

ful to Kyowa Hakeko Kirin for providing TPO and G-CSF. We also thank the Center for Anatomical Studies, Kyoto University Graduate School of Medicine, for immunocytochemical analysis. Funding was provided by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare to KW, TN, and TH, a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) to KW, TN, and TH, grants from the Leading Project of MEXT to TN, a grant from Funding Program for World-Leading Innovative Research and Development on Science and Technology (FIRST Program) of Japan Society for the Promotion

of Science (JSPS) to TN, grants from the SENSHIN Medical Research Foundation to IK, and grants from the Fujiwara Memorial Foundation to TM. This work was also supported by the Global COE Program "Center for Frontier Medicine" from MEXT, Japan.

Authorship and Disclosures

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.hematologica.org.

References

- Welte K, Zeidler C, Dale DC. Severe congenital neutropenia. *Semin Hematol*. 2006;43(3):189-95.
- Skokowa J, Germeshausen M, Zeidler C, Welte K. Severe congenital neutropenia: inheritance and pathophysiology. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(1):22-8.
- Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikan AG, Bos C, Bonilla MA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood*. 2000;96(7):2317-22.
- Kostmann R. Infantile genetic agranulocytosis; agranulocytosis infantilis hereditaria. *Acta Paediatr Suppl*. 1956;45(Suppl 105):1-78.
- Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schaffer AA, et al. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet*. 2007;39(1):86-92.
- Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, Takeshita H, Deuschle U, Watanabe T. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with Hs1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol*. 1997;158(6):2736-44.
- Sharp TV, Wang HW, Koumi A, Hollyman D, Endo Y, Ye H, et al. K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function. *J Virol*. 2002;76(2):802-16.
- Freedman MH, Bonilla MA, Fier C, Bolyard AA, Scarlata D, Boxer LA, et al. Myelodysplasia syndrome and acute myeloid leukemia in patients with congenital neutropenia receiving G-CSF therapy. *Blood*. 2000;96(2):429-36.
- Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. *Br J Haematol*. 2010;150(2):196-9.
- Chao JR, Parganas E, Boyd K, Hong CY, Opferman JT, Ihle JN. Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature*. 2008;452(7183):98-102.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
- Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2007;25(10):1177-81.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007;448(7151):313-7.
- Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008;451(7175):141-6.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
- Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Adachi S, et al. Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol*. 2011;226(5):1283-91.
- Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, et al. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One*. 2011;6(7):e22261.
- Matsubara K, Imai K, Okada S, Miki M, Ishikawa N, Tsumura M, et al. Severe developmental delay and epilepsy in a Japanese patient with severe congenital neutropenia due to HAX1 deficiency. *Haematologica*. 2007;92(12):e123-5.
- Skokowa J, Fobiwe JP, Dan L, Thakur BK, Welte K. Neutrophil elastase is severely down-regulated in severe congenital neutropenia independent of ELA2 or HAX1 mutations but dependent on LEF-1. *Blood*. 2009;114(14):3044-51.
- Kobayashi M, Yumiba C, Kawaguchi Y, Tanaka Y, Ueda K, Komazawa Y, et al. Abnormal responses of myeloid progenitor cells to recombinant human colony-stimulating factors in congenital neutropenia. *Blood*. 1990;75(11):2143-9.
- Konishi N, Kobayashi M, Miyagawa S, Sato T, Katoh O, Ueda K. Defective proliferation of primitive myeloid progenitor cells in patients with severe congenital neutropenia. *Blood*. 1999;94(12):4077-83.
- Germeshausen M, Grudzien M, Zeidler C, Abdollahpour H, Yetgin S, Rezaei N, et al. Novel HAX1 mutations in patients with severe congenital neutropenia reveal isoform-dependent genotype-phenotype associations. *Blood*. 2008;111(10):4954-7.
- Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, et al. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(8):3023-8.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302(5644):415-9.
- Ott MG, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, et al. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*. 2006;12(4):401-9.
- Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3143-50.
- Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMG2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*. 2010;467(7313):318-22.
- Papapetrou EP, Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari LM, et al. Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):73-8.
- Zou J, Sweeney CL, Chou BK, Choi U, Pan J, Wang H, et al. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*. 2011;117(21):5561-72.
- DeKaveler RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijings SH, et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res*. 2010;20(8):1133-42.
- Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKaveler RC, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*. 2009;27(9):851-7.
- Henckaerts E, Dutheil N, Zeltner N, Kattman S, Kohlbrenner E, Ward P, et al. Site-specific integration of adeno-associated virus involves partial duplication of the target locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(18):7571-6.
- Ishikawa N, Okada S, Miki M, Shiraio K, Kihara H, Tsumura M, et al. Neurodevelopmental abnormalities associated with severe congenital neutropenia due to the R86X mutation in the HAX1 gene. *J Med Genet*. 2008;45(12):802-7.

Keywords

疾患特異的 iPS 細胞
疾患モデル
神経疾患
心臓疾患
血液疾患
化合物スクリーニング

疾患特異的 iPS 細胞

Disease-associated iPS cells

齋藤 潤 中畑 龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門

Summary

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are potential cell sources for regenerative medicine and other clinical applications, such as cell therapies, drug screening, toxicology testing, and the investigation of disease mechanisms. Discovery of disease-associated iPSCs has led to the development of a new field of disease modeling, as they can provide somatic cells which cannot be directly obtained from each patient. In this review, we focus on the applications of disease-associated iPSCs for understanding various human disorders, while discussing the findings of previous reports of disease-associated iPSCs and future perspectives.

はじめに

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) とは、京都大学の山中らによって樹立された幹細胞の一種である。その特徴は、①すべての細胞・組織に分化できる多能性 (pluripotency) を有する、②体細胞より誘導できる、という点にある。2006年にマウス iPS 細胞¹⁾、2007年にヒト iPS 細胞²⁾が樹立された。ヒトの初期胚から作られる ES 細胞 (embryonic stem cells) は、個体のすべての組織へ分化することができるかとされているが、iPS 細胞も同等の万能性をもつ。しかし、大きく異なるのは、ES 細胞はヒトの受精卵を滅失して作成する必要があるのに対し、iPS 細胞は線維芽細胞や血球など、ある個体の体細胞から人工的に樹立することができる点である。これらの万能性細胞から心筋や神経、内分泌細胞

Saito, Megumu / Nakahata, Tatsutoshi

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

E-mail : msaito@cira.kyoto-u.ac.jp

などを分化・作出し、再生医療のソースとすることが考えられているが、iPS細胞はES細胞に比べて、①ヒトの受精卵を使用しないため倫理的問題が少ない、②自家移植であれば免疫拒絶のリスクが少ない、というメリットがある。このため、iPS細胞を用いた再生医療は非常に有望であろうと考えられている。一方、疾患をもつ患者から血液や皮膚線維芽細胞などの体細胞を採取し、これらからiPS細胞を樹立すると(疾患特異的iPS細胞)、このiPS細胞を患者の罹患細胞へ分化させることにより、患者由来のさまざまな分化細胞を得ることができる。特に神経疾患や心筋疾患などでは、従来得ることが極めて困難であった神経細胞や心筋細胞をiPS細胞を経て大量に培養し、解析に用いることが可能となりうる。このように、疾患特異的iPS細胞は、患者の病態を反映し、臨床へと結びつけるツールとして、疾患の病態解析や創薬などへの応用が可能なることから、医学・生物学分野への幅広い貢献が期待されている。すでに数多くの疾患特異的iPS細胞を用いた研究が報告されている一方で、本格的な疾患解析・治療薬開発のために疾患特異的iPS細胞を用いるための課題も明らかになってきた。本稿では、疾患特異的iPS細胞を用いた解析をレビューするとともに、これを取り巻く現状および今後の展開についてまとめたい。

三 ヒト疾患解析の手法

従来、ヒト疾患研究では、①ヒトプライマリ細胞、②遺伝子改変動物、③ヒト不死化細胞株、および④ヒト化マウス、などが実験系として用いられてきた。

ヒト疾患研究は、ヒトプライマリ検体を得て行うことができるのが望ましいが、さまざまな制約からそれが難しいことがほとんどである。患者由来プライマリ細胞は治療やサイトカイン環境などに影響を強く受けるため、実験系の信頼性にも問題が生じうる。

遺伝子改変動物は極めて重要なツールであり、ノックアウト、ノックインなどの遺伝子改変技術を用い、さまざまな疾患とその責任遺伝子についての知見が得られている。一方、マウスモデルを用いた場合、ヒトとマウスの遺伝子が異なるため、マウスにヒトの責任遺伝子が存在しない場合や、ヒトとマウスで遺伝子が共通でも機能や表現型が異なる場合がある。また、ヒトの場合、1つの責任遺伝子に対して多くの変異型が存在することが多いが、マウスモデルでは変異型は代表的なものに限定されるか、機能喪失型変異ではノックアウトで代表される。そのため、表現型-遺伝子型関係(phenotype-genotype correlation)の検討などは難しい。

患者由来線維芽細胞やEBウイルスで不死化したB細胞などのヒト細胞(株)や、すでに存在するヒト細胞株に遺伝子導入を行うなどして、ヒトの細胞株を解析に

用いた場合、遺伝子改変動物でみられたヒトと他の動物種間の遺伝子差異に帰着する問題は回避できる。しかし、この手法で解析できる手法が限定されること、遺伝子導入をした場合に生理的な発現から逸脱する場合が多いこと、培養細胞株ではしばしば核型の変化がみられることなどにより、患者病態を反映できる可能性は高くない。

疾患特異的 iPS 細胞は、ヒトプライマリ細胞に近い機能をもつ細胞を誘導でき、さまざまな細胞種に分化が可能である。また、ヒト ES/iPS 細胞の遺伝子改変技術も進歩しており、疾患 iPS 細胞をさらに遺伝的に改変することも可能になっている。したがって、前述のさまざまな方法を補完する手法として、疾患解析・創薬など、疾患モデルを応用した研究を推進するツールになると考えられる。

iPS 細胞の樹立方法

疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究を行うように、図に示すように、iPS 細胞の樹立・分化系確立・解析系確立を適切に行っていく必要がある。

患者・疾患特異的 iPS 細胞を用いて研究を行う場合、まず倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を受けた後、患者よりインフォームド・コンセントを取得する必要がある。他方、さまざまな疾患をもつ患者由来の線維芽細胞や不死化 B 細胞株を収集しているレポジトリもあるので、このような組織から体細胞を入手することも可能である。代表的な組織として、米国の Coriell institute (<http://www.coriell.org/>) がある。このようなレポジトリから購入した細胞は連結不可能匿名化されており、さまざまな実験に使用が可能であるが、詳細な使用条件について

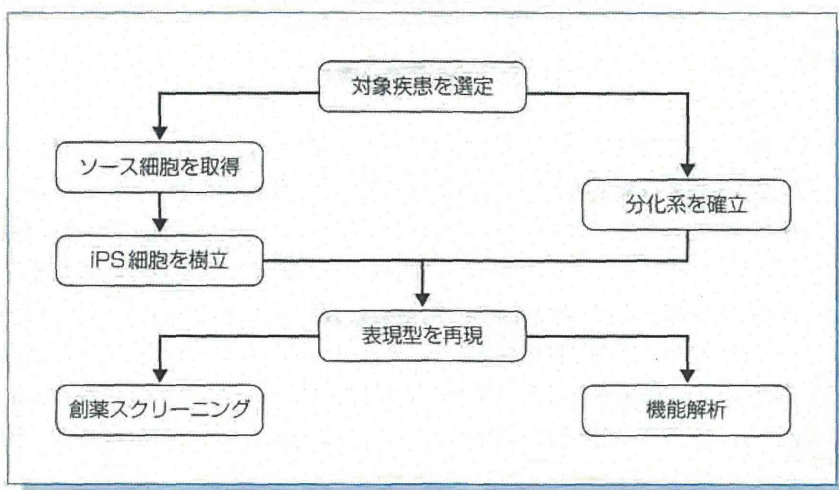


図 疾患特異的 iPS 細胞研究の流れ

はそれぞれのレポジトリに確認し、適切な物質移動合意書を締結しておく必要がある。

iPS細胞の樹立方法の詳細については、各種の実験書に譲るが、樹立に当たって考慮すべきことは、①ソースとなる細胞の種類、②遺伝子導入方法、③取得するクローン数、④コントロールをどうするか、といった事柄である。

①ソース細胞の種類であるが、最も一般的な細胞は、皮膚より採取し、培養した線維芽細胞である。最近、末梢血単核球や、末梢血CD34陽性細胞などからの樹立も可能になっている。さらに、EBウイルスを用いて不死化したB細胞株からも樹立が報告されており³⁾⁴⁾、このような株はさまざまな細胞バンクに大量に保存されているために、利用価値が高いと思われる。

②遺伝子導入方法について、報告上最も一般的なのは、ウイルスベクターを用いる方法で、最初に報告されたレトロウイルスを用いる手法であるが、1つのレンチウイルスベクター上に4つの初期化に必要な遺伝子が直列に並んだもの⁵⁾やセンダイウイルスベクターを用いる方法⁶⁾⁷⁾などが頻用されている。最近開発されたプラスミド(エピソーマル)ベクターを用いる方法⁸⁾⁹⁾はウイルスベクターの生成が不要で、通常プラスミドを用いた遺伝子導入方法で行えることから、ウイルスベクターを用いる方法よりかなり簡便である。線維芽細胞のほか、末梢血単核球からもこの方法で樹立が可能である。

③取得するクローン数であるが、我々は当初6~12クローン程度を取得し、ストックを作製してから、いくつかのクローンの分化能や未分化性を評価して、クローンを選別している。実際の疾患解析に使用するクローンは1症例あたり1~3クローンを用いて行っていることが多いと思われる。

④の対照群についてであるが、患者家族から樹立したiPS細胞や、分化能などの特性がすでに報告されている標準的なES/iPS細胞を用いて解析が行われている。患者iPS細胞がもつ遺伝子変異を相同組み換えなどにより修復したクローンが用いられることもある(後述)。体細胞モザイクで発症する疾患では、ある個人から特定の遺伝子変異をもつ細胞と変異をもたない細胞由来のクローンを得ることができ、後者を前者の対照として用いることができる¹⁰⁾。また、X染色体連鎖疾患の女性由来クローンでは、培養条件などによりiPS細胞クローンによって遺伝子変異をもつX染色体と変異をもたないX染色体のいずれかがランダムに不活化されるため、同様に前者のクローンを対照群として用いることが可能である¹¹⁾。

≡ iPS細胞と分化系

疾患iPS細胞研究に必要な要素として、①疾患iPS細胞、②これに対応する対

照 iPS 細胞, ③適切な分化系, ④機能評価系, が挙げられる。分化系については, ヒト ES 細胞の分化系が応用できることが多いが, 目的の細胞が得られない場合, 独自に開発する必要がある。分化系が適切に評価できれば, ④機能評価系については, マウスやヒトプライマリ細胞の実験系を用いることが可能になる。

iPS 細胞からの *in vitro* 分化系では, しばしば分化させた細胞は幼弱な表現型を呈し, 成人型の分化細胞まで至らないことがある。したがって, 遺伝子異常を伴い乳幼児期に発症する疾患に比べて, 成人期に発症する疾患の表現型の発露は遅れるかもしれない。場合によってはみられないかもしれない。しかし, 胎児・新生児疾患の解析を行うという観点からすると, この点は逆に利点となりうると考えられる。また, ヒト多能性幹細胞は理論的にはすべての細胞種に分化が可能であるとされるが, 実際には分化系が確立されていない細胞種も数多く存在するため, 疾患解析のためにまず分化系開発が必要な場合もある。

疾患特異的 iPS 細胞各論

すでに100以上の疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究の報告がなされており, 個別に言及することは難しいため, いくつかの領域における重要な成果について重点的に解説を行うこととしたい。

1 神経疾患の疾患特異的 iPS 細胞

脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy : SMA) は, SMN1 (survival motor neuron 1) 遺伝子の欠失によって発症する神経原性の筋萎縮症である。治療法はなく, 乳幼児の先天性疾患による死因のうち最多なもの1つである。2009年に Ebertらによって, SMA 患者1例からの iPS 細胞樹立が報告され, これが疾患 iPS 細胞の最初の報告となった¹²⁾。I 型 SMA 患者とその母親由来の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し, 神経細胞へ分化させたところ, 分化開始4週後の時点では差がなかったが, 6週後の時点では SMA 患者において, 運動ニューロンの割合が低下していた。また, 患者由来 iPS 細胞では, gem と呼ばれる細胞内の SMA 蛋白の凝集体が減少しており, SMN 遺伝子の正常転写産物の産生を増強させることが知られているバルプロ酸や tobramycin を添加することにより, gem が増加することが示された。また, SMA 患者由来 iPS 細胞を神経分化させると, 神経突起の伸長が障害され, 運動ニューロンへの分化能も低下するが, これらは SMN 遺伝子の強制発現により回復するという報告もある¹³⁾。他の報告では, SMA 患者由来 iPS 細胞に遺伝子修復を施し, 運動ニューロンへ分化させて SMA モデルマウスに移植すると, 表現型が改善したという¹⁴⁾。

同じ運動ニューロン疾患である筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral scler-

rosis : ALS)は進行性の神経変性疾患で、治療法はなく、発症後3~5年で半数が呼吸筋麻痺により死亡する。90%程度が孤発性であるが、残り10%程度の遺伝性ALSのうち、RNA結合蛋白であるTDP-43変異をもつ患者からの疾患特異的iPS細胞樹立が報告されている。TDP-43変異をALS患者3名からiPS細胞を樹立し、運動ニューロンへと分化させたところ、ALS患者由来細胞では、RNA代謝に関わる遺伝子群の発現が亢進し、神経突起が短くなっていた¹⁵⁾。また、TDP-43の発現が亢進し、TDP-43の凝集体が形成されており、細胞は酸化ストレスに対する脆弱性を示した。ALS運動ニューロンにアナカルジン酸を加えると、TDP-43発現量が低下し、脆弱性と神経突起長が改善したという。他のグループも同様に、TDP-43変異をもつ患者1例からiPS細胞を樹立し、運動ニューロンへと分化させたところ、TDP-43蛋白量の増加と神経細胞死の亢進がみられたと報告している¹⁶⁾。

Rett症候群は、主としてmethyl-CpG-binding protein 2 (MECP2) 遺伝子の変異によって発症するまれな疾患で、自閉症スペクトラムを呈する典型的な遺伝性疾患として知られている。Rett症候群患者から樹立したiPS細胞を神経細胞へ分化させたところ、対照群と比してシナプス、神経突起および細胞体のサイズが減少しており、カルシウムシグナリングの異常を認めたという¹⁷⁾。またRett症候群患者由来iPS細胞から誘導した神経前駆細胞では、MECP2によるL1レトロトランスポゾンの抑制が上手く働かず、レトロトランスポジションが増加していることも報告されている¹⁸⁾。

アルツハイマー病は頻度の高い神経変性疾患で、剖検によって脳内にアミロイド斑とneurofibrillary tangleが認められることにより定義される。ほとんどの患者は孤発性であるが、疾患特異的iPS細胞を用いた解析は主にまれな家族性アルツハイマー病患者由来の細胞を用いて行われている。Israelらは、APP遺伝子の重複により発症した家族性アルツハイマー病患者2例および孤発性アルツハイマー病患者2例よりiPS細胞を樹立し、神経細胞に分化させた¹⁹⁾。家族性アルツハイマー病患者2例と孤発性アルツハイマー病患者1例の由来神経細胞では、アミロイドβ(1-40)、リン酸化タウ蛋白および活性化GSK-3βの量が増加しており、RAB5陽性の早期エンドソームが細胞質に確認されたという。この報告では、孤発性アルツハイマー病患者でも、iPS細胞から分化させた神経細胞でアルツハイマー病に特有の表現型が得られていることが特色であり、iPS細胞を用いた解析がこのような遺伝的素因が未知の症例にも応用できることを示している。

また、新たなアプローチとして、アルツハイマー病患者由来の線維芽細胞をiPS細胞を経ずに直接神経細胞に分化転換(direct conversion)することも試みられている²⁰⁾。この報告では、presenilin-1またはpresenilin-2変異をもつ家族性アルツハイマー病患者由来の線維芽細胞に転写因子を強制発現し、約21日のプロトコ

ルで神経細胞を直接誘導している (iN 細胞)。患者由来 iN 細胞ではアミロイド前駆蛋白の局在と切断に変化がみられ、アミロイド β の過剰産生と A β 42/A β 40 比の上昇を認めたという。この手法を用いると、iPS 細胞の評価や長期間に及ぶ神経分化プロトコルを行うことなく、成熟した神経細胞を短期間で得ることができるため、分化転換が可能な細胞種に対しては有用な方法であると考えられる。

パーキンソン病は、アルツハイマー病と同様に高頻度にみられる神経変性疾患で、中脳ドパミン作動性神経細胞の脱落に伴う錐体外路症状を主徴とする。多くは孤発性であるが、一部に原因遺伝子が同定されている。パーキンソン病患者特異的 iPS 細胞の最初の報告は2009年で、5名の特発性パーキンソン病患者から iPS 細胞を樹立したところ、それらはドパミン作動性神経へ分化させることが可能であったという²¹⁾。また、 α -synuclein をコードする SNCA 遺伝子の重複によりパーキンソン病を発症した患者からの iPS 細胞樹立も報告されており²²⁾²³⁾、患者由来神経細胞では、酸化ストレスに対する脆弱性が観察されたという²⁴⁾。同様のストレス脆弱性は、LRRK2変異患者由来 iPS 細胞でも認められている²⁴⁾。PINK1変異患者由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞では、既報と同様に parkin のミトコンドリアへの移行障害が確認されている²⁵⁾。Parkin 変異患者由来 iPS 細胞を中脳ドパミン作動性神経細胞へ分化させた研究では、モノアミン酸化酵素の発現上昇と酸化ストレスの増加、ドパミン取り込み能の低下およびドパミン放出の増加が観察され、parkin がこの細胞種におけるドパミンの利用方法を制御しているのではないかと考察されている²⁶⁾。Cooper らは、PINK1変異とLRRK2変異をもつ患者/保因者からそれぞれ樹立した iPS 細胞を神経細胞に分化させ、ミトコンドリア機能を評価している。さらに、細胞の脆弱性が薬剤投与によって改善することを示しており、パーキンソン病におけるミトコンドリア機能と酸化ストレスの解析に iPS 細胞が有用であることを示唆している²⁷⁾。

代表的な精神疾患の1つであり、全人口の1%が発症すると推定されている統合失調症は、その発症に遺伝的バックグラウンドが関与することが推定されている。Brennan らは、4名の統合失調症患者から iPSC を樹立し、神経細胞に分化させてその細胞生物学的な特徴を調べた²⁸⁾。患者由来神経細胞は、神経突起および神経同士の接続が減少しており、PSD95 蛋白やグルタミン酸受容体の発現が低下していた。さらに、患者由来 iPSC を抗精神病薬の Loxapine で処理すると、マイクロアレイで発現に差異がみられた複数の遺伝子発現が正常化することが示された。この研究から、単一遺伝子病ではない、複雑な遺伝的バックグラウンドをもった疾患でも病態モデリングが可能なのことがわかる。

2 循環器疾患の疾患特異的 iPS 細胞

ヒトとマウスでは安静時の心拍数が10倍程度異なること、イオンチャネルや電

気生理学的な特性も異なることなどから、ヒト心筋を用いた疾患解析の重要性が指摘されており、いくつかのiPS細胞を用いた疾患再現モデルが報告されている。

著明な心電図上のQT延長に体表奇形・自閉症などを合併するTimothy症候群は、L型Caチャンネル(CaV1.2)をcodeする遺伝子CACNA1Cの変異によって発症する。Timothy症候群患者由来iPS細胞を心筋細胞へと分化させたところ、心筋細胞における不規則な筋収縮、過剰なCa²⁺流入、活動電位の延長・不規則化、不規則な自発性Ca²⁺上昇を認めたという²⁹⁾。さらに、CaV1.2の不活化を促進するロスコピチンがこれらの異常な表現型を正常化させることを報告し、薬剤スクリーニングの可能性について示唆している。なお、このグループは同じiPS細胞を用いてTimothy症候群の神経系の解析も行っている³⁰⁾。このほか、先天性QT延長症候群(LQT1型³¹⁾、LQT2型³²⁾、カテコラミン感受性多形性心室頻拍³³⁾などの不整脈疾患でもiPS細胞由来心筋を用いた病態再現が報告されている。

肥大型心筋症の解析として、PTPN11遺伝子変異によって経路の異常をきたし、肥大型心筋症を呈するRAS/MAPK症候群の1つであるLEOPARD症候群患者由来のiPS細胞樹立が報告されている。患者由来iPS細胞から分化させた心筋細胞は対照に比べて大きく、サルコメア構築が促進しており、心筋肥大に重要な要素であるNFATC4の核内移行も促進していたという³⁴⁾。

冠動脈疾患に次ぐ心不全の重要な原因である拡張型心筋症についても、モデルが作製されている³⁵⁾。TNNT2遺伝子に変異をもつ家系よりiPS細胞を樹立し、心筋に分化させたところ、サルコメアの構造異常が認められ、収縮力も低下していた。βアドレナリン受容体刺激によりサルコメアαアクチニン構造異常が悪化した一方で、βブロッカーの添加によりこの表現型は改善したという。

3 血液・免疫疾患の疾患特異的iPS細胞

血液疾患として最初に報告されたのは、まれな先天性骨髄不全症であるFanconi貧血の疾患特異的iPS細胞である³⁶⁾。Fanconi貧血患者由来の線維芽細胞に遺伝子修復を施した後に初期化を行い、iPS細胞を得ることができたが、未修復の線維芽細胞からiPS細胞を樹立することはできなかったという。このことは、Fanconi貧血で欠損している経路が初期化に重要であることを示している。一方で遺伝子修復を行ったiPS細胞クローンを血球分化させたところ、正常に分化したため、iPSCを用いた遺伝子治療の可能性も示された。最近、他のグループが、Fanconi貧血患者線維芽細胞を用いて、非常に低い効率ながら遺伝子修復を行わずにiPS細胞が樹立できることを報告している³⁷⁾。

サラセミアは最も高頻度にみられる遺伝性貧血であり、βグロビン遺伝子変異により発症する。サラセミア疾患特異的iPS細胞を用いた遺伝子治療のモデルが提唱されている。Wangらは相同組み換えによってβサラセミア患者由来iPS細胞

胞の遺伝子修復を行い、これを血球系前駆細胞へ分化させ、マウスに輸注することでヘモグロビンレベルが回復すると報告している³⁸⁾³⁹⁾。Papapetrouは β グロビン遺伝子をレトロウイルスでiPS細胞に組み込み、赤芽球前駆細胞で発現させることに成功している⁴⁰⁾。鎌状赤血球症においても、同様にiPS細胞を用いた遺伝子修復モデルが提唱されている^{41)~43)}。

免疫疾患については、食細胞機能異常による免疫不全症である慢性肉芽腫症患者由来のiPS細胞が2つの研究グループによって報告されている⁴⁴⁾⁴⁵⁾。疾患特異的iPS細胞より分化させた好中球では刺激に対する活性酸素の産生応答が傷害されており、患者の病態の一部が再現されていた。

また、血液系悪性疾患として、慢性骨髄性白血病由来のiPS細胞が樹立されている。ソースはヒト由来細胞株⁴⁶⁾、プライマリ骨髄細胞⁴⁷⁾、CD34陽性細胞⁴⁸⁾とさまざまであるが、いずれの報告においてもソースとなった体細胞に存在した9;22転座がiPS細胞においても保持されていた。興味深いことに、初期化後のiPS細胞クローンはimatinibに対する反応性を失っており、血球分化によってoncogene addictionは回復した⁴⁸⁾。

iPS細胞の重要な特徴は、それぞれのクローンがソースとなる単一の体細胞に由来するという点である⁴⁹⁾。この特徴を活かすことにより、ある個人から遺伝的差異のある複数の体細胞集団からなる場合に、個々の集団を代表する細胞を取り出すことができる⁵⁰⁾。自己炎症性疾患であるCINCA症候群では、30~40%の患者は責任遺伝子であるNLRP3の変異を体細胞モザイクとしてもつことが知られており、この場合のNLRP3変異陽性細胞と陰性細胞それぞれの働きは不明であった⁵⁰⁾⁵¹⁾。我々は、モザイク型CINCA症候群患者よりiPS細胞を樹立し、NLRP3変異ありクローンと変異なしクローンをそれぞれマクロファージに分化させて表現型を比較したところ、NLRP3変異細胞のみに特徴的な表現型を確認し、体細胞モザイクにおけるNLRP3遺伝子変異の働きを明らかにすることに成功した¹⁰⁾。

疾患特異的iPS細胞を用いた創薬スクリーニング

創薬スクリーニングは、iPS細胞を用いた近い将来に実現可能な研究として、大きな期待がかけられている。実際、多くの疾患特異的iPS細胞を用いた報告では、少数の活性既知の化合物を用いて表現型の改善を確認し、検討が行われている。

しかし、ラージスケールの化合物スクリーニングは、①特定の分化細胞を大量に純化し、②疾患に関連した表現型をこれらの細胞で再現し、さらに③これをハイスループットスクリーニングの解析系に最適化する必要があるため、現実的に