

高品質 iPS 細胞の作製のために

花園 豊

(自治医科大学分子病態治療研究センター再生医学研究部)

iPS 細胞の品質

本誌読者の中には、iPS 細胞に興味をもち、実際に作っておられる方も多くであろう。iPS 細胞作製というと、安全性の高いものをいかに作るかが重要な課題になっている。このことに関しては、既に数多くの論文・総説が発表されているので、私が屋上屋を架すこともない。本稿では、iPS 細胞の品質に焦点を当ててみたい。

さて、みなさんが作ったり実験に使ったりしているのはヒト iPS 細胞だろうか、マウス iPS 細胞だろうか？ この二つは同じ山中 4 因子で作製可能で、同じように三胚葉分化能をもち、免疫不全マウスに移植すれば奇形腫を作る。しかし、両者には形態や性質や遺伝子発現の違いがだいぶ見られる。

ここで、ヒトとマウス iPS 細胞の違いを品質に焦点を当てて整理してみる(表 1)。なお、このヒト対マウスの違いは、iPS 細胞に限ったことではなく、ES 細胞でも同様にあてはまる。まず、細胞の形態。マウス iPS 細胞は丸っこいドーム型(round)で、ヒト iPS 細胞は平らに(flat)見える。

次に、細胞の増え方。マウス iPS 細胞はよく増えるが、ヒト iPS 細胞は増えが悪い。さらに、マウス iPS 細胞は LIF (leukemia inhibitory factor) に対する反応性をもつが、ヒト iPS 細胞は LIF に反応せず bFGF (basic fibroblast growth factor) に反応する¹⁾。

マウス iPS 細胞は、細胞を一個一個ばらばらにしても問題なく増える。一方、ヒト iPS 細胞は、細胞を一個一個ばらばらにするとほとんど死滅する。ただし ROCK 阻害剤で多少の改善がみられる²⁾。薬剤選択やプレATING (plating) やサブクローニング(subcloning)については、マウス iPS 細胞の場合、とくに問題なく行うことが出来る。一方、ヒト iPS 細胞の場合、いずれの操作もかなり困

難を伴う。

遺伝子導入については、マウス iPS 細胞はおおむね良好な結果が得られるが、ヒト iPS 細胞はなぜかうまくいかない。ヒト iPS 細胞で導入遺伝子の安定高発現株を得るためには、相当の実験量が必要になる。相同組換えについては、マウス iPS 細胞の場合は一般的に行われている。ヒト iPS 細胞の場合、減多にうまくいかない。もっともアデノウイルスベクターを用いた高効率のヒト ES 細胞遺伝子相同組換え法が我が国から報告されており、筆者は試したいと思っている³⁾。とにかくヒト iPS 細胞を用いた研究を進める上で困ったことが多い。

このようにヒト iPS 細胞は扱いの難しい細胞といえる。こうしたヒトとマウス iPS 細胞の品質の違いは、当初、動物種の違い(ヒト対マウス)に起因するものと考えられてきた。

エピ幹細胞の登場

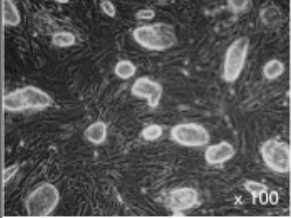
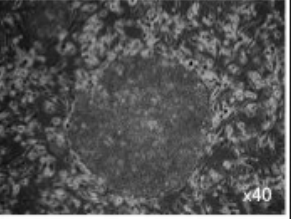
多能性幹細胞には、ES 細胞以外にエピプラスト幹細胞(epiblast stem cell, epi-stem cell, エピ幹細胞)があることがわかってきた⁴⁾(図 1)。胚盤胞の内部細胞塊由来の細胞が ES 細胞である。着床後のエピプラスト由来の細胞がエピ幹細胞だ。ES 細胞もエピ幹細胞も三胚葉分化能をもち、免疫不全マウスに移植すれば奇形腫を作る点は同じである。しかし、エピ幹細胞は、ES 細胞と異なり、キメラ形成なく、ジャームライン・トランスミッション(germ-line transmission)がない(生殖細胞に分化せず子孫に伝わらないこと)といった大きな違いがある。また、エピ幹細胞は、LIF に反応せず、X 染色体不活性化、MHC クラス I 陽性といった違いもある。

ヒト ES 細胞では、キメラ形成やジャームライン・トランスミッションは検証できない。しかし、他の性質を見る限り、ヒト ES 細胞は着床前の内部細胞塊由来でありながら、着床後のエピ幹細胞の特徴をもっている⁵⁾。

さて、iPS 細胞の場合はどうであろうか？ マウス iPS 細胞の場合、キメラ形成やジャームライン・トランスミッションがみられることから、マウス ES 細胞と同じ性

The generation of high quality induced pluripotent stem cells
Yutaka Hanazono (Division of Regenerative Medicine, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan)

表1 マウスとヒトのES/iPS細胞：扱いやすさの違い

	マウスiPS細胞	ヒトiPS細胞
形態		
増え方	よく増える LIF反応性	増えが悪い bFGF反応性
分散培養	細胞を1個1個ばらばらにしても問題なし	細胞を1個1個ばらばらにすると死ぬ(ROCK阻害剤で多少改善する)
遺伝子導入 相同組換え	比較的容易	なぜかうまくいかない
薬剤選択 Plating Subcloning	比較的容易	困難 効率が非常に悪い

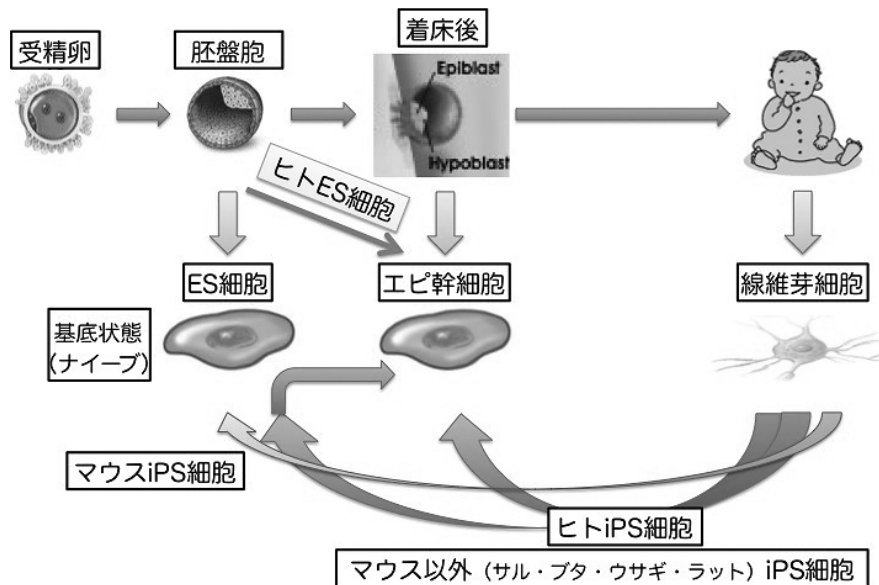


図1 ES細胞とエピプラスト幹細胞

胚盤胞内部細胞塊由来の細胞がES細胞、着床後のエピプラスト由来の細胞がエピプラスト幹細胞 (エピ幹細胞) である。ES細胞もエピ幹細胞も三胚葉分化能をもち奇形腫を作る点は同じ。しかし、エピ幹細胞は、ES細胞と異なり、キメラ形成やジャームライン・トランスミッションがみられない。マウス以外の動物やヒトのES/iPS細胞は、エピ幹細胞様の特徴をもっている。マウスES細胞に相当する発生段階を「基底状態」または「ナイーブ」状態、エピ幹細胞様の特徴をもつものを「プライム」状態という。

テクニカルノート

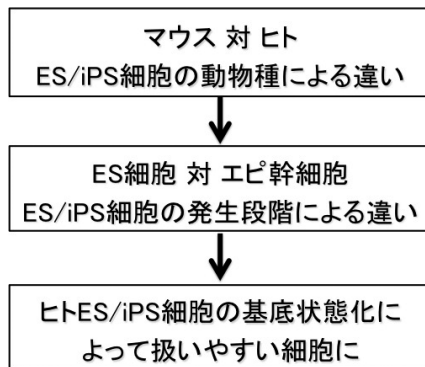


図2 マウスとヒトのES/iPS細胞の違いはどこから？

質をもつ⁶⁾。一方、ヒト iPS 細胞の場合はエピ幹細胞の発生段階に相当するようなのだ (図1)。マウス以外の動物、サル、ブタ、ウサギ、ラットの iPS 細胞も、全部ヒト型、すなわちエピ幹細胞の特徴をもつ。

マウス ES 細胞に相当する発生段階を「基底状態 (ground state)」と呼称することがある。または、マウス ES 細胞の特徴をもつものをナイーブな (naive) ES 細胞、ヒト ES 細胞の特徴をもつものをプライムされた (primed) ES 細胞と呼称することがある。

ES 細胞に相当するナイーブな iPS 細胞を作るためには、基底状態にある ES 細胞からエピ幹細胞への分化を止める、またはその逆方向 (脱分化) を促進する技術が必要になる。

マウスとヒトの ES/iPS 細胞の扱いやすさの違いについての考え方の変遷をまとめる (図2)。当初、それは動物種による違いと考えられた。ところが、それはどうも発生段階の違いからくるものらしい。つまり、ES 細胞段階 (ナイーブ、基底状態) か、エピ幹細胞段階 (プライムされた状態) かの違いではないか。そうなら、ヒト ES/iPS 細胞を基底状態にもって行けば、基底状態にあるマウス ES/iPS 細胞と同じように扱いやすい細胞になるのではないか。

基底状態の検証

マウス以外の動物では、サルでもブタでもウサギでもラットでも、iPS 細胞を作ると「ヒト型」(プライム型)になる。マウスでもジャームライン・トランスミクションが容易な ES 細胞の樹立は129系に限られていた。ようやく2008年になって、129系以外のマウス、およびラットでは、二つの阻害剤 2i (2 inhibitors, MEK 阻害剤と GSK 阻害剤) と LIF を添加することによって「マウス化」(または基底状態化・ナイーブ化) に成功した^{7,8)}。

ヒトでも「マウス化」が試みられている。2009年 Ding

らが 2i + TGFβ 受容体阻害剤でヒト iPS 細胞をマウス化したと報告して注目を集めた⁹⁾。しかし、このマウス化は細胞形態から判断しており、その他の証拠は十分とは言い難かった。

2010年 Jaenisch らは、2i と LIF とホルスコリンの添加によってマウス化を試みた¹⁰⁾。Jaenisch のマウス化は、LIF 反応性獲得、XX 再活性化 (XaXa)、MHC クラス I 陰性化、増殖能亢進、継代・株化効率向上など、マウス ES/iPS 細胞と同じ性質をいくつも示した点、説得力がある。今後の追試や検証実験が待たれる。

いずれにしても、ヒトではキメラ形成やジャームライン・トランスミクションを証明できないので、ほんとうに基底状態かどうかは、他の動物で検証を重ねていくことが必要になる。私どもがサルやブタの iPS 細胞を作っているのはこういう意味がある。サルやブタなら、本当に基底状態かどうか、キメラ形成もジャームライン・トランスミクションもみられるといった利点がある。

さて、X 染色体の再活性化が基底状態の証拠にあげられるが、これについて補足説明する。マウスの場合、胚発生初期の2-4細胞期に、メス細胞は一度、父方 X 染色体のゲノム・インプリンティングによる不活性化を受ける (XaXi)。発生が進んで、胚盤胞初期の内部細胞塊細胞では、前述の刷り込みによる X 染色体不活性化は解除され、それらの細胞では2本の X 染色体双方が活性化する (XaXa)。しかし、再び、それらの細胞それぞれが独立かつ無作為に X 染色体のうち片方が不活性化される (ライオンゼーション, lyonization) (XaXi)。したがって、内部細胞塊由来のメスマウス ES 細胞では、X 染色体の再活性化が見られる (XaXa)。

なぜ基底状態が必要か

ヒト iPS 細胞の医療応用を考える場合、三胚葉分化能を有していれば十分で、必ずしも基底状態にもちこむ必要はないという考えがある。それはその通りである。ただし、現状のヒト ES/iPS 細胞の使いづらさのまま満足ならという条件付きになる。増殖が遅く、プレーティング効率1%以下、液体窒素タンクから細胞を起こした場合99%は死滅、相同組換えも非常に困難な細胞である。こうした細胞がほんとうに使い物になるであろうか？ 基底状態にもちこんで、こうした使いづらさの問題が解決されるなら、それだけでもヒト iPS 細胞の基底状態化の意義はあると、私は考えている。

ま と め

今後なんといっても大事なことは、得られた iPS 細胞が

ほんとうに基底状態かどうかを検証していくことである。ほんとうに基底状態かどうかは、キメラ形成やジャームライン・トランスミッションを確認することに尽きると言ってよい。これはヒトでは出来ない実験である。他の動物で進めるしかない。他の動物の検証結果を踏まえ、適切な基底状態（ナイーブ）マーカーを抽出し、ヒト iPS 細胞の基底状態化を図ればよい。

- 1) Levenstein, M.E., Ludwig, T.E., Xu, R.H., Llanas, R.A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., & Thomson, J.A. (2006) *Stem Cells*, 24, 568–574.
- 2) Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., & Sasai, Y. (2007) *Nat. Biotechnol.*, 25, 681–686.
- 3) Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., Shimizu, Y., Suemori, H., Nakatsuji, N., & Mitani, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 13781–13786.
- 4) Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., & Vallier, L. (2007) *Nature*, 448, 191–195.
- 5) Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., & McKay, R.D. (2007) *Nature*, 448, 196–199.
- 6) Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007) *Nature*, 448, 313–317.
- 7) Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., & Smith, A. (2008) *Nature*, 453, 519–523.
- 8) Buehr, M., Meek, S., Blair, K., Yang, J., Ure, J., Silva, J., McLay, R., Hall, J., Ying, Q.L., & Smith, A. (2008) *Cell*, 135, 1287–1298.
- 9) Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., & Ding, S. (2009) *Cell Stem Cell*, 4, 16–19.
- 10) Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., & Jaenisch, R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 9222–9227.