

- directed differentiation of human embryonic stem cells towards kidney precursors, *Differentiation* 78 (2009) 45–56.
- [29] S. Yamanaka, Pluripotency and nuclear reprogramming, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363 (2008) 2079–2087.
- [30] S. Karumbayaram, B.G. Novitch, M. Patterson, J.A. Umbach, L. Richter, A. Lindgren, A.E. Conway, A.T. Clark, S.A. Goldman, K. Plath, M. Wiedau-Pazos, H.I. Kornblum, W.E. Lowry, Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons, *Stem Cells* 27 (2009) 806–811.
- [31] K. Tateishi, J. He, O. Taranova, G. Liang, A.C. D'Alessio, Y. Zhang, Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 31601–31607.
- [32] D. Taura, M. Sone, K. Homma, N. Oyamada, K. Takahashi, N. Tamura, S. Yamanaka, K. Nakao, Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 1100–1103.
- [33] G. Narazaki, H. Uosaki, M. Teranishi, K. Okita, B. Kim, S. Matsuoka, S. Yamanaka, J.K. Yamashita, Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells, *Circulation* 118 (2008) 498–506.
- [34] J.T. Dimos, K.T. Rodolfa, K.K. Niakan, L.M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G.F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, C.E. Henderson, K. Eggan, Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons, *Science* 321 (2008) 1218–1221.
- [35] I.H. Park, N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M.W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger, G.Q. Daley, Disease-specific induced pluripotent stem cells, *Cell* 134 (2008) 877–886.
- [36] Y. Asai, M. Tada, T.G. Otsuji, N. Nakatsuji, Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system: an ideal hybrid model assay for drug development, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* (2010) epub ahead of print.
- [37] K.A. D'Amour, A.G. Bang, S. Eliazer, O.G. Kelly, A.D. Agulnick, N.G. Smart, M.A. Moorman, E. Kroon, M.K. Carpenter, E.E. Baetge, Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1392–1401.
- [38] D.C. Hay, D. Zhao, J. Fletcher, Z.A. Hewitt, D. McLean, A. Urruticoechea-Uriguen, J.R. Black, C. Elcombe, J.A. Ross, R. Wolf, W. Cui, Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development *in vivo*, *Stem Cells* 26 (2008) 894–902.
- [39] K. Osafune, L. Caron, M. Borowiak, R.J. Martinez, C.S. Fitz-Gerald, Y. Sato, C.A. Cowan, K.R. Chien, D.A. Melton, Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 313–315.
- [40] S. Chen, M. Borowiak, J.L. Fox, R. Maehr, K. Osafune, L. Davidow, K. Lam, L.F. Peng, S.L. Schreiber, L.L. Rubin, D.A. Melton, A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 258–265.

Induced pluripotent stem (iPS) cells: an up-to-the-minute review

Frank Lau¹, Tim Ahfeldt¹, Kenji Osafune^{2,3}, Hidenori Akutsu⁴ and Chad A Cowan^{1*}

Addresses: ¹Stowers Medical Institute and Harvard Stem Cell Institute, Harvard University, Department of Stem Cell and Regenerative Biology, 185 Cambridge Street CPZN 4234, Boston, MA 02114, USA; ²Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan; ³PRESTO, Yamanaka iPS Cell Special Project, Japan Science and Technology Agency (JST), 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan; ⁴National Research Institute for Child Health and Development, Department of Reproductive Biology, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan

* Corresponding author: Chad A Cowan (ccowan1@partners.org)

F1000 Biology Reports 2009, 1:84 (doi:10.3410/B1-84)

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/legalcode>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, for non-commercial purposes provided the original work is properly cited. You may not use this work for commercial purposes.

The electronic version of this article is the complete one and can be found at: <http://F1000.com/Reports/Biology/content/1/84>

Abstract

Recent advances in nuclear reprogramming technology allow the transformation of terminally differentiated, adult cells into induced pluripotent stem cells whose phenotype is indistinguishable from that of embryonic stem cells. This leap forward enables the creation of patient-specific pluripotent cell lines that carry disease genotypes. These cell lines could be used both as *in vitro* models for the study of disease and as potential sources of material for cell replacement therapy. Ultimately, a greater understanding of the process by which cellular identity is shaped and altered may allow the generation of particular cell types for the treatment of degenerative disease.

Introduction and context

Development involves two distinct cellular processes: division and differentiation. Division is the means by which one cell gives rise to two daughter cells and is indispensable for the growth of an organism and the renewal of fully developed tissues. Differentiation refers to the process by which a cell specializes to perform a particular biological function in an adult. Differentiation usually occurs through a combination of cell-cell interactions, exposure to diffusible factors, and other positional cues that ultimately alter gene expression, conferring a specific cellular identity and function.

One of the more remarkable observations in the past century is that differentiation is not a unidirectional process. Instead, it can be turned back much like the hands of a clock. This rewinding of the developmental clock is termed nuclear reprogramming and is often defined as the process whereby an adult somatic nucleus has developmental potential restored to it [1]. There are three ways that nuclear reprogramming has been accomplished: (a) somatic cell nuclear transfer or

cloning, (b) cell fusion, and (c) factor-based reprogramming to produce induced pluripotent stem (iPS) cells. Here, we will discuss each approach with special emphasis on the most recent advances in this field and the challenges that lie ahead.

Somatic cell nuclear transfer, a procedure in which the nucleus of an adult cell is injected into an unfertilized egg whose chromosomes have been removed, has demonstrated that the genome of adult cells can be reset to an embryonic state [2,3]. Using this strategy, researchers have generated cloned embryos that possess the potential to develop into an adult animal or become an embryonic stem cell (ESC) line that is genetically identical to that of the donor nucleus [4,5]. These experiments established that no irreversible changes are made to the genome during development and further showed that animal oocytes harbored factors that could accomplish nuclear reprogramming.

In a related series of experiments, a number of researchers have shown that when somatic cells are

fused with ESCs, the resulting tetraploid hybrid cells silence the expression of somatic genes and establish a program of transcription indistinguishable from ESCs, indicating that ESCs contain the necessary reprogramming activities to accomplish this transformation [6,7]. Thus, the cytoplasm of the enucleated oocyte and the ESC is able to re-establish the pluripotent state via a mechanism dependent on global epigenetic and transcriptional changes.

The mechanism by which this transformation occurred and the mediators of nuclear reprogramming were largely undefined. In a breakthrough experiment, Takahashi and Yamanaka [8] identified four factors normally found in ESCs – Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc (OSKM) – that were sufficient to reprogram mouse somatic cells to closely resemble mouse ESCs. They called these iPS cells. Since this first report, the technique has been rapidly confirmed, improved, and subsequently applied to successfully reprogram somatic cells. This technology has since given birth to an entire field that has grown at a phenomenal pace.

Major recent advances

The rate at which iPS lines are being created is rapidly increasing. Although most iPS cells have been created from fibroblasts, in the past two years lines have also been created from adult neural stem cells [9], keratinocytes [10], hematopoietic somatic cells [11-13], fetal cells harvested during both amniotic fluid and chorionic villus sampling, and several other somatic cell types [11]. It appears that reprogramming is possible in almost any cell type, although the efficiency of the reprogramming process varies between cell types. Finding the best somatic cell types to accomplish reprogramming remains a main challenge for iPS cell research; we will discuss this in greater detail later on. Significant progress has been made in the next natural step after iPS cell creation: re-differentiating iPS cells into somatic cells. iPS cells have been re-differentiated into several somatic tissues, including active motor neurons [14], insulin-secreting islet-like clusters [15], and a number of cardiovascular cells (arterial endothelium, venous endothelium, lymphatic endothelium, and cardiomyocytes) [16,17].

Disease modeling with iPS cells

Currently, there are two major questions addressed by iPS cell research. One seeks to produce iPS cell lines that capture the genotypes of disease. These cell lines would offer an unprecedented opportunity to understand pathobiology, identify abnormalities in the development or function of differentiated cells affected by disease, develop therapies that render these cells resistant to disease, and provide sources of material for cell

replacement therapy. Ultimately, the goal is to develop new therapies in which treatment is either non-existent or insufficient.

Numerous groups have reported the creation of disease-specific iPS lines. A group headed by Kevin Eggan [18] has generated iPS cells from patient fibroblasts of a familial form of amyotrophic lateral sclerosis. Another group, headed by George Daley [19], has produced iPS cells from patients with 10 different genetic diseases, including Parkinson's disease, type-1 diabetes, Duchenne and Becker muscular dystrophy, adenosine deaminase deficiency-related severe combined immunodeficiency, Shwachman-Bodian-Diamond syndrome, Gaucher's disease type III, Huntington's disease, Down's syndrome, and the carrier state of Lesch-Nyhan syndrome. Groups led by Svendsen [20] and Jaenisch [21] have added to the list of disease-specific iPS cells by creating human cell-based models of spinal muscular atrophy and Parkinson's disease, respectively.

More recently, the Kan group [11] created iPS cells from skin fibroblasts of a patient with homozygous beta-thalassemia and subsequently differentiated them into hemoglobin-producing hematopoietic cells. In theory, these cells could be treated with gene therapy to yield autologous hematopoietic cells that function normally. The Belmonte group [22] advanced this goal when they derived iPS cells from dermal fibroblasts harvested from Fanconi anemia patients, corrected the genetic defect using lentiviral vectors encoding for FANCA and FANCD2, and subsequently derived somatic cells that were phenotypically disease-free.

In a publication demonstrating the broad utility of disease-specific iPS cells, the Studer group [23] generated iPS cells from patients with familial dysautonomia (FD), re-differentiated the iPS cells into cells of all three germ layers, and demonstrated tissue-specific mis-splicing of the protein responsible for FD. During redifferentiation, they also gained novel insights into the pathogenesis of FD: they demonstrated a possible mechanism for the tissue specificity of FD and uncovered defects in cell differentiation and migration. Lastly, they successfully used their *in vitro* model to screen candidate drugs.

Mechanistic understanding

The second major question in iPS cell research seeks to define the underlying mechanism by which nuclear reprogramming is accomplished. This includes identifying the molecular players, the key cellular and molecular events, and the likely ways in which this process might fail. The goal is to make the iPS induction process safer and more efficient and to one day manipulate the

underlying cellular state of any cell, thereby generating specific cell types at will.

The nature of the factors required for the reprogramming of somatic cells into iPS cells has been elucidated. In particular, Oct4 has emerged as a central molecule in iPS cell reprogramming; for example, neural stem cells can be reprogrammed to iPS cells with Oct4 alone, which was not unexpected as they express high levels of endogenous Sox2 [9]. To date, no cell line has been reprogrammed without Oct4. While Yamanaka's original four-factor combination remains the most widely used, several other combinations have been shown to generate iPS cells. Two of the earliest alternative combinations were developed by the Thompson group [24]. They successfully used Oct4/Sox2/Nanog/Klf4 as well as as Oct4/Sox2/Nanog/Lin28 to create iPS cell lines. Recently, the Ng group [25] was able to reprogram mouse embryonic fibroblasts (MEFs) by using Esrrb, which is an orphan nuclear receptor, in combination with Oct4, Sox2, and c-Myc.

It has also been shown that some of the reprogramming factors can be replaced with chemicals. The Melton group [26] added valproic acid to newborn human skin (fibroblast) cells in culture and was able to create iPS cells with only two reprogramming factors, Oct4 and Sox2, eliminating the need for two potent cancer-promoting genes, *c-Myc* and *Klf4*. The Ding group [27] used a combination of the small molecules BIX-01294 and BayK8644 to generate iPS from MEFs that were transfected with only Oct4 and Klf4. The promise of these approaches is to create iPS cells by using chemicals alone.

Improving induction

Several groups have recently developed several alternative iPS cell production methods. The iPS cells produced in each new method appear to be very similar to those produced in the traditional method. Each new method has its own advantages and disadvantages as compared with the original method, and each provides insight into how scientists may be able to develop iPS cells that are safe for use in clinical trials.

Hochedlinger and colleagues [28] used adenoviruses to deliver reprogramming factors into adult mouse liver cells. Newborn mouse fibroblasts were also transduced; however, these were transgenic and required doxycycline induction of Oct4 expression for iPS generation. Very recently, the Freed group [29] established three human iPS lines from fibroblasts by using adenoviruses. The adenoviral approach is advantageous because it avoids

integrating exogenous genes into the genome and the potential for insertional mutagenesis. The virus needs to be present for only a short time in order to accomplish reprogramming. However, the technique is inefficient compared with iPS transduction with retroviruses and still uses cancer-promoting genes, and the adenovirus may still integrate into the host DNA at low frequencies.

Yamanaka's group [30] reported success at generating murine iPS cells without using any viruses. They successfully reprogrammed mouse cells by transfection with two plasmid constructs carrying the reprogramming factors; the first plasmid expressed c-Myc while a second, polycistronic plasmid expressed Oct4, Klf4, and Sox2. In a related approach, the Belmonte group [31] used one polycistronic construct expressing all four factors to achieve nucleofection in MEFs and induced iPS formation. These methods avoid viruses entirely but still require cancer-promoting genes to accomplish reprogramming. As with the adenoviral strategies, plasmid-based approaches are much less efficient compared with retroviral methods and begin with embryonic skin cells, which may be more amenable to reprogramming than adult skin cells. Moreover, transfected plasmids have been shown to integrate into the host genome and therefore pose a risk of insertional mutagenesis [32].

Three separate research groups addressed the low efficiency of non-retroviral approaches to iPS induction by using the piggyBac transposon system to deliver the OSKM reprogramming factors to MEFs [33-35]. piggyBac is unusual among transposon systems because upon re-excision of the exogenous genes, no 'footprint' mutations are left in the host cell genome.

The Jaenisch group [21] reprogrammed fibroblasts from Parkinson's disease patients by using floxed doxycycline-inducible lentiviral vectors that can be excised using Cre recombinase. While this strategy yielded human iPS cells with global transcriptomes that more closely resembled those of human ESCs, a genomic 'footprint' (the loxP site) was left behind, so the mutagenicity of the retroviral approaches remains.

The Thomson group [36] recently used the episomal vector oriP/EBNA1 to generate iPS cells from human foreskin fibroblasts. This vector is duplicated as an extrachromosomal episome once per cell cycle and is stable as long as drug selection is used. In the absence of drug selection, the episomal vector is lost at a rate of 5% per iPS generation. After a few generations, iPS cells that do not carry the vector can be isolated. The major disadvantage to this approach is its low efficiency.

The Ding group [37] recently reported iPS cell generation using recombinant proteins. The protein reprogramming factors were delivered into MEFs by conjugating the proteins to poly-arginine, a short peptide that mediates protein transduction. A parallel approach was shown to work in human fibroblasts by the Kim group [38], who fused the OSKM factors to cell-penetrating peptide sequences. The major advantage to these protein-based strategies is that exogenous genes are not introduced. However, the strategy is again rather inefficient.

Increasing efficiency

The efficiency of reprogramming adult fibroblasts remains low (<0.1%). Whether this frequency reflects the need for the precise timing, balance, and absolute levels of expression of the reprogramming genes or selection for rare genetic/epigenetic changes either initially present in the somatic cell population or acquired during prolonged culture remains unsolved. Although considerable advances have been made in identifying the complex networks involved, we do not yet understand how these factors maintain pluripotency, how growth factors control and stabilize these networks, or how these cells respond so precisely to differentiation cues. Certain small molecules, including valproic acid (a histone deacetylase inhibitor) [39], 5-aza-cytidine [40], and BIX01294 [41], seem to improve the efficiency of the iPS cell generation process. We expect that more chemicals that improve the efficiency of iPS cell reprogramming will be identified. Ultimately, the goal is to develop a cocktail of reprogramming factors which efficiently and reliably transduces somatic cells to iPS cells.

Most recently, attention has focused on p53 as a key player in the efficiency of iPS cell transduction. In 2008, the Deng group [42] demonstrated that adding p53 siRNA (small interfering RNA) to the OSKM reprogramming factors increased the rate of iPS cell colony formation by up to 100-fold. However, many of the resulting iPS cells were only partially reprogrammed, and none yielded teratomas *in vivo*.

The central role of p53 in controlling iPS cell transduction has been better defined in several newly published papers. The Yamanaka group [43] showed that in homozygous p53 knockout MEFs, 10% of the cells could be transduced to iPS cells with three reprogramming factors (Oct4/Sox2/Klf4). They further showed that terminally differentiated, p53 null T cells could be turned into iPS cells. The Belmonte group [44] arrived at similar conclusions when they infected cells with p53 shRNA (small hairpin RNA) and when they transduced p53^{+/-} and p53^{-/-} MEFs into iPS cells. They further showed that

reducing p21 and Bax levels, two factors downstream of p53, also increased the efficiency of iPS cell transduction. Two separate groups, led by Serrano [45] and Hochedlinger [46], focused on the Ink4/Arf locus, which is responsible for inhibiting Mdm2, which in turn is the main destabilizing enzyme of p53. The Serrano group found that downregulating tumor suppressors contained in the Ink4/Arf locus increased the efficiency of iPS cell transduction. The Hochedlinger group showed that cells with low endogenous Ink4a/Arf locus products are more readily reprogrammed into iPS cells and that genetic ablation of p53 converts non-reprogrammable somatic cells into cells that could be transduced to iPS cells. Lastly, the Blasco group [47] showed that p53 is responsible for preventing iPS cell transduction of G3 Terc^{-/-} MEFs, which are cells with short telomeres. Taken together, these data show that the molecular network surrounding p53 strongly inhibits iPS cell transduction and that the disruption of this network increases the efficiency of iPS cell generation many-fold.

While the precise molecular mechanisms behind p53 inhibition of iPS cell reprogramming are unknown, a newly published study suggests that the very process of reprogramming upregulates tumor suppressor expression. The Gil group [48] found that the OSKM reprogramming factors induced DNA damage and chromatin remodeling, thereby resulting in the development of senescence characteristics, including expression of p16, p21, and p53.

More animal models

The creation of iPS lines from cells of species other than humans or mice expands the research potential of iPS in additional animal models. The Deng group [49] generated iPS cells from adult rhesus monkey fibroblasts. Two separate groups, one led by Ding [50] and the other by Xiao [51], created iPS cells from adult rat cells.

Most recently, iPS cells have been derived from somatic pig cells. The Xiao group [52] used tetracycline-inducible human Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc/Nanog/Lin28 delivered via lentiviruses to transduce primary pig ear fibroblasts and primary bone marrow cells into iPS cells. The Roberts group [53] transduced porcine fetal fibroblasts into iPS cells by using human OSKM delivered with lentiviruses. The availability of model animal iPS cells offers a new and potentially powerful model for therapeutics.

Complete pluripotency

Previously, iPS cells had not been shown to contribute fully to all of the cell types in adult organisms. In a significant breakthrough, three separate groups (led by

Zhou [54], Baldwin [55], and Gao [56]) recently reported that, in mice, MEF-derived iPS cells could be injected into tetraploid blastocysts and result in the live birth of mice derived entirely from iPS cells. Different iPS lines were, to varying degrees, effective at producing viable offspring, with some lines showing early termination of fetal development. The success of this approach seems related to the age of the somatic cells from which the iPS cells were derived. With these reports, the debate over the equivalence of ESCs and iPS with regard to pluripotency has been resolved, at least in mice.

Future directions

In the rapidly developing field of iPS cell research, we expect to see improved and more efficient iPS derivation protocols in the near future. The key will be the development of methods that do not rely on the integration of the transgenes but that are still highly efficient. As shown by the recent tetraploid complementation studies, the age at which somatic cells are harvested plays a key role in the derived iPS cells' pluripotency. As such, it will be important to identify somatic cell types that are easily harvested and that harbor the fewest mutations. It might be advisable to collect cord blood from newborns as they have been shown to be candidates for reprogramming and would at that time harbor very few mutations.

We are only beginning to understand the mechanism and kinetics of iPS cell reprogramming. Elucidation of these would overcome the current problems of low frequency and inefficient iPS cell transduction. An integrative genomic analysis of the reprogramming process demonstrated that the repression of lineage-specific transcription factors and DNA de-methylation are critical and inefficient steps [40].

Several reviews have addressed the question of quality standards for iPS cells [57,58]. A minimum set of criteria for iPS characterization includes: (a) pluripotent stem cell morphology and unlimited self-renewal, (b) expression of pluripotency markers and downregulation of differentiation markers, (c) reprogramming factor independence, and (d) 'proof of functional differentiation through the highest-stringency test acceptable' [58].

The promise of iPS cells includes applications in both patient care and advanced cellular research. Currently, incomplete silencing of viral transgenes and even continued dependence on exogenous factors to maintain pluripotency are barriers to fulfilling the promise of iPS cells.

It has also been shown that significant differences in the differentiation potential of different human ESC lines

exist, even though the observable differences in the pluripotent state are marginal [59]. Thus, although the demonstration of complete iPS cell pluripotency via the tetraploid complementation studies was significant, it remains necessary to develop and standardize differentiation protocols that assess the potential of iPS lines.

While the transcriptional and genomic characterizations of iPS cells are somewhat established, no proteomic characterization has been performed. The recent discovery of microRNAs (miRNAs) presents another area of potential research and characterization; the Wu group [60] at Stanford University performed the first 'miRNA-ome' analysis of human iPS cells compared with human ESCs and fibroblasts.

Conclusions

In a short period of time, iPS cells have proven to be a major new frontier for biologic research. iPS cells have been created in humans and several animal models, including mice, rats, pigs, and primates. They have been generated from numerous somatic cell types, and disease-specific iPS cells have been created from dozens of diseases. Most recently, iPS cells have been shown to autonomously develop into full-term mice via tetraploid complementation. Over the coming months and years, improved iPS cell generation efficiency and iPS cell-based disease modeling and drug discovery will yield new discoveries, culminating in the development of low-cost, patient-specific, cell-based therapies.

Abbreviations

ESC, embryonic stem cell; FD, familial dysautonomia; iPS, induced pluripotent stem; MEF, mouse embryonic fibroblast; miRNA, microRNA; OSKM, Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc; shRNA, small hairpin RNA; siRNA, small interfering RNA.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Rodolfa K, Di Giorgio FP, Sullivan S: **Defined reprogramming: a vehicle for changing the differentiated state.** *Differentiation* 2007, **75**:577-9.
2. Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE: **Somatic cell nuclear transfer.** *Nature* 2002, **419**:583-6.
3. Egli D, Rosains J, Birkhoff G, Eggan K: **Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes.** *Nature* 2007, **447**:679-85.
F1000 Factor 6.0 Must Read
Evaluated by Ali H Brivanlou 26 Jun 2007
4. Rodolfa KT, Eggan K: **A transcriptional logic for nuclear reprogramming.** *Cell* 2006, **126**:652-5.

5. Markoulaki S, Meissner A, Jaenisch R: **Somatic cell nuclear transfer and derivation of embryonic stem cells in the mouse.** *Methods* 2008, **45**:101-14.
6. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K: **Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells.** *Science* 2005, **309**:1369-73.
7. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T: **Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.** *Curr Biol* 2001, **11**:1553-8.
8. Takahashi K, Yamanaka S: **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell* 2006, **126**:663-76.
 F1000 Factor 10.5 *Exceptional*
 Evaluated by Charles Brenner 11 Jun 2007, Thomas Graf 30 Aug 2006, Wolf Reik 04 Sep 2006, Raphael Kopan 12 Sep 2006, Charles Coutelle 24 Oct 2006
9. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR: **Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells.** *Cell* 2009, **136**:411-9.
 F1000 Factor 6.0 *Must Read*
 Evaluated by Eric Schulze-Bahr 31 Mar 2009
10. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC: **Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:1276-84.
11. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW: **Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:9826-30.
 F1000 Factor 6.0 *Must Read*
 Evaluated by Valder Arruda 09 Jul 2009
12. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ: **Generation of induced pluripotent stem cells from human blood.** *Blood* 2009, **113**:5476-9.
 F1000 Factor 4.8 *Must Read*
 Evaluated by James Ellis 01 April 2009, Anthony D Ho 01 Jun 2009
13. Pereira CF, Terranova R, Ryan NK, Santos J, Morris KJ, Cui W, Merckenschlager M, Fisher AG: **Heterokaryon-based reprogramming of human B lymphocytes for pluripotency requires Oct4 but not Sox2.** *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000170.
14. Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, Umbach JA, Richter L, Lindgren A, Conway AE, Clark AT, Goldman SA, Plath K, Wiedau-Pazos M, Kornblum HI, Lowry WE: **Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons.** *Stem Cells* 2009, **27**:806-11.
15. Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y: **Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts.** *J Biol Chem* 2008, **283**:31601-7.
16. Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, Nakao K: **Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**:1100-3.
17. Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK: **Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells.** *Circulation* 2008, **118**:498-506.
18. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K: **Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons.** *Science* 2008, **321**:1218-21.
 F1000 Factor 3.0 *Recommended*
 Evaluated by Ulf Pettersson 11 Sep 2008
19. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ: **Disease-specific induced pluripotent stem cells.** *Cell* 2008, **134**:877-86.
 F1000 Factor 9.0 *Exceptional*
 Evaluated by Lois Weisman 19 Aug 2008
20. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN: **Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient.** *Nature* 2009, **457**:277-80.
 F1000 Factor 9.0 *Exceptional*
 Evaluated by Steven Dowdy 30 Jan 2009
21. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R: **Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors.** *Cell* 2009, **136**:964-77.
 F1000 Factor 3.0 *Recommended*
 Evaluated by John Mullins 21 April 2009
22. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Rio P, Sleep E, González F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surrallés J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC: **Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2009, **460**:53-9.
 F1000 Factor 9.8 *Exceptional*
 Evaluated by James Ellis 15 Jun 2009, Laura Haneline 25 Jun 2009, Michel Sadelain 07 Sep 2009
23. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L: **Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs.** *Nature* 2009, **461**:402-6.
 F1000 Factor 6.0 *Must Read*
 Evaluated by Chaya Kalcheim 24 Aug 2009
24. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA: **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** *Science* 2007, **318**:1917-20.
 F1000 Factor 9.0 *Exceptional*
 Evaluated by Cheng-Ming Chiang 30 Nov 2007
25. Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, Ng HH: **Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**:197-203.
 F1000 Factor 3.0 *Recommended*
 Evaluated by Patrick Tam 22 Jan 2009
26. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA: **Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:1269-75.
 F1000 Factor 9.0 *Exceptional*
 Evaluated by Jozef Lazar 17 Oct 2008
27. Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S: **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:568-74.
28. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K: **Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.** *Science* 2008, **322**:945-9.
 F1000 Factor 6.0 *Must Read*
 Evaluated by Lorenz Studer 07 Oct 2008
29. Zhou W, Freed CR: **Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells.** *Stem Cells* 2009, [Epub ahead of print].

30. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S: **Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors.** *Science* 2008, **322**:949-53.
31. Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Battlle Morera L, Rodriguez Piza I, Izpisua Belmonte JC: **Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector.** *Proc Nat Acad Sci U S A* 2009, **106**:8918-22.
32. Murnane JP, Yezzi MJ, Young BR: **Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells.** *Nucleic Acids Res* 1990, **18**:2733-8.
33. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A: **Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon.** *Nat Methods* 2009, **6**:363-9.
34. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämmäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A: **piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2009, **458**:766-70.
- F1000 Factor 9.0 *Exceptional*
Evaluated by M Angela Nieto 12 May 2009
35. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K: **Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors.** *Nature* 2009, **458**:771-5.
- F1000 Factor 6.4 *Must Read*
Evaluated by Yi Eve Sun 01 Apr 2009, M Angela Nieto 12 May 2009
36. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA: **Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences.** *Science* 2009, **324**:797-801.
- F1000 Factor 8.0 *Exceptional*
Evaluated by Bill Lowry 06 Apr 2009, M Angela Nieto 12 May 2009
37. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S: **Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:381-4.
- F1000 Factor 8.1 *Exceptional*
Evaluated by William H Colledge 08 May 2009, David States 19 May 2009, Jason Yuan 22 Jul 2009
38. Kim D, Kim CH, Moon JJ, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS: **Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:472-6.
39. Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH: **Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:301-12.
40. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A: **Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis.** *Nature* 2008, **454**:49-55.
- F1000 Factor 3.0 *Recommended*
Evaluated by Stephan Beck 23 Jun 2008
41. Shi Y, Do JT, Despoints C, Hahm HS, Schöler HR, Ding S: **A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**:525-8.
42. Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, Zhang Q, Xiang C, Hou P, Song Z, Liu Y, Yong J, Zhang P, Cai J, Liu M, Li H, Li Y, Qu X, Cui K, Zhang W, Xiang T, Wu Y, Zhao Y, Liu C, Yu C, Yuan K, Lou J, Ding M, Deng H: **Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:475-9.
43. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S: **Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway.** *Nature* 2009, **460**:1132-5.
44. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Belmonte JC: **Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming.** *Nature* 2009, **460**:1140-4.
45. Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, Blasco MA, Serrano M: **The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming.** *Nature* 2009, **460**:1136-9.
46. Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG, Hochedlinger K: **Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells.** *Nature* 2009, **460**:1145-8.
47. Marión RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA: **A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity.** *Nature* 2009, **460**:1149-53.
48. Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, Pinho S, Silva JC, Azuara V, Walsh M, Vallier L, Gil J: **Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells.** *Genes Dev* 2009, **23**:2134-9.
49. Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, Jiang W, Cai J, Liu M, Cui K, Qu X, Xiang T, Lu D, Chi X, Gao G, Ji W, Ding M, Deng H: **Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:587-90.
50. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S: **Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:16-9.
51. Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, Li H, Jia N, Cheng L, Xiao H, Xiao L: **Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:11-5.
- F1000 Factor 3.0 *Recommended*
Evaluated by Zhu Chen 24 Feb 2009
52. Wu Z, Chen J, Ren J, Bao L, Liao J, Cui C, Rao L, Li H, Gu Y, Dai H, Zhu H, Teng X, Cheng L, Xiao L: **Generation of pig-induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system.** *J Mol Cell Biol* 2009, **1**:46-54.
53. Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM: **Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:10993-8.
54. Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q: **iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation.** *Nature* 2009, **461**:86-90.
- F1000 Factor 6.0 *Must Read*
Evaluated by Insoo Hyun 15 Oct 2009
55. Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, Kupriyanov S, Baldwin KK: **Adult mice generated from induced pluripotent stem cells.** *Nature* 2009, **461**:91-4.
56. Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S: **iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**:135-8.
57. Daley GQ, Lensch MW, Jaenisch R, Meissner A, Plath K, Yamanaka S: **Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs.** *Cell Stem Cell* 2009, **4**:200-1; author reply 202.
58. Maherali N, Hochedlinger K: **Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells.** *Cell Stem Cell* 2008, **3**:595-605.
- F1000 Factor 6.0 *Must Read*
Evaluated by Wolf Reik 01 Apr 2009
59. Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA: **Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines.** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:313-5.
60. Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, Sun N, Butte AJ, Wu JC: **MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells.** *Stem Cells Dev* 2009, **18**:749-58.

2. iPS細胞作製の最先端と作製されたiPS細胞株間の特性差異についての最新の知見

長船健二

最初の樹立の報告以降、わずか数年の間で、iPS細胞研究は生物学および医学における先駆的な一大研究領域となった。マウス、ラット、ブタ、そして、霊長類など複数の動物種、体内の多くの細胞種からのiPS細胞樹立が報告された。体細胞が未分化幹細胞に初期化される機構は、ほとんど未解明のままであるが、その機構の解明に基づく真に安全で効率のよいiPS細胞の樹立方法が、近い将来に確立されることが期待される。幹細胞株間の分化能や安全性の差異をはじめとする特性を理解したうえで、より適切な維持培養法と分化誘導法を開発することが、再生医療の実現化を加速させる。

はじめに

簡便な遺伝子操作にて体細胞から作製可能な多能性幹細胞であるiPS細胞(induced pluripotent stem cell:人工多能性幹細胞)が、マウス¹⁾に続いてヒトにおいても開発され²⁾³⁾、それ以降、世界中で激しい研究競争が繰り広げられている。そのなかにおいても、最近のiPS細胞研究で最も進展した分野は、ゲノムへの導入遺伝子の組み込みを必要としない、あるいは、

それを残さない新しいiPS細胞樹立方法の開発と、疾患特異的iPS細胞を用いた疾患モデル作製研究ではないかと考える。疾患モデル研究における最新の知見は他稿に譲る(第6章-5参照)として、本稿においては、iPS細胞作製についての最新の知見、および、われわれの報告を含めた幹細胞株間の特性差異についての知見を要約し、それらに基づく今後のiPS細胞研究の課題と展望について述べてみたい。

[キーワード&略語]

iPS細胞, 初期化機構, 樹立法, 分化能, 株間の特性差異

GSK-3: glycogen synthase kinase-3 (グリコーゲン合成酵素キナーゼ3)

MAPK: mitogen-activated protein kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)

shRNA: small hairpin RNA (低分子ヘアピン型RNA)

siRNA: small interfering RNA (低分子干渉RNA)

Recent advances in iPS cell generation and characterization of inter-line variability among iPS cell lines
Kenji Osafune: Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University/PRESTO, Yamanaka iPS Cell Special Project, Japan Science and Technology Agency (JST) (京都大学物質-細胞統合システム拠点iPS細胞研究センター/科学技術振興機構(JST)・さきがけ, 山中iPS細胞特別プロジェクト)

① iPS細胞樹立可能な細胞種および動物種

これまでの多くの報告では、iPS細胞は、成体あるいは胎児の線維芽細胞から作製されているが、成体由来の神経幹細胞⁴⁾、皮膚の角化細胞⁵⁾、血液細胞^{6)~8)}をはじめとするさまざまな体細胞^{9)~10)}、そして、出生前診断時に採取される羊水中および絨毛の細胞⁸⁾や臍帯血^{11)~12)}からも樹立が報告された。よって、初期化(再プログラム化、リプログラミング)は、樹立効率が細胞種で異なる可能性があるが、生体内のほとんどの細胞種で可能であることが予想される(図1A)。

マウス以外のより大型で寿命の長い動物種からのiPS細胞の樹立は、疾患に対する新しい動物モデルを作製することやiPS細胞から作製された臓器細胞の移植後の安全性を検証する優れた系の開発に繋がる。現在までのところ、マウスとヒトのiPS細胞とくらべて培養条件の確立が十分ではない可能性もあるが、サル(rhesus monkey:アカゲサル)¹³⁾、ラット^{14)~15)}、ブタ^{16)~17)}、そして最近、京都大学の中村らよりイヌからのiPS細胞樹立も報告されている(図1B)¹⁸⁾。

② 初期化機構の解明

分化細胞が未分化状態に初期化されるメカニズムは、iPS細胞研究における生物学的な面で最も興味深い謎の1つであるが、その機構はほぼ未解明のままである。

初期化誘導因子に関しては、オリジナルである山中4因子の組み合わせ(Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc)^{1)~2)}が最も広範に使用されているが、ウィスコンシン大学(アメリカ)のトムソンらの組み合わせ(Oct4/Sox2/Nanog/Lin28)を用いてもiPS細胞が樹立されている³⁾。最近、Sox2を内因性に高発現する神経幹細胞が、Oct4単独でiPS細胞に初期化されることが報告されたが⁴⁾、現在までのところ、Oct4を用いないで初期化された報告が存在しないため、前述の因子のなかでは、Oct4が中心的な分子であると考えられる。また、最近、核内オーファン受容体であるEsrrb遺伝子が、Oct4/Sox2との組み合わせでiPS細胞を樹立するとの興味深い報告がなされた¹⁹⁾。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるバルプロ酸²⁰⁾やBIX-01294/BayK8644の2剤²¹⁾が、それぞれ、Oct4/Sox2、そして、Oct4/Klf4との組み合わせでiPS細胞を誘導できるなど、化合物に

より初期化因子が置き換えられることが示された(図1C)。

初期化機構の解明に向けて、iPS細胞とその元となった体細胞などで超高速シーケンサーを用いた遺伝子発現解析やエピゲノム解析などの試みも開始され、分化細胞系譜に特異的な転写因子の抑制とDNA脱メチル化が初期化にとって重要なステップであることが報告されているが²²⁾、この研究領域のますますの進展が期待される。

③ 新規のiPS細胞樹立法

iPS細胞樹立の最初の報告では、レトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入が行われた^{1)~3)}。かつて、免疫不全症の患者に対して、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療が施行されたが、ゲノムへのベクターの挿入による癌原遺伝子の過剰発現に起因する白血病発症という深刻な合併症が生じ、死亡例も報告された^{23)~24)}。同様に、iPS細胞においてもゲノムに組み込まれたベクターの影響により、それから作製された臓器細胞を移植に用いた場合、将来的にその細胞が悪性化するなどのさまざまな危険性が懸念される。

この問題の解決を目指して、ゲノムへの導入遺伝子の組み込みを必要としない、あるいは、それを残さない新しいiPS細胞樹立方法が次々と報告されている(図1D)。まず、ゲノムへの組み込みの危険性の少ないアデノウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立がマウス²⁵⁾、そして、ヒトにおいても報告された²⁶⁾。また、ウイルスベクターを用いず2つのプラスミド(Oct4/Klf4/Sox2を繋いだプラスミドとc-Mycのみのもの)を用いた方法や²⁷⁾、4因子を繋いだ1つのプラスミドによる方法にて、マウスiPS細胞が樹立された²⁸⁾。

その他にも、piggyBacトランスポゾン^{29)~31)}やCre-loxPシステム³²⁾によりiPS細胞樹立後に導入遺伝子を切り出す方法も報告された。また、エピゾーマルベクターoriP/EBNA1を用いてベクターを含まないiPS細胞の単離を可能とする方法や³³⁾、初期化因子のリコンビナントタンパク質を導入することによりマウス³⁴⁾およびヒト³⁵⁾でiPS細胞が樹立された。さらに最近、核に取り込まれないセンダイウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立の報告がディナベック社の房木らのグルー

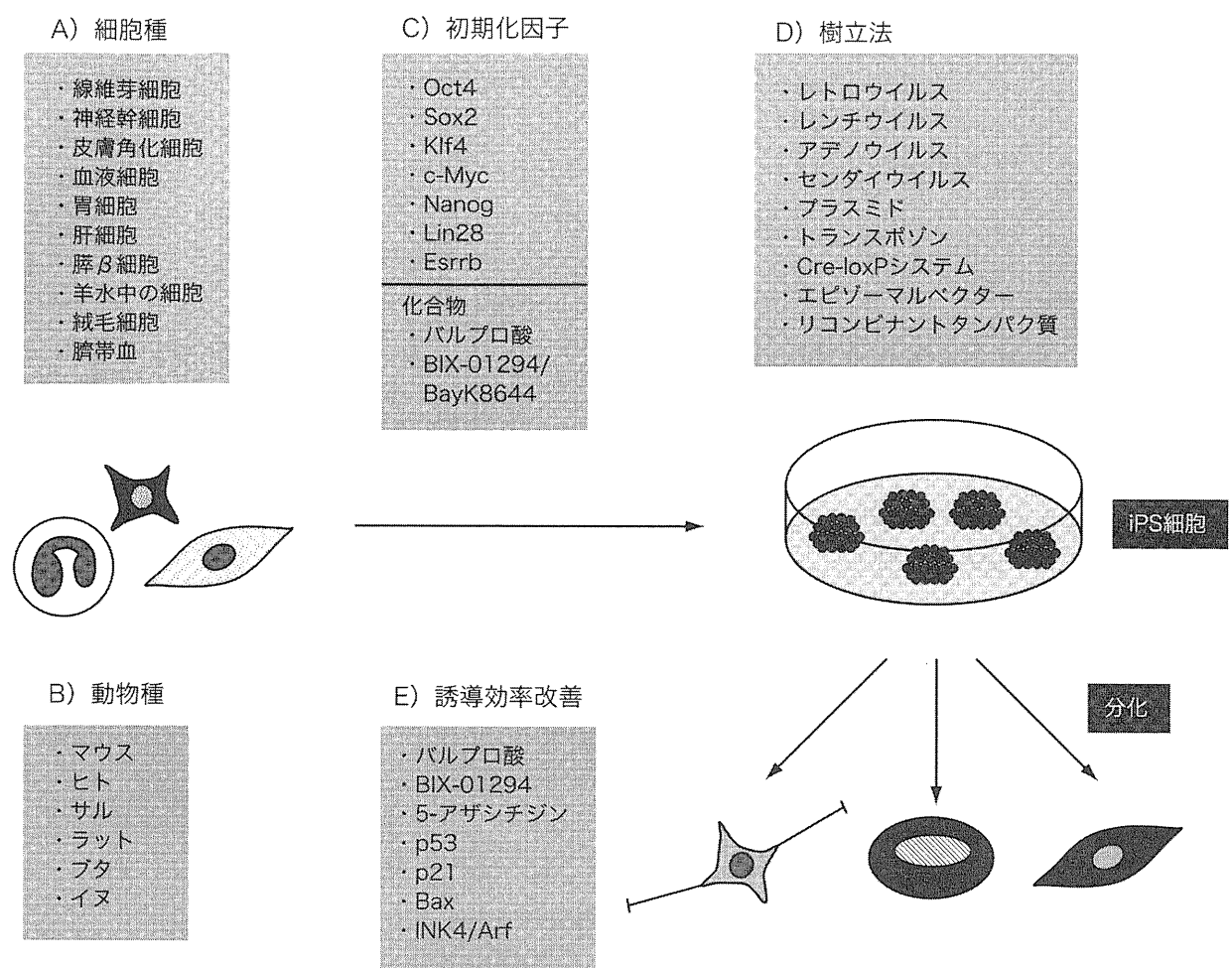


図1 iPS細胞作製に関する知見の要約
 さまざまな細胞種、動物種、初期化因子の組み合わせ、樹立法を用いてiPS細胞が作製され、誘導効率を改善する方法も報告されている

プよりなされた³⁶⁾。

以上、さまざまな樹立法が報告されているが、多くの方法で共通していることは、オリジナルのレトロウイルスベクターとくらべて樹立効率が低い点である。また、アデノウイルスやプラスミドも低い確率でゲノムに組み込まれる可能性があることや、初期化因子として依然として癌関連の遺伝子であるc-Myc/Klf4を用いていることが今後の改善点としてあげられる。

4 iPS細胞誘導効率の改善

体細胞を初期化してiPS細胞を誘導する効率は、依然として高くはない。これは、初期化因子発現のタイミング、バランス、発現量などが正確に調節されることが必要である可能性、あるいは、稀少なゲノム・エ

ピゲノム状態の変化を起こした細胞集団のみが選択される可能性などが考えられるが、機序は不明のままである。前述のバルプロ酸²⁰⁾、BIX01294²¹⁾、そして、5-アザシチジン (5-azacytidine)²²⁾などの化合物がiPS細胞誘導効率を高めることが報告されている(図1E)。

近年、iPS細胞誘導効率に関して、癌抑制遺伝子であるp53について注目が集まっている。まず2008年に、山中4因子にp53のsiRNA (small interfering RNA)を加えることでiPS細胞クローンの出現率が100倍に上昇するが、多くは部分的に初期化されたものであり、iPS細胞の特徴の1つである*in vivo*での奇形腫形成を示さないことが報告されていた³⁷⁾。しかし最近、山中らを含む複数のグループより、iPS細胞形成にお

ける p53 の役割について、より解明の進んだ報告が同時になされた^{38)~42)}。まず山中らによると、p53 遺伝子のノックアウトマウス由来の線維芽細胞では、驚くべきことに 3 因子 (Oct4/Sox2/Klf4) 導入にて 10% もの細胞が iPS 細胞に初期化され、同マウス由来の終末分化した T 細胞から iPS 細胞を作製することさえ可能であった³⁸⁾。同様の所見が、p53 の shRNA (small hairpin RNA) によるノックダウンを用いて別のグループからも報告され、さらに、p53 の下流にある p21 や Bax 遺伝子の発現を低下させることでも iPS 細胞誘導効率が上がることも示された³⁹⁾。また、別の 2 グループが、p53 の発現を制御する Ink4/Arf 遺伝子の発現低下が初期化効率を高めることを報告し^{40) 41)}、さらに、別のグループによって、p53 がテロメア長の短い細胞の iPS 細胞への初期化を阻害することが示された⁴²⁾。以上より、p53 を取り囲む分子ネットワークが初期化を阻害し、このネットワークの破綻が iPS 細胞誘導効率を高めることが示唆される (図 1 E)。

5 iPS 細胞株間の特性および差異

われわれは、異なる 17 の個体由来のヒト ES 細胞 (embryonic stem cell: 胚性幹細胞) 株を比較解析し、株間で分化能が大きく異なっており、神経外胚葉、中内胚葉組織など分化しやすい細胞系譜も株間で顕著な差があることを示した (図 2)⁴³⁾。このようなヒト ES 細胞株間の分化能の差を生じている原因として、異なる人種・家系に由来する余剰胚から作製されていることによる遺伝的素因の違いや、各 ES 細胞株間での異なるエピゲノム状態の関与などが予想されるが、現時点では全く不明である。

このようなヒト ES 細胞株間における分化能の定量的な差は、体細胞核移植法で作製された ES 細胞や iPS 細胞の株間においても、同様に存在する可能性が示唆される。特に iPS 細胞に関しては、未分化状態の ES 細胞と同じマーカー遺伝子を発現し、三胚葉への分化能を示すことのみによって定義されており、現時点では、iPS 細胞を分子的に定義するより明確で客観的な基準がない。また、レトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いて樹立された iPS 細胞のゲノムにはベクターが複数の染色体にランダムに組み込まれており⁹⁾、同一個体由来の iPS 細胞株間でも遺伝的背景が異なる。

さらに、iPS 細胞には、前述のようにさまざまな樹立法や細胞種を用いて作製された細胞株があり、異なる方法により作製された iPS 細胞が、全く均一なものであるか否かは不明である。

最近、テトラプロイド凝集胚形成法^{※1)}にてマウス iPS 細胞が完全な個体を形成する分化能を有することが示されたが^{44)~46)}、その生存率や成功率は iPS 細胞株間で異なり、iPS 細胞樹立に要した日数と関連があることが認められている⁴⁴⁾。また最近、異なる組織由来のマウス iPS 細胞から分化誘導された神経細胞を移植した際に奇形腫形成を合併する率が、由来組織によって異なり、株間で安全性が異なることが示された (第 4 章 - 3 参照)⁴⁷⁾。

現在までのところ、多くの iPS 細胞株間で分化能を詳細に比較解析した報告はほとんど存在しないが、分化能や安全性など株間の差異は、細胞療法などの移植医療に使用する細胞を効率よく作製するために、また、移植後の重篤な合併症を防ぐために大変重要な点であり、今後、異なる iPS 細胞株間で詳細に比較検討する必要があると考える。

6 iPS 細胞研究の課題と展望

iPS 細胞は、再生医療の開発など医学面での注目が高い一方で、生物学的にも大変興味深い疑問を提示している。特に初期化機構の解明は始まったばかりであり、この機構の解明が、ひいては iPS 細胞の樹立効率の低さを克服すると期待される。また、初期化機構の解明に基づいて、ゲノムへの導入遺伝子の組み込みがないため安全で、かつ、レトロウイルスベクターを用いたものと同様かそれ以上の誘導効率を有する iPS 細胞樹立方法の開発および普及が期待される。また今後、iPS 細胞を分子的に定義するより明確で客観的な基準の決定、すなわち「iPS 細胞の標準化」にも貢献する

※1 テトラプロイド凝集胚形成法

野生型の 2 つの胚を電氣的に融合させたテトラプロイド (四倍体) 胚とディプロイド (二倍体) である ES 細胞を凝集させ、ES 細胞からクローン (個体) を作製する方法。このキメラ胚では、テトラプロイド細胞は胚体自体には寄与できないが、胎盤などの胚体外組織には寄与できるという性質があり、100% ES 細胞由来の個体が作製できる。ES 細胞の分化能を判定する最も厳しい評価基準と言われている。

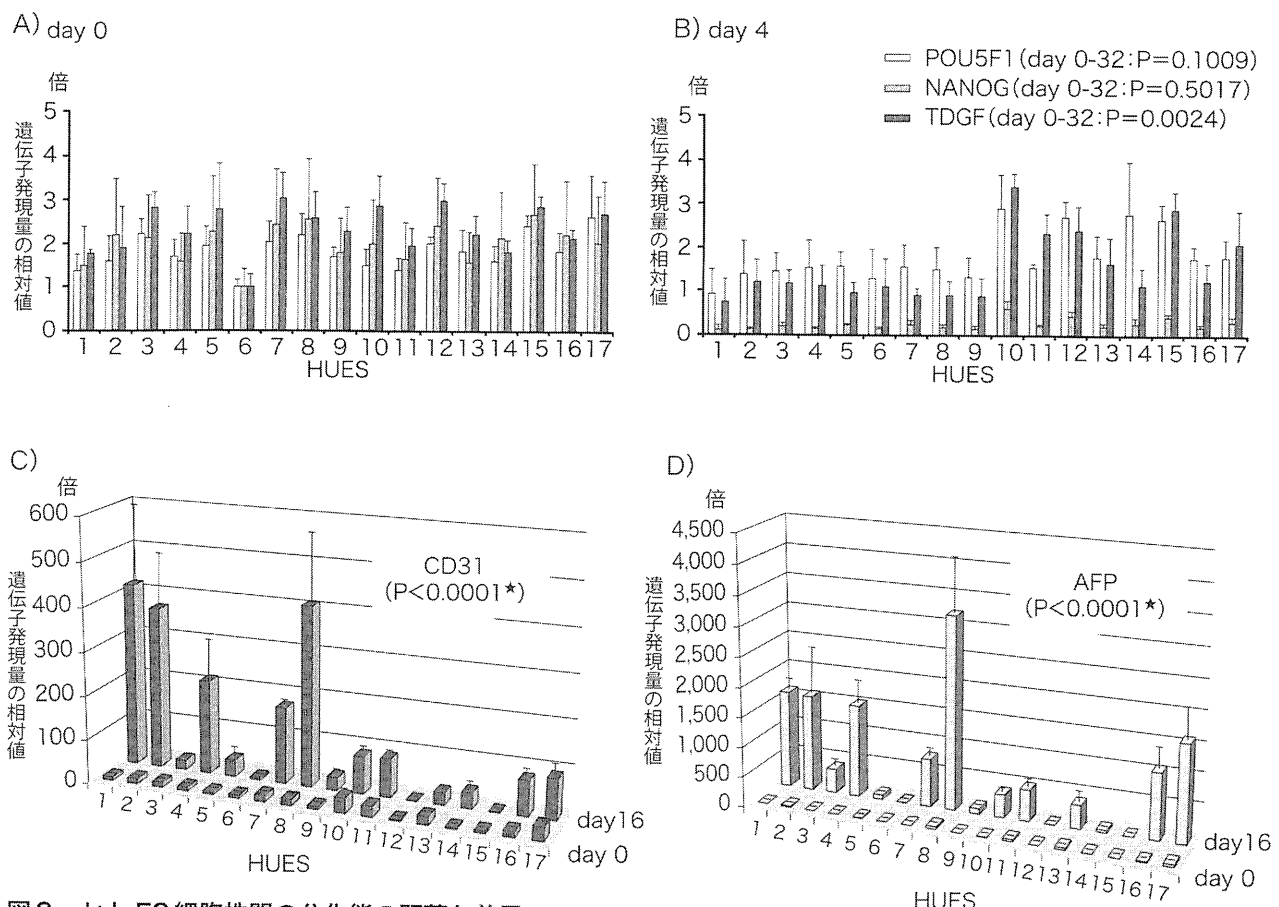


図2 ヒトES細胞株間の分化能の顕著な差異

17種類のヒトES細胞株 (HUES1-17) 由来の胚様体における自発性分化時の遺伝子発現の多様性. mRNA発現量の定量的PCRによる解析結果. day 0 (A) および day 4 (B) における未分化状態マーカー遺伝子 (*POU5F1*, *NANOG*, *TDGF*). C) day 0 および 16 における血管内皮 (中胚葉) マーカー遺伝子 *CD31*. D) day 0 および 16 における内胚葉マーカー遺伝子 *AFP*. それぞれのグラフは, 17細胞株間で最も発現量の小さい株の値を1として, それに対する倍率を示している. 未分化マーカー遺伝子の発現量は, 17細胞株間で差が小さく統計学的有意差はないが, *CD31* および *AFP* の発現量は, 顕著な違いがあり, 株間で有意差を認める ($P < 0.0001$, ANOVA for repeated measurements, 文献43より)

ものと期待される。

細胞株間の分化能や安全性の差異/不均一性については, その正確な評価を可能とする分化プロトコールの開発を行い, 目的に応じた細胞株を選択して使用できるシステムの構築が必要である. あるいは, 逆のアプローチとして, 近年, MAPK (mitogen-activated protein kinase) および GSK-3 (glycogen synthase kinase-3) の2つの酵素の阻害剤を使用する培養法で, 異なる系統に由来するマウスES細胞株がより均一になることが示されているが⁴⁸⁾, 同様の培養法が特にヒトES/iPS細胞に対しても開発され, 細胞株間の差異を最

小限とし, 株間をより均一にする技術の開発が望まれる (図3).

おわりに

iPS細胞研究はすさまじいスピードで進展が続いている. また, 世界中の大学や研究機関のみならず, 産業界, 官公庁, マスメディアをも巻き込んで, 1つの社会現象を引き起こしたと言っても過言ではないと思われる. 毎日のように新しい論文の発表や報道が行われるため, すべての知見を網羅することは困難であり, 本誌が出版されるころにはiPS細胞に対する認識も多

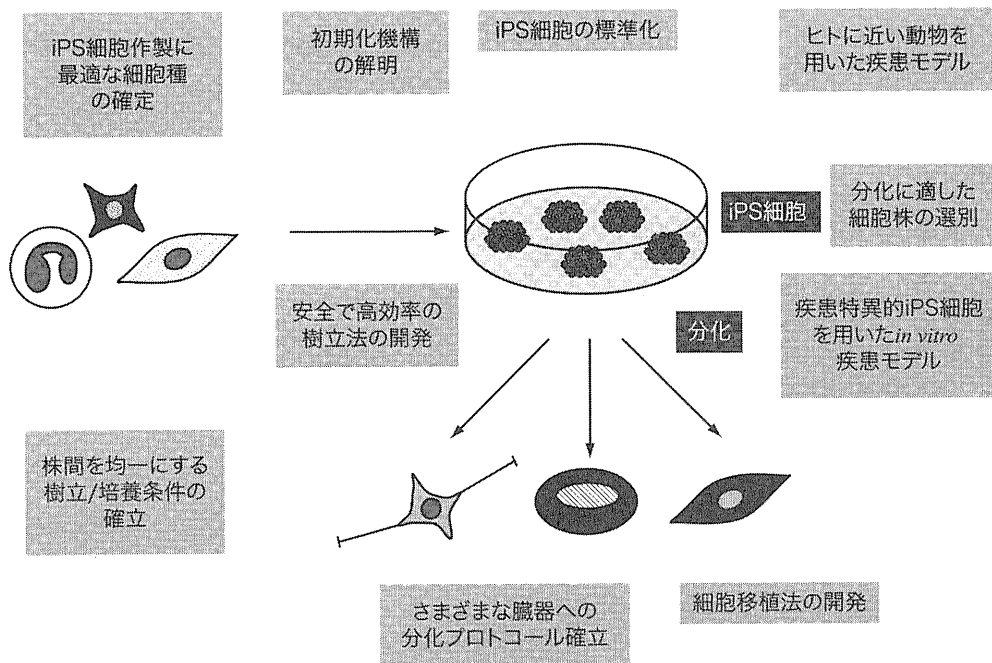


図3 iPS細胞研究の課題と今後の展望

初期化機構の解明に基づく安全で高効率なiPS細胞樹立法の開発と再生医療の実現化に向けた主要臓器細胞への分化誘導/移植法の開発,そして,難治性疾患に対するよりヒトに近い動物モデルおよび疾患特異的iPS細胞を用いた*in vitro*モデル作製による病態解析と治療薬開発への貢献が期待される

少変わっているのかもしれない。しかしながら、本稿がiPS細胞研究の知識の整理に少しでも役立ち、1人でも多くの若者や他領域の研究者が、iPS細胞研究に参入し、この本邦から誕生した技術を起点として新たなブレークスルーを次々と生み出すことを願ってやまない。

文献

- 1) Takahashi, K. & Yamanaka, S. : Cell, 126 : 663-676, 2006
- 2) Takahashi, K. et al. : Cell, 131 : 861-872, 2007
- 3) Yu, J. et al. : Science, 318 : 1917-1920, 2007
- 4) Kim, J. B. et al. : Cell, 136 : 411-419, 2009
- 5) Aasen, T. et al. : Nat. Biotechnol., 26 : 1276-1284, 2008
- 6) Hanna, J. et al. : Cell, 133 : 250-264, 2008
- 7) Loh, Y. et al. : Blood, 113 : 5476-5479, 2009
- 8) Ye, L. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 9826-9830, 2009
- 9) Aoi, T. et al. : Science, 321 : 699-702, 2008
- 10) Stadtfeld, M. et al. : Curr. Biol. 18 : 890-894, 2008
- 11) Giorgetti, A. et al. : Cell Stem Cell, 5 : 353-357, 2009
- 12) Haase, A. et al. : Cell Stem Cell, 5 : 434-441, 2009
- 13) Liu, H. et al. : Cell Stem Cell, 3 : 587-590, 2008
- 14) Li, W. et al. : Cell Stem Cell, 4 : 16-19, 2009
- 15) Liao, J. et al. : Cell Stem Cell, 4 : 11-15, 2009
- 16) Wu, Z. et al. : J. Mol. Cell Biol., 1 : 46-54, 2009
- 17) Ezashi, T. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 10993-10998, 2009
- 18) Shimada, H. et al. : Mol. Reprod. Dev., 77 : 2, 2010
- 19) Feng, B. et al. : Nat. Cell Biol., 11 : 197-203, 2009
- 20) Huangfu, D. et al. : Nat. Biotechnol., 26 : 1269-1275, 2008
- 21) Shi, Y. et al. : Cell Stem Cell, 3 : 568-574, 2008
- 22) Mikkelsen, T. S. et al. : Nature, 454 : 49-56, 2008
- 23) Hacein-Bey-Abina, S. et al. : Science, 302 : 415-419, 2003
- 24) Cavazzana-Calvo, M. & Fischer, A. : J. Clin. Invest., 117 : 1456-1465, 2007
- 25) Stadtfeld, M. et al. : Science, 322 : 945-949, 2008
- 26) Zhou, W. & Freed, C. R. : Stem Cells, 27 : 2667-2674, 2009
- 27) Okita, K. et al. : Science, 322 : 949-953, 2008
- 28) Gonzalez, F. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106 : 8918-8922, 2009
- 29) Yusa, K. et al. : Nat. Methods, 6 : 363-369, 2009
- 30) Woltjen, K. et al. : Nature, 458 : 766-770, 2009
- 31) Kaji, K. et al. : Nature, 458 : 771-775, 2009
- 32) Soldner, F. et al. : Cell, 136 : 964-977, 2009
- 33) Yu, J. et al. : Science, 324 : 797-801, 2009
- 34) Zhou, H. et al. : Cell Stem Cell, 4 : 381-384, 2009
- 35) Kim, D. et al. : Cell Stem Cell, 4 : 472-476, 2009

- 36) Fusaki, N. et al. : Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci., 85 : 348-362, 2009
- 37) Zhao, Y. et al. : Cell Stem Cell, 3 : 475-479, 2008
- 38) Hong, H. et al. : Nature, 460 : 1132-1135, 2009
- 39) Kawamura, T. et al. : Nature, 460 : 1140-1144, 2009
- 40) Li, H. et al. : Nature, 460 : 1136-1139, 2009
- 41) Utikal, J. et al. : Nature, 460 : 1145-1148, 2009
- 42) Marion, M. et al. : Nature, 460 : 1149-1153, 2009
- 43) Osafune, K. et al. : Nat. Biotechnol., 26 : 313-315, 2008
- 44) Zhao, X. Y. et al. : Nature, 461 : 86-90, 2009
- 45) Boland, M. J. et al. : Nature, 461 : 91-94, 2009
- 46) Kang, L. et al. : Cell Stem Cell, 5 : 135-138, 2009
- 47) Miura, K. et al. : Nat. Biotechnol., 27 : 743-745, 2009
- 48) Ying, Q. L. et al. : Nature, 453 : 519-523, 2008

<著者プロフィール>

長船健二：腎臓内科医，理学博士。1996年京都大学医学部卒業，京都大学附属病院老年科入局（北徹教授）。2000年まで腎臓内科医として内科診療に専念。'00～'05年東京大学大学院理学研究科（浅島誠教授）にて腎臓の発生と再生を研究。'05～'08年ハーバード大学幹細胞研究所/幹細胞再生生物学教室（Douglas A. Melton教授）にてヒトES細胞およびiPS細胞を用いた腎臓再生を研究。'08年より現職。iPS細胞を用いた腎臓および膵臓再生医療の開発研究を行っています。学部生，大学院生，ポスドク研究員，助教を募集中。興味のある方は御連絡お願いします（<http://www.users.iimc.kyoto-u.ac.jp/~z59080/>）。

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管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。

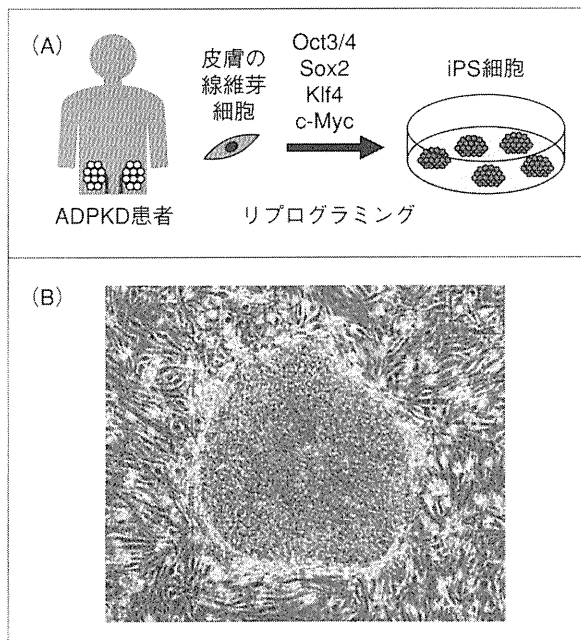


図 1 iPS細胞の樹立法(A)と常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) 患者から樹立された疾患特異的iPS細胞(B)

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

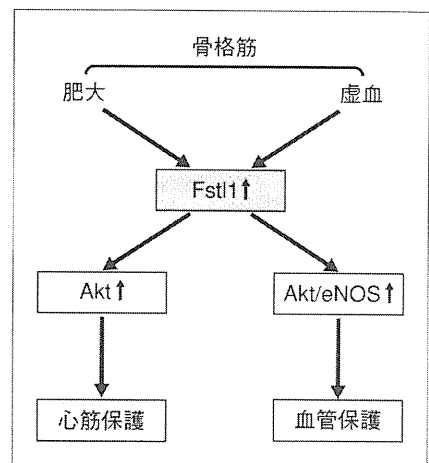


図 1 Fstl1 による心血管保護作用

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細胞を用いた創薬研究

—薬効・副作用評価系への活用—

Drug discovery using induced pluripotent stem cells
- Application to drug screening and toxicology assay -

中西 淳

武田薬品工業株式会社 医薬研究本部 開拓研究所



中西 淳（なかにし あつし）
1981年東京大学薬学部卒業。'86年東京大学薬学系研究科博士課程修了。武田薬品工業入社。'88～'89年米国ハーバード大学医学部留学。研究テーマ：中枢神経系疾患治療薬の研究、低分子再生医薬の研究

Key Words: induced pluripotent stem cells, drug discovery, screening

■ Abstract ■

新薬を創生することが年々難しくなっている。2008年の米国食品医薬品局（FDA）の新薬承認数は24とやや持ち直したが、ここ数年は20前後で推移しており1990年代に比較して明らかに減少している。これは、審査基準の厳格化、とくに副作用試験に対する要求基準のアップに加え、創薬に適したターゲット分子の減少や難易度の高い疾患への挑戦などが要因と考えられる。このような状況下、製薬企業は低分子化合物を中心とした創薬に加えて、抗体医薬や核酸医薬など新たな医薬品の形態に取組み、新技術も積極的に活用しつつ厳しい競争に打ち勝つ努力をしている。ES細胞や体性幹細胞など幹細胞関連技術は従来から創薬への応用の可能性が言及されてきたが、iPS細胞は患者組織から作製できること、使用に関して倫理的な問題がほとんどないことから創薬への期待が非常に大きい。創薬研究のプロセスは多くのステップが必要であるが、その中でも薬効スクリーニング、毒性評価へのiPS細胞の活用について述べる。

■ iPS細胞を用いた薬効スクリーニング

医薬品開発の初期の重要なステップであるスクリーニングは数十万あるいは100万種以上の化合物から活性のある候補化合物を見つけ出す作業である。短時間で数多くの化合物を評価するためには、再現性に優れたスループットの高いアッセイ系（スクリーニング系）を構築しなければならない。

近年のイメージング技術の進歩により、細胞を用いたセルベースアッセイでもスループットの高いアッセイが可能になってきた。創薬スクリーニング用の細胞としては、培養方法や遺伝子操作が比較的簡単であることから、がん細胞株や不死化細胞株が広く用いられている。

しかし、これらの細胞はヒト組織の生理的な性質あるいは病態の異常を忠実に反映している保障はない。動物やヒト組織由来の初代培養細胞も使用されるが、増殖能に限界があり均質な材料が常に入手できないことから、スクリーニングのハイスループット化と安定的な供給の面で問題がある。ヒト細胞の性状を反映し供給面での問題を解決したソースとしてヒトiPS細胞から分化成熟させた細胞の利用が考えられる。iPS細胞の樹立にはヒト胚を利用しないので倫理的な障壁がなく、企業がスクリーニング等の創薬開発に積極的に使用することについても抵抗はない。

iPS細胞を用いた分化誘導研究はまだ緒についたばかりであるが、すでに、神経細胞（1）（2）、心筋細胞（3）、網膜色素上皮細胞（4）など一部の成熟組織細胞への分化が報告され、生体の組織細胞の機能を反映したヒト分化細胞の取得が可能とな

■ Atsushi Nakanishi

Frontier Research Laboratories, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Ltd.

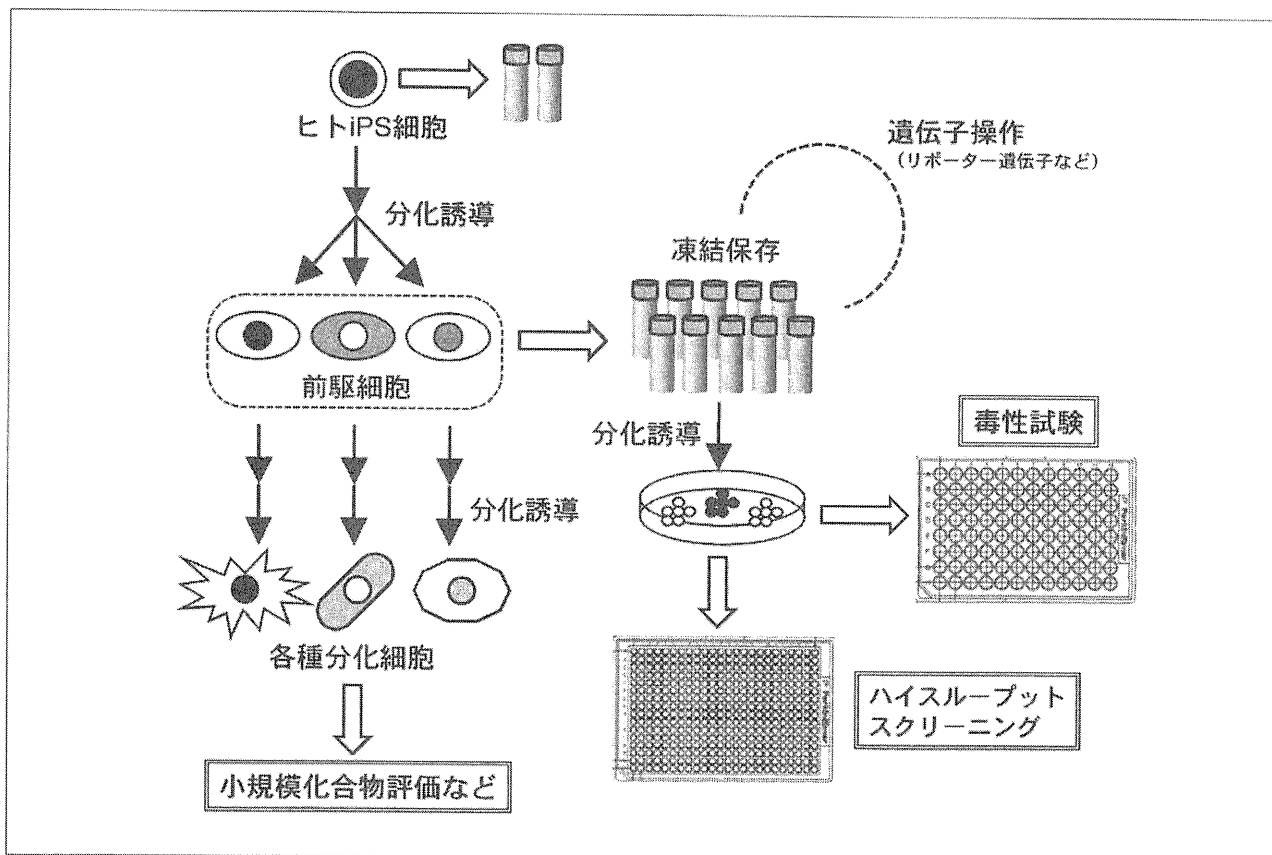


図 iPS細胞を用いた創薬研究の流れ

iPS細胞から分化誘導したヒト成熟組織細胞は小規模な化合物評価に利用できる。一方、大規模な薬効スクリーニングに用いるためには、分化誘導の効率化や前駆細胞の凍結保存など利便性および品質の安定性に繋がる細胞供給システムの確立が必要である。

ってきた。これらの細胞を用いた中枢神経系疾患、心疾患などの薬剤スクリーニングへの応用が期待される。例えば、ヒトiPS細胞由来のヒト神経細胞を用いて、神経細胞死、神経突起伸張、電気生理などに関する機能的なアッセイが構築可能であり、さらに、iPS細胞からの各種成熟神経への選択的な分化培養法で得られたドーパミン神経、アセチルコリン神経などの機能的なヒト成熟ニューロンを用いて神経伝達物質に関するアッセイも構築可能であろう。今後、上記組織以外にもヒトiPS細胞から様々な組織の細胞への分化誘導系が研究され、ヒト組織を反映したヒト成熟組織が入手可能になると予想される。

このように期待の大きいiPS細胞であるが、実際に使用するためには解決すべき課題も少なくない。

現状では、iPS細胞から成熟組織細胞への分化誘導には比較的長期間の培養期間と複数のステップが必要であり、成熟細胞の純度も高くない。大規模スクリーニングのためには大量の細胞の供給が必要であり、また、再現性があり信頼できる実験結果を得るためには、分化細胞の性状の安定化が必須である。使用目的にもよるが、成熟細胞の純度を上げるために分化誘導効率の向上や目的細胞の濃縮・精製方法の確立が必要である。

さらに、利便性の面から、分化培養の途中段階、例えば特定の組織への分化がコミットされた前駆細胞の段階で凍結保存が可能となれば、供給のみでなく再現性の面からもメリットは大きい。大量に保存された前駆細胞から少数のステップで必要な組織への分化が実現できれば、創薬スクリー

表 iPS細胞の創薬利用に焦点を当てたベンチャー企業

	Key Scientists (創業者、アドバイザー)	iPS細胞関連のプロダクト・サービスおよび技術	主なiPS細胞関連特許 (ライセンスを含む)	備考
ReproCELL Inc. (日本)	中辻憲夫 中内 啓光	・iPS細胞培地 ・iPS細胞由来心筋細胞の提供 ・iPS由来心筋細胞を用いた毒性評価	マウス及びヒトiPS細胞 (Yanamaka, 2006)	
iPierian (米)	George Daley Douglas Melton Lee Rubin Deepak Srivastava Corey Goodman	・疾患特異的iPS細胞の作製と分化誘導 ・疾患特異的iPS細胞を用いたDrug Discovery	ヒトiPS細胞 (Sakurada, 2007)	Gladstone Instituteおよび京都大学と共同研究
Cellular Dynamic International (米)	James A. Thomson Craig T. January Timothy J. Kamp Igor Slukvin	・iPS由来分化細胞の提供 ・iPS由来心筋細胞を用いた毒性評価 ・血球細胞からiPS作製 ・プラスミドによるiPS作製技術	ヒトiPS細胞 (Thompson, 2007)	Rocheと提携
Fate Therapeutics (米)	Philip Beachy Sheng Ding Rudolf Jaenisch David Scadden Leonard Zon	・iPS細胞の作製 ・iPS由来細胞を用いた再生医療と創薬応用 ・タンパク質にあるいは化合物によるiPS作製	転写因子によるリプログラミング (Jaenisch, 2004)	創薬応用を目指したiPS細胞研究ネットワーク CATALYSTを構築

ニングへの応用は飛躍的に広がると思われる(図)。

■iPS細胞を用いた副作用評価

ヒトの成熟組織細胞を安定的に供給できるという点で、iPS細胞は副作用(毒性)評価にも活用が期待されている。心毒性、肝毒性、神経毒性などへの応用がまず考えられ、創薬の初期の段階から品質の安定したヒト組織を用いた毒性評価が可能になれば、ヒトへの外挿性が上がり臨床試験の成功確率の上昇に繋がると期待できる。毒性試験は製薬企業各社が開発した医薬品そのものの競争力に直接関係しないので、各社が協力して標準的な評価法の開発を行なうことが可能である。また、iPS細胞を用いた毒性評価が可能になれば、各社連携してデータを蓄積し将来的に申請資料に使えるように当局と早期から協議をしていくことが望まれる。日本においても、新エネルギー・産業開発機構(NEDO)のプロジェクト「iPS細胞等幹細胞産業応用促進基盤技術開発」、医薬基盤研究所が主

体となったスーパー特区「ヒトiPS細胞を用いた新規in vitro毒性評価系の構築」などが立ち上がり、iPS細胞を用いた心毒性、肝毒性評価系構築に向けて研究がスタートしている。前者はユーザーフォーラムという形で複数の製薬企業が参加しており、後者は将来製薬協との連携を視野に入れている。これらのプロジェクトを中心に毒性評価系の標準化に向けて産官学が協力し、iPS細胞を用いた毒性評価の早期実用化が望まれる。

iPS細胞の毒性研究への応用として利用価値が高いと思われるのは、前臨床試験や臨床試験において毒性が原因で開発中止となった薬剤の毒性発現メカニズムの解析である。iPS細胞を用いると、毒性発現の対象となるヒト成熟組織細胞を用いたメカニズム解析が可能になり、先行化合物の副作用を軽減したバックアップ化合物の研究開発に繋がる。また、実際に副作用が発現した患者組織からiPS細胞を作製し、その分化細胞を用いることが出来れば、毒性発現のメカニズムの研究はより効率