

ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 技術を用いた疾患モデル研究 (疾患特異的 iPS 細胞研究)

三枝 智香, 藤岡 正人

北里大学医学部分子遺伝学単位

ヒトの体細胞を初期化することで得られる多能性幹細胞 (iPSC: induced pluripotent stem cell) の技術は様々な医学分野に応用が可能である。中でも、疾患の原因や発症機構が不明のためにこれまで治療方法の確立していなかった疾患について、患者由来 iPS 細胞を用いて作成した疾患細胞で病態解析や薬剤スクリーニングを行うことで、疾患の発症機構を明らかにし、新規の治療標的を見出せる可能性がある。本稿では、疾患 iPS 細胞研究の現状について、最近明らかになってきた limitation と合わせて述べる。

Key words: 多能性幹細胞, 疾患 iPS 細胞, 疾患モデル, 希少難治性疾患

はじめに

分化した細胞に山中4因子 (c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2) を導入することで胚性幹細胞 (ES 細胞) に近い多能性幹細胞を誘導できる iPS 細胞樹立技術が発表されてから15年以上が過ぎた¹。iPS 細胞技術は①疾患 iPS 細胞を用いた病態研究, ② iPS 細胞創薬, ③ iPS 細胞を移植ソースに用いた細胞治療などに応用可能である。本稿では①疾患 iPS 細胞を用いた病態研究について概説する。

疾患 iPS 細胞研究

ES 細胞での相同組み換えを利用した遺伝子改変マウス作成技術に、近年ゲノム編集技術が加わることで、遺伝子操作による疾患モデル動物作成が広く一般的に行われてきた。しかしながら、げっ歯類動物モデルがヒトの病態を再現しない例も数多く報告されており^{2,3}、ヒト細胞・ヒト組織を用いた疾患研究の重要性が再認識されるようになった⁴。一方、疾患によってはその解剖学的特性から、治療標的組織あるいは標的細胞の採取に強い侵襲を伴う場合があり、その際、研究に必要な細胞の採取が困難であるため、ヒト細胞を用いた病態解析が行えない。この状況を打開するのが iPS 細胞技術、つまりヒト iPS 細胞から分化誘導した標的細胞をモデル系として使用する研究手法である。これまでに血液中の細胞や繊維芽細胞、尿中に含まれ

る細胞など低侵襲的に採取可能な体細胞から iPS 細胞を樹立した例が報告されており、さらに iPS 細胞から神経、網膜、内耳、肝臓、腎臓など多くの細胞への分化誘導法が報告されている⁵⁻¹²。疾患患者由来 iPS 細胞から分化誘導した成体細胞は疾患情報を有しており、病態を再現すると期待され、患者の組織や細胞に代わる病態解析のモデル系として使用可能である (図1)。特にヒトから採取しにくい細胞を病巣とする疾患や、原因遺伝子が不明な疾患、またミトコンドリア遺伝子など原因遺伝子が明らかになっている疾患であっても遺伝子操作がしにくい疾患の発症機構の解析には患者由来疾患 iPS 細胞を用いた研究は非常に有用である^{13,14}。また、胚から樹立するヒト ES 細胞を用いた研究は、生命の元となる胚を破壊する操作を伴うため倫理的に容認しがたい場合も多いが、iPS 細胞はヒト体細胞から樹立可能であるため、ES 細胞研究に伴う倫理的問題を回避して研究に使用することができる。

希少難治性疾患研究

希少難治性疾患とは有効な治療方法が確立されていない、患者数の少ない疾患である。現在日本では患者数が人口の0.1%より少ない330種類の難病が希少難治性疾患の指定難病として厚生労働省に指定されている。希少難治性疾患は希少であるがゆえに原因や発症機構の不明なものも多く、病態の再現が難しいことから治療方法を見出すことが困難である。このような疾患概念

Received 18 January 2023, accepted 17 February 2023

連絡先: 藤岡 正人 (北里大学医学部分子遺伝学単位)

〒252-0374 神奈川県相模原市南区北里1-15-1

E-mail: mtfuji@kitasato-u.ac.jp

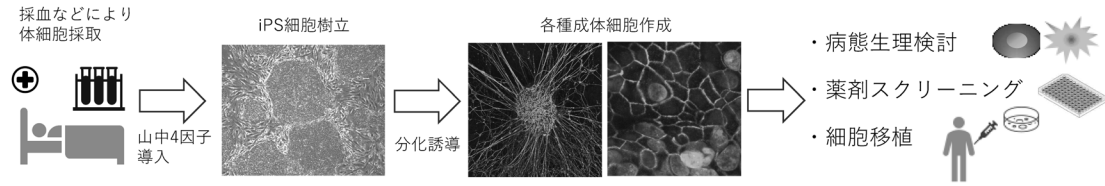


図1. 疾患特異的iPS細胞研究の流れ

表1. 日本の研究グループから発表された疾患iPS細胞研究の一部

発表年	疾患名	原因遺伝子	標的細胞	参考論文
2013	ドラベ症候群	SCN1A	神経細胞	doi: 10.1186/1756-6606-6-19
2014	ペリツェウス-メルツバッハー病	PLP1	オリゴデンドロサイト	doi: 10.1016/j.stemcr.2014.03.007
2016	脊髄小脳変性症	CACNA1A	小脳プルキンエ細胞	doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.026
2016	Perry症候群	DCTN1	TH陽性ニューロン	doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.06.007
2016	前頭側頭葉変性症	MAPT	神経細胞	doi: 10.1038/srep34904
2016	滑脳症	TUBA1A	神経前駆細胞, 神経細胞	doi: 10.1186/s13041-016-0246-y
2016	多発性嚢胞腎	PKD1, PKD2	血管内皮細胞, 平滑筋細胞	doi: 10.1038/srep30013
2017	チャージ症候群	CDH7	神経堤細胞	doi: 10.7554/eLife.21114
2017	シャルコー・マリー・トゥース病	PMP22など	神経堤細胞	doi: 10.1097/WNR.0000000000000831
2017	アンデルセン・タウシル症候群	KCNJ2	心筋細胞	doi: 10.1016/j.bbrep.2017.01.002
2017	ペンドレッド症候群	SLC26A4	内耳細胞	doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.020
2018	ブラウ症候群	NOD2	macrophage	doi: 10.1016/j.jaci.2017.04.013
2018	多系統萎縮症 (MSA)	COQ2	神経細胞	doi: 10.1038/s41598-018-32573-1
2019	前頭側頭葉変性症	MAPT	cortical neurons	doi: 10.1016/j.stemcr.2019.08.011
2019	デュシェンヌ型筋ジストロフィー	DMD	心筋細胞	doi: 10.1016/j.bbrc.2019.09.095
2019	パーキンソン病	CHCHD2	神経細胞	doi: 10.1093/hmg/ddz241
2019	基底核石灰化症	SLC20A2	内皮細胞	doi: 10.1016/j.bbrc.2019.01.096
2019	セッケル症候群	ATR	神経前駆細胞	doi: 10.1038/s10038-019-0574-8
2020	球脊髄性筋萎縮症	androgen receptor	運動神経	doi: 10.1186/s13041-020-0561-1
2020	パーキンソン病	Parkin, PINK1	神経細胞	doi: 10.1016/j.stemcr.2020.04.011
2021	レット症候群	MeCP2	神経幹細胞	doi: 10.1016/j.celrep.2021.109124
2021	網膜色素変性症	MERTK	網膜色素上皮細胞	doi: 10.1016/j.exer.2021.108503
2021	ミトコンドリア脳筋症 (MELAS)	mtDNA	網膜色素上皮細胞	doi: 10.1016/j.redox.2021.101921
2021	ニーマンピック病C型	NPC1, NPC2	神経細胞	doi: 10.1016/j.ymgmr.2021.100784
2021	拡張型心筋症	DSG2	心筋細胞	doi: 10.1093/hmg/ddab127

の確立していない希少難治性疾患でも、その患者の体細胞からiPS細胞を樹立し、そのiPS細胞を疾患の標的細胞に分化誘導し、その細胞の性質を解析することで難治疾患の原因・病態・治療方法の研究を行うことができる。iPS細胞は大量に培養することが可能であり、長期保存も可能であることから、症例数の限られる希少難治性疾患の研究には非常に有用な実験系である。さらにヒトの細胞であることから、ヒト患者における薬剤の有効性や副作用をより正確に評価できると期待で

きる。近年日本の研究グループより報告された希少疾患・難治性疾患iPS細胞研究例の一部を表1にあげた。

現在、理研BRCには神経・感覚器系、循環器系、血液系、筋・骨格系など疾患数180、患者数637、株数2634の指定難病疾患iPS細胞が所有されており、希少疾患・難病iPS細胞研究へ多くの研究者が参画しやすい状況になっている。希少疾患は患者数の多い疾患と異なり営利企業の参画を期待しにくく、公的機関と連携しながら、アカデミアが率先して取り組むべき課

題であると考える。

疾患 iPS 細胞研究の limitation

疾患 iPS 細胞研究にも limitation はある。その一つに、加齢に関連する疾患の解析が難しいことがある。体細胞から iPS 細胞に初期化する際に元の細胞が有していた加齢に関連する情報は失われてしまうため、発症までに時間のかかる神経変性疾患などは iPS 細胞から *in vitro* で分化誘導した細胞では病態が再現しにくいことが多い。この問題点を解決する方法として近年、“ダイレクトコンバージョン”が再注目されている¹⁵。ダイレクトコンバージョンとは体細胞に転写因子などを強制発現させることで、iPS 細胞への初期化を経ずに目的の細胞に系譜を変換させる手法である^{16,17}。これまでに MyoD による筋細胞¹⁸、Ascl1/Brn2/Myt11 による神経細胞¹⁹、Gata4/Mef2c/Tbx5 による心筋細胞^{20,21}、DNP63A/GRHL2/TFAP2A/cMYC による表皮細胞²²へのダイレクトコンバージョンなどが報告されている。成体細胞を一度初期化して iPS 細胞にしてから分化誘導する場合と異なり、初期化を経ないダイレクトコンバージョンの系では、epigenetic な情報、細胞老化の情報が維持されており、加齢に伴う表現型の解析が可能であると期待される。研究の目的によって iPS 細胞への初期化を経るかダイレクトコンバージョンの手法をとるかを使い分ける必要がある。

さらに別の limitation として、iPS 細胞から成体細胞を分化誘導し解析する系は、単一細胞の 2D 分化誘導系、3D オルガノイド誘導系いずれも *in vitro* の系であり、組織間相互作用や *in vivo* の全身的な影響を十分には再現できない可能性には留意する必要がある。

おわりに

疾患 iPS 細胞研究によりこれまで不明であった疾患の原因究明や創薬が飛躍的に進むことが期待できる。limitation もあるが、この点を克服するためにはやはり基本的な生命現象を理解するための基礎研究が不可欠であり、基礎研究と臨床応用研究を車の両輪のように進めていくことで、真に社会に役立つ疾患 iPS 細胞研究が行えると考えている。

利益相反

本論文内容に関する著者の利益相反：なし

文 献

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.

2. Jucker M. The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nat Med* 2010; 16: 1210–4.
3. Bolker JA. Animal models in translational research: rosetta stone or stumbling block? *BioEssays* 2017; 39: 1700089.
4. Corsini NS, Knoblich JA. Human organoids: new strategies and methods for analyzing human development and disease. *Cell* 2022; 185: 2756–69.
5. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008; 132: 661–80.
6. Song Z, Cai J, Liu Y, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 2009; 19: 1233–42.
7. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51: 297–305.
8. Inamura M, Kawabata K, Takayama K, et al. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol Ther* 2011; 19: 400–7.
9. Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, et al. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol* 2015; 33: 1193–200.
10. Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015; 526: 564–8.
11. Tao Y, Zhang SC. Neural subtype specification from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2016; 19: 573–86.
12. Koehler KR, Nie J, Longworth-Mills E, et al. Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2017; 35: 583–9.
13. Okano H, Yamanaka S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol Brain* 2014; 7: 22.
14. Sternecker JL, Reinhardt P, Scholer HR. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet* 2014; 15: 625–39.
15. Inagaki E, Yoshimatsu S, Okano H. Accelerated neuronal aging *in vitro* approximately melting watch approximately. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 868770.
16. Traxler L, Edenhofer F, Mertens J. Next-generation disease modeling with direct conversion: a new path to old neurons. *FEBS Lett* 2019; 593: 3316–37.
17. Han JK, Shin Y, Kim HS. Direct conversion of cell fate and induced endothelial cells. *Circ J* 2021; 86: 1925–33. doi: 10.1253/circj.CJ-21-0703
18. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transcribed cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 987–1000.
19. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463: 1035–41.
20. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375–86.
21. Sadahiro T, Yamanaka S, Ieda M. Direct cardiac reprogramming: progress and challenges in basic biology and clinical applications. *Circ Res* 2015; 116: 1378–91.
22. Kurita M, Izpisua Belmonte JC, Suzuki K, et al. Development of *de novo* epithelialization method for treatment of cutaneous ulcers. *J Dermatol Sci* 2019; 95: 8–12.

Disease modeling and discovery of therapeutics using patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs)

Chika Saegusa, Masato Fujioka

Department of Molecular Genetics, Kitasato University School of Medicine

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are generated by reprogramming human somatic cells. Various applications of iPSCs include disease modeling and drug screening. Noteworthy, iPSCs can be, promisingly, used to clarify mechanisms underlying rare diseases with no known cure. Pathological analysis of disease cells, differentiated from patient iPSCs, can unravel disease onset mechanisms and help discover novel therapeutic targets. In this review, we will discuss the current state of iPSC research as a disease modeling tool and its limitations that have recently been revealed.

Key words: induced pluripotent stem cells (iPSCs), patient derived iPSCs, disease modeling, rare diseases