



TOHOKU
UNIVERSITY

ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞は、Muse 細胞からのみ形成される

Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem (iPS) cells in human fibroblasts

—米国科学アカデミー紀要掲載—

平成 23 年 6 月 1 日

国立大学法人 東北大学

1. 要旨

昨年、東北大学大学院医学系研究科出澤真理教授らの研究グループでは、ヒト皮膚線維芽細胞や骨髄間質細胞などの間葉系細胞には多能性を持つ幹細胞が存在することを発見し、その性状から、Muse (Multilineage-differentiating stress-enduring) 細胞と名付け、発表しました (参考文献 1)。Muse 細胞は、多能性幹細胞、すなわち 1 細胞から神経系や皮膚などの外胚葉系、骨格筋や骨・軟骨などの中胚葉系、肝臓や膵臓などの内胚葉系のそれぞれの細胞に分化可能な幹細胞であり、この点は ES 細胞 (*1) や iPS 細胞 (*2) に似ていますが、奇形腫 (*3) を形成しないという点で大きく異なる細胞です。すなわち、再生医療への応用において問題となる腫瘍化という副作用を事実上考えなくて良いという点で、Muse 細胞は大きな可能性を秘めていると考えられています。

今回、東北大学大学院医学系研究科出澤真理教授、北田容章准教授、若尾昌平助手、および、京都大学大学院理学研究科藤吉好則教授らの共同研究グループは、ヒト皮膚線維芽細胞に山中 4 因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を導入した場合、Muse 細胞のみが iPS 細胞へと変化し得るという事実を発見しました。また、Muse 細胞由来 iPS 細胞との比較により、Muse 細胞が無限増殖能を獲得すると iPS 細胞に変化するのではないかというメカニズムが示唆されました。

ヒト皮膚線維芽細胞を用いた場合は Muse 細胞だけが iPS 細胞に変化し得るのであれば、Muse 細胞を最初に分離する事で iPS 細胞への誘導効率を向上させることが可能となるでしょう。また、皮膚線維芽細胞は様々な細胞種を含む集団であることが知られていますが、比較的均質な集団である Muse 細胞を用いることで iPS 細胞誘導のメカニズムの解明に役立てることが可能となると考えられます。更に、Muse 細胞と iPS 細胞の違いを詳細に解析することで、iPS 細胞による腫瘍形成問題を解決する糸口が得られる可能性も考えられます。

一方で、そもそも多能性を持つ Muse 細胞からしか iPS 細胞が形成されなかったという事実は、細胞の初期化に基づかず iPS 細胞が形成されるのかもしれないという、新しい可能性をも示唆するものであります。本研究結果はヒト皮膚線維芽細胞を用いて得たものでしたが、今回の研究結果が他の細胞種でも有効であるかどうかについて、より詳細に検討していく必要があるでしょう。

2. 研究の背景

iPS 細胞樹立メカニズムに関し、京都大学山中伸弥教授はストカスティックモデル (Stochastic

model) とエリートモデル (Elite model) という 2 つのモデルを提唱しました。ストカスティックモデルとは、山中 4 因子導入を受けた全ての細胞が確率論に従い iPS 細胞化するという事であり、理論的には様々な手法によりこの樹立効率を 100% にまで高めることが出来るものと解釈されています。これに対しエリートモデルでは、特定の細胞種のみが iPS 細胞に変化可能であるとされています。iPS 細胞はどんな細胞からでも樹立されるのか、あるいは、特定の細胞種からのみ形成されるのか。この問いに対しての回答として、特定の血球系細胞に分化した細胞からの iPS 細胞樹立などの結果が示されてきており、現状ではストカスティックモデルが広く受け入れられつつありました。しかし一方で、細胞の分化度が iPS 細胞の樹立効率に大きく影響を与えるという事実も示されており、これは細胞の種類によって iPS 細胞のなりやすさに違いがあるとも解釈出来ます。これらのことは、エリートモデルが積極的に否定されているという訳ではない事を示していると言えます。

3. 研究成果

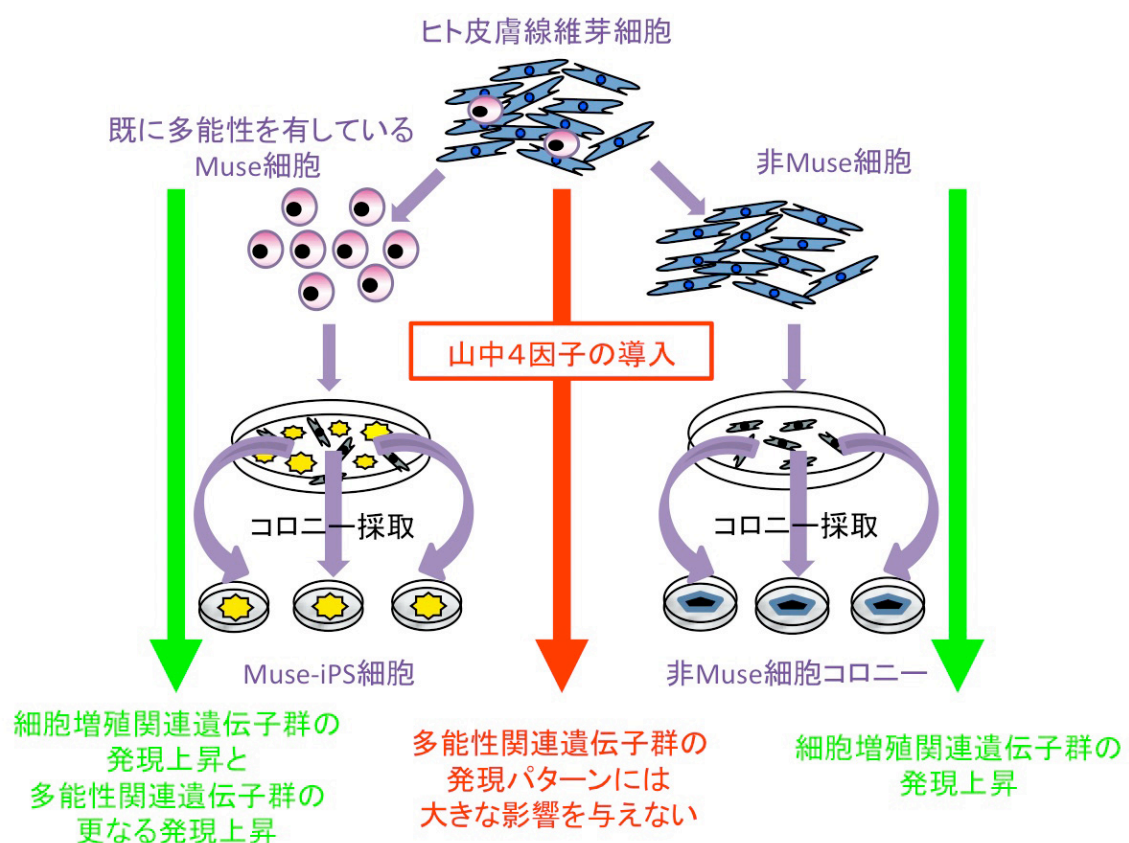
iPS 細胞誘導実験には、ヒト皮膚線維芽細胞が広く用いられてきています。このヒト皮膚線維芽細胞は様々な細胞種によって構成されますが、その中に含まれる幹細胞成分が iPS 細胞に変化しやすいという現象が考えられました。Muse 細胞もまたヒト皮膚線維芽細胞に含まれる幹細胞ですので、Muse 細胞がそうした幹細胞の一部である可能性を検索しました。この Muse 細胞は SSEA-3 という ES 細胞などのヒト多能性幹細胞のマーカーとして用いられる糖脂質分子を細胞膜表面に発現していますが、この SSEA-3 陽性集団は、ヒト皮膚真皮に存在する他の幹細胞のマーカーを一切発現していませんでした。すなわち、Muse 細胞はそうした幹細胞とは一切重複のない、独立した集団であることが判明しました。

こうした Muse 細胞を 1 細胞ずつに分離培養し、神経系細胞、脂肪細胞、骨細胞、肝細胞への分化誘導を試みたところ、いずれの場合も 90% 以上の高効率で分化誘導可能であったことから、Muse 細胞の多能性が確認されました。iPS 細胞ではテロメラーゼと呼ばれる酵素活性が高くそれにより無限増殖能を有しているとされていますが、Muse 細胞のテロメラーゼ活性は非常に低く、通常の体細胞と同レベルでした。このことは Muse 細胞が無限増殖能を持たない理由の一つであると考えられます。

次にヒト皮膚線維芽細胞を Muse 細胞と Muse 細胞以外の細胞に分離し、レトロウィルスベクター (※4) を用いて山中 4 因子を導入することで iPS 細胞誘導を試みました。すると、両集団よりコロニーが形成されたものの、非 Muse 細胞由来コロニーの数は Muse 細胞由来コロニーの 1/8 程度であり、また、Muse 細胞由来コロニーでは Tra-1-81 という iPS 細胞を同定する上で信頼性の高いマーカー分子を発現していたのに対し、非 Muse 細胞由来コロニーでは一切発現が確認されませんでした。これらの細胞をフィーダー細胞ごと全て回収し、その遺伝子発現を確認したところ、NANOG、SOX2 といった iPS 細胞形成に不可欠である内因性因子は Muse 細胞群のみで発現が見られ、非 Muse 細胞群では一貫して検出されませんでした。こうしたコロニーを 1 つ 1 つ採取し iPS 細胞の樹立を試みたところ、Muse 細胞由来コロニーからのみ奇形腫形成能を有する iPS 細胞を樹立することが出来ました。具体的には、非 Muse 細胞由来コロニーでは OCT3/4、SOX2、NANOG などの多能性細胞マーカーは発現しておらず、また、ABCG2、DNMT3B、CDX2 などの iPS 細胞誘導過程に発現する分子も発現していないこと、NANOG や OCT3/4 のプロモーター部位の脱メチレーションにあまり変化が見られないことから、Schlaeger らが提唱し

ている、Type I 部分リプログラミングという、iPS 細胞になり得ない状態に相当すると考えられました (参考文献 2)。一方で、UTF1 やテロメラーゼといった分化能や無限増殖能に関わる因子が低いながらも発現が見られたことなどから、非 Muse 細胞は山中 4 因子導入により何らかの作用を受けたと考えられつつも、iPS 細胞へと変化するには至らなかったと言えます。なお、これらの所見は、山中 4 因子をそれぞれ一つずつ搭載したウィルスベクターを用いて遺伝子導入した結果でしたが、一つのウィルスベクターに山中 4 因子全てを搭載し遺伝子導入した場合にも同様の結果が得られたことから、遺伝子導入効率の違いにより生じた結果ではないことも確認されました。

最後に Muse 細胞と Muse 細胞由来 iPS 細胞の遺伝子発現パターンを解析したところ、多能性関連遺伝子群ではその発現パターンが両者とも似通っていましたが、Muse 細胞由来 iPS 細胞における NANOG、OCT3/4、SOX2 などの多能性関連分子や細胞分裂関連遺伝子群の発現は、Muse 細胞と比較しその程度がかなり高いことが分かりました。一方で、非 Muse 細胞へ山中 4 因子を導入した場合においては、多能性関連遺伝子群発現にはほとんど変化が見られず、細胞分裂関連遺伝子群発現のみ若干の発現上昇が見られるに留まっておりました。すなわち、山中 4 因子は、Muse 細胞と非 Muse 細胞に共通して、多能性関連遺伝子群のパターンそのものには影響を与えるものではなく、主に細胞増殖関連遺伝子群の発現上昇に関与するものではないかと考えられました。



4. 考察

Reijo Pera 博士らのグループは、ヒト皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞誘導効率の向上を目指し、下記の実験を行っていました (参考文献 3)。ヒト皮膚線維芽細胞には SSEA-3 というマーカーに

陽性となる細胞が存在する事を示し、SSEA-3 マーカーを用いて強陽性細胞と陰性細胞を分離しました。それらを用いて iPS 細胞誘導を行うと、SSEA-3 強陽性細胞のみから iPS 細胞が誘導出来たという事実を示しました。これにより、iPS 細胞誘導においては SSEA-3 というマーカーで細胞を予め分離することで、その誘導効率を高めることができるのではないかと結論づけをしていました。今回の研究では、Reijo Pera 博士らのグループとは独立して研究を進めてきた結果、ヒト皮膚線維芽細胞中には Muse 細胞という特異な幹細胞が存在することを証明し、かつそうした多能性を有する幹細胞が iPS 細胞の元となっている事実を示しました。Reijo Pera らのグループによる研究では、SSEA-3 陽性細胞がこういった細胞であるのかについて詳細な検討を行っていなかったため、この細胞が多能性を有する一方で奇形腫形成を行わないという特異な幹細胞であることを見出していませんでした。本研究では Muse 細胞の活性に着目することで、線維芽細胞を材料とした場合においては、こうした特異な多能性幹細胞こそが iPS 細胞の元となっていることを示し、また、山中 4 因子導入そのものは線維芽細胞に多能性をもたらすものではないことや、Muse 細胞においては多能性関連遺伝子群の発現向上とそれによる細胞増殖関連遺伝子群の更なる発現亢進を引き起こすこと、そしてそれが無限増殖能を与えているのではないかと、新しい可能性を示すことが可能となりました。この点が、本研究の新しい知見であると考えられます。

本研究では、山中 4 因子導入による変化として、細胞増殖関連遺伝子群については Muse 細胞と非 Muse 細胞の両方において発現上昇がもたらされていることを示しました。一方で多能性関連遺伝子群については、Muse 細胞においてのみその発現上昇が見られていました。多能性関連遺伝子群のうち NANOG や OCT3/4 等は、ES 細胞に導入すると細胞分裂を促進することが既に知られています。これらのことから、Muse 細胞では、山中 4 因子によりまず細胞増殖関連遺伝子群と多能性関連遺伝子群の発現が上昇し、その発現上昇した多能性関連遺伝子群による更なる細胞増殖関連遺伝子群の発現上昇が生じたと考えられます。Muse 細胞と Muse 細胞由来 iPS 細胞の表現系としての大きな相違点は、無限増殖能と言えます。すなわち、山中 4 因子導入によるこうした細胞分裂関連遺伝子群の発現向上が、Muse 細胞に無限増殖能を付与したのではないかと、新しい可能性が示唆されたと言えます。

5. 今後の展開

本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞を用いた場合は Muse 細胞だけが iPS 細胞に変化し得るという事実を示しました。iPS 細胞を利用するという観点からは、Muse 細胞をあらかじめ分離しておく事で、iPS 細胞への誘導効率を向上させることが可能となると考えられます。また、皮膚線維芽細胞は様々な細胞種を含む集団であることが知られていますが、Muse 細胞は比較的均質な集団であると言えます。基礎医学的観点からは、こうした均質な集団からの iPS 細胞誘導における前後比較は、iPS 細胞誘導のメカニズムの解明に役立つと考えられます。これらに加え、Muse 細胞と Muse 細胞由来 iPS 細胞の違いを詳細に解析することで、iPS 細胞による腫瘍形成問題を解決する糸口が得られるのではないかと考えられます。

また、現在まで、iPS 細胞とは、山中 4 因子導入により細胞のある種の状態が初期化された結果得られたものであるという考え方が、主流となっています。本研究結果は、そもそも多能性を有する幹細胞が無限増殖能を獲得したことにより iPS 細胞が形成されるという現象を示唆しています。すなわち、細胞の初期化に基づかず iPS 細胞が形成されるのかもしれないという、新しい可能性をも示唆するものであると考えられます。本研究結果はヒト皮膚線維芽細胞を用いて得た

ものでしたが、今回の研究結果が一般化される事実かどうか、より詳細に検討していく必要があるでしょう。

6. 論文名

Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem (iPS) cells in human fibroblasts

Shohei Wakao, Masaaki Kitada, Yasumasa Kuroda, Taeko Shigemoto, Dai Matsuse, Hideo Akashi, Yukihiro Tanimura, Kenichiro Tsuchiyama, Tomohiko Kikuchi, Makoto Goda, Tatsutoshi Nakahata, Yoshinori Fujiyoshi, Mari Dezawa

(平成 23 年 5 月 31 日 (米国現地時間)、電子版に掲載)

7. 参考文献

(1) Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. Yasumasa Kuroda, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Kouki Nishikawa, Yukihiro Tanimura, Hideki Makinoshima, Makoto Goda, Hideo Akashi, Ayumu Inutsuka, Akira Niwa, Taeko Shigemoto, Yoko Nabeshima, Tatsutoshi Nakahata, Yo-ichi Nabeshima, Yoshinori Fujiyoshi, Mari Dezawa (2010) Proc Natl Acad Sci USA 107(19): 8639-8643.

(2) Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. Elayne M Chan, Sutheera Ratanasirintrawoot, In-Hyun Park, Philip D Manos, Yui-Han Loh, Hongguang Huo, Justine D Miller, Odelya Hartung, Junsung Rho, Tan A Ince, George Q Daley, Thorsten M Schlaeger (2009) Nat Biotechnol 27(11): 1033-1037.

(3) Enhanced generation of induced pluripotent stem cells from a subpopulation of human fibroblasts. James A. Byrne, Ha Nam Nguyen, Renee A. Reijo Pera (2009) PLoS One 4(9): e7118.

8. 用語解説

(1) ES 細胞 (Embryonic stem cell、胚性幹細胞)

受精後胚盤胞から内部細胞塊と呼ばれる多能性細胞を採取し、それを培養することにより人為的に作成される多能性幹細胞の一つ。マウスでは 1981 年、ヒトでは 1998 年に樹立された。あらゆる組織の細胞に分化することができると考えられており再生医療への応用が長く期待されているが、その樹立に受精卵を破壊する必要があり、また、患者自身の細胞を用いて作成することが不可能なため、免疫拒絶反応が生じる恐れがある。一つでも未分化な細胞が混入していると腫瘍(奇形腫)を形成すること、再生医療への応用において問題となっている。

(2) iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell、人工多能性幹細胞)

体細胞に特定の因子を導入することにより作成される多能性幹細胞で、京都大学山中伸弥教授らの研究グループにより、マウスでは 2006 年、ヒトでは 2007 年に樹立された。ES 細胞の抱え

る倫理的問題を解決する細胞として、その再生医療への応用が期待されている。遺伝子導入を伴うため癌化の危険性は ES 細胞と同等かそれ以上と考えられているが、癌化を回避する方法が開発されつつある。ES 細胞と同様に様々な細胞に分化することができると考えられてきたが、最近では ES 細胞とはふるまいが異なる場合があること、その理由として、ゲノム／エピゲノム領域に遺伝子のコピー数やエピゲノム修飾の異常、点変異などが蓄積しており ES 細胞とは大きく異なっていることなどが判明しつつある。

（３）奇形腫

ES 細胞などの多能性幹細胞を免疫不全マウス精巣に注入した場合に形成される腫瘍であり、内部には神経系や皮膚などの外胚葉系、骨格筋や骨・軟骨などの中胚葉系、肝臓や膵臓などの内胚葉系のそれぞれの細胞が混在している。この免疫不全マウス精巣への注入という手法は、移植細胞の多能性を確認する一般的な手法として用いられている。ただし、胚盤葉上層細胞など、多能性細胞であっても奇形腫形成を示さない細胞も存在する。このことから、奇形腫は、細胞の多能性に加え腫瘍性増殖能の結果生じるとも考えられる。

（４）レトロウィルスベクター

ベクターとは運び屋という意味であり、この場合は細胞外から細胞内に遺伝子を持ち込む役割を果たす。レトロウィルスベクターによる遺伝子導入では、宿主細胞に感染後、遺伝情報を宿主細胞のゲノム領域に組み込み、半永久的な遺伝子発現をもたらす。iPS 細胞樹立のための遺伝子導入には様々なベクターが用いられているが、本研究で用いたレトロウィルスベクターによる遺伝子導入法は、2007 年山中らにより報告された手法とほぼ同様である。

9. 問い合わせ先

東北大学大学院医学系研究科

細胞組織学分野 出澤真理

〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1

Tel: 022-717-8025, FAX: 022-717-8030

e-mail: mdezawa@med.tohoku.ac.jp