

# 十全医学会総会・学術集会報告

平成22年度 十全医学会総会次第

日 時 平成22年7月9日(土) 12:55～13:10

場 所 金沢大学十全講堂

I・会 長 挨拶
II・庶 務 報告
平成21～22年 事業計画および報告
III・会 計 報告
1. 平成21年 決算報告
2. 平成22年 予算計画
IV・編 集 報告

## I. 会長挨拶

井上正樹会長から、十全医学賞受賞式及び学術集会開催に先立って総会議事を行う旨の挨拶があり、会長が議長となって議事が進行された。

## II. 庶務報告

中村裕之庶務担当理事が、資料に基づき平成21～22年度事業計画等について報告した。

### 1. 十全医学会会員数について

会員数は平成22年6月現在で、約1,904名(昨年より53名減)(学外1,655名、学内249名)である。

### 2. 人事について

#### 1) 役員について

会長は井上正樹教授、副会長に向田直史教授、横田崇教授、庶務担当理事に中村裕之教授が就任され、その他役員については留任となった。

#### 2) 新評議員について

昨年(平成21年7月25日)に開催された総会でのご報告以降に就任された評議員は、学内から山下竜也教授(寄付講座 地域医療教育学)、新井隆成教授(寄付講座 周生期医専門医養成学)、高橋智聡教授(がん研究所腫瘍分子生物学)、土屋弘之教授(機能再建学)が就任された。

#### 3) 定年評議員について

評議員の高島利一先生(島根医科大学)、福田 護先生(富山大学)、田中重徳先生(神経分布路形態・形成学)、原田文夫先生(がん研 細胞情報調節学)、森 厚文先生(アイソトープ総合研究施設)が定年となりましたが、規定上名誉会員には就かれない。

### 3. 会議開催日について

総会・学術集会は平成21年7月25日(詳細は十全医学会雑誌118巻3号に掲載)に開催され、定例の理事会は平成21年2月17日、11月10日、及び評議員会は平成21年3月4日、12月2日に開催された。

以上、報告の通り承認された。

## III. 会計報告

市村宏会計担当理事に代わり、井上正樹会長により、平成21年度決算報告(細、小出両監事による監査報告添付)が説明され、承認された。また、引き続き平成22年度予算計画が提案、説明され、同様に承認された。

## IV. 編集報告

井関尚一編集担当理事から、平成21年度の十全医学会雑誌の発行状況についての説明があった。すなわち、118巻1号～4号が発行され、発行回数は4回であり、内容は原著論文数5編、総説12編(うち高安賞受賞3編、十全医学賞1編)、研究紹介8編、修士課程優秀論文要約2編、見聞記4編、学会開催報告9編であった。

(文責：中村裕之)

### 1. 第6回 十全医学賞受賞式および記念講演

平成22年度金沢大学十全医学会学術集会が去る7月9日(金)に十全医学会総会終了後、十全講堂にて、第6回十全医学賞受賞式および記念講演が開催された。

はじめに、井上正樹会長より本年度の受賞者である金沢大学大学院医学系研究科形態機能病理学、准教授、原田憲一先生に記念の楯が贈呈された。続いて、原田憲一先生により「胆管における自然免疫機構と病態形成の解析」の演題名で記念講演がなされた。講演の要旨は以下のとおりであった。



## 原田憲一先生

胆管は単なる胆汁排泄の導管ではなく、免疫応答に起因する炎症の場となり、胆管細胞自らが免疫応答に加担する。また、原発性胆汁性肝硬変や胆道閉鎖症などの胆道系疾患の病因または病態形成に細菌やウイルス感染が想定されている。私は胆道系自然免疫の観点から胆管病変の病態形成について検討してきた。今回、胆道系自然免疫の基礎と胆道閉鎖症の病態形成における胆道系自然免疫の関与について、我々の研究成果を紹介する。

**胆道系自然免疫：**自然免疫の分子標的は Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) と呼ばれ、PAMPs 受容体として Toll 様受容体 (TLR) family がある。ヒト培養胆管細胞およびヒト肝組織を用いた検討にて、胆管細胞は少なくとも TLR1～TLR6 および関連分子やシグナル伝達アダプター分子を恒常的に発現しており、細菌由来 PAMPs で刺激すると NF- $\kappa$ B の活性化を介して抗菌ペプチドやサイトカイン、ケモカインの産生が誘導された<sup>1,2)</sup>。また、レオウイルス科ウイルス (レオウイルス, ロタウイルス) に代表される 2 本鎖 RNA ウイルスに対しても胆管細胞は自然免疫応答を示す。すなわち胆管細胞は 2 本鎖 RNA の認識受容体である TLR3 を発現しており、合成 2 本鎖 RNA である poly (I:C) で刺激すると、NF- $\kappa$ B のみならず interferon regulatory factor-3 (IRF-3) も活性化し、抗ウイルス作用を示す IFN- $\beta$  の産生が見られた<sup>3)</sup>。このように胆管細胞は細菌やウイルスに対して自然免疫応答を示し、PAMPs の由来に準じて微生物に対する液性因子を産生し、マクロファージなどの免疫担当細胞の助けを借りることなく適切な感染防御機構が作動することがわかった。

**自然免疫トレランス機構：**トレランス機構、特に LPS に対するエンドトキシントレランスは、感染症発症時のショック回避のみならず、腸内細菌叢を有する腸管のホメオスターシス維持にも重要である。ヒト培養胆管細胞は NF- $\kappa$ B 抑制分子である PPAR  $\gamma$  を恒常的に発現しており、リガンドの存在下では自然免疫応答は抑制されると考えられる<sup>4)</sup>。LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化や TNF- $\alpha$  mRNA の発現亢進は経時的に減弱し、また LPS で前処置しておくとも再刺激後の反応性は著明に抑制され、容易にトレランス状態を誘導できた。また、トレランス誘導時には細胞内シグナル伝達の抑制分子である IL-1R-associated kinase (IRAK)-M の発現が亢進しており、胆管上皮で恒常的に発現していることから、生理的状态下での胆道系自然免疫の恒常性維持にトレランス機構が関与していると考えられた。しかし、胆管細胞は poly(I:C) で 2 段階刺激しても、再刺激後の NF- $\kappa$ B 活性や IFN- $\beta$  産生の抑制は全く見られず、2 本鎖 RNA ウイルスに対するトレランス機構が存在しない<sup>5)</sup>。この結果より、ウイルスが完全に排除されるまで自然免疫応答が持続し、胆管傷害も進行すると推測された。

**胆道閉鎖症：**胆道閉鎖症は新生児期における肝外胆管の硬化性胆管炎と線維性閉塞が基本病態で、原因としてレオウイルス感染が示唆されている。レオウイルス科ウイルスは上皮親和性があり、腸管上皮細胞に対してアポトーシス誘導分子 TRAIL および NF- $\kappa$ B 活性化を介してアポトーシスを誘導することが証明されている。我々は poly (I:C) 刺激後の胆管細胞を検討した結果、TRAIL の発現亢進とアポトーシスによる細胞死の誘導を確認した。また、胆道閉鎖症患児の肝外胆管上皮には、2 本鎖 RNA 認識受容体である TLR3 の発現に加え、活性化 NF- $\kappa$ B や IRF-3 の発現、TRAIL 発現の亢進、アポトーシスが見られた<sup>3)</sup>。また、胆管上皮での Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 現象が、慢性肝胆道系疾患の病態形成に関与しているとの報告がある。ヒト培養胆管細胞を用いて EMT 現象を検討した結果、poly (I:C) 刺激で胆管型サイトケラチンである CK19 と一般的上皮系マーカーである E-cadherin の発現が経時的に減弱し、上皮としての特徴を失いつつあることを見出した<sup>6)</sup>。また、胆管細胞は EMT 誘導因子のひとつである TGF- $\beta$ 1 とその受容体である TGF  $\beta$  R1 を恒常的に発現していたが、自然免疫応答による発現の挙動は認めなかった。しかし、TGF- $\beta$ 1 の pseudoreceptor である Bambi が poly (I:C) 刺激で発現が低下し、その結果 TGF- $\beta$ 1 に対する感受性が亢進すると推測された。もう一つの EMT 誘導因子である basic FGF は、poly (I:C) 刺激で発現が誘導された。また、胆道閉鎖症の肝外胆管、特に胆管炎や傷害像を示す胆管上皮を中心に、EMT 関連の転写因子である活性化 Smad3 の発現、上皮系マーカーの減弱または消失、間葉系マーカーの異常発現、bFGF の発現を認めた<sup>6)</sup>。胆道閉鎖症の硬化性病変の形成に胆道系自然免疫を介した EMT が関与していると推測された。また、2 本鎖 RNA に対する胆管細胞の自然免疫応答にはトレランス機構は存在しないため、2 本鎖 RNA ウイルスが存在する限り自然免疫応答による組織障害も持続すると考えられた。

## 参 考 文 献

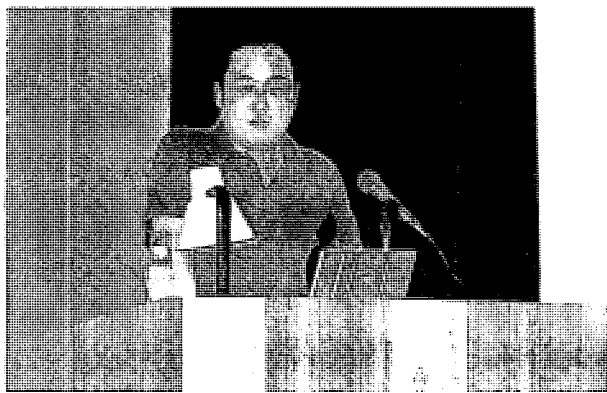
- 1) Harada K, Ohira S, Isse K, et al. Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. *Lab Invest* 83:1657-67, 2003
- 2) Harada K, Ohba K, Ozaki S, et al. Peptide antibiotic human beta-defensin-1 and -2 contribute to antimicrobial defense of the intrahepatic biliary tree. *Hepatology* 40:925-932, 2004
- 3) Harada K, Sato Y, Itatsu K, et al. Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. *Hepatology* 46:1146-1154, 2007
- 4) Harada K, Isse K, Kamihira T, et al. Th1 cytokine-induced downregulation of PPARgamma in human biliary cells relates to cholangitis in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 41:1329-38, 2005
- 5) Harada K, Sato Y, Isse K, et al. Induction of innate immune response and absence of subsequent tolerance to dsRNA in biliary epithelial cells relate to the pathogenesis of biliary atresia. *Liver Int* 28:614-21, 2008

6) Harada K, Sato Y, Ikeda H, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by biliary innate immunity contributes to the sclerosing cholangiopathy of biliary atresia. *J Pathol* 217:654-64, 2009

## 2. 学術集会報告

十全医学賞受賞式および記念講演に続いて、平成22年度十全医学会学術集会が開催された。本年度は「再生医療の最前線—分子からiPS細胞まで—」のテーマの下、学外講演者として京都大学iPS細胞研究所の高橋和利先生、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 多能性幹細胞研究プロジェクトの丹羽仁史先生、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 網膜再生医療研究チームの高橋政代先生、慶応義塾大学医学部の岡野栄之先生の4名、その他指定討論者として学内の4名、合計8講演がなされた。前半はiPS細胞の誕生やその多能性に関する転写因子の役割りについて、後半は網膜再生や脳脊髄再生についてiPS細胞やES細胞を用いた細胞移植の最新データが発表された。今回は、例年と異なり十全講堂での開催となり総勢274名の来場者があり、活発な討論が行なわれ、本学における幹細胞生物学や再生医療の発展に大きなインパクトを与えることができた。講演の要旨は以下のとおりであった。

(文責：加藤 聖)



高橋和利先生  
背景

1998年のヒト胚性幹 (Embryonic Stem : ES) 細胞樹立の報告を機に、ESを用いた臨床応用への期待が一気に高まった。とはいえ、それから10年以上が経過した現在においても未だヒトES細胞およびヒトES細胞を由来とした分化細胞を用いた臨床試験は行われていない。いったいなぜだろうか？

ES細胞は大きな2つの問題を抱えている。第1に、ES細胞は胚盤胞期の受精卵を由来とすることにある。将来個体を形成する素となる細胞を起源とするのがES細胞の持つ分化多能性の所以であるが、同時に胚の滅失を伴うという倫理的問題が常に付きまとう。第2にES細胞は受精卵由来であることから、まったく同じ遺伝情報を持ちうるのは一卵性双生児のみである。つまり現実

的に考えると、世界中のすべての人にとってES細胞は他人由来の細胞である。その結果、いざ移植した際に免疫拒絶反応が起こることとなる。これらはES細胞を臨床応用する上で避けて通ることのできない問題であり、大きな障壁となってきた。

### iPS細胞の誕生

上記の課題を克服するための作戦がいくつも考えられてきた中で、多くの異なるアプローチに共通した概念がリプログラミングである。ここで言うリプログラミングとは、体細胞の記憶を消去し、未熟な多能性細胞型へとリセットすることをイメージしている。この表現が正確かどうかはさらなる研究が必要であるが、いずれにしても体細胞をES細胞に類似した細胞に作り替えるということの意味している。一度分化した細胞を未分化な状態に戻すということは、発生の時計を逆回転させるようなものであり通常自然には起こらないと考えられる。しかし、それを実現すれば個々の皮膚細胞から自分の遺伝情報を持ったES様細胞を得ることができるため、多くの研究が精力的に行われてきた。

私たちもリプログラミングを目指して研究を行ってきた。いくつかの方法が考えられる中の一つに、既知の遺伝子を導入することによるリプログラミングが考えられた。雲をつかむような話ではあるが、過去の知見により、未受精卵やES細胞にリプログラミングを引き起こす遺伝子が存在することを示唆されていた。

そこで、ES細胞において特異的に発現する遺伝子および重要な役割を果たしている遺伝子に着目し、解析を行った。複数の幸運が重なり候補因子の絞り込みを経て、特定の遺伝子セットがリプログラミングを引き起こす瞬間に立ち会うことができた。そしてこの人為的に作製した細胞を人工多能性幹 (induced Pluripotent Stem : iPS) 細胞と呼ぶことにした<sup>1,2)</sup>。その後、作製法の改良などを経てiPS細胞の品質はES細胞に極めて類似したレベルにまで達した。同時に詳細な解析によって、似てはいるが決して同じではないということがだんだん明らかになってきている。

### iPS細胞が抱える課題

iPS細胞が人工的に体細胞をリプログラミングした産物であるため、その作製法には様々な可能性が考えられる。当初レトロウイルスを用いて導入していた遺伝子はプラスミドやアデノウイルスを用いた一過性発現でも達成され、さらにはタンパク質を導入することでもiPS細胞ができたという報告もある。ゲノムDNAを傷つけないという点において一過性発現を用いた手法は優れている。しかし、十分なリプログラミングが起こっていない可能性は無いだろうか？

また、iPS細胞は様々な細胞種から作製できることもわかってきた。線維芽細胞のみならず、神経細胞や成熟したB細胞からでも作製に成功している。私たちは、由来となる体細胞の組織の違いについて検討する実験を行

った。マウスiPS細胞36株を用いてニューロスフェア法による神経への分化誘導を行い、免疫不全マウス脳線条体へ移植することにより安全性の評価を行った。その結果、胎仔線維芽細胞由来のiPS細胞がほとんど腫瘍を形成しなかったのに対し、成体尾由来線維芽細胞から作製したクローンはその多くが移植後に腫瘍を形成した<sup>3)</sup>。これらの結果は、iPS細胞の分化能と安全性が由来となる体細胞によって大きく異なりうるということを示唆している。

#### iPS細胞のこれから

基礎科学的な側面からみると、iPS細胞の誕生がもたらしたものは、既知因子でリプログラミングが引き起こせるという事実であり、それ以上でもそれ以下でもない。いったいどのようなイベントが起こった結果リプログラミングが達成されるのかはほとんどわかっていない。いくつかが明らかになっていることをまとめて考えると、やはりES細胞の分化多能性維持機構とリプログラミングのからくりは共通点が多いことが分かる。当たり前のようで驚きでもある。リプログラミングが起こる確率は決して高いものではなく、通常の技術をもってすればせいぜい1%程度である。つまり、解析をするにあたってはやりづらい部分も多い。リプログラミングを引き起こす能力がある細胞として、扱いづらい未受精卵よりもES細胞が重宝されるように、今後もES細胞の分化多能性維持機構の解析を通して重要な知見が蓄積されていくと思われる。

一方、ツールとしてのiPS細胞はケースによっては既に応用が始まっている。特定の疾患患者由来の細胞から作製したiPS細胞は、病態解明の強力なツールになりうるし、iPS細胞の増殖能力を生かして大規模な創薬スクリーニングを行うことも可能である。もちろん試験管内での病態再現は簡単ではない。しかし、これまで困難であったアプローチが容易に実現する可能性をiPS細胞はもたらした。

唯一、応用までのハードルが高いのがやはり臨床応用である。そもそもお手本であるES細胞ですら実現していない分野である。冒頭で述べた倫理的問題や拒絶反応以外にも「安全性」という、避けては通れない課題が立ちだかっている。今後の課題として、安定した培養法・高効率で確実な分化誘導法の確立といったES細胞、iPS細胞共通の課題がある。一方で、遺伝子導入法、由来細胞、出来たクローンの評価法といったiPS細胞固有の課題もある。これら両方を解決しない限り臨床応用は無理である。長い道のりのように思えるが、近年の当分野における研究競争は尋常ではないため案外早く活路が見出されるのかもしれない。

#### 参 考 文 献

1) Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by

Defined Factors. *Cell* 126, 663-76

2) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861-72

3) Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., Yamanaka, S. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology* 27, 743-5



丹羽仁史先生

個体を構成する分化細胞の種類は、おおまかな分類でも250以上存在する。これらの分化細胞が持つ異なる特性は、ゲノムにコードされた約23000(マウスの場合)の遺伝子の発現の組み合わせにより規定されている。そして、分化形質を規定する特定の組み合わせの遺伝子発現は、遺伝子発現を制御する転写因子の組み合わせと、その標的遺伝子の受容性のエピジェネティック制御により規定されている。初期胚に存在する未分化細胞が有する分化多能性(pluripotency)も分化形質と同等な細胞の特性であり、同様に転写因子とエピジェネティック機構により規定されているが<sup>1)</sup>、この場合には特に転写因子による規定が優位に働きうるということが、iPS細胞の樹立により劇的な形で証明された。

では、なぜわずか3つの転写因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)の強制発現により、効率は高くないとはいえ、ある確率で分化多能性は獲得されるのだろうか?これまでの研究から、これらの導入された外来遺伝子の発現は、多能性の賦与される過程には必要であるが、最終的に誘導された多能性幹細胞においてはもはや必要でなく、これらが正常な分化多能性を発揮する上では寧ろ阻害的に働くことが示されている。このことは、これらの転写因子を一過性に強制的に発現させることにより、多能性を規定する転写因子ネットワークを構成する内在性の遺伝子群が活性化し、最終的にはこれらが安定化して多能性幹細胞の自己複製を維持していることを示唆する。我々は、このような強い自律性を有する多能性を規定する転写因

子ネットワークの構造と動態を解明することを目指している。

細胞の分化は、転写因子ネットワークの変遷として捉えられる。また、転写因子は単独では機能せず、複数の因子の直接ないしは間接の相互作用により転写制御能を発揮し、さらには同一の転写因子がことなるパートナーとの組み合わせにより異なる標的遺伝子の制御に関与することも、次第に明らかになってきた(カクテルパーティーモデル)。これら2つのモデルの組み合わせは、古典的な「マスター遺伝子」モデルが説明できなかった現象を説明可能であるという点で、より生命現象の実像に近いといえる。iPS細胞が、本来多能性幹細胞で発現する複数の転写因子の強制発現により分化細胞から誘導されたことは、これらのモデルの強力な証拠といえる。即ち、多能性を規定する転写因子は、相互の発現制御により自律的なネットワークを構成するが故に、外来遺伝子の一過性発現によって、内在性遺伝子の恒常的発現が誘導され維持されたと考えられる。また、転写因子は単独では機能できないために、複数の特定の組み合わせが必要であったといえよう。しかし、これらの見解は現時点ではあくまで仮説であり、その証明には実際に具体的にOct3/4, Sox2, Klf4を含む「多能性を規定する転写因子ネットワーク」がどのようなものであるかが示されなければならない。これまで、このような転写因子ネットワークの解明は、主に遺伝子発現プロファイルの解析を通じて行われてきた。即ち、多能性幹細胞で発現している遺伝子をcDNAマイクロアレイ法で同定するとともに、そこで発現している転写因子の結合部位をクロマチン免疫沈降+ゲノムマイクロアレイ法で解析し、その組み合わせからネットワークを抽出する、というものである。この方法は、安定な多能性の状態を、いわば「スナップショット」として解析するもので、ネットワークの構成因子を同定し、その大まかな構造を解くことには威力を発揮する。しかし、このような理論的モデル構築の前提となるネットワークの基本構造の実験的解析は十分とは云えない。更には、ネットワークのネットワークとしての性質(動的平衡、ロバストネスなど)は、ネットワークを人為的に揺さぶり、さらにはその変遷を誘発しつつ観察することなしには、解明できない。

そこで、我々は、多能性幹細胞のひとつであるES細胞から栄養外胚葉系の幹細胞であるTS細胞への分化過程における転写因子ネットワークの動態の解析を試みた。ES細胞における転写因子ネットワークは、その自己複製維持に必要な液性因子LIFのシグナル入力下に階層的構造を形成している<sup>2)</sup>。一方、TS細胞では、自己複製に必要な液性因子はFGF4であり、この入力下に階層的構造を有する転写因子ネットワークが形成されている。ES細胞において、多能性関連転写因子Oct3/4の発現抑制ないしはTS細胞特異的な転写因子Cdx2の強制発現は、TS細胞への分化を誘導する<sup>3,4)</sup>。これは、ES細胞

を規定する転写因子ネットワークが、TS細胞を規定するネットワークへと移行することにより規定される。興味深いことに、この移行に際しては、すべてのネットワークの構成因子が置き換えられるわけではなく、一部の転写因子はこの移行においてESネットワークからTSネットワークへと継承される。しかし、これらの転写因子は、ES細胞とTS細胞で、その機能も階層的構造における配置も全く異なり、異なる標的遺伝子群の制御に寄与することが、最近の我々の研究から明らかになりつつある。本講演では、このような分化に伴う転写因子ネットワークの構成因子のつなぎかえ(rewiring)について、その実例を示すとともに、この現象が持ちうる発生過程における意義を論じてみたい。

## 参考文献

- 1) Niwa, H.: How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134, 635-646, 2007.
- 2) Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. and Adachi, K.: A parallel circuit of LIF signaling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460, 118-122, 2009.
- 3) Niwa, H., Miyazaki, J.-I. and Smith, A. G.\*: Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.*, 24, 372-376, 2000.
- 4) Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R. and Rossant, J.: Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123, 917-929, 2005.



高橋政代先生

iPS細胞は、世界中に大きなインパクトを与え、その影響は再生医療にも及ぶ。しかし、日本の報道などをみると、必ずしも実体を表していない場合も多いので、今一度、再生医療の枠組みの中でのiPS細胞の可能性と今後の課題を考えてみたい。あくまでも再生「医療」からみたiPS細胞について私見をお話する。

## iPS細胞の可能性

iPS細胞の意義には、1. 再生医療への応用、2. 疾患の機序解明や治療法選択への利用、3. DNAリプログラミングや幹細胞研究への貢献などがあげられるが、その中

で再生医療は応用範囲としては最も小さいかもしれない。実際、医療においても1より2の患者iPS細胞による疾患研究や治療研究の方が波及効果は大きいと考えられる。さらに3の基礎研究分野における意義は将来の波及効果が計り知れず、これこそがiPS細胞の最大の意義と言える。

iPS細胞を用いた再生医療研究のこの位置づけを確認した上で、再生医療から見たiPS細胞の可能性と意義を考える。

1) 細胞の分化能力：ES細胞と同様にあらゆる臓器の細胞に分化することができる。これは我々が現在網膜細胞移植治療の対象と考えている視細胞や網膜色素上皮細胞にも分化するということであり、実際ES細胞と同様の方法でヒトiPS細胞からこれらの細胞を得ることができた<sup>1,2)</sup>。特に網膜色素上皮細胞については形態と色調で分別できる細胞が密に並んだコロニーとして回収できるので、顕微鏡下に純化できる。

一方で、真に中枢神経の再生医療と言える視細胞については、分化誘導は可能であり、網膜という小さな臓器に移植する量は確保することは現在も可能であるが、視細胞を純化して未分化細胞が混在しない移植細胞を準備することが難しい。この問題点は網膜色素上皮細胞以外のES/iPS細胞由来細胞の移植での現時点の問題点である。

2) 拒絶反応の回避：iPS細胞の再生医療における最も大きな利点は拒絶反応が回避できることである。再生医療において、ES細胞と比べた時のiPS細胞の科学的な利点はこの一点である。患者側から見れば、他の細胞を用いるより治療が効果的になるわけではなく、移植後に免疫抑制剤を服用しなくてよいということのみである。網膜色素上皮細胞移植など生死に関わらない疾患の治療で全身を危険にさらす免疫抑制はリスクベネフィットで考えると治療のブレーキとなる。よって、細胞種によってはiPS細胞による拒絶反応の回避は治療への大きな前進である。

網膜色素上皮細胞は視細胞と同じ神経管由来であるが、IFN $\gamma$ の存在下でHLA class IIも発現する<sup>3)</sup>。網膜色素上皮細胞は海外ではアイバンクの提供眼（日本では法律で研究にも使用できない）から得られる他、株化したヒト細胞が販売されている。しかし、胎児網膜色素上皮細胞移植の臨床研究で他家移植では拒絶反応を認めると報告されており、iPS細胞の利用が最適である。

一方で、この利点があまり寄与しない細胞種もある。視細胞は中枢神経の神経細胞でMHC class Iの発現は低く、class IIは発現していないことから拒絶反応を起こしにくいと考えられている（実際には拒絶反応がないわけではない）。拒絶反応が低いことに加え、視細胞移植で最初の対象となる網膜色素変性は遺伝子疾患なので、患者本人のiPS細胞からは同じ遺伝子変異をもつ視細胞ができることになる。遺伝子変異を持っていても疾患の経過を考えると数十年視細胞が変性せずに働く可能性も

あるので患者本人のiPS細胞で治療するということも考えられるが、視細胞移植に関してはES細胞由来の方が適しているかもしれない。

3) 倫理的な問題の回避：iPS細胞が倫理的問題を解決したと言われる場合、しばしばES細胞との比較で語られる。しかし日本においてこれは必ずしも的を射ているとは思わない。いつからを生命の誕生と考えるかは人によって異なる。キリスト教カトリックでは受精を生命のはじまりとする教義があり、ES細胞は許されるものではないが、一方で教義は一貫していて胎児の中絶ももちろん許されないのである。iPS細胞は生命の萌芽を破壊せずに得られることで倫理的ということであるが、妊娠中絶を容認する環境でこのような主張をすることはダブルスタンダードである。またES細胞の倫理だけを論じて、それを使用した治療ができないことは倫理的なのかという視点もある。

それよりもiPS細胞の倫理的な意義は、これまで移植には臓器にしる細胞にしる必ず他者の犠牲ということが必須であったが、それがなくなると可能性が出てきたということはイデオロギーを越えた利点である。

#### iPS細胞の課題

可能性と同様に、課題も再生医療から俯瞰して考える必要がある。あまりに危険性を強調するとそれは実情とあわず、これも虚像となってしまう。

1) 安全性：ES細胞に比べ安全性の面で劣ると言われるiPS細胞であるが、これも詳細に考える必要があるiPS細胞そのものを移植すれば当然奇形種を形成する危険がある。これは良性腫瘍であり、ES細胞とまったく同じ危険である。次に、iPS細胞は遺伝子を導入して作成するため、遺伝子挿入部位によって癌化の危険がある。これはES細胞にはない危険性であるが、現在は遺伝子を染色体に挿入しない作成法がつつぎと開発されており<sup>4,6)</sup>、この問題は解決に近づいている。

後はいかに移植細胞に未分化な細胞が混入しないようにするかであり、これはESとiPS由来細胞共通の細胞純化の問題である。これは厳密にコントロールする必要がある。網膜色素上皮細胞に関しては可能であると思われるが、視細胞をはじめ他の組織ではこの点がまだ解決には至っておらず、重要な問題である。

また一方で、iPS細胞の混入がなくても、分裂途中の細胞を移植する場合はiPS細胞とは関係ない腫瘍形成の危険が伴う。これはiPS細胞独自の危険と区別する必要がある。

2) 安定性：もうひとつの大きな課題は安定性である。ES細胞と比べ、維持が難しく継代によって性質が変わりやすい。そもそも真のiPS細胞として安定な状態がどのような状態か、いわゆる標準化という問題が解決されていない。現在はここに焦点が当てられているが、ここでも基礎研究から見る姿と再生医療から見る姿は異なる。

基礎研究的にはスタートのiPS細胞の基準が定まって

いないことには、研究結果を比べることもできず好き勝手にiPS細胞と認定している現状は問題が大きい。iPS細胞は株毎の相違が大きいと言われるが細胞株の標準化だけでは不十分で、維持培養によって性質が変化するので標準化された「細胞の状態」が重要である。しかし、再生医療から見るとiPS細胞は通過点であってそこに大きな基準をおく必要はないかもしれない。できあがった分化細胞が安定で標準化されていればそれでよいのである。むしろ、真のiPS細胞よりも外胚葉に分化しやすい、網膜細胞になるべく近い細胞が望ましい細胞であり、これはiPS細胞の標準化と相反する条件である。

3) 費用：iPS細胞の最大の課題は作成コストと時間である。GMP基準のcell processing center (CPC) の維持費だけでも年間数千万円必要であるが、患者本人のiPS細胞はES細胞と異なり、毎回作成する費用と時間がかかる。現在は早くても2ヶ月かかるので、急性疾患には間に合わず、またその間にかかる費用も膨大である。作成の時間を短縮する方法や、バンクを作ることが必要である。

さらにES細胞と共通の問題であるが、分化の過程では多能性幹細胞は発生を順次なぞる時間が必要で、体性幹細胞の状態にするまでの時間が余分に必要である。この分化過程を短縮することも大きな課題である。その意味では完璧なiPS細胞よりも、必要な体性幹細胞に近い状態の細胞がよいのである。

4) 行政的、社会的問題：例えば網膜色素上皮細胞移植の場合は、移植に適した分化細胞を移植に必要な量得ることができ、顕微鏡下に機械的に純化可能となっている。移植手技は従来の手術法で確立されており、過去にiPS細胞由来でないが網膜色素上皮細胞移植が臨床で行われそのデータが存在する。

このように網膜色素上皮細胞移植について科学的には大きな課題は残っていない状況であるが、iPS細胞を用いた再生医療を実際に行おうと考えると社会的な課題は残っている。厚労省では「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」においてiPS細胞の自家移植は可能となる改訂が行われ、規制面の整備が予測を越えるスピードでなされている。残る課題は疾患当事者や一般の方へ正確な情報伝達である。網膜色素上皮細胞移植の対象となる疾患は加齢黄斑変性や網膜色素変性が考えられる。例えば加齢黄斑変性は欧米では高齢者の失明原因首位の疾患であるが、失明と言っても視力低下だけで視野は正常なので普通の生活ができるし(WHOのblindnessの定義は矯正視力0.05未満あるいは視野10度以内)、再生医療で回復するとしても初期には危険回避のためにそれ以上悪化のない進行例を対象とするので生活を一変させるような大幅な視力向上は望めない。よく見えるようになることを期待している当事者たちにそれを理解してもらうことはなかなか困難であるが、再生医療の発展のためには重要な事項である。

もちろんiPS細胞の真の意義は再生医療だけではなく、むしろ基礎研究の発展、それから派生する素晴らしい成果である。その意味で標準化が重要であり、リプログラミングの機構を解明することが重要であることは論を待たない。この項ではあえて、再生医療に特化してその「狭い視点」から見たときに映るiPS細胞像ということでお話する。

## 参考文献

- 1) Osakada, F. et al.: Nat. Biotechnol., 26: 215-224, 2008
- 2) Hirami, Y. et al.: Neurosci. Lett., 458: 126-131, 2009
- 3) Sun D, et al. : J Neuroimmunol. 144: 1-8, 2003
- 4) Yu J, et al.: Science 324:797-801, 2009
- 5) Kim D, et al. : Cell Stem Cell 4: 472-476, 2009
- 6) Fusaki N, et al. : Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85:348-62, 2009



岡野栄之先生

「再生」とは生体の失われた細胞・組織が、幹細胞の増殖・分化や分化した細胞の分化転換によって補われることと定義される。現在、発生過程を一部再現させることにより臓器再生を目指そうという新しい学問潮流が生まれつつあり、まさにこれに立脚した治療哲学である「再生医学」、そしてその実践である「再生医療」が21世紀の医学・医療の進むべき一つの方向であると期待されている。再生を誘導するために、色々な臓器を作るものになる細胞である体性の「幹細胞」の操作と、初期胚由来の多能性幹細胞であるES細胞やさらには体細胞から人工的に誘導した多能性幹細胞であるiPS細胞(Induced Pluripotent Stem Cell, iPS細胞)を用いた手法に注目が集まっている。iPS細胞は、皮膚の繊維芽細胞などの体細胞にSox2, Oct3/4, Klf4, (c-Myc)などの少数の転写因子の遺伝子を導入するだけで、試験管内で誘導される多能性の幹細胞であり、細胞移植治療や疾患研究において大きな期待を集めている。一方、実際にiPS細胞技術を細胞移植に用いるためには、腫瘍形成の問題等の安全性の問題をクリアする必要がある。我々は、京大の山中伸弥教授との共同研究により、体細胞の由来やc-

Myc transgeneの有無や遺伝学的な選択の有無などの観点から樹立法が異なる様々なマウスiPS細胞を出発材料にして神経系前駆細胞を分化誘導し、マウス脳へ移植する試験を行った。その結果、iPS細胞の樹立に用いた体細胞の由来が移植安全性に大きく影響することを明らかにした(Miura et al.; *Nature Biotechnology*, 2009)。本講演では、幹細胞の制御メカニズムに関するcutting edgeの研究成果と、多くの生命科学の研究成果を取り込んで進めてきた脊髄損傷、網膜変性症、パーキンソン病、ALS、統合失調症などの難治性の精神・神経疾患の治療法開発、さらにはRett症候群、Perizaeus-Merzbacher病、Prader-Willi症候群などの小児神経疾患、パーキンソン病、ALS、統合失調症疾患などの精神・神経疾患を対象とした疾患モデル細胞作出という観点からのiPS細胞研究の最近の我々の研究成果や世界的動向について解説する。

また、講演ではiPS細胞研究と並行して我々が開発を進める遺伝子改変霊長類モデル(Sasaki et al., *Nature*, 2009)とその活用について紹介したい。ヒトの脳の機能の解析やヒト精神・神経疾患を理解するために、*In vivo*のモデル生物の実験系として、これまで主に用いられてきたげっ歯類と比べて、格段にヒトと中枢神経系が機能的・解剖学的に類似している霊長類による動物実験が期待されている。私達と実験動物中央研究所の共同研究グループは、霊長類のうちでもっとも小型で、かつ繁殖力の高いマウモセットを使用して、脊髄損傷などを再生する治療法の開発やMRIによる系統的画像解析や脳アトラスの作成、ES細胞・iPS細胞の作成を行い、さらには理化学研究所のグループとの共同でゲノム解析に成果を挙げた。マウモセットは、1.特徴的な親子関係を示す、2.音声コミュニケーションを示す、3.マカクでの高次脳機能の行動学的な解析方法を適用できる、4.多くのヒト神経疾患モデルが得られており、その解析法が開発が進められている点から、脳科学研究において注目される注目を集めています。特に、昨年には、遺伝子改変霊長類(コモンマウモセット)の作出に成功した(Sasaki et al., *Nature*, 2010)。ここで得られました個体では、遺伝子の導入された第一世代だけではなく、第二世代でも導入遺伝子の発現が認められており、次世代まで導入遺伝子が受け継がれた霊長類の作出は世界で初めてである。

現在、この遺伝子改変技術を用いてヒトのパーキンソン病、などの神経難病のモデルマウモセットの作出を進めており、これら神経難病の治療法開発研究などへの貢献が期待される。さらに遺伝子改変マウモセット作成の技術開発を進めるとともに、ヒトあるいは霊長類に固有な脳の構造と機能の解析、さらにはこれらが障害されたヒト精神・神経疾患モデルの開発を行いたいと考える。

#### 参 考 文 献

- 1) Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H.: Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature Med.* 12: 829-834, 2006.
- 2) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, and Okano H: A selective Sema3A-inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nature Med.* 12(12): 1380-1389, 2006.
- 3) Sawamoto, K., Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Martin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla, A: New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311: 629-631, 2006.
- 4) Naka H, Nakamura S, Shimazaki T, Okano H: Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in central nervous system development. *Nature Neurosci* 11 (9): 1014-1023, 2008
- 5) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Okada Y, Mabchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H.: Ontogeny and Multipotency of Neural Crest-Derived Stem Cells in Bone Marrow, Dorsal Root Ganglia and Whisker Pad of Adult Rodents. *Cell Stem Cell.* 2: 392-403, 2008.
- 6) Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S.: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines *Nature Biotechnol.* 27(8):743-745, 2009. (\*H. Okano is the corresponding author in this paper)
- 7) Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. : Generation of transgenic non-human primates with germ line transmission. *Nature*, 459(7246): 523-527, 2009. (\*H. Okano is the corresponding author in this paper)