再生医学

別種の細胞へ直接分化転換

Cell reprogramming gets direct

CORY R. NICHOLAS AND ARNOLD R. KRIEGSTEIN

2010年2月25日号 Vol. 463 (1031-1032)

これまで、分化した細胞を初期化して別の細胞種に転換させるには、
 いったん多能性をもつ幹細胞の状態にする必要があった。
 このほど、幹細胞を経ずに、繊維芽細胞から直接ニューロンを作製できたという、
 画期的な成果が報告された。

ある細胞種から別の細胞種へ直接転換したり、細胞の再プログラム化を起こしたりすることを「分化転換」という。分化転換させるには、さまざまな障壁を越えなければならず、なかなか容易でない。しかしながら、近年、さまざまな生物学的手法を駆使することで、その障壁が急速に崩れてきている。こうした流れの中、Vierbuchen らは、幹細胞を用いずに疾患や患者に特異的な中枢神経系 (CNS) 組織を作製できるという、将来性のある革新的な技術を発表した¹。これにより、てんかんや脳卒中、パーキンソン病などの CNS 障害に対する再生医療は、予想外の新たな展開を迎えたといえるだろう。

2006 年、再生医療にとって画期的な成果が報告された。全身の結合組織に存在する細胞の一種「繊維芽細胞」を胚性幹細胞 (ES 細胞) のような細胞 (人工多能性幹細胞 = iPS 細胞) に初期化することができるようになったのだ²。これにより、疾患や患者に特異的な幹細胞を作るための方法が示され、人間の胚から作られる ES 細胞に付きまとう難しい倫理的問題を回避できるようになった。既に、筋萎縮性側索硬化症 (ルー・ゲーリッグ病) の症例など、特定の遺伝病の患者から疾患特異的な iPS 細胞が作製され、疾患のメカニズムの研究と新薬標的の探索に利用されている。また、患者特異的な iPS 細胞には、免疫拒絶反応の心配が

ない置換細胞療法への利用が期待されている。しかし、細胞の分化転換の研究は日々進歩しているため^{1,3}、再生医療に幹細胞は本当に必要なのかという疑問が出てきてもおかしくない。

かつて細胞は、特定の細胞種に不可逆的に分化すると考えられていた。しかし現在、そうではないことが知られている。細胞の運命の再プログラム化が研究され始めた 1960 年代当時は、分化した成熟細胞の核を未分化状態に引き戻すために卵母細胞の能力が利用されていた。体細胞核移植 (SCNT)⁴とよばれるこの方法により、成熟細胞の遺伝子構成をもつ胚と ES 細胞が得られる。同様に、ES 細胞と成熟細胞とを融合させることで成熟細胞の核を未分化状態に転換することも可能だ⁵ (図 1)。しかし、これらの研究が臨床に結びつくかは、いまだはっきりしない。人間の SCNT は成功していないうえ、細胞融合では四倍体 (臨床的に容認できない、遺伝物質の重複) が発生するからだ。

2006 年の論文²では、転写因子をコードする 4 種類のマスター調節遺伝子を一時的に発現させることにより、成熟した繊維芽細胞の運命を劇的に逆転させて、未分化の iPS 細胞が得られることがわかり、再プログラム化研究の分野は非常に活気付いた。iPS 細胞は、間違いなく臨床に利用できる。しかし、ま

ず成熟細胞を完全に脱分化させて ES 細胞のような状態に戻し、その後目的とする成熟細胞へ再分化させなければならず、時間がかかる、効率の悪い回り道となっている (図 1)。

この回り道に対して、完全な脱分化を行わずに別の種類の成熟細胞になるよう分化を直接誘導して細胞の再プログラム化を最適化することは可能か、という疑問が沸き上がった。細胞系譜の再プログラム化は細胞融合だとする論文⁶が出されたとき、哺乳類細胞の分化転換研究は打撃を受けた。しかし、別の研究により、ごく少数の重要な因子を活性化させると、ある細胞種から別の細胞種へ転換できる可能性が示唆された⁷。特に、2008 年に報告された、3 種類の転写因子の一時的な活性化により、膵臓の外分泌細胞をかなりの効率 (20 パーセント) でインスリンを産生する内分泌細胞に直接再プログラム化できるという研究成果³は、大きな前進となった。しかし、これを含む多くの研究では、再プログラム化は、極めて近い細胞系統間でしか起こらなかった。

Vierbuchen ら¹は、まさにそんな中に登場した。研究チームは、神経の発生または機能に関与する転写因子をコードする候補遺伝子 19 個をピックアップし、最終的にはわずか 3 種類の因子の組み合わせで、繊維芽細胞からニューロ

ンへ転換できることを発見した (図1)。この繊維芽細胞は、マウスの胚と、マウスの新生児または成体の尾端に由来するもので、タウタンパク質をコードする *Tau* 遺伝子がオンになったときに緑色蛍光マーカーを発現するように遺伝子操作されている。*Tau* 遺伝子を選んだのは、ニューロンで特異的に発現するため、緑色の蛍光を指標にニューロンに転換された細胞を簡単に見つけることができると考えたからである。Vierbuchen らは、19 個の遺伝子をすべて同時に導入したとき、繊維芽細胞の中に緑色を呈するものがあるのを観察した。彼らは、ニューロンと推定されたこの細胞を、人工神経細胞 (iN 細胞) と名付けた。

その後、導入する遺伝子の数を徐々に減らしていくと、最終的には、わずか 5 遺伝子の組み合わせ (*Brn2*, *Myt1l*, *Zic1*, *Olig2*, *Ascl1*) を用いれば、12 日間の培養で、繊維芽細胞からニューロンへ十分転換することが示された。この iN 細胞は、さまざまなニューロンマーカーを発現し、活動電位の発火というニューロンの基本的な機能をもっていた。さらに、iN 細胞をマウスの神経細胞と一緒に培養すると、マウスニューロンから興奮性と抑制性の双方のシナプス結合を受け、それぞれの機能をもつシナプスを形成することができた。

Vierbuchen ら¹は、形質転換に用いる遺伝子の数をさらに減らして *Ascl1*, *Brn2*, *Myt1l* の組み合わせ、または *Ascl1*, *Brn2*, *Zic1* の組み合わせにより、20 パーセント程度まで転換効率を高められることを発見した。これは、5 つの遺伝子を導入した場合の 2~3 倍である。さらに、*Ascl1* 単独でも未熟なニューロンを作ることができたが、成熟したニューロンを作り出すには、*Brn2* と *Myt1l* も同時に導入する必要があることがわかった。驚いたことに、この 3 つの因子で作製された iN 細胞のほとんどは、前脳の興奮性大脳皮質ニューロンと類似していて TBR1 というタンパク質を発現しており、iN 細胞どうして形成されるシ

図1. 直接的 / 間接的な、細胞の再プログラム化経路。間接的な経路（点線）には、体細胞核移植 (SCNT) や細胞融合、Oct4 などの遺伝子導入による人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作製がある。しかし、脱分化した細胞は、中胚葉、内胚葉、外胚葉の細胞系統に対応した、それぞれ別の成熟細胞種に再分化させなければならない。これまでにも、血液、脾臓、脳の細胞の細胞系統内では、図に示したような遺伝子を誘導することによって分化転換が実現されている。今回 Vierbuchen ら¹は、神経細胞系統に特異的な転写因子を繊維芽細胞に導入することにより、関係の遠い大脳皮質興奮性ニューロンに直接転換できることを示した（青色の矢印）。

ナプスは興奮性シナプスが多かった。

この結果は、特に脳の発生で *Ascl1* が果たす役割を考えると、不思議である。というのも *Ascl1* は、TBR1 が発現されない抑制性ニューロン系統³において、前駆細胞が発現する転写因子をコードしているからだ。また、興奮性の脳皮質ニューロン前駆細胞に抑制性ニューロンの細胞マーカーを発現させるには、*Ascl1* の強制発現だけで十分なこともわかって⁹。これらの結果と興奮性 iN ニューロンの形成で *Ascl1* が果たす役割の整合性をどのようにとったらいいのかは、よくわからない。さらに興味深いことに、興奮性ニューロンの発生に必要な転写因子をコードする遺伝子 *Neurog2* (*Ngn2*) の強制発現で、アストロサイトから興奮性ニューロンへの転換および TBR1 の発現を示した研究がある¹⁰。

げっ歯類と人間の皮膚から外胚葉神経堤由来の多能性前駆細胞が分離され¹¹、そこからは、多くが末梢グリアや機能のないニューロンとみられたものの、神経細胞が得られている。これに

対し、Vierbuchen らの方法では、CNS の機能性興奮性ニューロンが得られたのだ。今回の方法を改良して、神経伝達物質 γ アミノ酪酸 (GABA) を産生する抑制性ニューロンやドーパミンを産生するニューロンなど、さまざまな種類のニューロンを作製できるようになれば、再生医療の戦略が軌道修正されるかもしれない。

しかし、まだ乗り越えなければならない障害が存在する。重要なのは、導入した 3 種類の転写因子の発現を抑制しても iN 細胞の再プログラム化が確立されていることを示し、細胞の運命が本質的かつ安定的に転換されていることを確認しなければならない、ということだ。これが確認されれば、iPS 細胞の作製¹²で利用されたのと同様な、ウイルスを用いない、安全で一時的な再プログラム化法への道が開けるだろう。また、皮膚生検で得られる成人の繊維芽細胞や血球など、簡単に採取が可能な細胞から機能性ニューロンが効率的に得られるのかどうかも調べなければならない。

Vierbuchen らが機能性実験に用いたのは新生児マウスの繊維芽細胞由来の iN 細胞であり、成体マウスの繊維芽細胞に由来する iN 細胞の機能性は明らかにされていない。

さらに、動物モデルでの移植実験を行い、移植 iN 細胞が脳に生着して疾患が治るのかを調べる必要があるだろう。細胞の数を増やす方法の研究も必要だ。ヒトの治療に利用するには何百万個という細胞が必要と考えられるが、現段階では iPS 細胞と異なり、iN 細胞の数を増やす手段が存在しない。ただし、まさにその制約が、iPS 細胞に対する iN 細胞の優位性の源かもしれない。効率的に細胞

の数が増えないということは、多能性幹細胞のように腫瘍を形成しないと思われるからだ。

まだまだ課題は多いとはいえ、iN 細胞の将来性は大きな魅力だ。ヒトの細胞で iN 細胞への転換が可能ならば、疾患モデルや創薬用の疾患特異的ニューロンの作製、また、細胞の運命を決める遺伝学的メカニズムやエピジェネティックな制御機構の解明に、すぐにでも応用可能と考えられる。もはや、未分化の多能性状態に戻すことなく細胞の運命を大胆に操作することができるかどうかの問題なのではない。今や、それぞれの細胞系統で特異的な因子を組み合わせる再プログ

ラム化を活性化することにより、どれだけ多様な細胞が得られるのかが問題になっているのだ。

(翻訳：小林盛方)

Cory R. Nicholas と Arnold R. Kriegstein、カリフォルニア大学サンフランシスコ校医学系大学院 (米国)。

1. Vierbuchen, T. et al. *Nature* **463**, 1035–1041 (2010).
2. Takahashi, K. & Yamanaka, S. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
3. Zhou, Q. et al. *Nature* **455**, 627–632 (2008).
4. Gurdon, J. B. & Uehlinger, V. *Nature* **210**, 1240–1241 (1966).
5. Han, D. W. et al. *Stem Cells* **26**, 445–454 (2008).
6. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. *Cell* **116**, 639–648 (2004).
7. Zhou, Q. & Melton, D. A. *Cell Stem Cell* **3**, 382–388 (2008).
8. Letinic, K., Zoncu, R. & Rakic, P. *Nature* **417**, 645–649 (2002).
9. Fode, C. et al. *Genes Dev.* **14**, 67–80 (2000).
10. Berninger, B. et al. *J. Neurosci.* **27**, 8654–8664 (2007).
11. Toma, J. G. et al. *Nature Cell Biol.* **3**, 778–784 (2001).
12. Kim, D. et al. *Cell Stem Cell* **4**, 472–476 (2009).