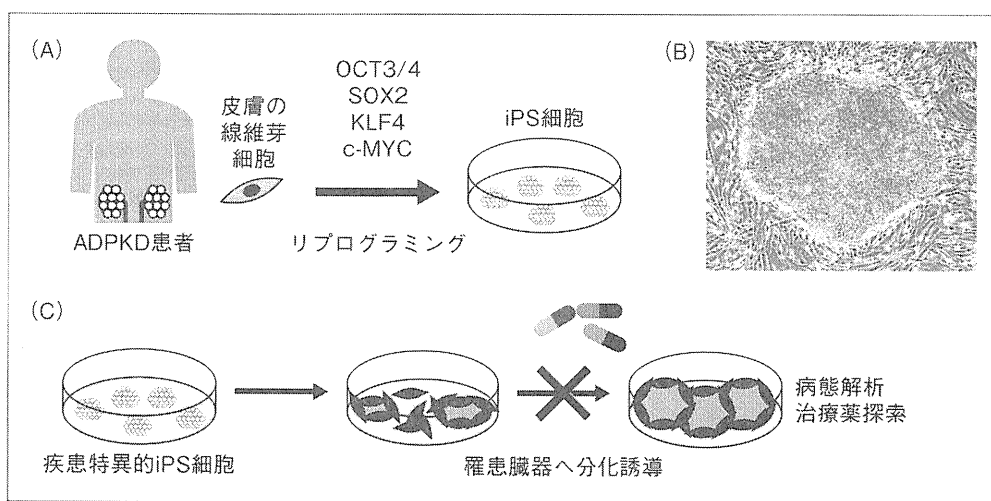


図 2 iPS細胞を用いた疾患モデル作製研究

- A: 患者由来の皮膚線維芽細胞に OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の4つのリプログラミング因子を遺伝子導入することによって疾患特異的 iPS 細胞が樹立される。
 B: 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)特異的 iPS 細胞。
 C: 疾患特異的 iPS 細胞の分化系を用いた病態解析と治療薬探索研究。

そして疾患特異的 iPS 細胞を罹患細胞種に分化誘導することにより, *in vitro* で病態の形成を模倣する系を作製し, 詳しい病態解析や治療薬探索を行う疾患モデル作製研究(disease modeling)が盛んに行われている^{25,26)}。神経変性疾患の一種である筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)にはじまり²⁵⁾, 2011年11月の時点で約60種の難治性疾患からのiPS細胞樹立と疾患モデル作製に関する報告が存在する。そのうち, 難治性神経疾患である脊髄性筋萎縮症や家族性自律神経失調症などにおいて, 患者の体内で起こっている神経細胞の病理学的な変化を*in vitro*でiPS細胞から作製した同細胞種で模倣できることが実際に示された²⁶⁾。

著者らは, 腎臓をはじめとする多数の臓器に嚢胞を形成し機能不全を引き起こす難治遺伝性腎疾患である, 常染色体優性多発性嚢胞腎(autosomal dominant polycystic kidney disease: ADPKD)から疾患特異的 iPS 細胞を樹立した(図2-A, B)。現在, ヒト iPS 細胞から同疾患で障害される腎尿細管や集合管への分化誘導法の開発を並行して行っており, ADPKD 特異的 iPS 細胞の分化系を用いた新規疾患モデルを開発し, 同疾患の病態解析と治療薬探索を行うことをめざしている(図2-C)。

そのほかにも, iPS 細胞技術を用いて臨床応用

をめざした研究として薬剤の毒性評価系開発(toxicology)があげられる。近年, ヒト ES 細胞や iPS 細胞から作製した心筋を使って, 突然死に至る不整脈である QT 延長症候群を引き起こす薬剤のスクリーニング系が開発されている²⁷⁾。同様のストラテジーにより日常臨床上しばしば生じる薬剤の腎毒性の有無を, 実際に人体に投与する前にヒト iPS 細胞から作製した腎細胞を用いて*in vitro*で検証することも可能であると考えられる。また, iPS 細胞から分化誘導された特定細胞種を用いて治療薬を探索する研究(drug discovery)が行われている。腎臓の生理機能を制御する薬剤や再生を促す薬剤の開発が期待される。

おわりに

幹細胞からの腎再生を実現するために, 今後も腎発生機構の解明が進められなければならない。中間中胚葉や発生期の腎臓に特異的なマーカー遺伝子の同定, 成体腎内に20種類以上存在するといわれている, 機能的に最終分化した腎細胞の運命決定機構を明らかにすることが, 腎分化誘導法の確立にももちろん必須である。逆に幹細胞からの分化誘導研究が細胞移植療法の開発のみならず腎発生機構の解明にも貢献する。

iPS 細胞の誕生によって患者由来の細胞を用い

たテーラーメイド医療が可能となった。また、拒絶反応の問題が解決されることにより再生医療が実現化に近づいた。本稿で述べた研究や技術開発を可能とするために、ヒト iPS 細胞から腎系譜の細胞を分化誘導する方法の 1 日も早い確立が望まれる。

文献

- 1) Evans, M. J. and Kaufman, M. H.: *Nature*, **292** : 154-156, 1981.
- 2) Martin, G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78** : 7634-7638, 1981.
- 3) Thomson, J. A. et al.: *Science*, **282** : 1145-1147, 1998.
- 4) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: *Cell*, **126** : 663-676, 2006.
- 5) Takahashi, K. et al.: *Cell*, **131** : 861-872, 2007.
- 6) Yu, J. et al.: *Science*, **318** : 1917-1920, 2007.
- 7) Warren, L. et al.: *Cell Stem Cell*, **7** : 618-630, 2010.
- 8) Okita, K. et al.: *Nat. Methods*, **8** : 409-412, 2011.
- 9) D'Amour, K. A. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **24** : 1392-1401, 2006.
- 10) Saxen, L.: *Organogenesis of the kidney*. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
- 11) Osafune, K. et al.: *Development*, **133** : 151-161, 2006.
- 12) Kobayashi, A. et al.: *Cell Stem Cell*, **3** : 169-181, 2008.
- 13) Osafune, K.: *Exp. Cell Res.*, **137** : 13-17, 2010.
- 14) Osafune, K.: *Semin. Nephrol.* (in press)
- 15) Osafune, K. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **26** : 313-315, 2008.
- 16) Takayama, N. et al.: *J. Exp. Med.*, **207** : 2817-2830, 2010.
- 17) Kim, K. et al.: *Nature*, **467** : 285-290, 2010.
- 18) Polo, J. M. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **28** : 848-855, 2010.
- 19) Bar-Nur, O. et al.: *Cell Stem Cell*, **9** : 17-23, 2011.
- 20) Song, B. et al.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, **22** : 1213-1220, 2011.
- 21) Zhou, T. et al.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, **22** : 1221-1228, 2011.
- 22) Chen, S. et al.: *Nat. Chem. Biol.*, **5** : 258-265, 2009.
- 23) Kobayashi, T. et al.: *Cell*, **142** : 787-799, 2010.
- 24) Panq, Z. P. et al.: *Nature*, **476** : 220-223, 2011.
- 25) Dimos, J. T. et al.: *Science*, **321** : 1218-1221, 2008.
- 26) Saha, K. et al.: *Cell Stem Cell*, **5** : 584-595, 2009.
- 27) Kiskinis, E. and Eggan, K.: *J. Clin. Invest.*, **120** : 51-59, 2010.

* * *

血管炎症候群の患者由来 iPS 細胞を用いた新規バイオマーカー探索

*¹京都大学 iPS 細胞研究所 *²科学技術振興機構 (JST) さきがけ *³JST 山中 iPS 細胞特別プロジェクト
*⁴田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科 *⁵京都大学医学部附属病院腎臓内科
長船健二*^{1,2,3} 荒岡利和*¹ 天久朝廷*¹ 武曾恵理*⁴ 深津敦司*⁵

はじめに

末期慢性腎不全に進行しうる難治性疾患である血管炎症候群に属する多くの疾患において、その病因は依然として解明されていない^{1,2)}。抗好中球細胞質抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibody : ANCA)などの自己抗体が検出されるため、免疫異常の関与が考えられているが、血管側にも傷害される素因があるか否かは不明のままである。また、治療薬として副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬が使用されているが、完全に病態をコントロールすることは困難であり、重篤な副作用も多いため、これらの疾患の病態形成メカニズムの正確な理解に基づく、より特異的な治療薬の開発が望まれる。しかし、血管炎症候群の病態を模倣する動物モデルも少なく、現在までのところ、その解析は困難である²⁾。

一方、無限の増殖能を有し、全身のすべての細胞種へ分化することができる ES 細胞 (embryonic stem cell, 胚性幹細胞) とほぼ同等の性質を有する iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞) が、2006 年のマウスに続き、

2007 年にはヒトにおいても簡便な遺伝子操作によって樹立可能となった^{3~5)}。iPS 細胞は、患者自身の細胞から樹立できるため、それから作製した臓器や組織を移植した際に「拒絶反応」を生じない。さらに、その樹立に「ヒト胚の使用」を必要としないため倫理的な問題が少ない。これらヒト ES 細胞に付随する 2 つの問題点を克服可能としたため、iPS 細胞は再生医学研究を臨床応用に向けて大いに進展させた。

iPS 細胞の臨床応用を目指した研究用途として、細胞移植療法 (いわゆる再生医療) の開発に加えて、「疾患モデル作製研究 (disease modeling)」があげられる⁶⁾。それは、難治性疾患患者の体細胞から疾患発症に関与する遺伝情報を有する iPS 細胞を樹立し、試験管内で罹患臓器細胞種に分化させ病態を模倣する実験系を確立することにより、病態の詳しい解析や病態形成を阻害する治療薬の探索を行う研究のことである。2008 年の米国ハーバード大学のグループによる神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に始まり、現在まで多数の難治性疾患からの iPS 細胞樹立が報告されている^{7,8)}。そのうち、脊髄性筋萎縮症⁹⁾、家族性自律神経失調症¹⁰⁾、母斑症である LEOPARD 症候群¹¹⁾ などにおいて、患者の体内で実際に起こっている神経や心筋細胞の病理学的な変化を試験管内で iPS

The search of novel biomarkers for vasculitis syndrome using patient-derived iPS cells

key words : iPS 細胞, バイオマーカー, 血管炎症候群

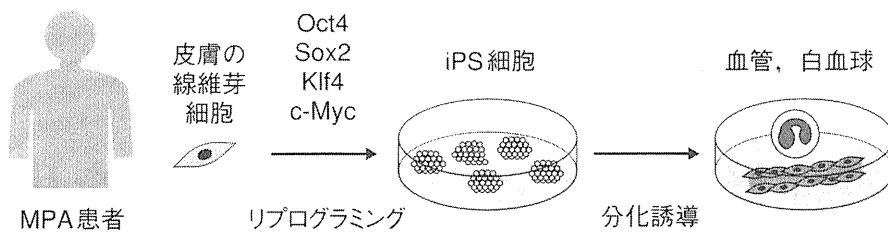


図 1

顕微鏡的多発血管炎(MPA)患者皮膚細胞からの iPS 細胞樹立と血管、白血球への分化誘導を用いた疾患モデル作製

細胞から分化誘導したそれらの細胞種で模倣できることが報告された。したがって、患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデルにより病態解析や治療薬探索が可能であることが実際に示されたのである。このような疾患特異的 iPS 細胞を用いた試験管内疾患モデル作製研究は、マウスなどの動物モデルの存在しない疾患や、動物モデルがヒトの病態を完全に模倣できない疾患において特に有効であると考えられ、この領域における研究の飛躍的な進展が期待されている⁶⁾。

本研究では、血管炎症候群に属する顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis : MPA)の患者皮膚細胞から iPS 細胞を樹立し、同疾患の罹患臓器である血管や白血球に分化誘導することにより、新規の試験管内疾患モデルの作製を行う(図 1)。そして、患者と健康者由来の iPS 細胞から作製された血管細胞や白血球の間で、遺伝子および蛋白発現などの比較解析を行う。本研究の目的は、iPS 細胞技術を用いて、血管炎症候群において血管自体に異常が存在するか否かを明らかとし、さらに、血管や白血球に存在する疾患の発症や進展を反映する新規のバイオマーカーの同定を目指すことである。

対象と方法

京都大学医学部附属病院腎臓内科に外来通院する 1 症例と田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科に通院する 2 症例の MPA 患者から、同意のもとに iPS 細胞樹立のための皮膚生検を行った。本研究の実施に関しては、京都大学大

学院医学研究科・医の倫理委員会および田附興風会医学研究所北野病院・医の倫理委員会の承認を受けたうえで実施した。皮膚生検は、局所麻酔下で臍横部より径 4 mm のトレパン針を用いて施行した。生検後 1 針縫合し、10 日後以降に抜糸処置を行った。

結 果

皮膚生検後、皮膚塊を細切し、約 1 カ月間 DMEM/10%FBS の培地を用いて皮膚組織を培養した。皮膚線維芽細胞を十分な細胞数にまで増殖させ、MPA 患者由来線維芽細胞のストックを作製した。

前述の 3 症例のうち、北野病院の 2 例から iPS 細胞樹立を開始した。京都大学山中らのオリジナルの方法に従い、まず線維芽細胞にレンチウイルスベクター pLenti6 を用いてレトロウイルス受容体 Slc7a1 を遺伝子導入した⁴⁾。その後レトロウイルスベクター pMX を用いて、リプログラミング 4 因子(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)および 3 因子(前述から c-Myc を除く)を遺伝子導入することによって iPS 細胞の樹立を行った(図 1)。

北野病院の 1 例目においては、3 因子の遺伝子導入では、iPS 細胞のクローンは全く出現しなかったが、4 因子では多数の iPS 細胞のクローンが出現したため 50 クローンをストックした(図 2)。これらの細胞株のうち、iPS 細胞樹立のために導入された Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc トランスジーンが発現がサイレンスされている

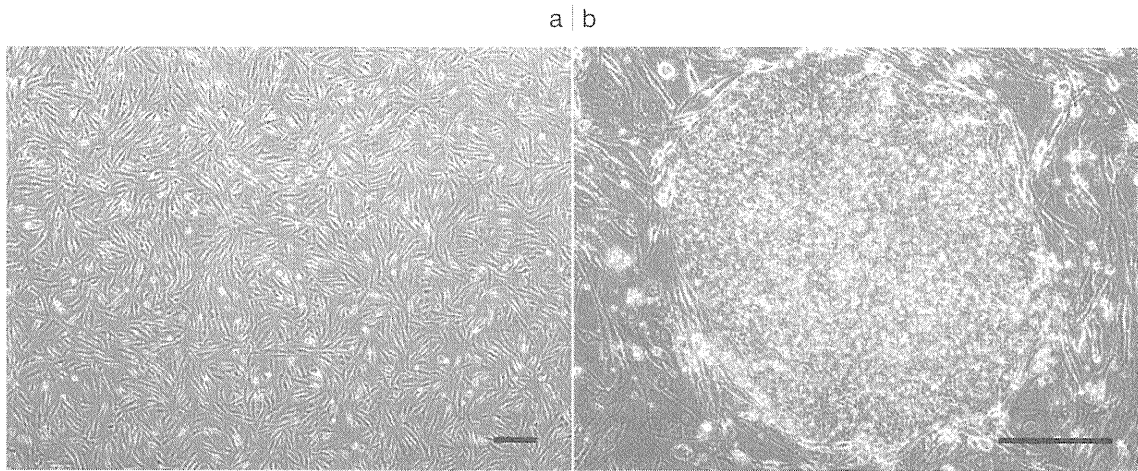


図 2
 a: MPA 患者由来の皮膚線維芽細胞 b: MPA 特異的 iPSC 細胞
 スケールバー 100 μ m

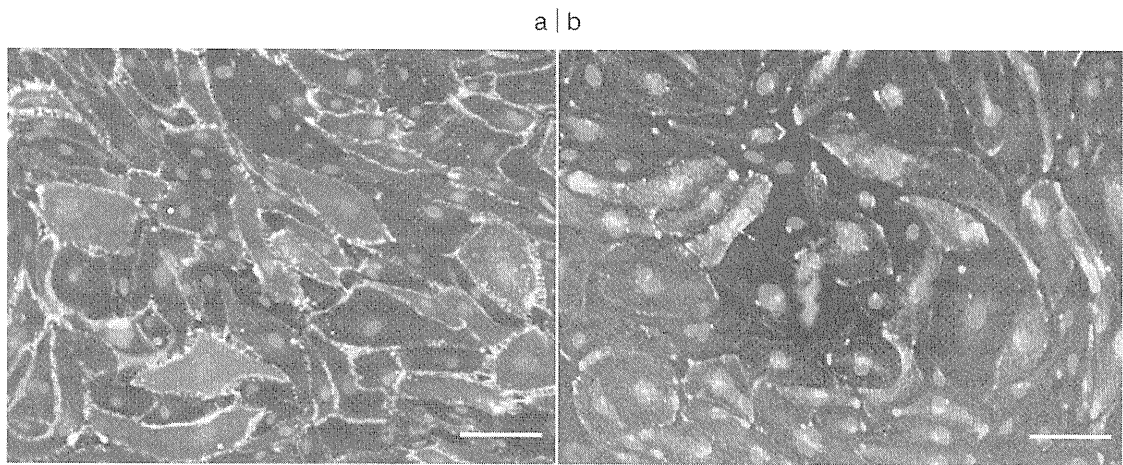


図 3 ヒト iPSC 細胞から分化誘導された血管内皮細胞のマーカによる免疫染色像
 a: 抗 PECAM1/CD31 染色 b: 抗 VE-cadherin 染色
 スケールバー 100 μ m

クローンを選別し、50 クローン中 7 クローンは 4 因子ともに十分なサイレンシングを受けていることを確認した。これらについては更なる細胞株の評価を行い、今後の実験に使用する予定である。北野病院の 2 例目については、3 因子の導入で 25 クローン、4 因子の導入で約 70 クローンの iPSC 細胞株をすでにストックし、現在、解析中である。京都大学医学部附属病院の症例からの iPSC 細胞樹立も進めている。

また、北野病院の 1 例目の MPA 患者由来 iPSC 細胞を既報のヒト ES/iPSC 細胞を血管内皮および周皮細胞へ分化誘導する方法^{12,13)}に適用したとこ

ろ、健常日本人由来 iPSC 細胞株(図 3)に加え、MPA 患者由来 iPSC 細胞株も内皮細胞は 2~4%、周皮細胞は 20~30%程度の分化誘導効率で、罹患臓器である血管細胞への分化誘導が可能であることを確認した。

考 察

現在までに、さまざまな難治性疾患からの疾患特異的 iPSC 細胞の樹立が報告されているが、骨髄不全をきたす難治性疾患である Fanconi 貧血の患者皮膚細胞からの iPSC 細胞樹立は不可能