

疾患特異的iPS細胞ライブラリーの構築と難病研究への応用

浅香 勲 (iPS細胞研究所 教授)



おはようございます。iPS細胞研究所から来た浅香です。

私がお話しさせていただくテーマは「疾患特異的iPS細胞ライブラリーの構築と難病研究への応用」ということで、本日お話しさせていただく内容は、ここに示すような感じですが、最初にiPS研究所に来るまでの経緯について簡単に説明させていただきたいと思います。

私の生まれは1959年で東京都大田区で生まれました。当時、大田区は小さな町工場がたくさんあって、映画になった『三丁目の夕日』のような光景で、幼少期は小児喘息があって虚弱でよく熱を出していましたが、幼稚園に上がる前に父親に安い顕微鏡を買ってもらい、近所のどぶ川から採取した水の中にいるゾウリ虫などを観察して、実験観察に興味を持つようになりました。

これは、iPS細胞研究所に支援者から寄贈された手塚治虫のキャラクターを描いた複製画ですが、当時、『鉄腕アトム』がテレビでは放映が始まりまして、その後、成長に従って『ブラックジャック』ですとか、これらの作品に刺激を受けて成長しました。

そして、自分が虚弱で病院の世話になることも多かったため、医療系の職を目指して北里大学の薬学部に入學しました。当時は、2015年にノーベル賞を受賞されました大村智先生が微生物薬品製造学の教室におられて、北里大学の薬学部は微生物をはじめとして、動物、植物ともに培養技術を用いた研究が盛んだったと思います。

1986年に何とか大学院の修士課程を卒業し、いったん専門学校の講師に着いた後、その後、民間企業であります、当時は岩城硝子と言っていた現AGCテクノグラス株式会社に入社しました。その会社は、理化学研究用の製品を販売しており、数少ないパイオ関連製品のメーカーでした。ここにありますが、細胞培養をするための容器、プラスチック製の容器です。こういったものを生産している会社です。

いろいろな製品開発をする中で、2001年に京都大学、今のウイルス・再生医学研究所の中辻教授と末盛准教授によって樹立されたカニクイザルのES細胞を研究市場

Center for iPS Cell Research and Application (CIRA)

略歴

1959年
東京都大田区生まれ

1984年
北里大学薬学部製薬学科卒業

1986年
北里大学大学院薬学研究科
修士課程修了

1988年
滋慶学園東京医薬専門学校
生命工芸技術科 講師

1989年
岩城硝子株式会社(現AGCテクノ
グラス株式会社)入社

1994年
博士(薬学)取得

昭和58年度北里大学薬学部卒業アルバムより

AGCテクノグラス会社車内より

に普及させるため、両先生にES細胞の技術の指導を受けながら、凍結保存法等関連する培養技術の開発に携わりました。

当時は、ヒトやサルの多能性幹細胞の培養は、従来法では継代や凍結保存が困難で、維持も毎日培地交換をしないとすぐ分化してしまったりするため、とても大変でしたが、凍結保存法を開発して、研究用製品として販売にこぎつけることができました。

現在、iPS細胞を利用した再生医療を研究している先生の多くは、ヒトES細胞を使用する前にカニクイザルのES細胞を再生医療研究の材料として使用されており、山中先生とはそのころに知り合いました。

そして、2007年に山中先生らによってiPS細胞の樹立が報告され、それまでは海外の研究者から大きく後れていた日本の幹細胞の研究が一気に加速されました。

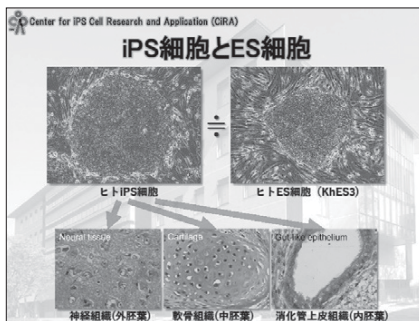
最初に報告されたヒトiPS細胞は、この図にありますように、レトロウイルスベクター、ベクターというのは「運び屋」というもののなのですが、ウイルスを運び屋としたものの中に初期化因子と呼ばれる遺伝子、これはOCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYCという4つの遺伝子で、細胞の若返りに関する遺伝子を導入して発現させることによって樹立されました。

冒頭にお見せした手塚治虫のキャラクターの中に、1970年に放映された『ふしぎなメルモ』というキャラクターが描かれておりましたが、彼女が持つ赤と青のキャンデーは、赤を食べると10年若返り、青を食べると10年年をとるというような設定でしたが、今にして思えば、初期化因子は、いわばメルモの赤いキャンデーと同じような効果を持つ遺伝子群といえると思います。

ヒトiPS細胞は、この図のように、ES細胞と形もよく似ており、生産する特異的なたんぱく質の状態もES細胞と同様でした。

また、マウスの胎内にiPS細胞を移植しますと、テラトーマと呼ばれる良性の腫瘍組織を形成しますが、その中には、このように神経系の組織ですとか、軟骨の組織だとか、消化器系の組織が形成され、ES細胞とほぼ同等の多分化能を有していることが確認されました。

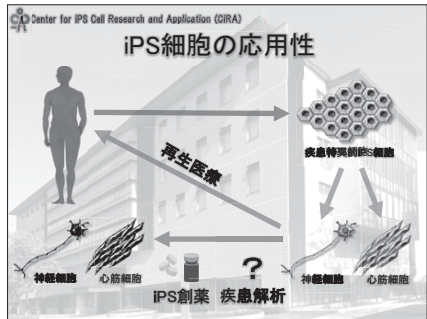
日本では、研究に使うことに高いハードルがあったヒトES細胞に替わる研究材料が開発



され、医療応用に向けたオールジャパンの研究体制の構築が推進されるようになりました。当時、iPS細胞研究所では、まだヒトの多能性幹細胞を培養できる人材は、それほど多くなかったことから多方面から人材を集めており、私も2008年よりiPS細胞研究所、当時はセンターでしたけども、に入所しました。

さて、ここから、きょうの本題であります疾患特異的iPSの説明をしたいと思います。

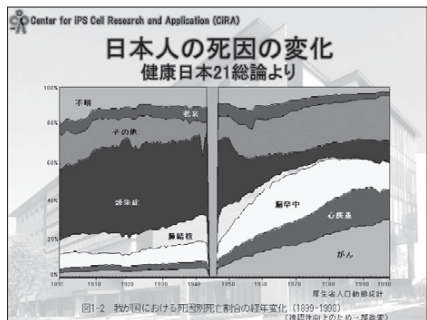
先ほどご説明したとおり、およそ11年前からヒトiPS細胞の医療応用の研究が始まったわけですが、iPS細胞は成長したヒトの組織や細胞から作ることができ、そしてたくさん増やせて、さらに体のあらゆる細胞や組織に分化させることができるため、これを患者さんに戻す再生医療への応用がニュースなどでもよく取り上げられています。



ですが、もう一つ有用な応用法としては、iPS細胞は、先ほどお話ししたように、細胞の時間を巻き戻すことができる技術ですので、このような難病の患者さんから取った組織から樹立したiPS細胞を分化させて、その組織で病変を再現することによって、その病気がどのようにして発生するかを解明したり、またその病変を予防したり、回復させる薬の探索を行うことができます。

このように、ある病気の要因をそのまま持って樹立されるiPS細胞を疾患特異的iPS細胞と呼んでいます。

疾患特異的iPS細胞のような技術がなぜ必要になったのかという背景の一つがこの図ですが、大体1900年代、1960年ぐらいまでの日本人の死因の大半は感染症ですとか、これは結核も入りますけど、そういったものが主流でした。



北里大学の太村先生は、この抗生物質関係の開発に力を注がれ、多くの医薬品を開発しましたが、その結果もあって、その後、感染症での死亡率が下がると、それに代わってこういう生活習慣病といわれる病気ですとか、それから癌、あるいは、その他に分類される死因による死亡率が高くなってきました。

癌にしても、生活習慣病にしても、さらにその他に分類されるような認知症や他の難病も、感染症とは違ってヒトの細胞や組織で起こる病変のため、感染症の原因菌のように治療の対象が明確に区別できませんでした。

ヒトの細胞や組織で病変が起こった場合、そこから細胞や組織を取り出しても、その組織をたくさん増やすことも困難ですし、部位によっては取ること自体もできない。例えば、脳とか心臓は勝手にその組織を採取することはすごく難しいのですが、そういった理由で、病変が起こった組織を使って薬を開発するということは困難でした。

しかし、病変と関係ない健全な組織からiPS細胞を作って、そして病変の組織へ分化することで、その病変の発生を抑える薬を数多く試すことができるようになります。

疾患特異的iPS細胞は、このような従来、方法がなかった疾患について有用な研究材料となります。

このような有用な研究材料となる疾患特異的iPS細胞をできるだけ多くの疾患で早期に樹立して研究者に提供するため、疾患特異的iPS細胞用の難病の研究プロジェクトが約10年前から京都大学で始まりました。

私は、当時、今もそうですが、基盤技術研究部門という部門に所属しておりますが、研究支援業務として、さまざまな疾患の患者さんの組織から疾患特異的iPS細胞を集約して樹立するとともに、iPS細胞の樹立と培養を中心とした技術の標準化についても検討を進めてきました。

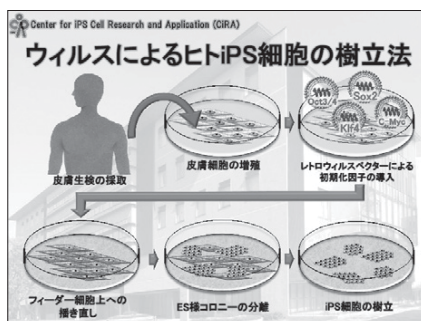
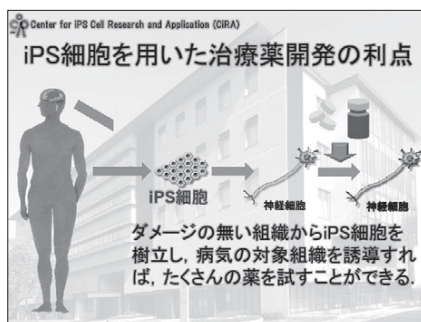
疾患特異的iPS細胞ライブラリーを構築するためには、年齢や性別の異なるた

くさんの材料を用いてiPS細胞を樹立するわけですが、もし、樹立工程に使用する技術がいい加減だと、このように樹立されたiPS細胞の品質が一定の範囲内におさまらず、もしかするとiPS細胞の性質の一部を失った細胞ができる可能性も考えられます。

従って、材料が変わっても一定の品質の範囲内におさめられるように、樹立にかかわる技術において、きっちり管理する管理点を明確に決める必要があり、そのような活動を標準化するといいます。数多くの疾患特異的iPS細胞のライブラリーは、このように標準化された技術によって樹立されました。

ここからは、疾患特異的iPS細胞を樹立するための実際の手順について説明させていた

だきたいと思います。



皮膚から細胞を取って、ウイルスベクターにより初期化因子を導入して出てきたコロニーを分離して樹立していました。

このスライドは、実際に患者さんの腕から皮膚を採取しているところですが、このように、円形の丸い刃がついた機具を使って丸く切開した後、円形の皮膚片をハサミで切りとって培養液に入れて実験室に持ち込みます。

傷口は、一針縫合して1週間後に抜糸します。実験室では、皮膚片をさらに細かく切り分け、そして培養容器に均等に置いて、培養液を注入して、約3週間培養を行います。

細胞は、このように皮膚片から外に成長していきます。この場合は、最初に表皮細胞が少し出てくるのですが、実験に使うのは、その後から出てくる線維芽細胞と呼ばれる細長い細胞です。これが大体3週間ぐらいすると、急激に増えて容器いっぱいになります。

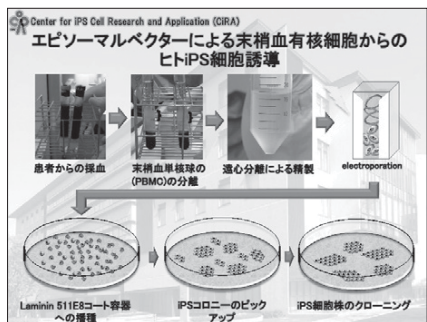
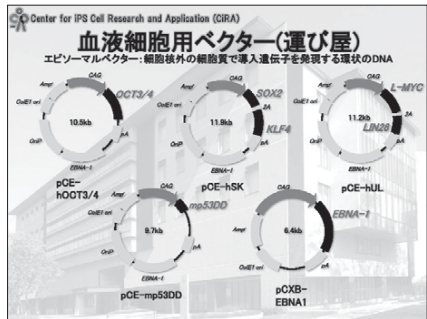
このような感じで、容器いっぱいになった増殖のよい細胞にウイルスベクターを使って遺伝子導入をすると、このスライドのように、3週間ぐらいかけて、この細胞とは違う種類のコロニーですね、これができてきますが、これがiPS細胞のコロニーになります。

これが最初の疾患特異的iPS細胞を樹立していた方法ですが、その技術が改良され、麻酔や縫合が必要な皮膚由来の細胞ではなくて、あまり増殖はよくないけれども採取が簡単な血液細胞用のiPS細胞がつくれるベクターが開発されました。

このベクターにも初期化因子と呼ばれる遺伝子が組み込まれています。このベクターは、一時的に細胞に取り込まれて発現するだけで、iPS細胞になってしまうと、このベクター自体は消えてしまいますので、後の実験に影響を及ぼすことはありません。

このスライドは、先ほどのベクターを用いて血液からiPS細胞を樹立する工程を示したのですが、血液には赤血球や血小板のような核を持たない細胞群と、白血球のように核を持っている細胞群が生まれていますので、これを分離精製して、核を持っている細胞だけ集めて遺伝子導入します。

このとき細胞懸濁液を機械に入れて、直流の高電圧で細胞の膜に一部穴をあけて、先ほどのベクターを導入します。その後の培養は、ウイルスのときと同じように、コロニーが



出てきたものを分離して樹立していくわけです。

このスライドは、実際の手順の動画ですが、このように血液が入ったチューブを遠心分離します。終わりますと、先ほど上層にあった赤血球とかは底のほうに沈んで、この領域に核のある細胞が残りますので、そこだけを分離します。これはヒトの検体ですので、この辺は慎重に取り扱う必要があります。

上部は血漿になりますけれども、大事な部分はこの半透明に濁った領域で、そこから細胞を取ります。

こうやって細胞をきれいに回収して、このとき上層の血漿等も若干まざりますので、少しきれいにするために緩衝液を1回加えて、再度遠心分離して細胞を集め直します。

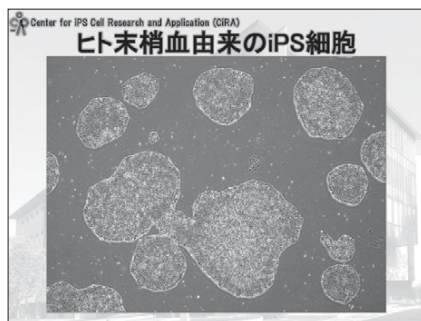
一応細胞は、この中に入っています。今浮遊している状態ですが、遠心分離して下に落とすことで精製されます。ちょっとこれは見えないですが、底のほうに薄くたまっているのが有核細胞です。

この細胞がどのぐらい取れたかというのを測定するためにサンプリングしまして、機械で測定するためのチャンバーにサンプルを導入します。このように、細胞を入れて機械でカウントするわけです。細胞数に応じて希釈した適切な濃度の細胞を1回培地にまいて、1週間ほど前培養を行います。前培養が終わって1週間後の状態がこういう状態ですが、この状態の細胞を集めまして、今度は、ある程度有核細胞がきれいにそろった状態で細胞を集めます。

これに先ほど示したベクターで遺伝子導入するのですが、まず最初に、このときの細胞数がどのぐらいあるかというのを数えるので、先ほどと同じように機械で細胞をカウントします。このときは大体60万個ぐらいがあって、遺伝子導入に適切な濃度に希釈して遠心分離します。

集めた細胞の上清を除いて、先ほどのベクターが入った溶液と細胞を混合し、その混合液を遺伝子導入の機械にかけるため、電極がついたチャンバーの中に入れます。大体これで行っている量は数百マイクロリットル、0.2ミリリットルとか0.1ミリリットルとか、そんな量ですが、その少ない量で行います。機械に入れて、自動的に直流の高電圧をかけて穴をあけて、その後回収して、新しい培養液が入った容器に播種します。

播種が終わりましたら、いったん観察するのですが、このときの状態は細胞膜に穴があいてありますので、ちょっと浮遊したような状態ですが、インキュベーターに入れて培養を開始して、おおむね6日ぐらいますと、このようにコロ



ニーらしきものが出てきまして、10日する
とある程度の大きさになります。大体2週
間ぐらい培養して、コロニーが拾えるぐら
いになります。

前培養1週間と、それからiPS、遺伝子導
入をして2週間ですので、当初の樹立法より
も約半分の時間でiPS細胞が樹立できるよ
うになっています。そして、さらに増殖も
このように、おおむね7日から8日で数十倍
から100倍程度増えるようになっています。

このような方法でいろいろな患者さんの
サンプルからiPS細胞を樹立した結果がこ
のスライドですが、サンプルを提供いた
だいたドナーが大体688名、そして実際樹立
に至った症例数が403症例で、基本的に一
つの疾患で複数症例のiPSを樹立しており
ますので、疾患数としては243疾患がプロ
ジェクトの中でできました。これらを理研
のバイオリソースセンターにある細胞バン
クに寄託したところです。

このスライドは少し小さくて見にくいのですが、理化学研究所のバイオリソースセン
ター細胞バンクの、疾患特異的iPS細胞ライブラリーのページです。この表は、2月末時点
で提供可能になった疾患特異的iPS細胞の表ですが、疾患数としては231、患者数は
742人、細胞株が今の時点で3080株が提供可能になっているという状況です。

では、疾患特異的iPS細胞の利用法について具体例を少しお話ししたいと思います。

きょう説明させていただく疾患は、FOPと呼ばれる病気です。FOPという病気はどの
ような病気かということですが、日本語で進行性骨化性線維異形成症といいます。英語で
Fibrodysplasia Ossificans Progressivaと呼ばれるので、頭文字をとってFOPと呼ばれて
います。

この病気は患者数が少なく、国内で40から70例、世界でも約700例という希少疾患であり
ますが、幼少から頻発する炎症や痛みを伴う腫脹と、それからそれに続いて筋肉など骨が
通常できないところで、このように骨化が起こります。進行すると、体が動かせなくなるよ
うな大変重篤な病気、患者数も少ないため、これまで有効性の確認された治療は存在し
ませんでした。

初めてFOPのiPSを樹立したのは、ほぼ9年前でしたが、当時は、先ほどお見せしたよ

Center for iPS Cell Research and Application (CIRA)

疾患特異的iPS細胞樹立拠点実績 (2012~17年プロジェクト終了時)

- ドナーリクルート数: 688件
- 樹立症例数: 403症例
- 樹立疾患数: 243疾患
- 樹立株数: 2,427株

順次理化学研究所バイオリソースセンターへ寄託



Center for iPS Cell Research and Application (CIRA)

疾患特異的iPS細胞ライブラリー

疾患名	症例数	患者数	株数
疾患特異的iPS細胞	231	742	3080

疾患数 231疾患
患者数 742人
株数 3080株

理研iPS細胞材料開発室 http://cell.brc.riken.jp/ja/hps/hps_diseaselist_index

うな皮膚からiPSをつくる方法でしたので、検体を採取するだけでも症状が悪化する恐れがあって、失敗は許されない状況でした。緊張しながら、それでも何とか皮膚の細胞からiPS細胞を樹立し、数株を戸口田先生らのグループにお渡ししました。

戸口田研究室の池谷先生が、お渡ししたFOPのiPSを用いて骨が形成される条件で培養を行うと、健常人のiPS細胞よりも骨の形成能の高いことが証明されました。このスライドは、骨形成条件で培養した細胞の石灰化というか、カルシウムが固まった状態が染められているのですが、黒く染まった部分が石灰化した領域で、FOPのiPS細胞から作った細胞は骨になる条件では、健常人よりも圧倒的に骨になる能力が高いのです。こうして、iPS細胞を使うことによって、この病気の症状である骨ができやすい現象が再現できました。

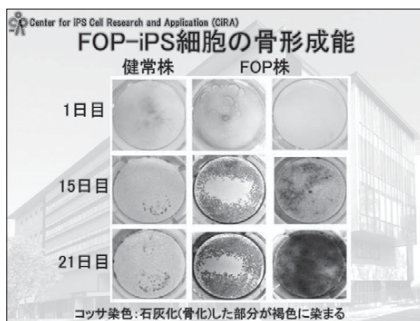
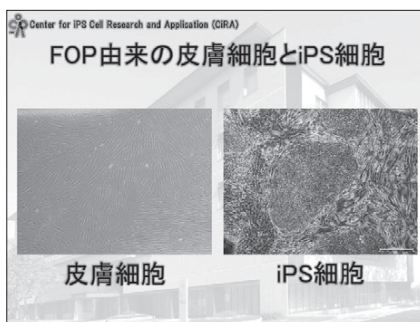
その後、戸口田先生らは複数のFOPの患者のiPS細胞を使い、さらに詳細な病気のメカニズムを解明しました。

そして、最終的にいろいろな薬の中から、ラパマイシンという薬がこの症状を抑制する可能性があることが見出されたため、この表にあるように、2017年の8月からラパマイシンを用いた医師主導の治験が始まっております。

ほかにも、この表にあるように、疾患特異的iPS細胞を用いた治療薬開発には、このように候補物質が発見されたものですか、FOP以降も治験に至っているものとかいろいろ出てきております。

ただ、先ほどお見せしました疾患特異的iPS細胞ライブラリーは230疾患以上ありますので、それらがさらに応用され、難病治療薬の開発がさらに促進されることを願わずにはいられません。

これは、最後のスライドになります。今回のシンポジウムのコンセプトが「京大曼荼羅」



Center for iPS Cell Research and Application (CiRA)

疾患特異的iPS細胞による治療薬開発例

発表年月	疾患名	候補薬物	開発段階	遺伝性疾患 or 通常疾患	研究機関
2012年6月	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	アナカルジン酸	候補物質発見	遺伝性疾患	CiRA
2014年9月	軟骨無形成症	スタテン	候補物質発見	遺伝性疾患	CiRA
2016年11月	脊髄小脳変性症	リルゾール	候補物質発見	遺伝性疾患	理研(CDB)
2017年5月	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	ボスチープ	候補物質発見	通常疾患	CiRA
2017年8月	進行性骨化性線維異形成症(FOP)	ラパマイシン	医師主導治験	遺伝性疾患	CiRA
2017年11月	アルツハイマー病	プロモクリプテン +クロモリン +ドピラマート	候補物質発見	通常疾患	CiRA
2018年4月	Pandred症候群	シロリムス	医師主導治験	遺伝性疾患	慶応大学
2018年10月	パーキンソン病	T型カルシウムチャネル阻害剤	候補物質発見	遺伝性疾患	慶応大学
2018年12月	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	ロビニロール塩酸塩	医師主導治験	通常疾患	慶応大学

ということではなく、また、私自身が特定の宗教を信仰しているわけでもないのですが、iPS細胞研究所に来て、この仕事をするようになって以来、毎年1月の早い時期に東寺の本尊である薬師如来を参拝するようにしております。

なぜかというと、薬師如来は大医王とか呼ばれる医学の仏様というだけでなく、阿弥陀如来とか他の仏様のような、極楽に行ってからとか、あるいは来世で苦しみを解放するというようなのではなくて、薬師如来だけが現世において苦しみを解放するという功德をお持ちの仏様で、私の仕事で少しでも病気で苦しんでいる人々の役に立てるような仕事であればと思い参拝を続けてきました。

再生医療だけでなく、創薬でも、ようやく成果が出つつあるiPS細胞技術ですが、今後、さらに利用を促進するために、技術の標準化や普及、及び人材育成に資する活動を進め、iPS創薬や再生医療により少しでも多くの難病患者の方の回復に寄与できるような活動を続けていきたいと考えております。

そして、時間を巻き戻すiPS細胞の技術によって、リカバブルな社会、これは取り返しのつく再挑戦可能な社会という意味ですが、そのような社会の実現をしていくことを夢として今後も仕事を続けていきたいと思っております。

きょうの内容については、これらの先生方のご協力をいただいた仕事です。

ご清聴ありがとうございました。