学　術

ES細胞・iPS細胞の研究動向

小　林　正　之

秋田県立大学 生物資源科学部 応用生物科学科 動物分子工学研究室

Ⅰ．ES細胞とは？

幹細胞（Stem cells）は、あたかも木の幹に相当するように種々の分化細胞の源になる性質を持っている（**図１**）。ES細胞（Embryonic stem cells、胚性幹細胞）は、身体を構成する全ての細胞に分化する能力である分化多能性をもつ。1981年、発生学研究の一環としてマーティン・エバンス博士（英）らにより、着床直前のマウス胚（胚盤胞、**図２**）に含まれている胎仔前駆細胞（内部細胞塊）から樹立された[1)]。胚を出発材料としているため“胚性”幹細胞と命名されている。マウスES細胞の樹立に遅れること約20年、ジェームズ・トムソン博士（米）らにより、サルES細胞[2)]に続いてヒトES細胞[3)]が着床前胚より樹立された。ES細胞を培養する際には細胞分化を抑制し、かつ、分化多能性を維持させるため、培養液に特定のサイトカイン類（マウスはLIF [Leukemia inhibitory factor]、ヒトはFGF2 [Fibroblast growth factor 2]・Activinなど）を添加する必要がある。これらのサイトカイン類は遺伝子組換え技術と哺乳動物細胞、大腸菌を用いて生産されている。一方、ES細胞の樹立方法そのものには遺伝子組換え技術は含まれておらず、純粋に細胞培養技術のみによってつくり出された幹細胞である。

体外に取り出した着床前マウス胚に顕微操作技術を用いてマウスES細胞を注入し、借腹雌マウスの子宮に胚移植した場合、ES細胞は再び胚発生に寄与する。これがマウスES細胞の最大の特徴であり、

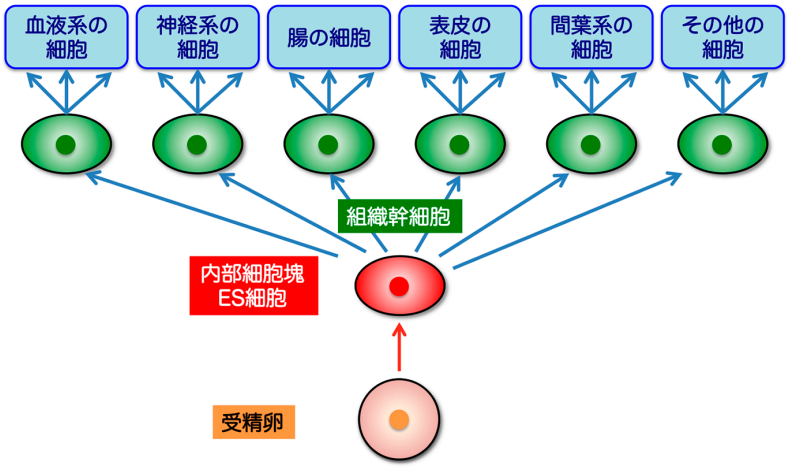

図１．哺乳動物の発生と幹細胞

たった１個の細胞から構成されている受精卵を借腹雌の子宮に胚移植すると、個体が誕生する。受精卵は幹細胞であるが、受精卵がもつ分化能を“全能性”とよぶ。着床直前の胚である胚盤胞に含まれる内部細胞塊、また、内部細胞塊より樹立されたES細胞は幹細胞だが、これらを子宮に移植しても個体が誕生することはない。この限定的な分化能を“分化多能性（多能性）”とよび、全能性とは区別している。

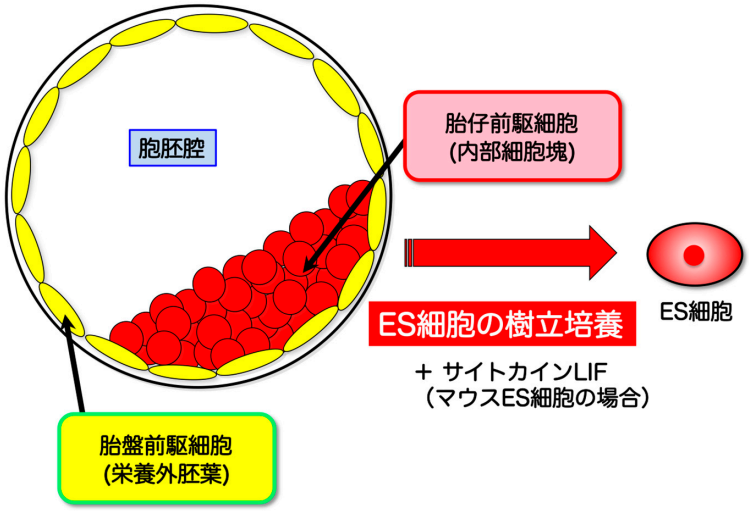

図２．着床直前の胚である胚盤胞の構造

胚盤胞は、胎仔前駆細胞である内部細胞塊と胎盤前駆細胞である栄養外胚葉から構成されている。内部細胞塊を培養して得られた細胞株がES細胞（胚性幹細胞）である。ES細胞は胎盤を形成できない。また、栄養外胚葉を培養することによりTS細胞（栄養膜幹細胞）が得られた[23]。TS細胞は胎盤への分化能をもつ幹細胞であるが胎仔は形成できない。つまり、ES細胞・TS細胞の分化能は限定的である。なお本稿では、TS細胞の詳細については割愛した。胚盤胞の基本構造は哺乳動物で共通している。

からだの一部分にES細胞から分化した細胞を含むキメラマウスを得ることができる。マウスES細胞はキメラマウスの生殖細胞（精子・卵）にも分化することができ、なんと、ES細胞の子孫が誕生する。さらなる技術の進歩により、あらかじめES細胞にヒト遺伝子などを導入したり、ES細胞のゲノムにコードされている特定の遺伝子を破壊したうえで子孫を得ることにより、遺伝子導入マウス・遺伝子ノックアウトマウスを作出できるようになった。2007年、エバンス博士は遺伝子ノックアウト技術を発明したマリオ・カペッキ博士（伊）、オリバー・スミティーズ博士（英・米）とともにノーベル賞を受賞している。

その後、特定の細胞内シグナル伝達酵素（主にタンパク質リン酸化酵素群）に対する低分子阻害剤の開発と細胞培養技術の進歩により、2008年、培養液にLIFを添加し、安定して培養できるラットES細胞も得られた[4]。なお、これら低分子・酵素阻害剤は分化抑制剤として培養液に添加されるが、もともとは癌の治療薬候補として膨大な種類が開発されてきたものである。マウスES細胞と同様、ラットES細胞からキメララットが作成できること、生殖細胞へ分化できること、その子孫が誕生することが証明されている。

一方、ヒトやサル（霊長類）のES細胞は、細胞コロニーの形態や分化多能性を維持するために必要なサイトカイン類への依存性について、マウスやラットに代表される齧歯類のES細胞と明らかに異なる。1998年にトムソン博士らによりヒトES細胞が樹立された当初、この相違は種差ではないかと理解されていた。2007年、マウスES細胞が得られるより遅い発生時期である着床後のマウス胚より、分化多能性を持つエピブラスト幹細胞（EpiS細胞）が得られた[5]。幹細胞研究者が驚愕したことは、ヒトES細胞とマウスEpiS細胞が示す細胞コロニーの形態とサイトカイン類への依存性がよく一致すること、また、マウスEpiS細胞はキメラマウスを形成できず、卵子・精子に分化できなかったことである。現在では、マウスEpiS細胞はES細胞よりも分化ステージが進行していることに起因して、卵子・精子への分化能を喪失しているのではないかと考えられている。また、今のところ得られているヒトES細胞はマウスEpiS細胞に相当し、卵子・精子への分化能を喪失しているのではないかと考えられるようになった。すなわちヒトES細胞は、「卵子・精子への分化能を喪失している」という点においては、“完璧なES細

胞”とはいえないのである。逆にいうと、“完璧なES細胞”は齧歯類のみから得られているにすぎない。

Ⅱ．iPS細胞とは？

ヒトES細胞は生殖細胞への分化能を喪失しているとしても、種々の体細胞（臓器を構成する細胞）への分化多能性を保持している。この性質を応用し、ES細胞から分化誘導技術により得た体細胞を用い、傷んだ臓器・組織を交換・補充することを目指した“再生医療”の研究がスタートした。ヒトES細胞、また、基礎研究としてマウスES細胞を用いることにより、種々の臓器細胞を分化誘導する基本技術について大きな前進があった。それと同時に、他人のES細胞から得た体細胞を移植した場合、免疫拒絶反応を惹起してしまうこと、また、ヒトES細胞はヒト胚を壊して作成することが大きな課題として捉えられるようになった。

これらを背景として、山中伸弥博士らは遺伝子組換え技術を用いることにより、ES細胞に匹敵する分化多能性を保持するiPS細胞（induced pluripotent stem cells）を体細胞から作出することを考案した。マウスiPS細胞は2006年[6]、ヒトiPS細胞は2007年[7]に論文発表され、山中博士により“人工多能性幹細胞”という和名が与えられた。すなわちiPS細胞は、遺伝子組換え技術を駆使して人工的につくり出されたES細胞に他ならない。この大発明により、患者から得られた体細胞よりiPS細胞をつくり出せるので免疫拒絶反応の心配はなくなり、また、生命の萌芽であるヒト胚を壊す必要もなくなったのである。

幹細胞研究者が最も驚愕したことは、その作出技術の簡便さである（**図３**）。iPS細胞開発のスタート時、山中博士らはマウスES細胞で強く活性化しており、逆に、マウス体細胞（実際には線維芽細胞）では活性化していない遺伝子群を23個に絞り込んだ。このような特徴を持つ遺伝子群を体細胞に導入すれば、ES細胞のような状態に転換できるのではないかと予測したのである。またこの絞り込み方法は賢く、インターネットで公開されている遺伝子発現データベースを利用しており、理論上は実験を必要としない。この23個に加え、たまたま当時、山中博士らが研究対象としていた、体細胞でも活性化している１個の遺伝子（Klf4）を追加して、計24個の候補遺伝子からiPS細胞の作出に必要な遺伝子の絞り込みに着手している。最終的には、幸運なことにKlf4を含む４個の遺伝子（Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc；山中４因子と呼ばれている）により、iPS細

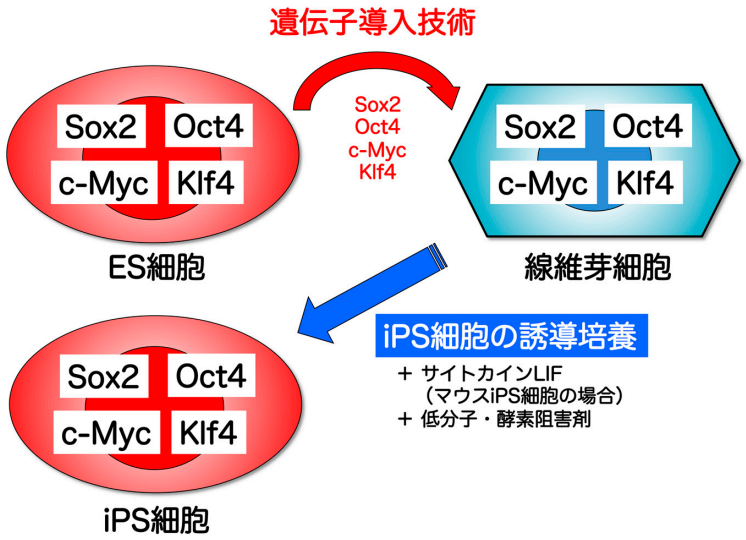

図３．iPS細胞の作出

遺伝子組換え技術を用いることにより、ES細胞に匹敵する分化多能性を保持するiPS細胞が線維芽細胞から作出された。マウスES細胞で強く活性化しており、逆に、マウス線維芽細胞では活性化していない遺伝子群から山中4因子（Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4）が発見された。

胞が作出できることを見出した。いずれも遺伝子発現を調節する“転写因子”とよばれる遺伝子群である。Oct4とSox2は、もともとES細胞で強く活性化している遺伝子として非常に有名であり、c-Mycも含めてその機能はよく調べられていた。iPS細胞の誘導にこれら３種が重要であることは予測されていたが、Klf4が関与することは全くの想定外であった。また、iPS細胞をつくり出せること自体は幹細胞研究者たちも予測していたが、まさか、わずか４個の遺伝子で達成されるとは思っていなかった、というのが大方の見方であろう。マウスiPS細胞は生殖細胞への分化能を有しており、iPS細胞から分化誘導して得た精子[8]・卵子[9]より、子孫が得られている。また、子孫が得られるラットiPS細胞も作出されている[10,11]。一方、ヒトiPS細胞の作出については、霊長類ES細胞の樹立に成功したトムソン博士ら（前出）も独自に研究を進めていた。山中博士らと時を同じくして論文発表し[12]、山中４因子とは一部異なるトムソン４因子（Oct4、Sox2、Nanog、Lin28）を見出している。山中４因子、サイトカイン類と低分子・酵素阻害剤などをうまく組み合わせることにより、ヒトiPS細胞の作出効率は飛躍的に向上し、ほぼ100%になったと主張している例もある[13]。2012年、山中博士は体細胞核移植によるクローンカエルの作出に成功したジョン・ガードン博士（英）とともに、ノーベル賞を受賞したのはまだ記憶に新しいところである。

ここで特筆すべきは、マウスES細胞とマウスiPS細胞、ヒトES細胞とヒトiPS細胞の形態・サイトカイン類への依存性・細胞の特性を示す遺伝子発現状況・分化能いずれとも、それぞれの種の中では非常によく一致していることである。確かにiPS細胞は、遺伝子組換え技術により人工的につくり出されたES細胞に相当することが証明されたことになる。また、ヒトiPS細胞も卵子・精子への分化能を喪失しており、マウスiPS細胞ほどの“完璧なiPS細胞”とはいえないのである。2015年、ヒトiPS細胞から始原生殖細胞（卵子・精子の前駆細胞）を効率的につくり出す技術を開発した、とする研究成果が報告された[14]。しかし、卵子・精子への誘導には成功していない。

“完璧なiPS細胞”から分化誘導した臓器細胞の方が完成度は高い、という可能性が指摘され[15]、現在、ヒトiPS細胞については“完璧なiPS細胞”にするべく作製方法や培養方法の改善が検討されている。しかし、現段階では決定打ともいえる方法は見つかっていない。

Ⅲ．家畜に由来するES細胞・iPS細胞の研究動向

マウスES細胞が発明されて以来、ウシ・ブタ等、家畜のES細胞を作出する努力が継続している[16]。発生学研究への利用や遺伝子改変家畜の作出に応用するためである。ところが、およそ30年にわたる研究の歴史があるにもかかわらず、マウスES細胞に匹敵する能力をそなえたES細胞は得られていない。マウスやヒトES細胞の樹立条件を参考にして家畜ES細胞を得ようとしているが、ウシ・ブタのES“様”細胞はとりあえず得られるものの、ES細胞としての性質を保ったまま、安定して培養することができない。

マウスiPS細胞（2006年）・ヒトiPS細胞（2007年）が発明された後、家畜iPS細胞に関する研究論文は数多く報告されている[16,17]。また、伴侶動物の再生医療（血液疾患など）を目指して、イヌ・ネコiPS細胞の作出も試みられている[16]。なかでも特に、ブタiPS細胞の研究報告は多い。なぜならば、生理学的にもサイズ的にもブタはヒトに近く、ヒト再生医療技術の前臨床試験においてブタの利用が真剣に考えられているからである。また論文数はブタほどではないが、ウシiPS細胞の作出例もある。ブタ・ウシいずれとも、マウスやヒトのES・iPS細胞に類似したiPS細胞が得られており、着床前胚に注入してキメラ動物を作出した例がある。ブタiPS細胞では複数のキメラ個体を得ることに成功しているが[18,19]、ブタiPS細胞の子孫は得られていない。一方、ウシiPS細胞ではキメラ胎仔は得られているが、iPS細胞の寄与はかなり低いようである[20]。その他、ヤギ・ヒツジ・ウマ・ウサギ・絶滅危惧種（ジャガー・トラ・ユキヒョウなど）に由来するiPS細胞の作出が試みられている[16,17,21,22]。特筆すべき点は家畜ES細胞と同様、家畜iPS細胞から子孫を得た例は報告さ

れていないことである。加えて、家畜iPS細胞を作出するときに導入した山中４因子等、外来遺伝子群の発現を消失させてしまうと、家畜iPS細胞は安定して培養できないことである。

Ⅳ．おわりに

現在、ES細胞よりもiPS細胞の方が大きな注目を集めている感があるが、「ES細胞は遺伝子組換え技術を施していない」という特徴があり、応用面においては大きな長所となる。従って、家畜ES細胞の作出を目指す研究は今後とも継続するだろう。一方、ヒトiPS細胞が開発され、再生医療への応用を目指した臨床研究がスタートした現在においても、ES細胞・iPS細胞に関してまだ判っていないことは多い。ヒトや家畜の“完璧なES細胞・iPS細胞”は、マウスES細胞・iPS細胞の作出方法・培養方法では作り出すことができない。マウスとヒト・家畜の間にあるこの違いの実態は不明である。

とはいえ、ヒントはある。マウスはその扱いやすさ・産仔数の多さ・世代交代の早さゆえ、哺乳動物モデルとして発生学や医学の進歩に貢献してきた。例えば、胚発生プロセスにおける遺伝子発現状況はマウスで詳細に調べられ、転写因子と遺伝子の活性化との関連が明らかにされてきた。マウスにおいて得られた知識は他の動物種でも大方はあてはまるのだろうと思われていた。ところが技術が進歩し、実際にヒトやその他の動物種の胚発生プロセスが調べられ、様子の違いがわかってきた。筆者の目には、マウスにおける遺伝子発現状況は“きれいすぎる”ように見える。例えば、ES細胞の分化多能性維持に必須であり、山中４因子のメンバーでもある転写因子Oct4の発現部位は、マウス胚では見事に内部細胞塊に限局される。一方、ウシ胚・ブタ胚では胎盤前駆細胞でも認められる。つまり、遺伝子の発現部位についてマウスでは非常に理解しやすくきれいであり、まるで“模範解答”を見るようである。とはいえウシ胚・ブタ胚は、子宮内ではバランスよく胚発生が進行する。ところが培養皿でES細胞・iPS細胞を樹立しようとするとバランスを崩してしまい、うまくゆかない。

ヒトや家畜の“完璧なES細胞・iPS細胞”をつくり出すためには、その動物種の遺伝子発現状況に見合った培養方法、すなわち、低分子・酵素阻害剤やサイトカイン類を見出す必要がある。そのような都合のよい物質が存在するかは定かではないが、昨今の研究開発の勢いからすると時間の問題でみつかるのではないかと思われる。“iPS細胞づくり”という実験操作は、慣れてしまえば何度でも、わりと手軽にチャレンジできる。「iPS細胞は遺伝子組換え技術により人工的に作り出したES細胞である」ことを考えると、“iPS細胞づくり”で培養方法を見出し、その研究成果を“ES細胞づくり”に応用するのが“完璧なES細胞・iPS細胞”をつくり出す早道ではないかと予測している。

謝　辞

本稿を投稿する機会をいただきました、秋田県立大学名誉教授 稲元民夫先生に感謝申し上げます。

引用文献

1）Evans M.J. and M.H. Kaufman (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, Nature, 292. 154-156.
2）Thomson J.A., J. Kalishman, T.G. Golos et al. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92. 7844-7848.
3）Thomson J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science, 282. 1145-1147.
4）Buehr M., S. Meek, K. Blair et al. (2008) Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts, Cell, 135. 1287-1298.
5）Brons I.G., L.E. Smithers, M.W. Trotter et al. (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos, Nature, 448. 191-195.
6）Takahashi K. and S. Yamanaka (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell, 126. 663-676.
7）Takahashi K., K. Tanabe, M. Ohnuki et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, Cell, 131. 861-872.
8）Hayashi K., H. Ohta, K. Kurimoto et al. (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells, Cell, 146. 519-532.
9）Hayashi K., S. Ogushi, K. Kurimoto et al. (2012) Offspring

from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice, Science, 338. 971-975.
10) Liao J., C. Cui, S. Chen et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells, Cell stem cell, 4. 11-15.
11) Li W., W. Wei, S. Zhu et al. (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors, Cell stem cell, 4. 16-19.
12) Yu J., M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, Science, 318. 1917-1920.
13) Rais Y., A. Zviran, S. Geula et al. (2013) Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency, Nature, 502. 65-70.
14) Sasaki K., S. Yokobayashi, T. Nakamura et al. (2015) Robust in vitro induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells, Cell stem cell, 17. 178-194.
15) Carter M.G., B.J. Smagghe, A.K. Stewart et al. (2016) A primitive growth factor, NME7AB , is sufficient to induce stable naive state human pluripotency ; reprogramming in this novel growth factor confers superior differentiation, Stem Cells, 34. 847-859.
16) Ezashi T., Y. Yuan and R.M. Roberts (2016) Pluripotent stem cells from domesticated mammals, Annu Rev Anim Biosci, 4. 223-253.
17) Malaver-Ortega L.F., H. Sumer, J. Liu et al. (2012) The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates, Theriogenology, 78. 1749-1762.
18) West F.D., S.L. Terlouw, D.J. Kwon et al. (2010) Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring, Stem Cells Dev, 19. 1211-1220.
19) West F.D., E.W. Uhl, Y. Liu et al. (2011) Chimeric pigs produced from induced pluripotent stem cells demonstrate germline transmission and no evidence of tumor formation in young pigs, Stem Cells, 29. 1640-1643.
20) Kawaguchi T., T. Tsukiyama, K. Kimura et al. (2015) Generation of naive bovine induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factors, PloS one, 10. e0135403.
21) Honda A. and A. Ogura (2017) Rabbit models for biomedical research revisited via genome editing approaches, J Reprod Dev, in press.
22) Tancos Z., C. Nemes, Z. Polgar et al. (2012) Generation of rabbit pluripotent stem cell lines, Theriogenology, 78. 1774-1786.
23) Tanaka S., T. Kunath, A. Hadjantonakis et al. (1998) Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4, Science, 282. 2072-2075.

プロフィール

神奈川県横浜市出身
昭和59年３月　帯広畜産大学畜産学部卒業
昭和61年３月　帯広畜産大学大学院畜産学研究科修士課程修了
平成２年３月　群馬大学大学院医学研究科博士課程修了（医学博士、内分泌研究所［現・生体調節研究所］）
平成元年４月～平成３年３月　日本学術振興会特別研究員（於・群馬大学内分泌研究所、農水省畜産試験場）
平成３年４月～平成８年９月　森永乳業(株)生物科学研究所　研究員
平成８年10月　秋田県立農業短期大学・同短期大学部・助教授
平成12年４月　秋田県立大学生物資源科学部・助教授／准教授
平成25年４月　秋田県立大学生物資源科学部・教授（応用生物科学科　動物分子工学研究室）
研究テーマ：哺乳動物の発生学、ヒト・齧歯類以外の動物種における“完璧なiPS細胞”の作出