

再生医療を目的とした 幹細胞研究の歴史 (ES細胞, iPS細胞, 組織幹細胞)



Shimane University

島根大学医学部
生命科学講座
松崎有未

今日学んで行ってほしいこと

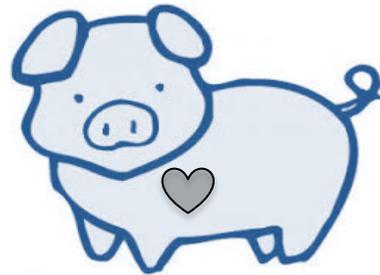
- 「幹細胞」と「体細胞」の違いを理解する
- 幹細胞の種類とそれぞれの特長を理解する
 - ES細胞
 - iPS細胞
 - 組織幹細胞



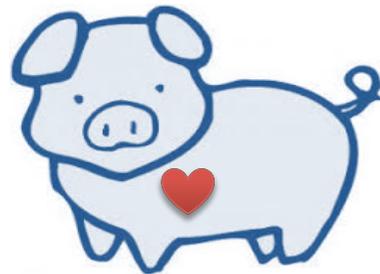
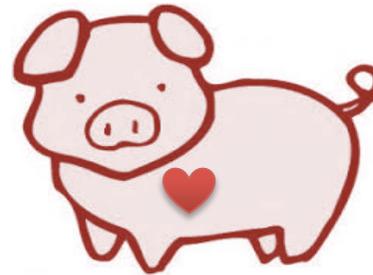
夜露四苦！

再生医療とはなにか？

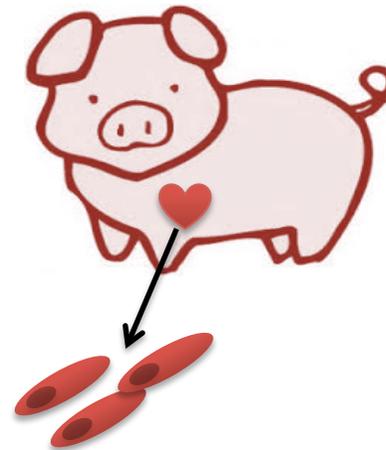
機能不全におちいった臓器を再生させる医療



臓器移植

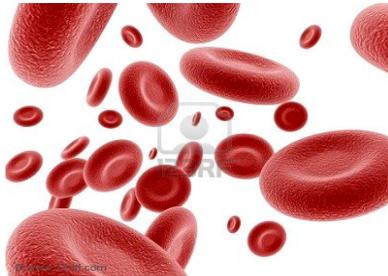


細胞移植



臓器の機能をおぎなう

輸血



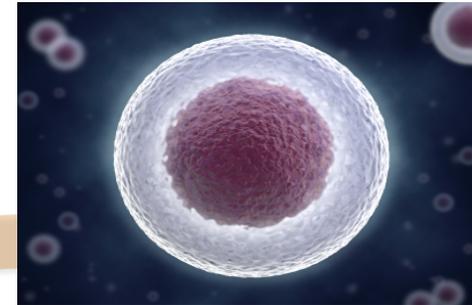
成熟細胞を移入

赤血球寿命は約120日

寿命を迎えると消失

一過性に機能を補う

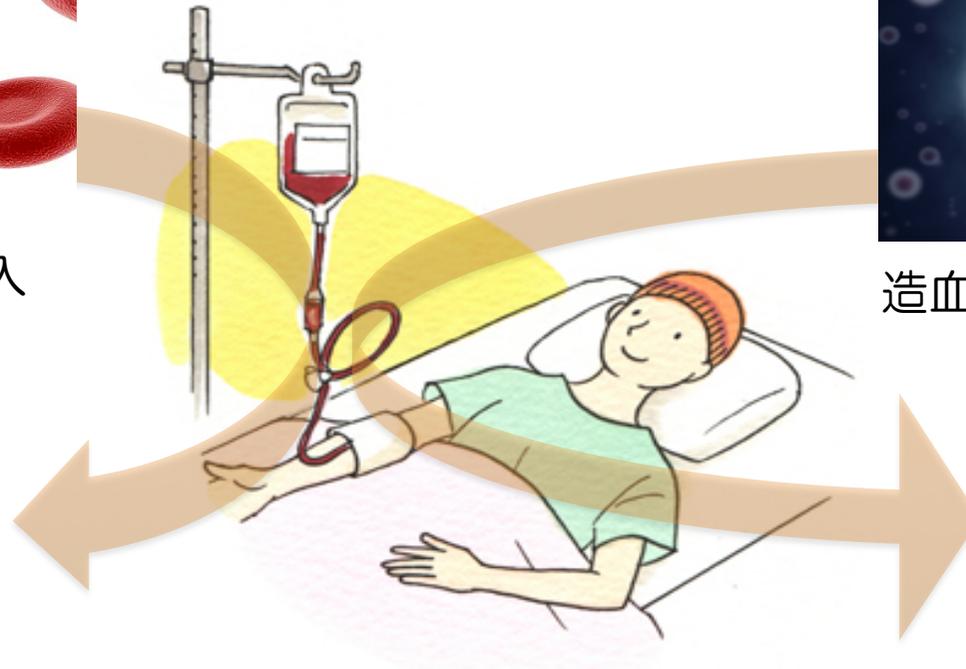
骨髄移植



造血幹細胞を移入

一生にわたって
血液を作り続ける

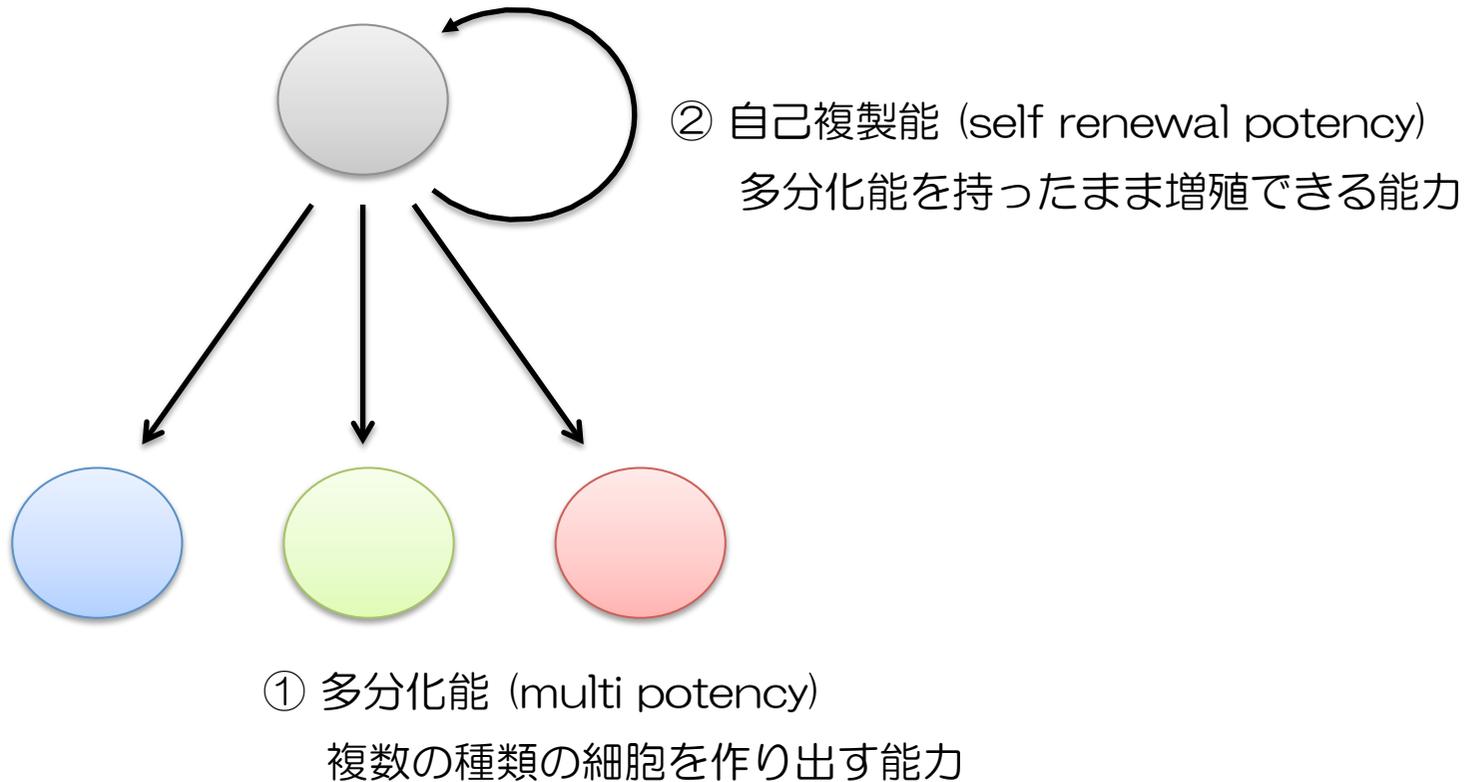
根治治療



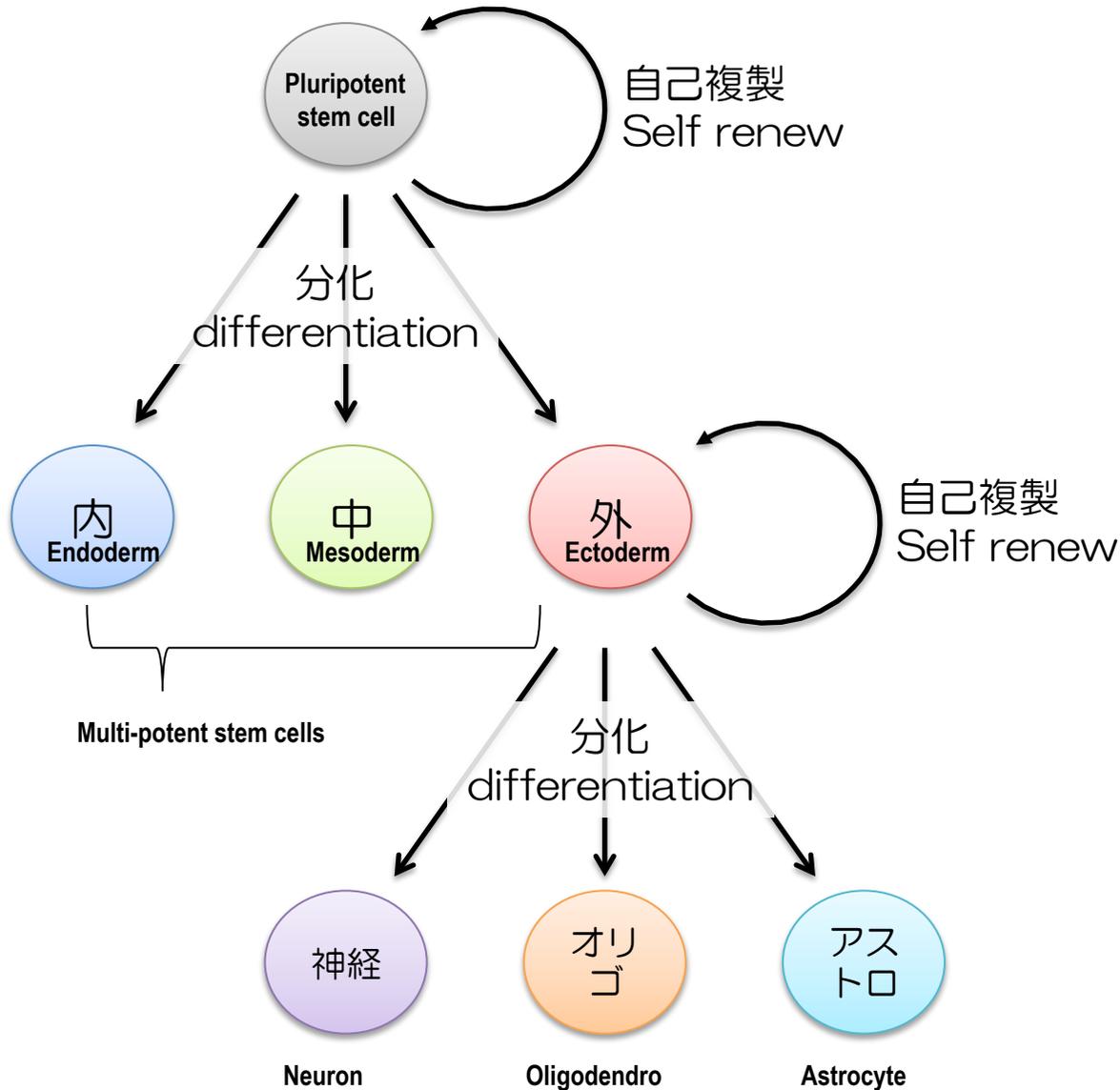
再生医療

幹細胞を移入することによって
治療法の存在しなかった難治疾患を
根本的に治す医療

幹細胞 (Stem Cell) とはなにか？ 定義と性質



幹細胞にも色々あります

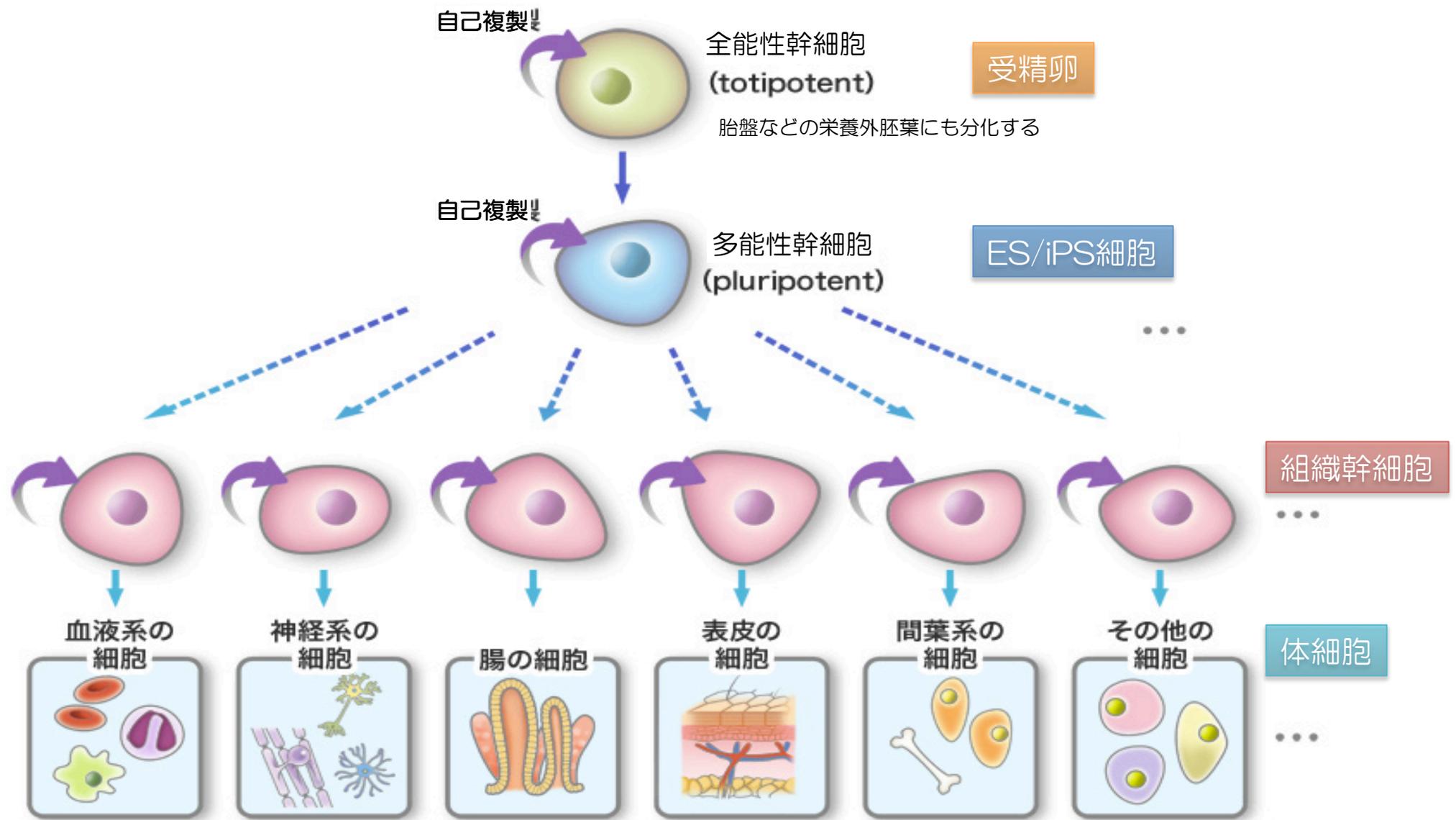


多能性幹細胞
Pluripotent stem cell
すべての細胞に分化可能
(胚葉を越えた分化能を持つ)

例：胚性幹細胞(ES細胞)
iPS細胞

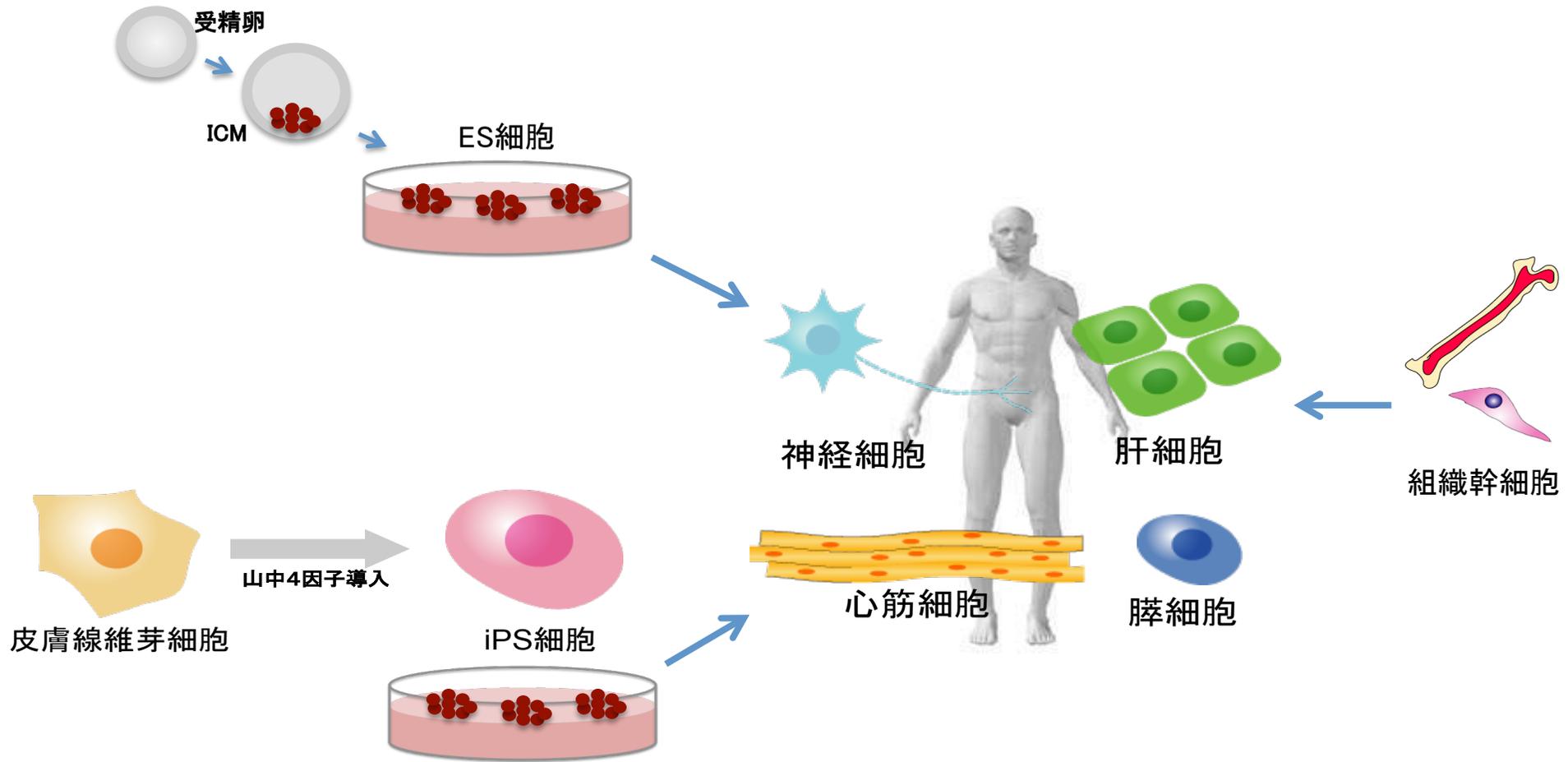
多分化幹細胞
Multi-potent stem cell
複数の種類の細胞に分化可能
(胚葉を越える分化能を持たない)

例：組織幹細胞
体性幹細胞



私達のからだの中には様々な細胞があり、それぞれが別の働きを持つ
 その全てを1個の受精卵が増殖と分化を繰り返して作りだす

再生医療応用が期待される3つの幹細胞



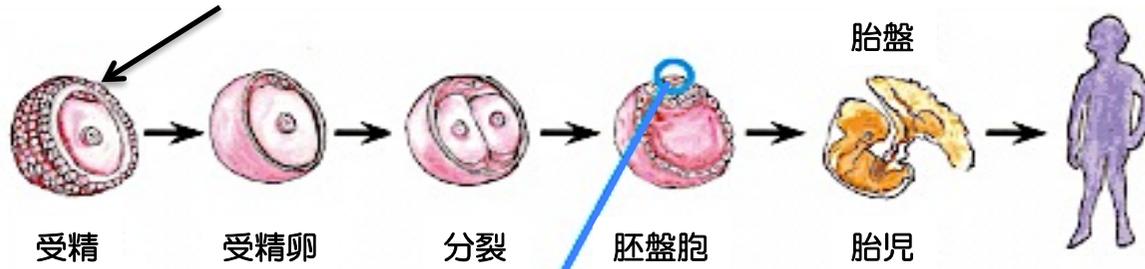
ES細胞

Embryonic Stem Cell

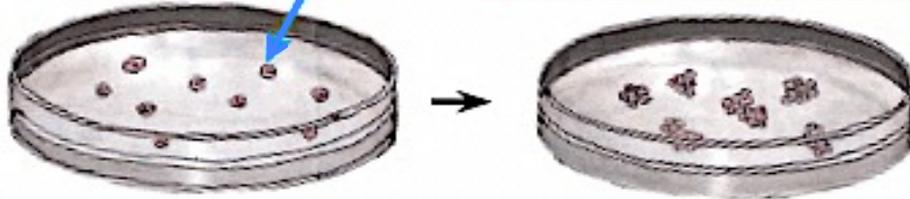


マウスES細胞の樹立

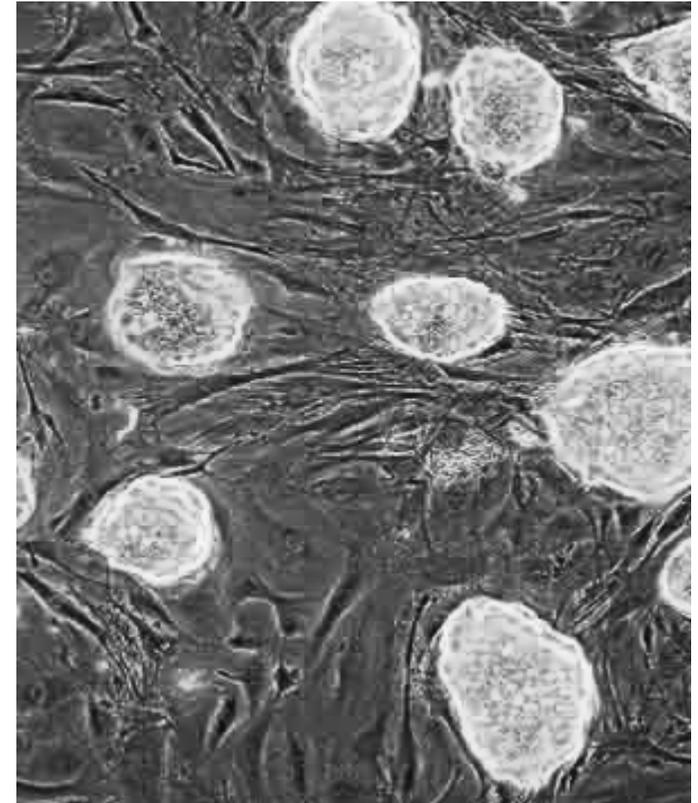
精子+卵子=受精卵



胚盤胞から細胞を取り出し、
特別な条件で細胞を培養する
と...

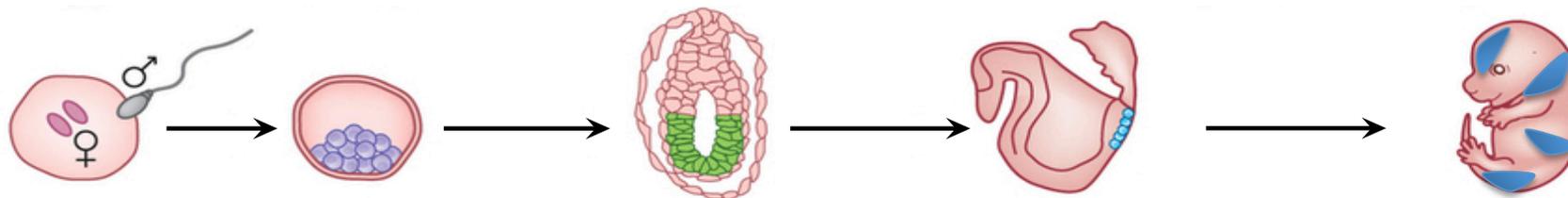
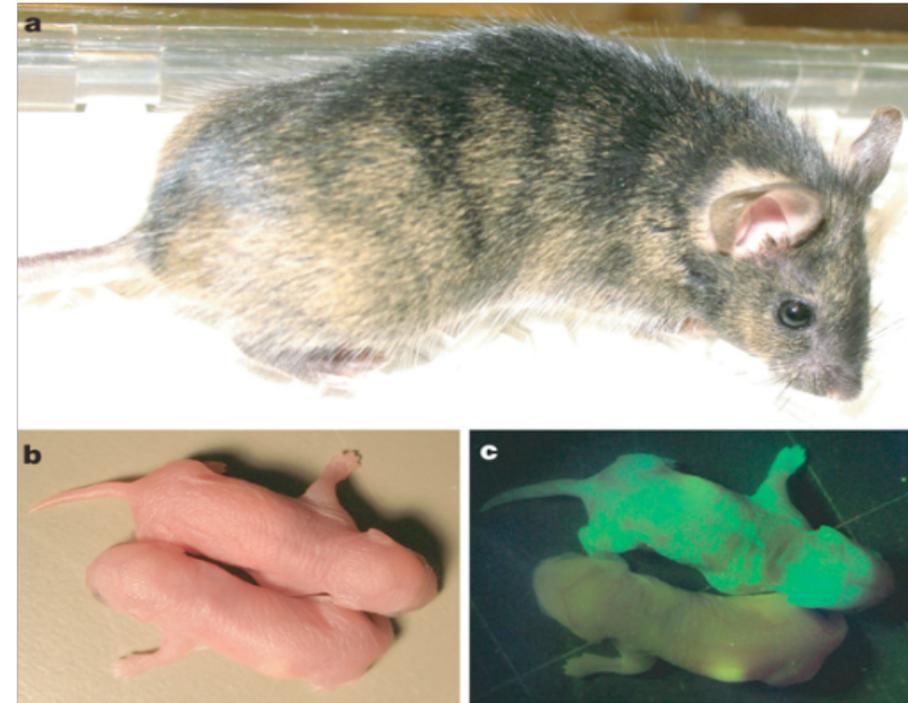
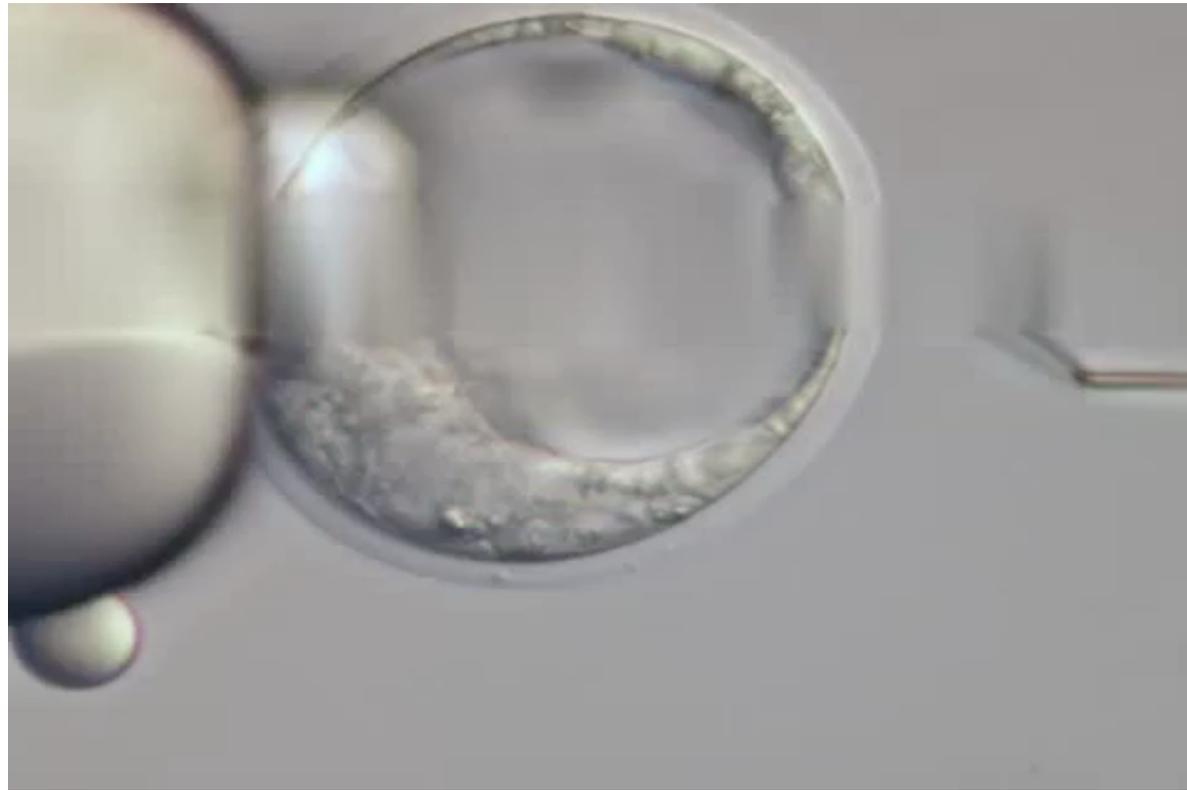


ES細胞が出現！

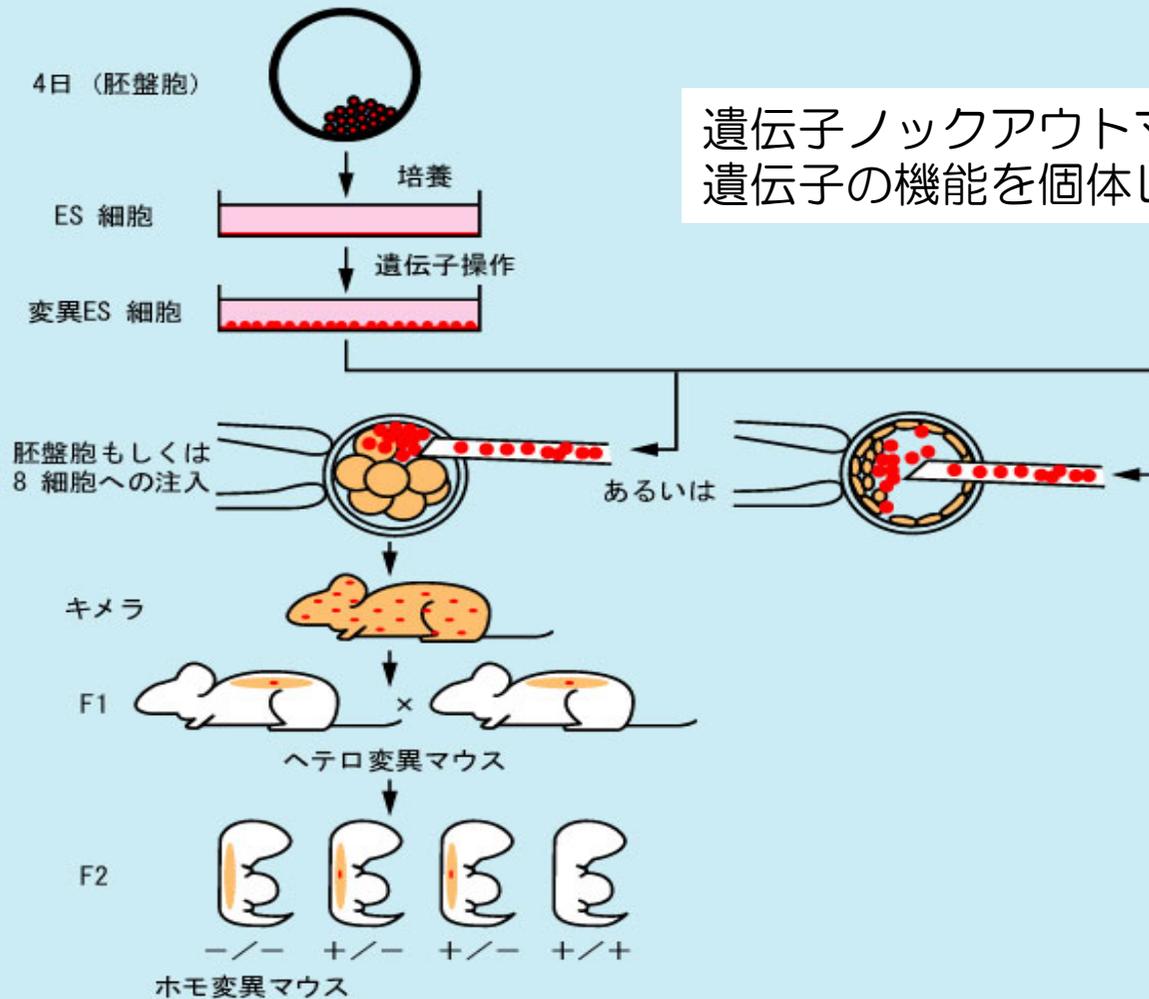


マウスES細胞

ES細胞を受精卵へ移入すると全身の細胞に分化する



ES細胞を用いた遺伝子改変動物の作成



遺伝子ノックアウトマウスが作成できるようになり
遺伝子の機能を個体レベルで検証できるようになった

Sir Martin Evans

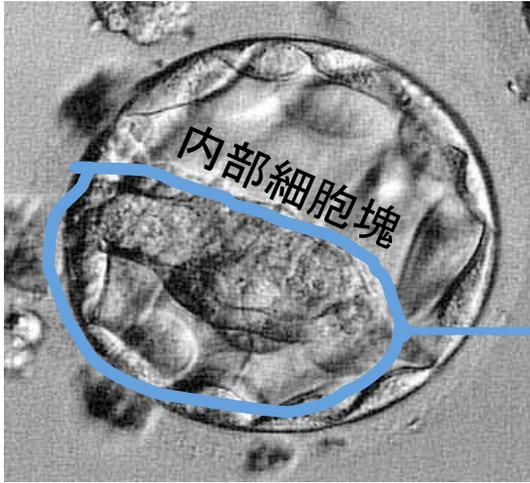


Oliver Smithies
Mario R. Capecchi
とともに2007年
ノーベル医学生理学賞

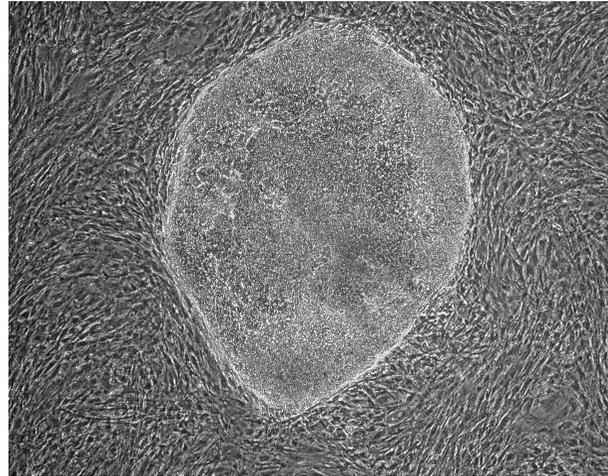
図1 ES細胞を用いた遺伝子変異マウスの作製法

出典：相沢慎一 編、ジーンターゲティング、杏林書院、p.18 (1995)
一部改変

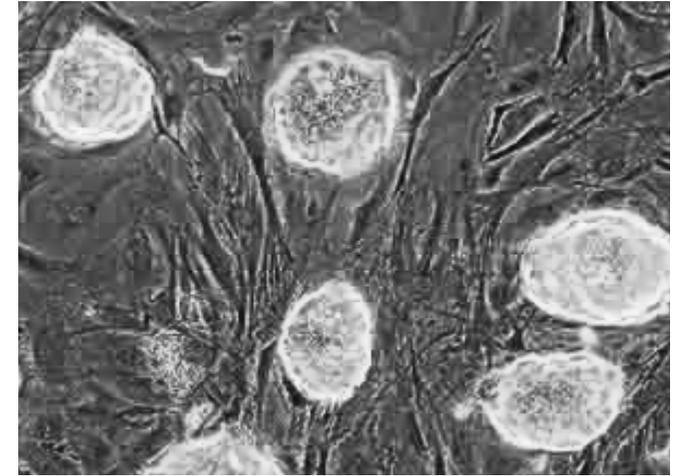
ヒトES細胞の樹立



ヒト5日胚
(胞胚)

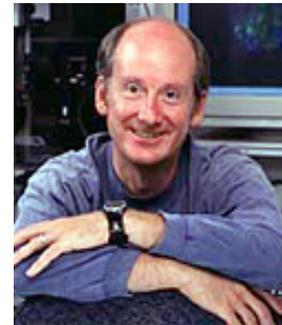


ヒトES細胞



マウスES細胞

ヒトES細胞の樹立
James Thomson (1998)



ここまでのまとめ

受精卵から取り出した細胞を特殊な方法で培養することで、
胚性幹細胞（ES細胞）を作ることができた



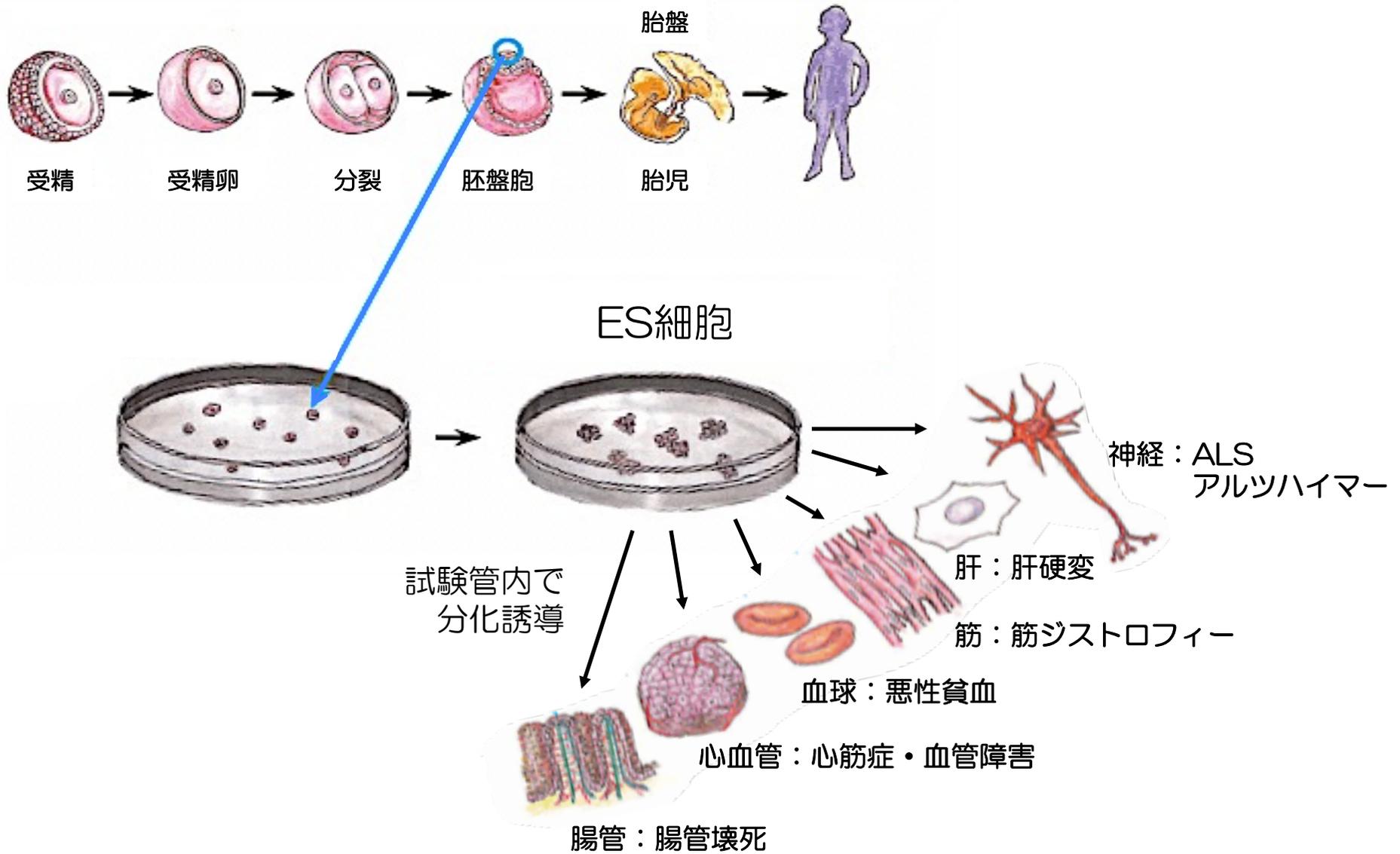
ES細胞は培養条件を整備すれば、無限に増殖させることができる
培養中に遺伝子改変を行うことができる



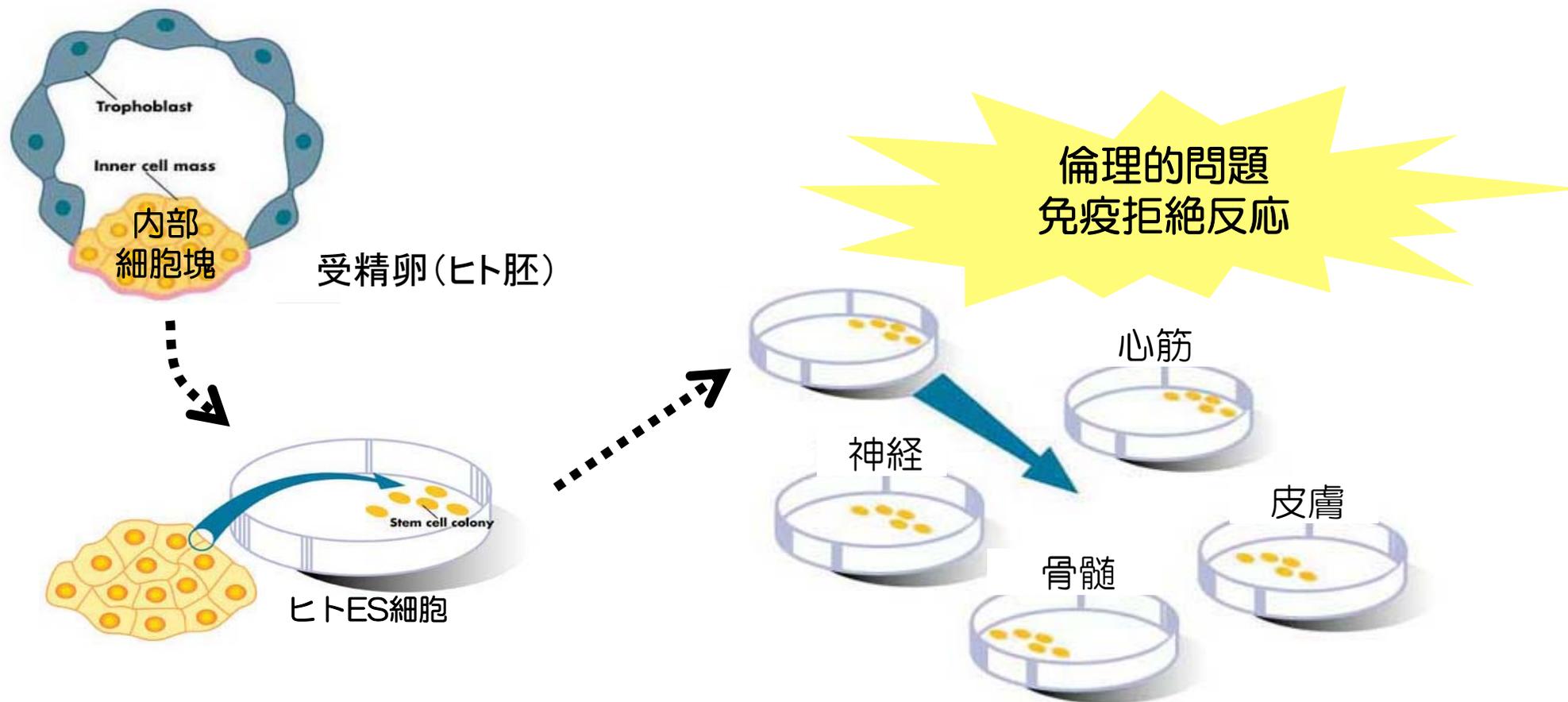
もう一度受精卵に戻せば
身体中の全ての細胞へ分化する能力を持っている

ES細胞を試験管内で色々な細胞へ分化させれば
移植に使えるのでは？

ES細胞の多能性を再生医療に応用する

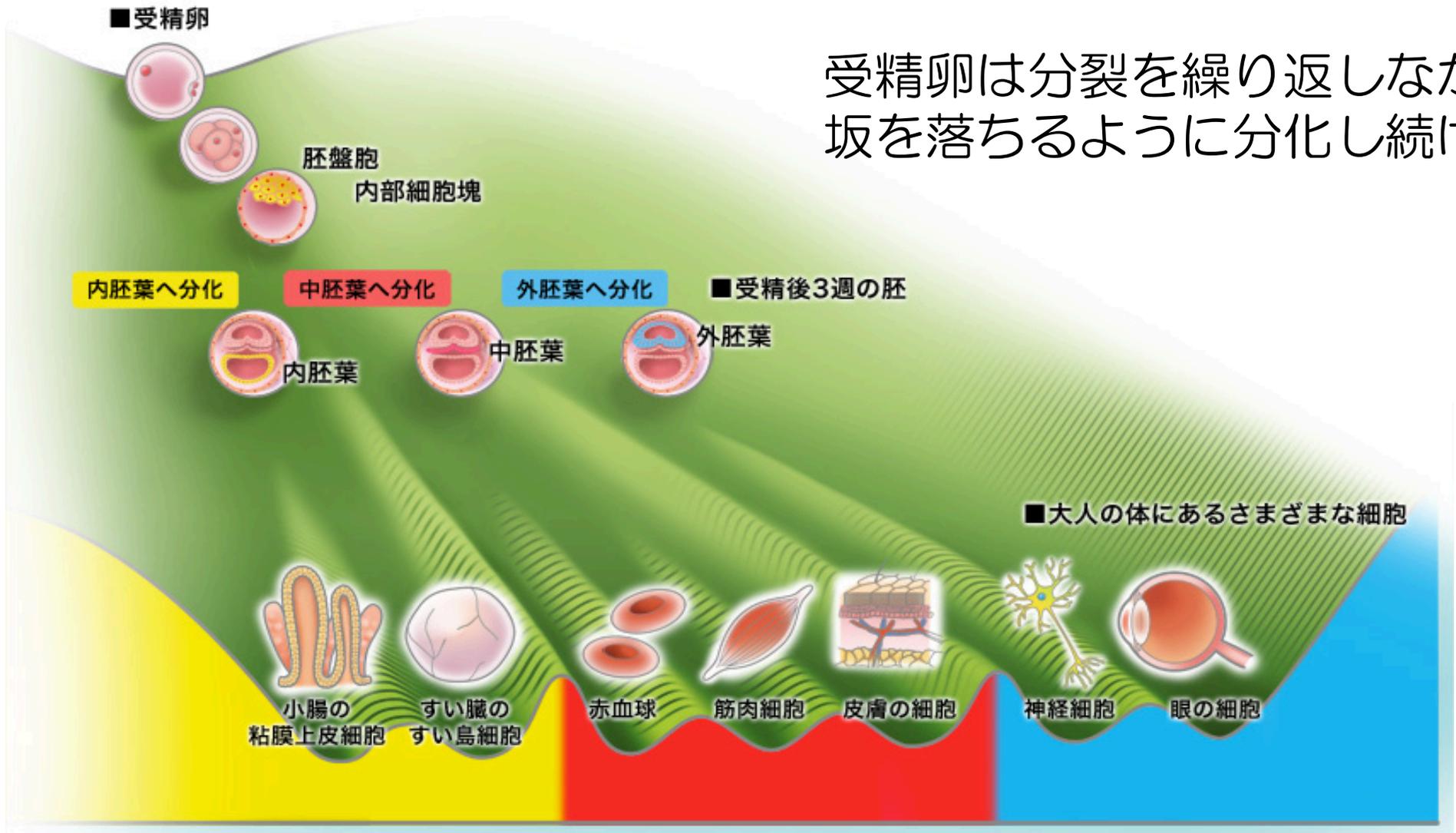


ところが！ ヒトES細胞を移植に使うには問題が…



体細胞からES(と同じ性質を持つ)細胞は作れない？

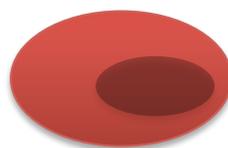
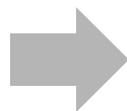
受精卵は分裂を繰り返しながら坂を落ちるように分化し続ける



ヒトは受精卵の分裂と分化によってかたちづくられる



受精卵



体細胞（神経・心臓・肝臓など）

DNA (ゲノム)の配列（遺伝情報）は全く同じ

しかし、RNAの発現パターンは異なる

タンパクの発現パターンも異なる

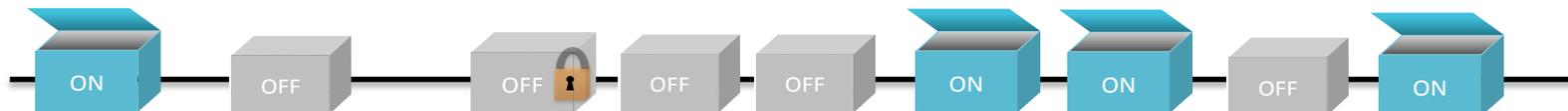
胚発生が進み体細胞へ変化すると共に
受精卵ではONだった遺伝子がOFFになる
一度OFFになった遺伝子はもうONにはならない

遺伝子の発現パターンは 細胞の種類や分化段階によって異なる

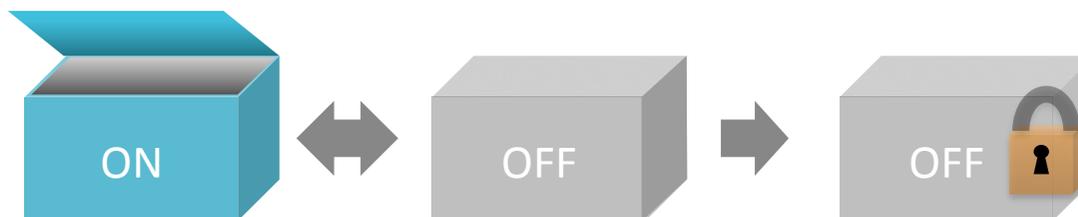
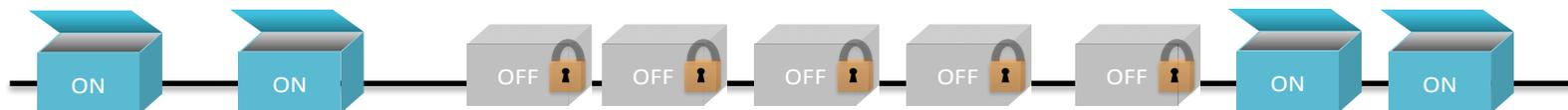
ES細胞



肝幹細胞



肝細胞



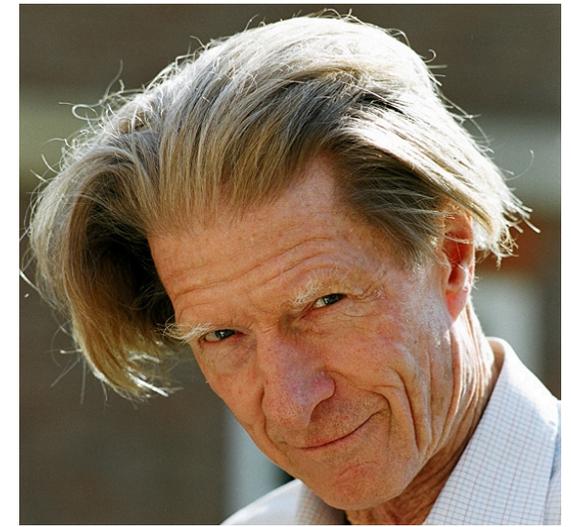
ON/OFFは行き来できるが、鍵がかかると開けなくなる

一度OFFになった遺伝子を
ふたたびONにするれば
体細胞をES細胞レベルまで
戻すことができる？

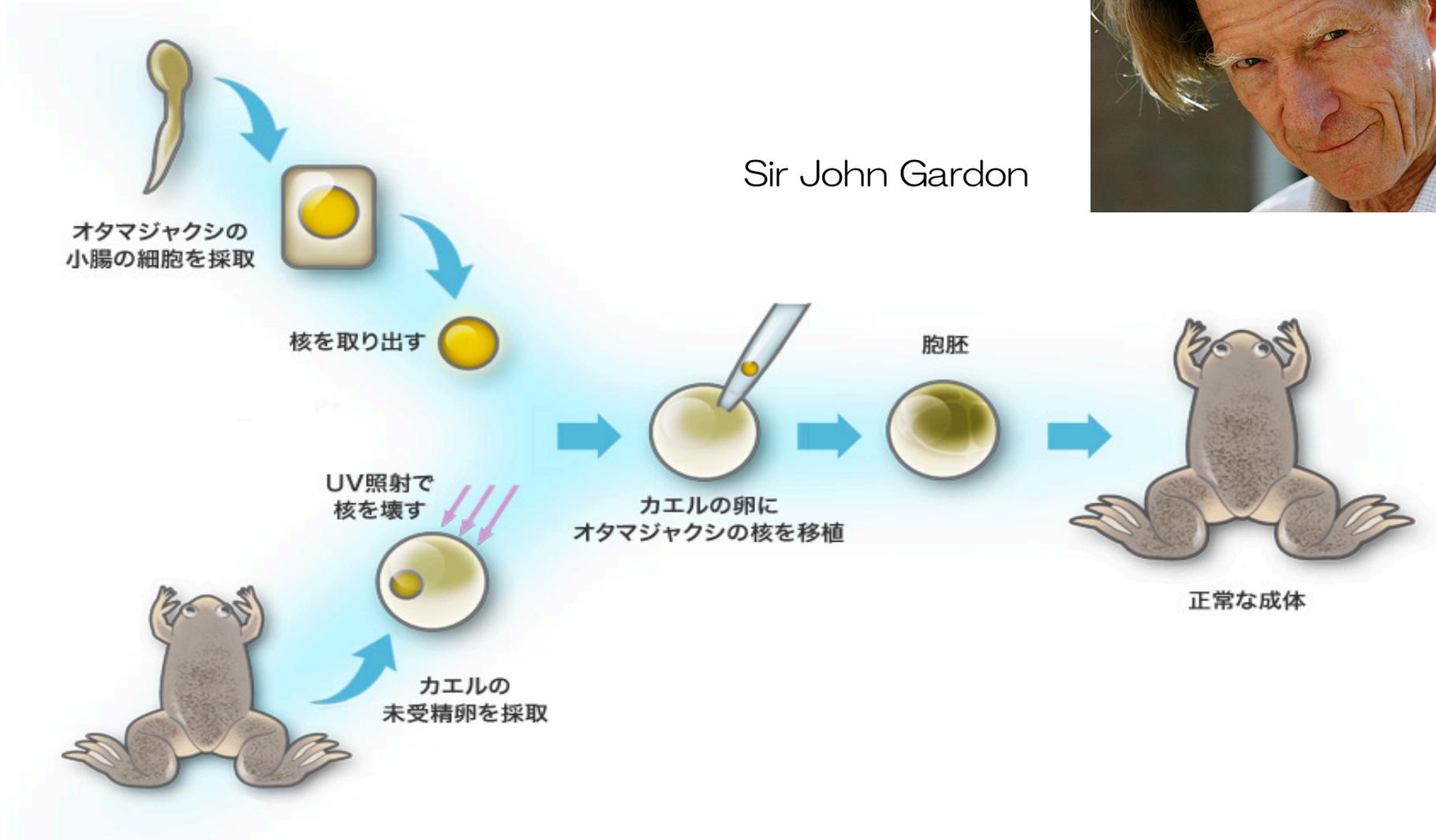


細胞の初期化の方法①

クローン動物



Sir John Gurdon



体細胞の核を移植して 生まれた世界初の クローン脊椎動物

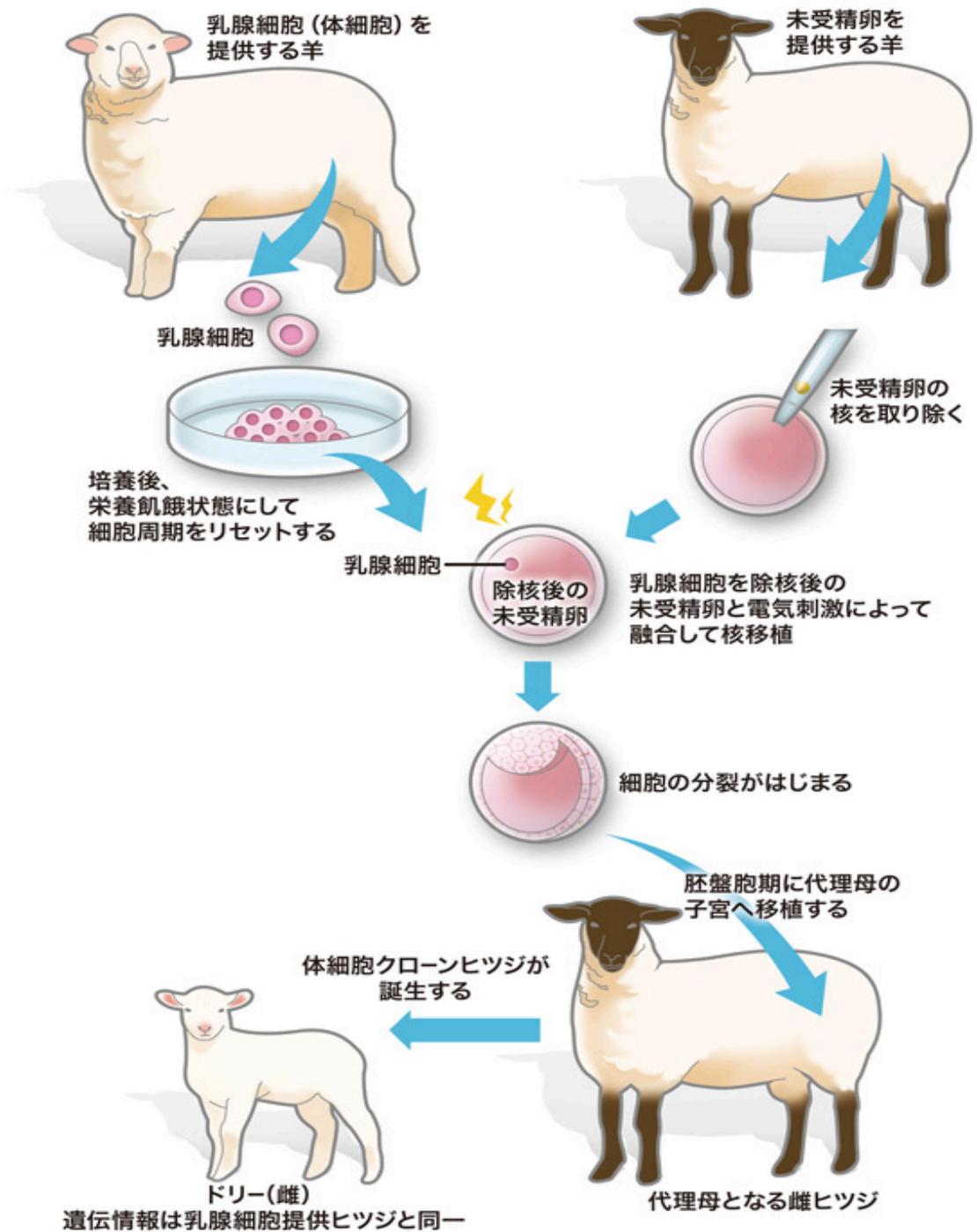
Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line

K. H. S. Campbell, J. McWhir, W. A. Ritchie & I. Wilmut

Roslin Institute (Edinburgh), Roslin, Midlothian EH25 9PS, UK



Nature. 1996



世界初のクローンマウス

Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei

T. Wakayama*†, A. C. F. Perry*‡, M. Zuccotti*§, K. R. Johnson|| & R. Yanagimachi*

* Department of Anatomy and Reproductive Biology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii 96822, USA

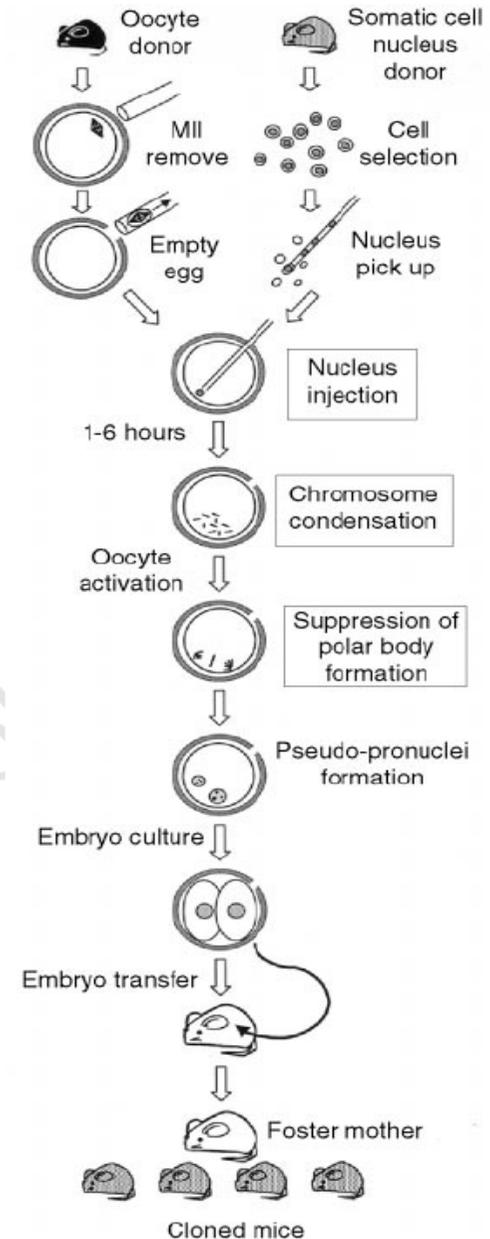
† Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

‡ Department of Signalling, Babraham Institute, Cambridge CB2 4AT, UK

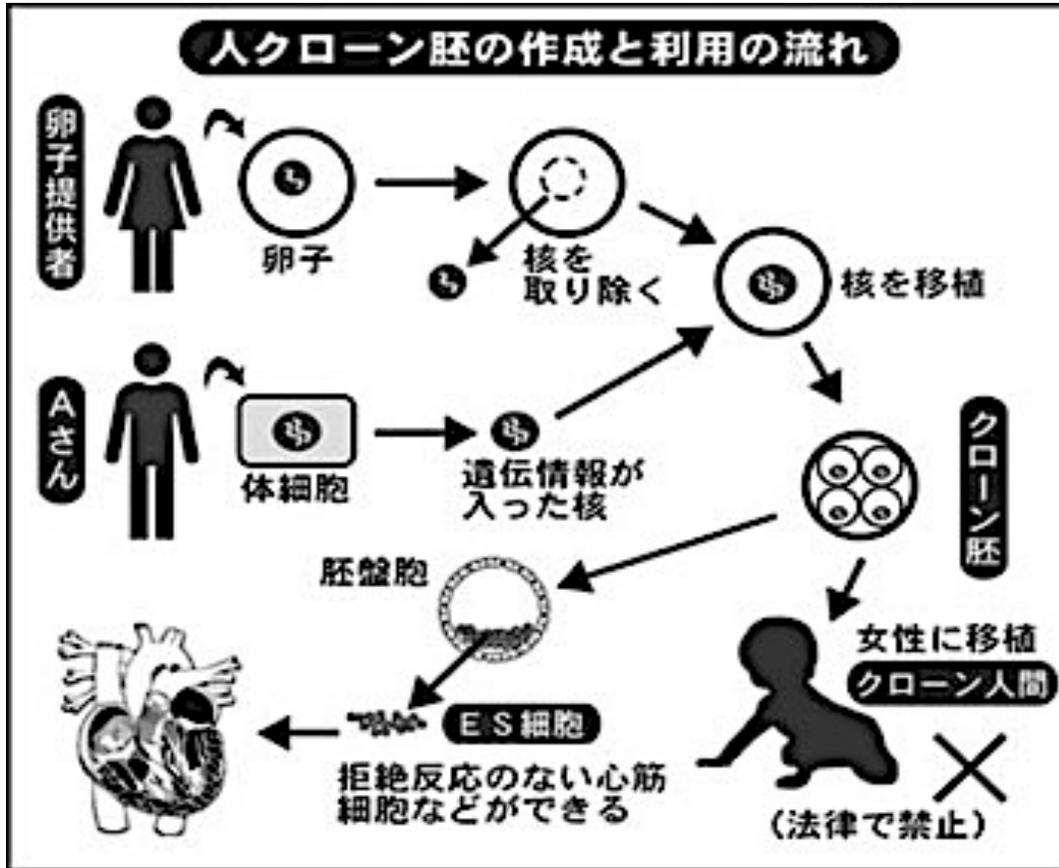
§ Dipartimento Biologia Animale, Laboratorio Biologia dello Sviluppo, University of Pavia, Piazza Botta 10, 27100, Pavia, Italy

|| Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609, USA

NATURE | VOL 394 | 23 JULY 1998



ヒトクローンだって(やれば)作れる



体細胞と同じ遺伝情報を持つES細胞を作成できる

「ほんとうにすごい！ iPS細胞」岡野 栄之（講談社）

Evidence of a Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived from a Cloned Blastocyst

Woo Suk Hwang,^{1,2*} Young June Ryu,¹ Jong Hyuk Park,³ Eul Soon Park,¹ Eu Gene Lee,¹ Ja Min Koo,⁴ Hyun Yong Jeon,¹ Byeong Chun Lee,¹ Sung Keun Kang,¹ Sun Jong Kim,³ Curie Ahn,⁵ Jung Hye Hwang,⁶ Ky Young Park,⁷ Jose B. Cibelli,⁸ Shin Yong Moon^{5*}

Somatic cell nuclear transfer (SCNT) technology has recently been used to generate animals with a common genetic composition. In this study, we report the derivation of a pluripotent embryonic stem (ES) cell line (SCNT-hES-1) from a cloned human blastocyst. The SCNT-hES-1 cells displayed typical ES cell morphology and cell surface markers and were capable of differentiating into embryoid bodies in vitro and of forming teratomas in vivo containing cell derivatives from all three embryonic germ layers in severe combined immunodeficient mice. After continuous proliferation for more than 70 passages, SCNT-hES-1 cells maintained normal karyotypes and were genetically identical to the somatic nuclear donor cells. Although we cannot completely exclude the possibility that the cells had a parthenogenetic origin, imprinting analyses support a SCNT origin of the derived human ES cells.

Science 303,1669 (2004)



ここまでのまとめ

卵子から核を取り除き、体細胞から核を移植するとクローン胚が作成できた



体細胞の遺伝子発現が受精卵とほぼ同じになった
(一度OFFになった遺伝子が受精卵の中でONに変わった)



受精卵など万能性の高い細胞の細胞質に
核を初期化する因子があるのではないか？



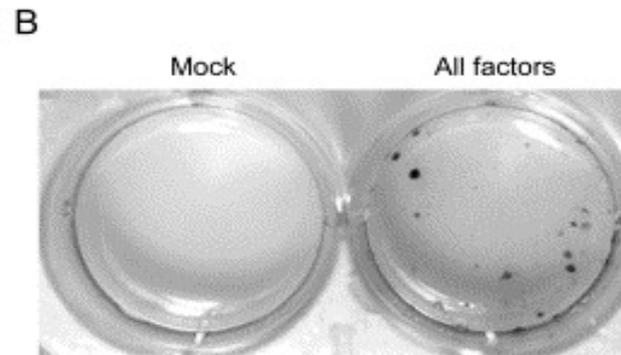
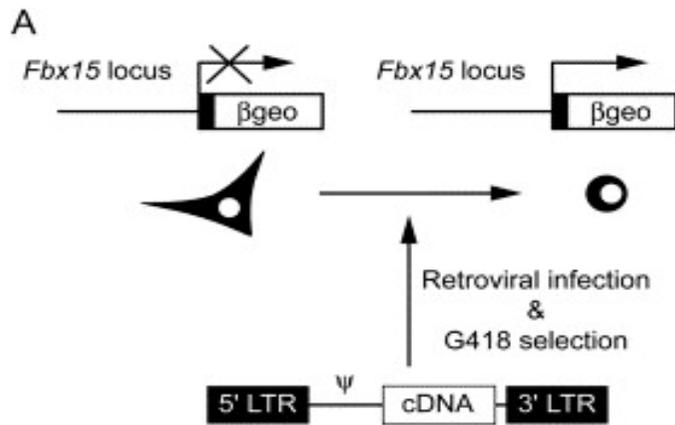
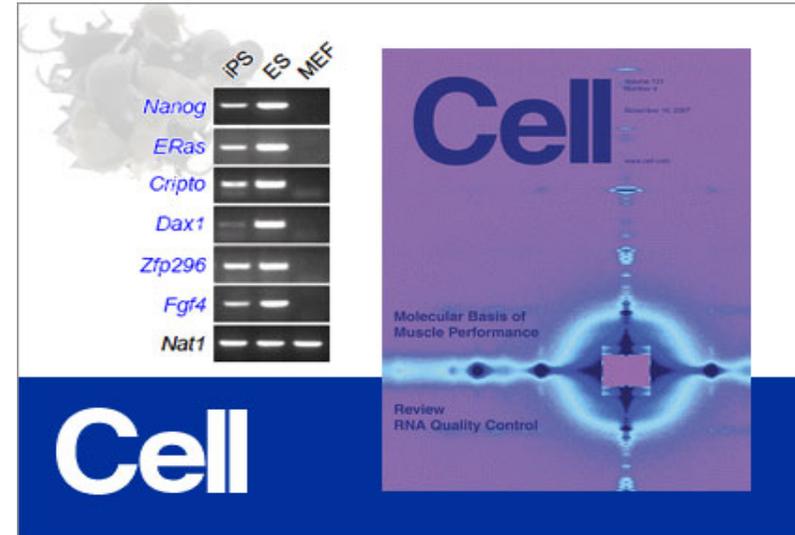
そのような初期化因子を体細胞で人工的に発現させれば
体細胞が受精卵のような多能性をとりもどせるのでは？

iPS細胞

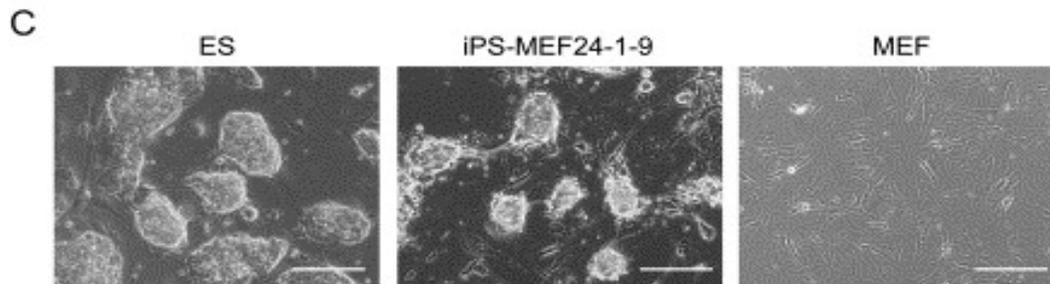
Induced Pluripotent Stem Cell



iPS細胞の発見(2006年)

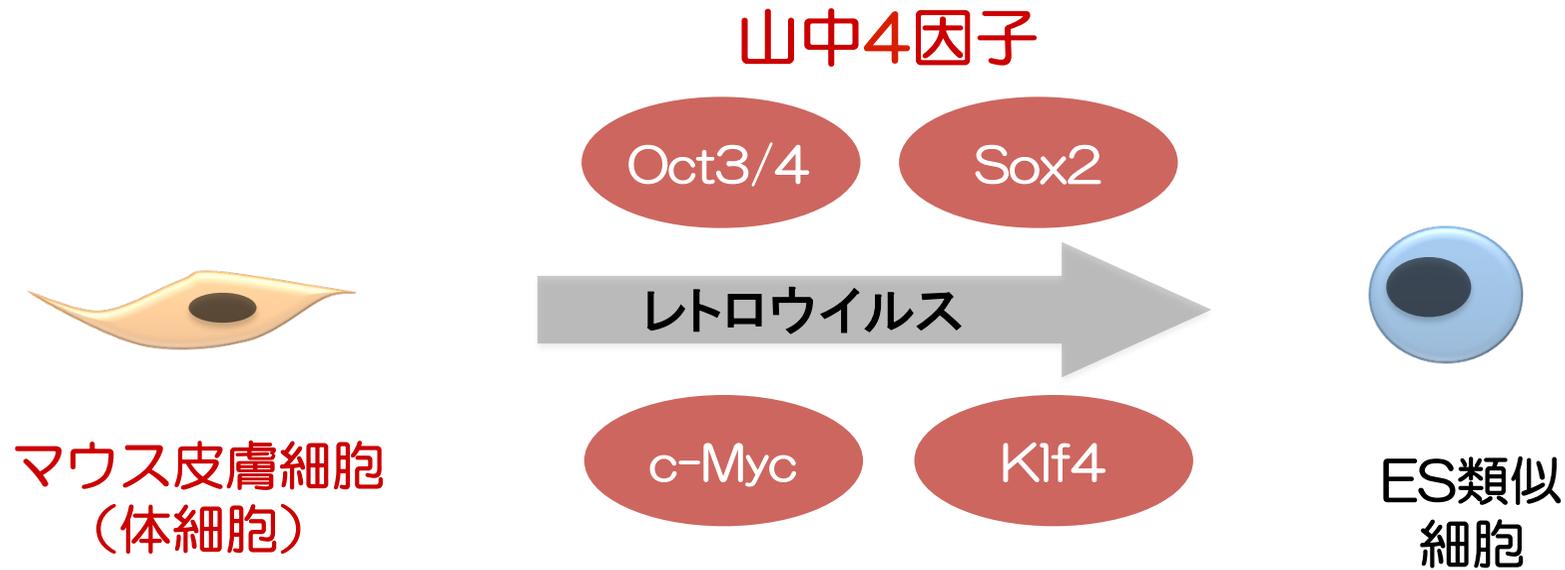


Induced (誘導された)
Pluripotent (多能な)
Stem Cells (幹細胞)



Takahashi K, Yamanaka S.
Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76.

マウスiPS細胞の樹立 2006.8



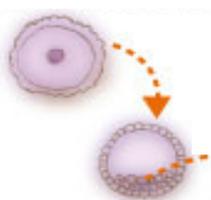
人工多能性幹細胞
iPS細胞
(Induced pluripotent stem cell)

山中4因子は体細胞を初期化（受精卵の状態へ戻す）ための鍵

ES細胞とiPS細胞の大きな違い



受精卵



細胞採取と培養

胚盤胞

ES細胞

Differentiation induction

皮膚線維芽細胞
etc.



山中4因子
and cell culture

iPS細胞

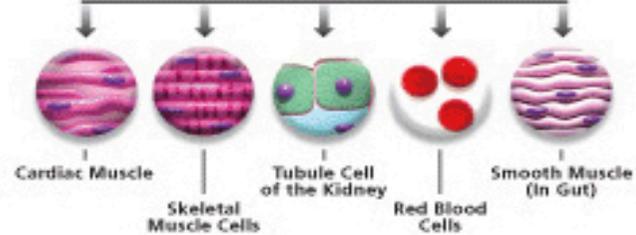


自分と同じ遺伝子を持つ
ES細胞は作れない
免疫拒絶される

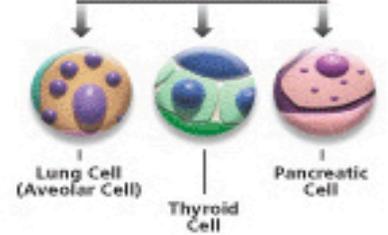
自分と同じ遺伝子を持つ
iPS細胞が作れる
免疫拒絶されない

多能性幹細胞

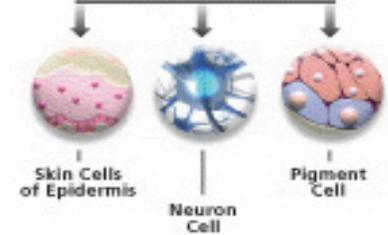
中胚葉性



内胚葉性



外胚葉性



ヒトiPS細胞の樹立

2007年11月・京都大学・山中研

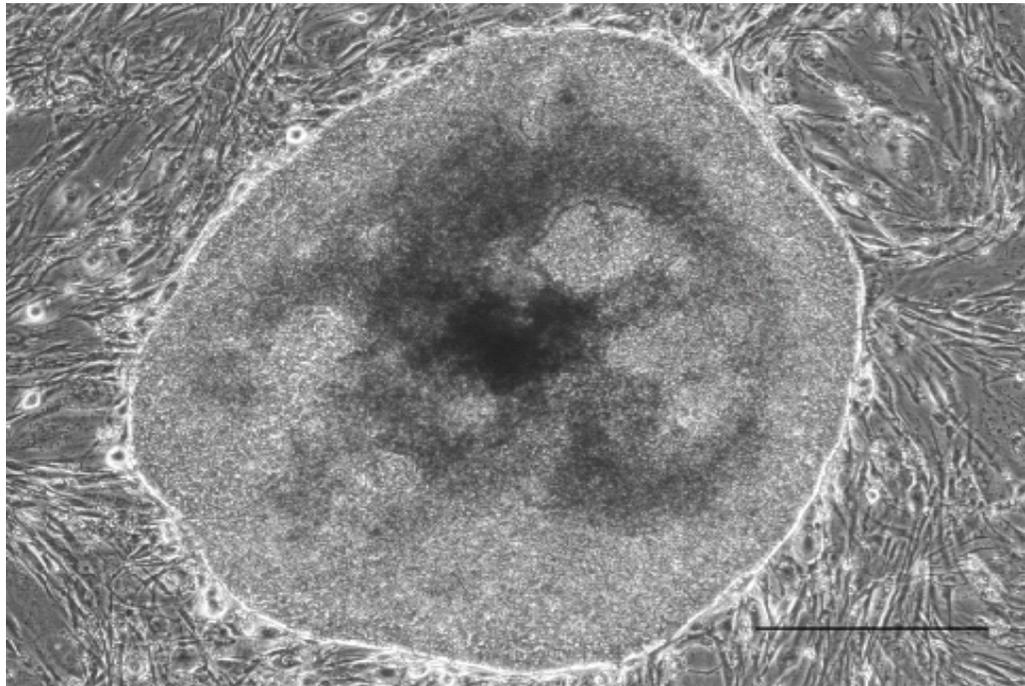
50,000 cells/10 cm dish

Retroviral
transduction

Reseeding
on feeder

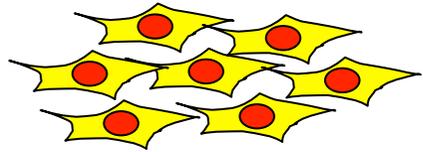
Takahashi et al. Cell, 2007

Colony
picking up



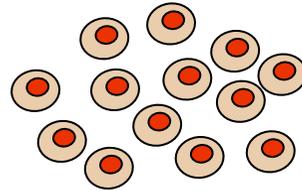
幹細胞による損傷脊髄の再生

皮膚線維芽細胞



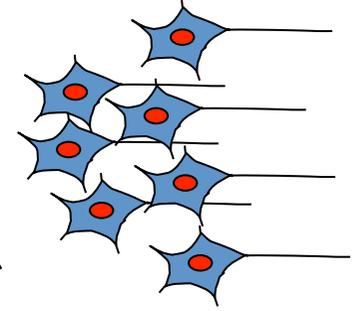
初期化

iPS 細胞



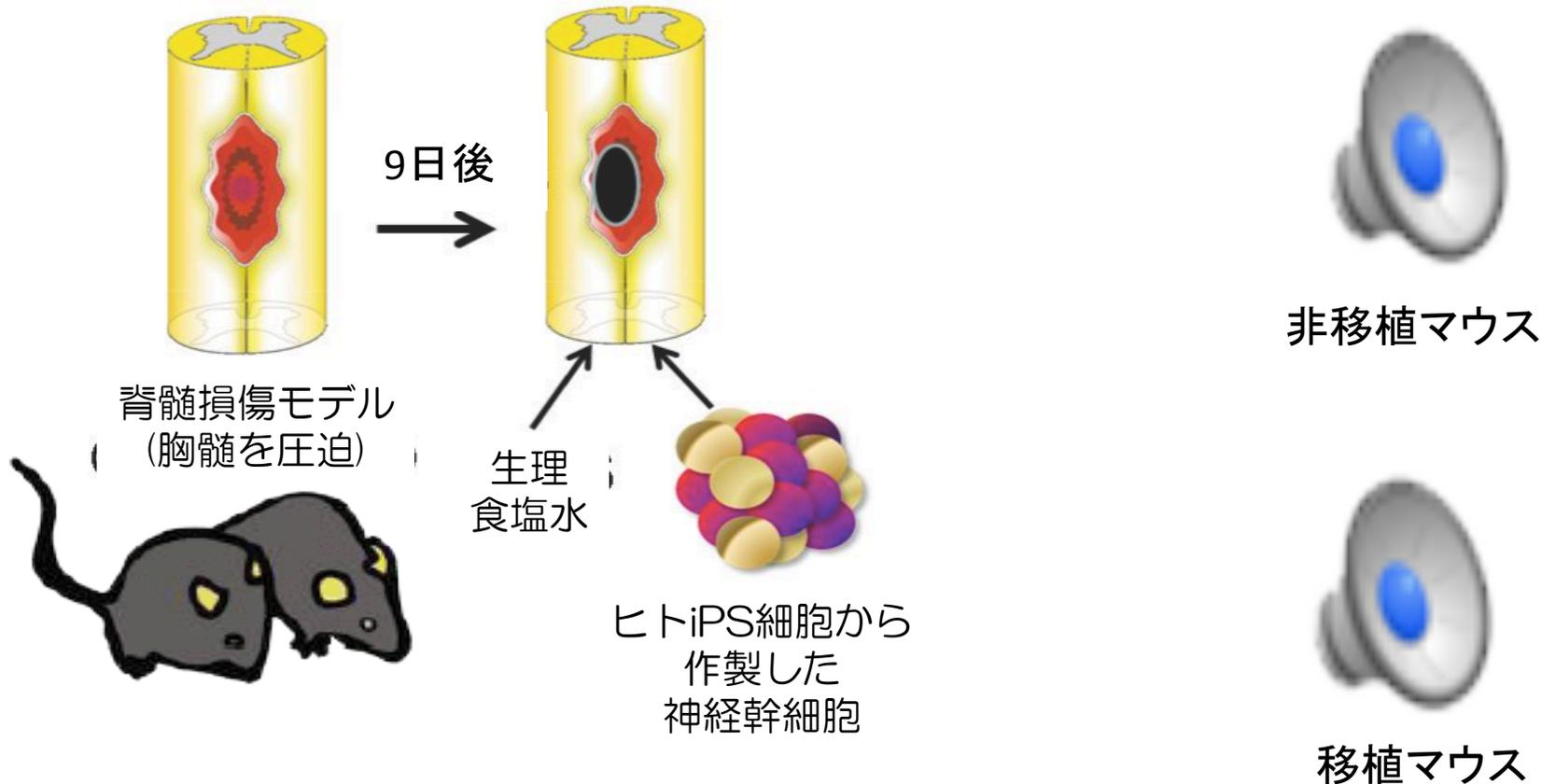
分化誘導

神経細胞



細胞治療

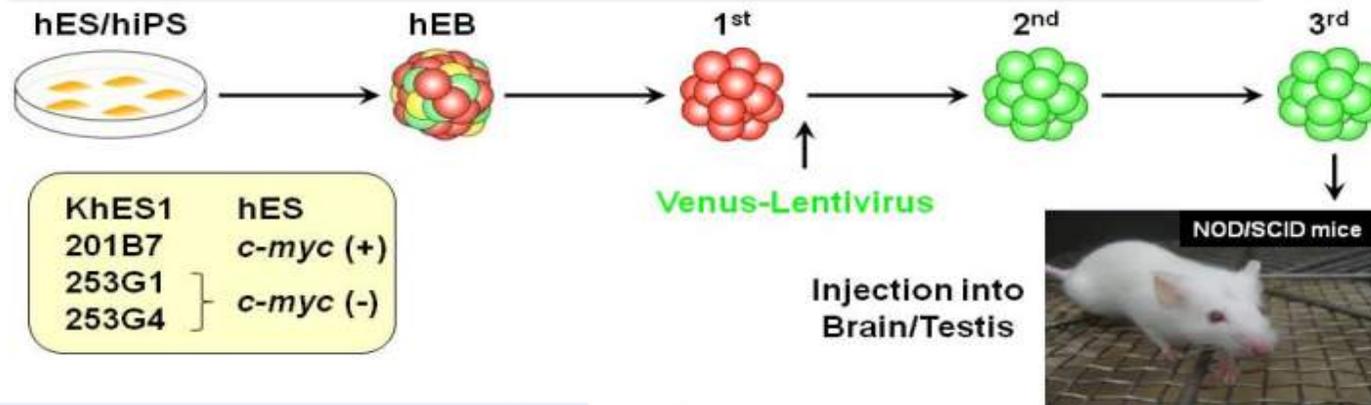
ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞移植による マウス脊髄損傷の運動機能回復



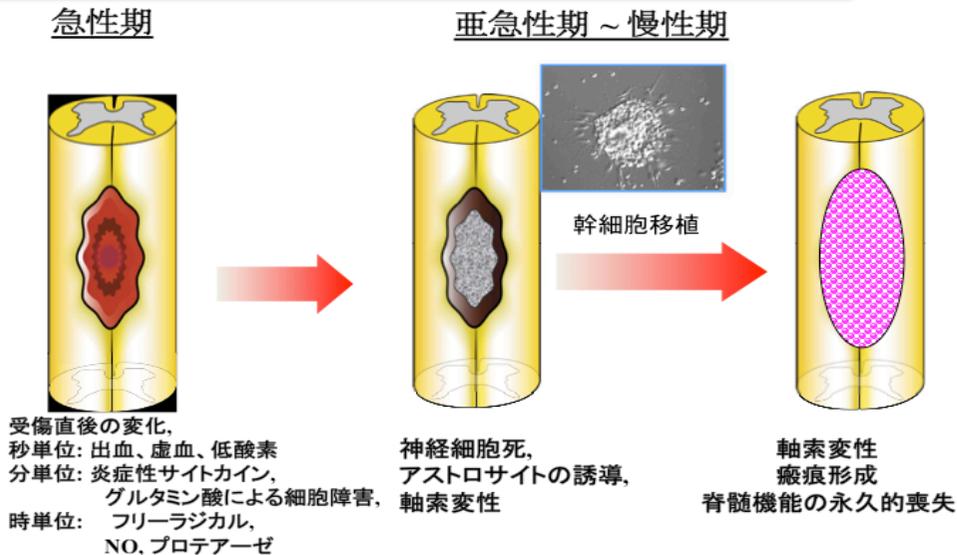
ヒトiPS細胞由来細胞を用いた治療効果を初めて証明
(移植されたマウスの何匹かで腫瘍が形成された)

iPS細胞由来細胞を再生医療に使う場合の問題点

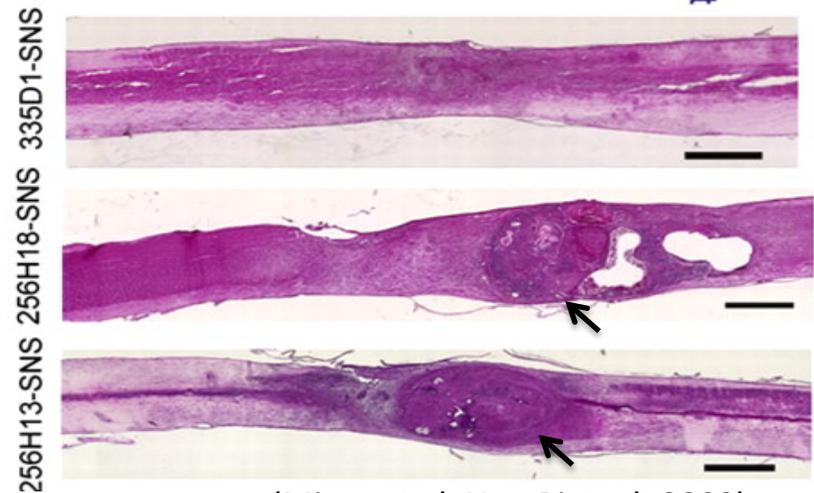
ヒト多能性幹細胞から神経幹細胞への誘導は長い培養期間が必要



細胞移植は亜急性期を過ぎると効果に乏しい



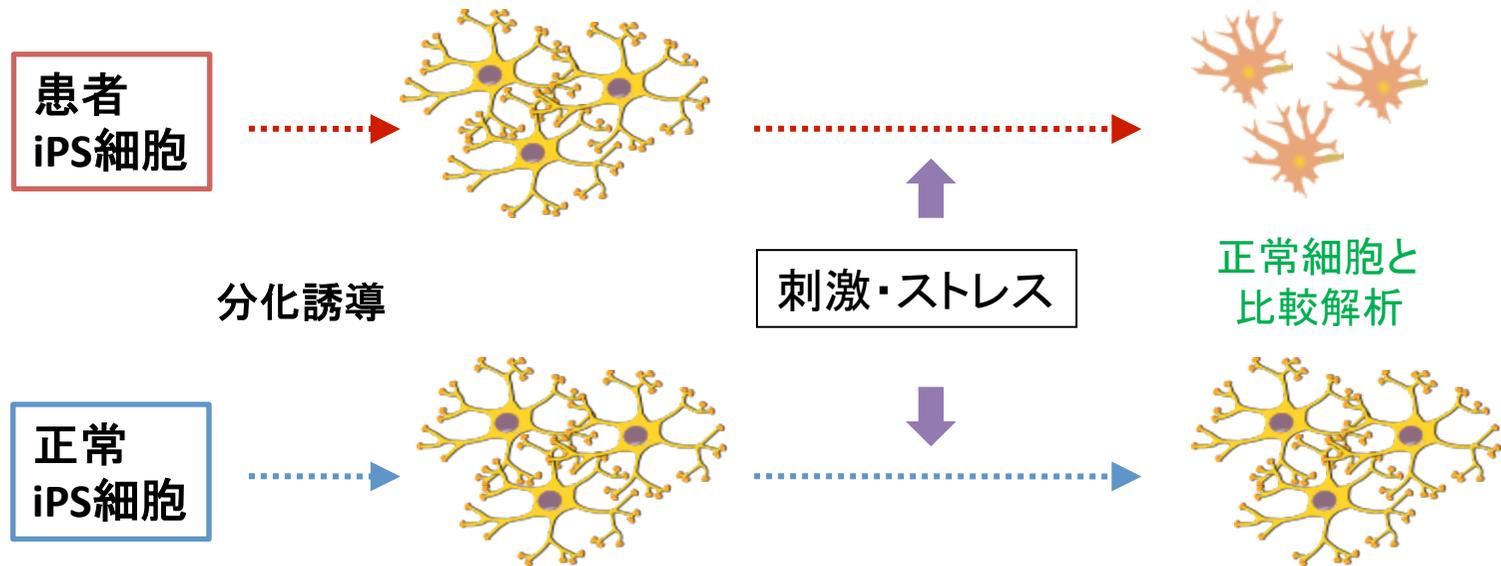
良いクローンを選択しないと腫瘍化する



(Miura et al. Nat. Biotech 2009)

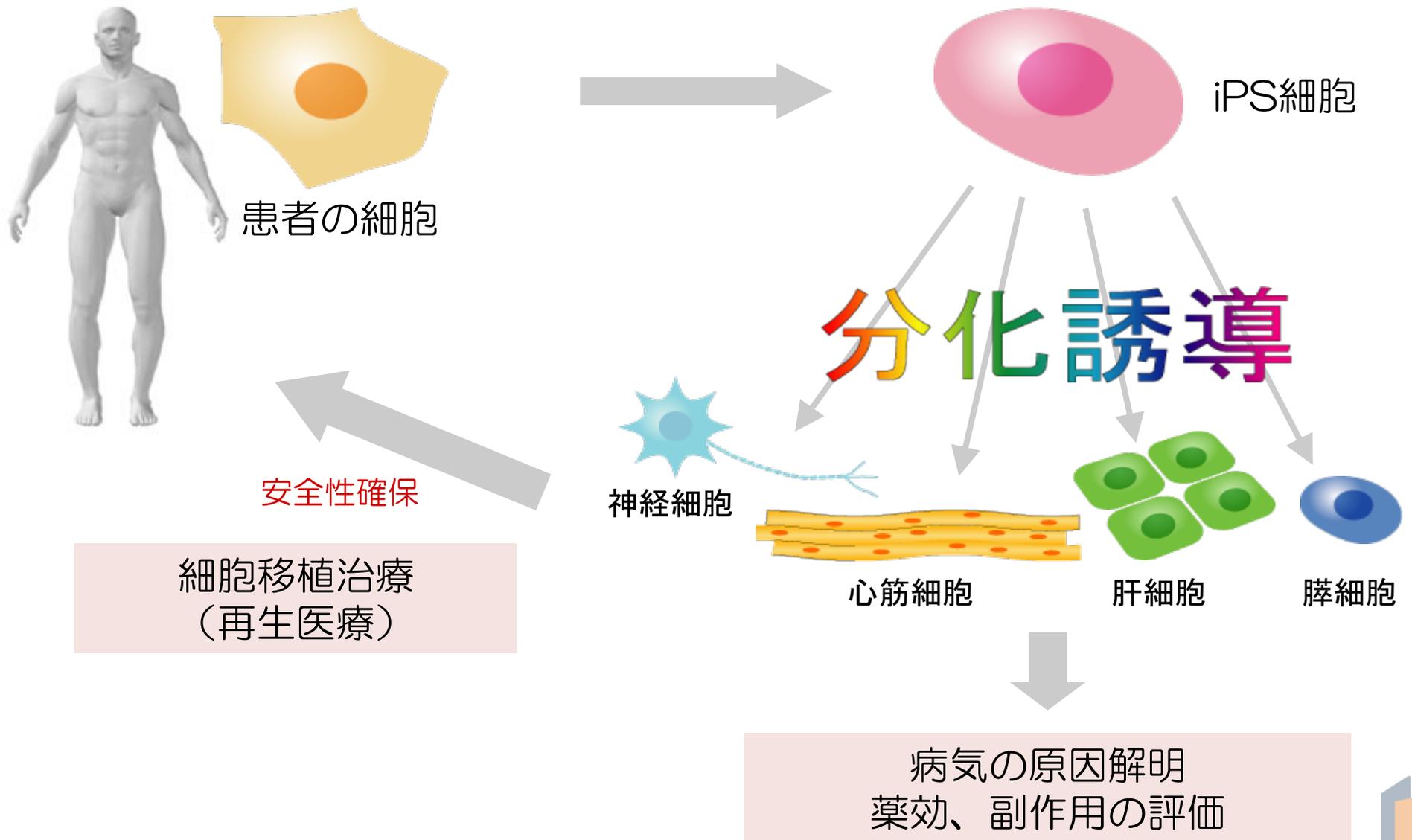
患者さんが受傷してからiPS細胞を作り、神経幹細胞を作っても間に合わない

疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明と創薬研究

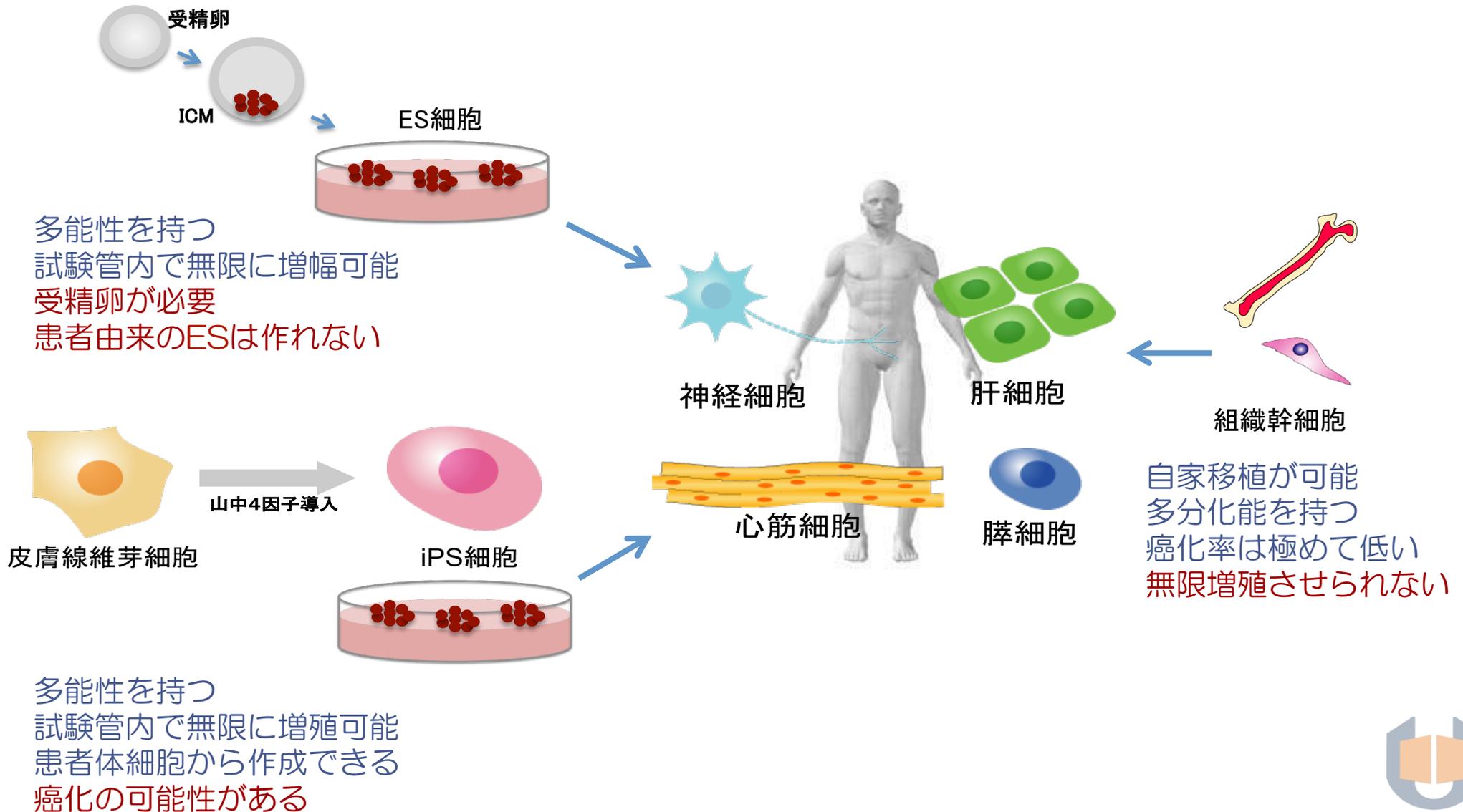


新しい診断方法や治療薬の開発

iPS細胞の医療応用への2つのアプローチ



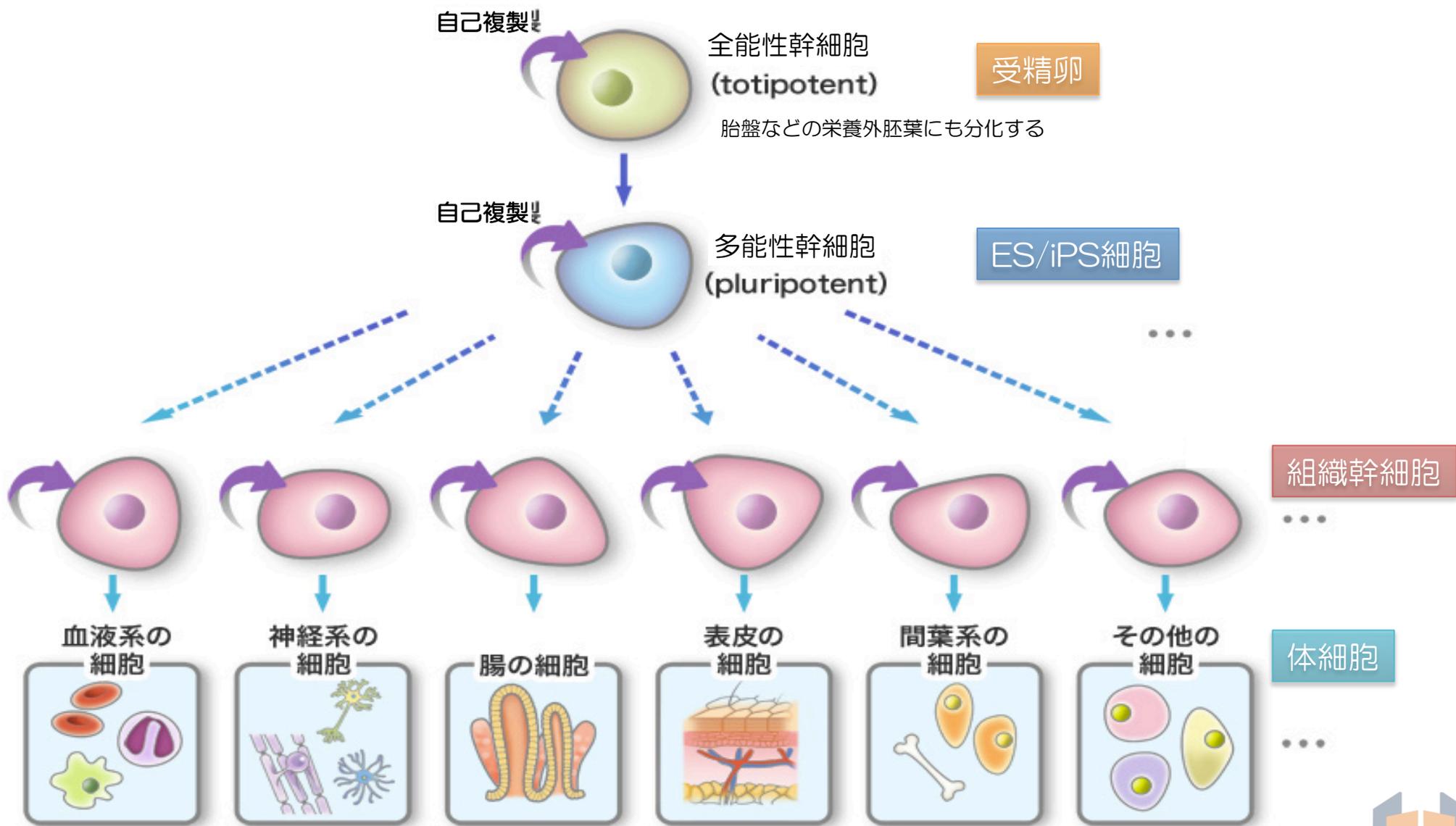
再生医療応用が期待される3つの幹細胞



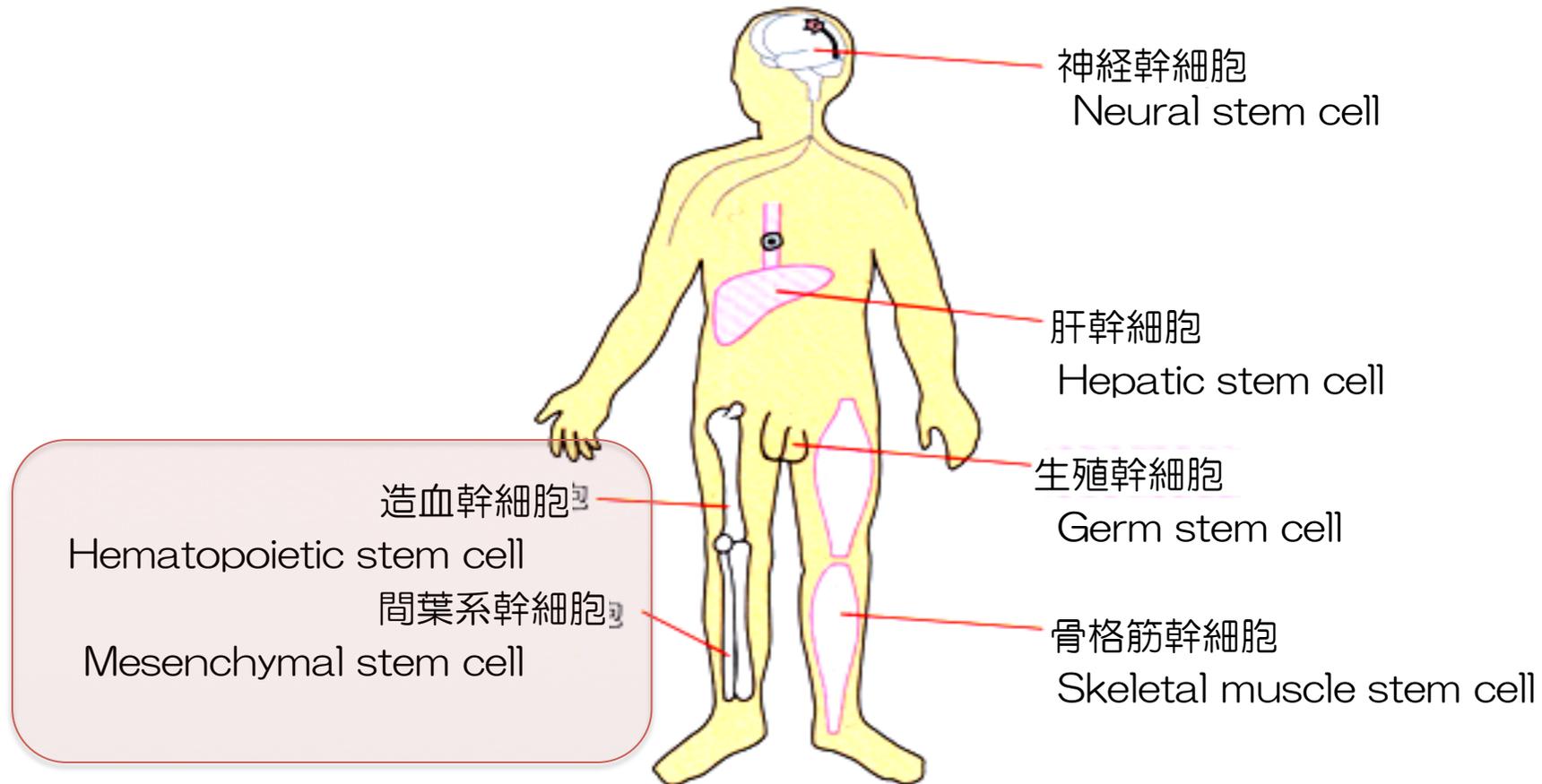
組織幹細胞

Tissue Stem Cell





組織幹細胞 (Somatic Stem Cell)

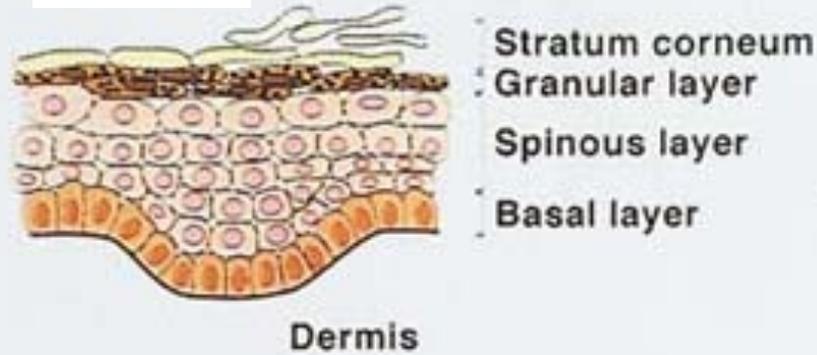


体中のあらゆる組織に幹細胞があり
組織の恒常性維持に役立っている

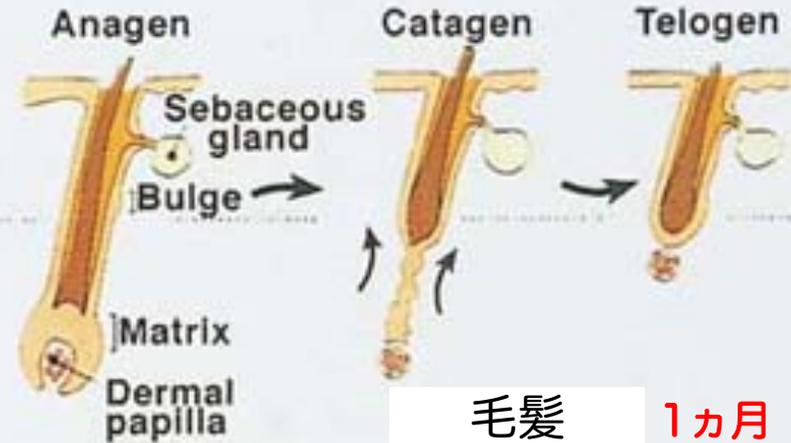
様々な組織幹細胞

(Cell 100:143-155.2000より引用)

皮膚 1ヵ月



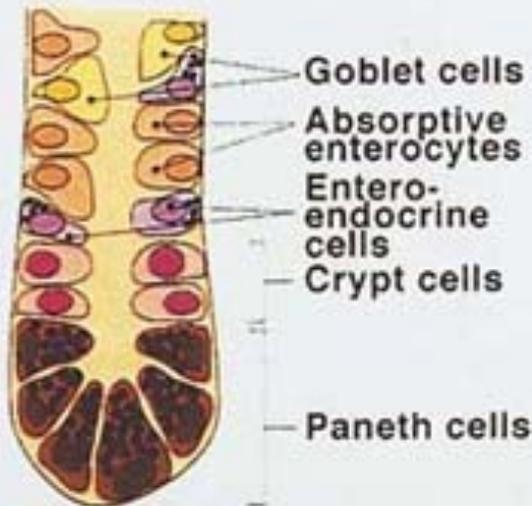
A. EPIDERMAL



B. FOLLICULAR

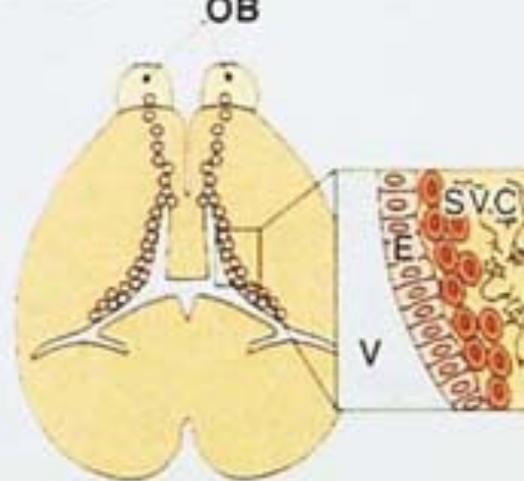
毛髪 1ヵ月

C. INTESTINAL



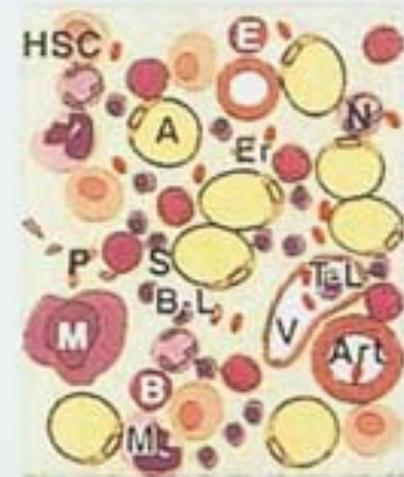
腸管 2-3日

D. NEURAL OB



中枢神経 一生

E. HEMATOPOIETIC



血液

最も実用化されている組織幹細胞治療＝骨髄移植



骨髄穿刺を行ってドナーから骨髄液を集める

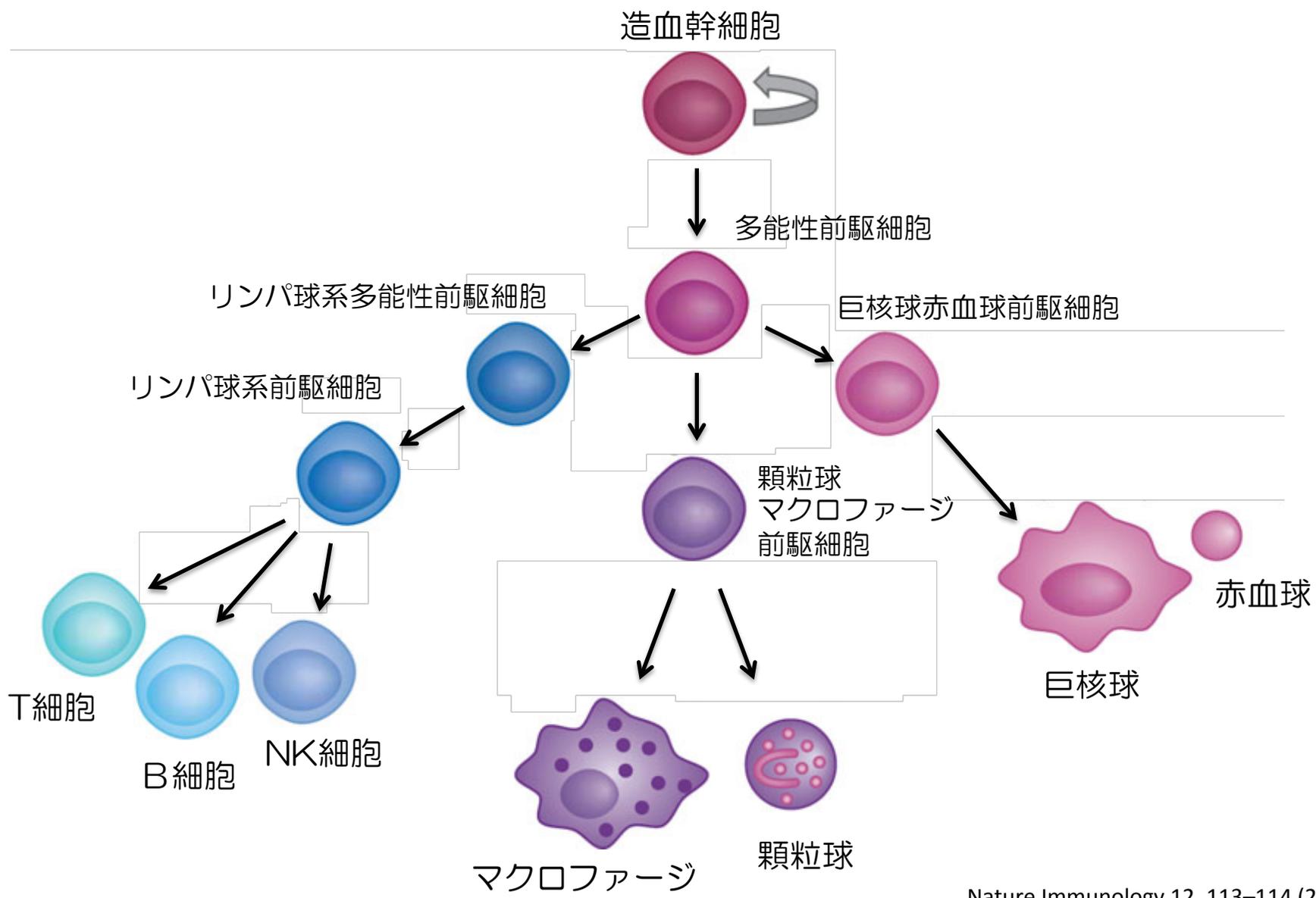


集まった骨髄液を患者さんに移植

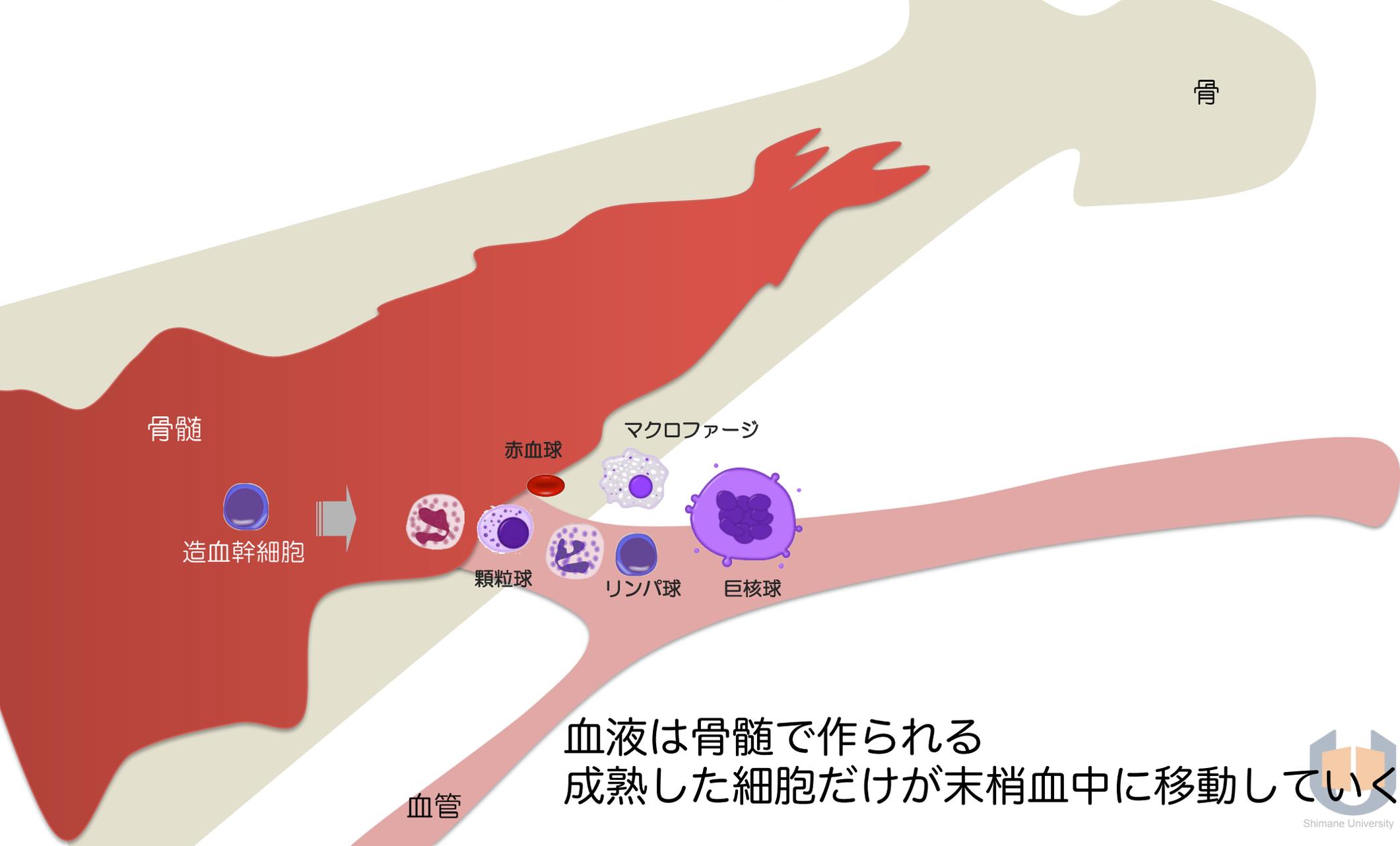
骨髄液の中には血液細胞のもととなる造血幹細胞が含まれているため
移植された造血幹細胞が患者さんの体内で正常な血液を作りはじめる

白血病や悪性貧血に対する根治療法として
最も早く、かつ最も普及した再生医療の一つ

全ての血球細胞は造血幹細胞から産生される

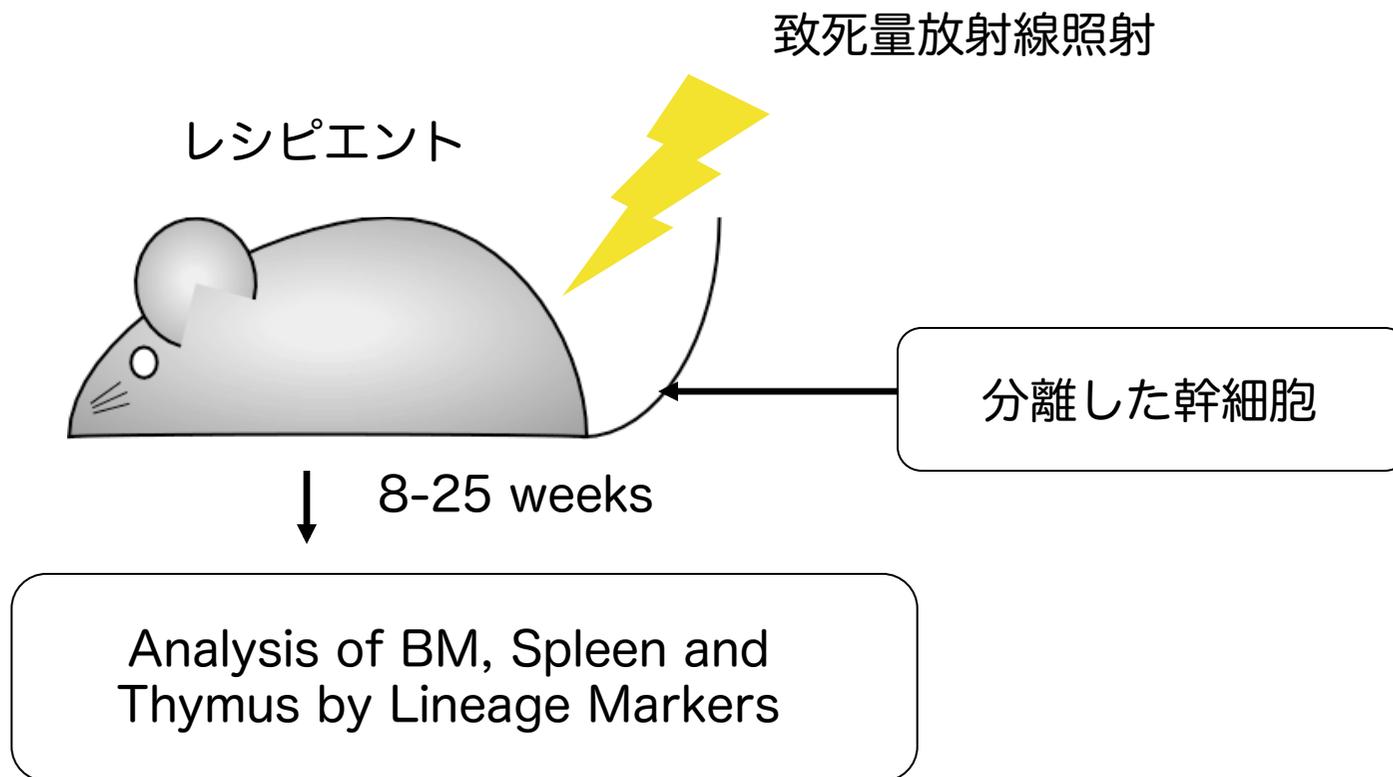


血液（を構成する細胞）は骨髄で作られている



血液は骨髄で作られる
成熟した細胞だけが末梢血中に移動していく

造血幹細胞移植による骨髄再構築

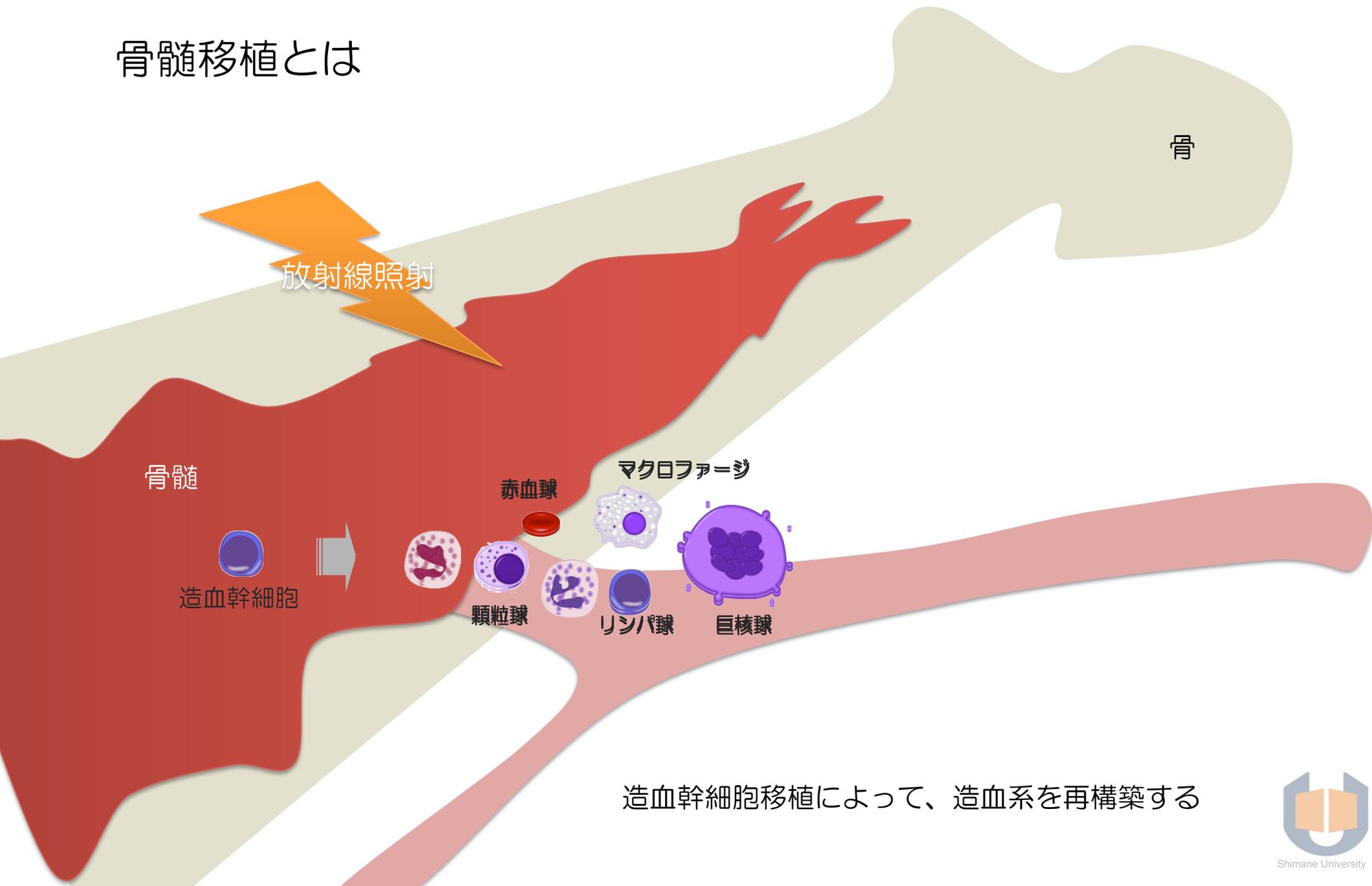


造血幹細胞移植



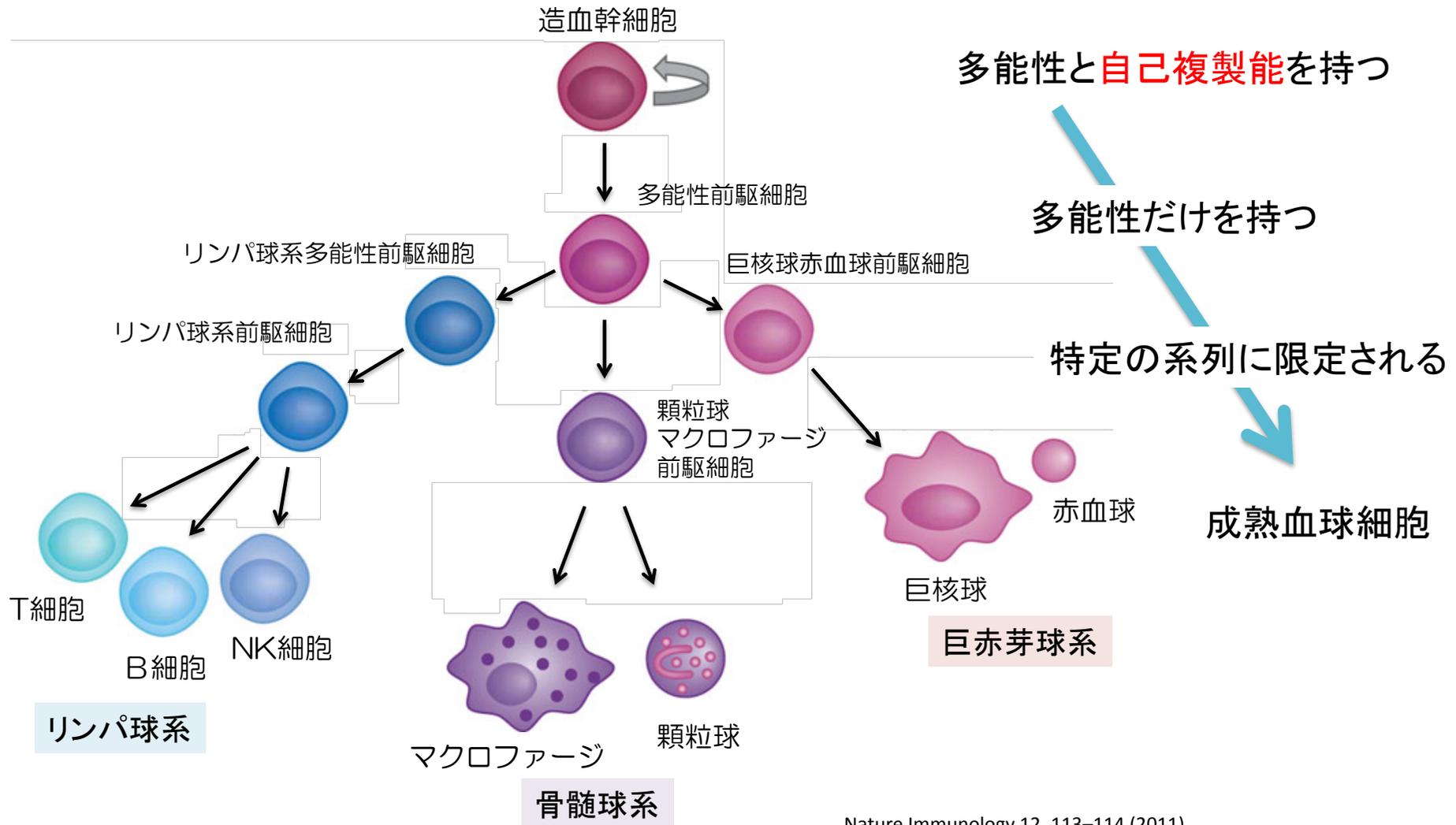
- ①患者に化学療法を行い、腫瘍細胞を全滅させる
- ②ドナーから骨髄を採取する
- ③ 集まった造血幹細胞を患者に移植する

骨髓移植とは



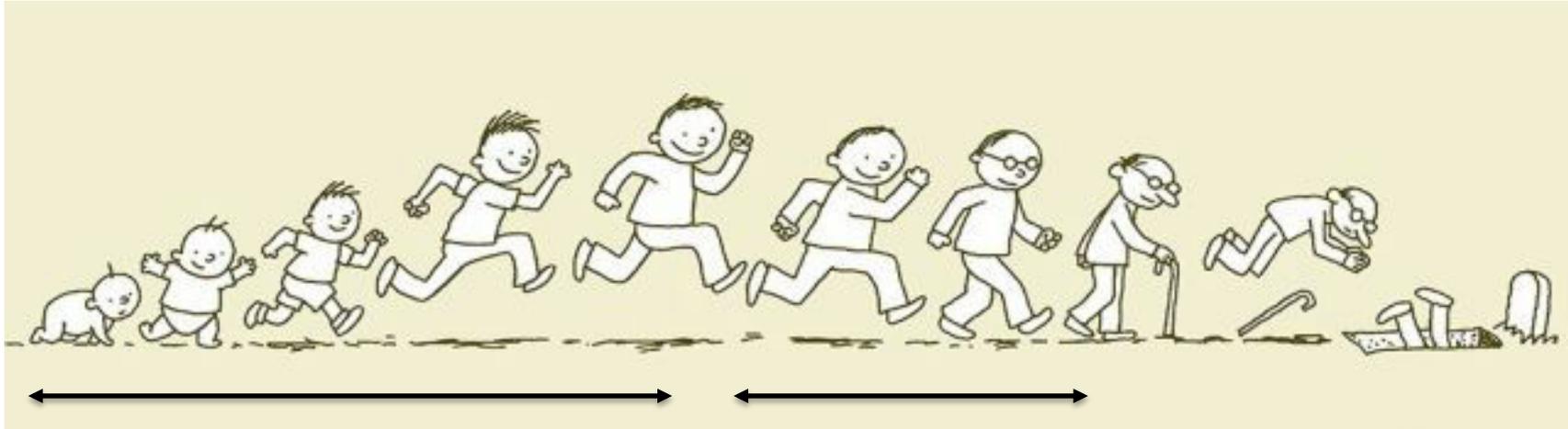
造血幹細胞移植によって、造血系を再構築する

造血幹細胞の分化と細胞系譜



Nature Immunology 12, 113–114 (2011)

ヒトの一生



成長=分化

成熟完了
社会に出て働く

寿命を迎える

幹細胞

前駆細胞

成熟細胞

輸血と骨髄移植は治療効果が異なる

輸血

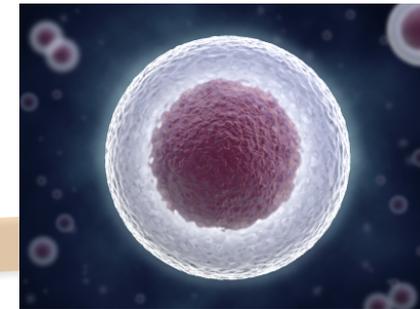


成熟細胞を移入

赤血球寿命は約120日

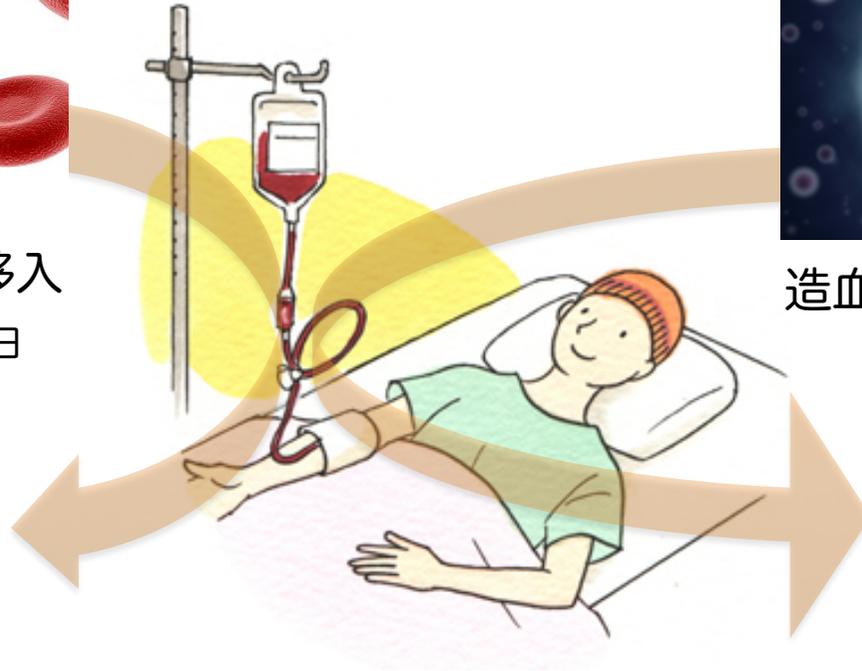
寿命を迎えると消失
一過性に機能を補う

骨髄移植

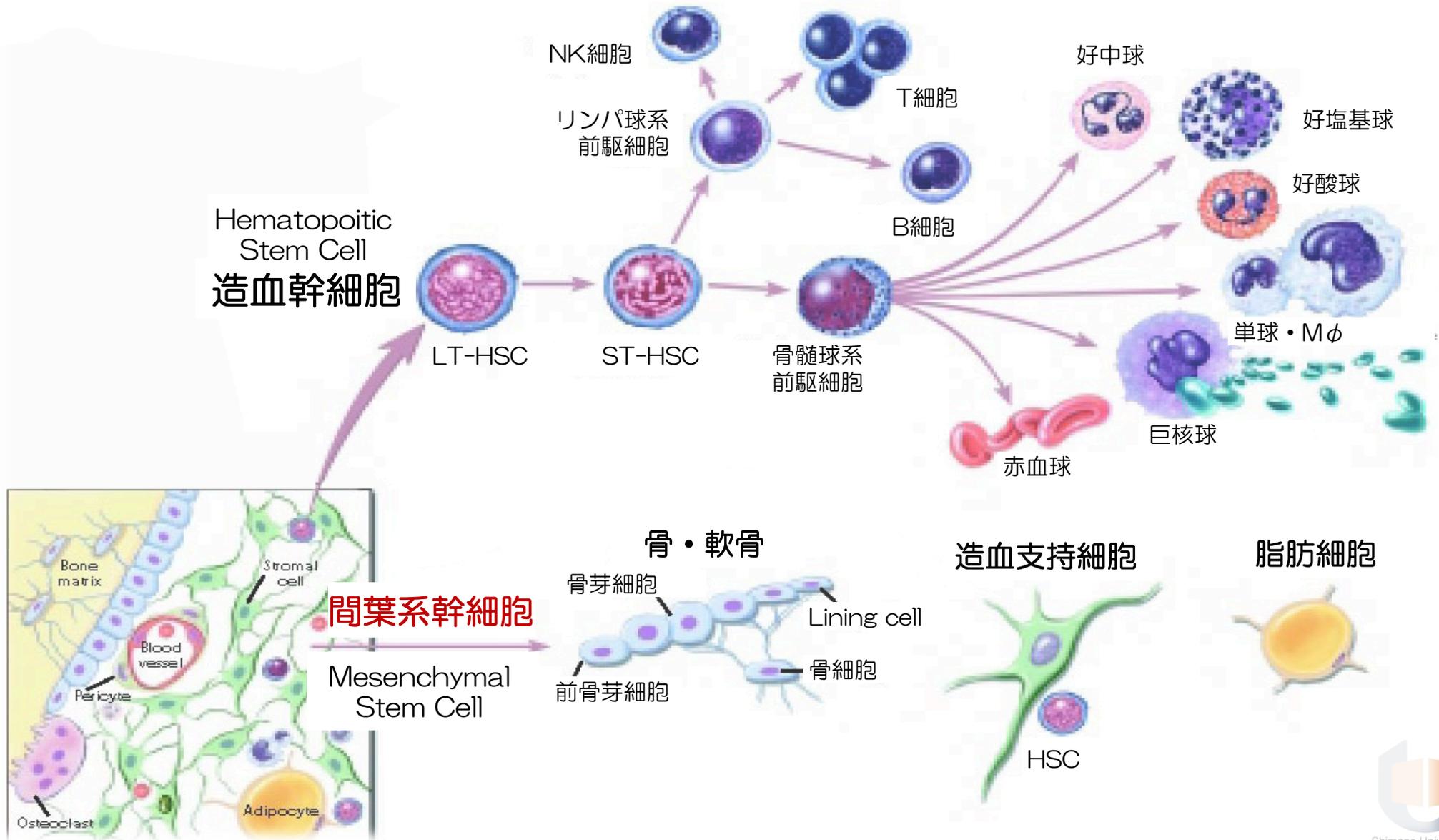


造血幹細胞を移入

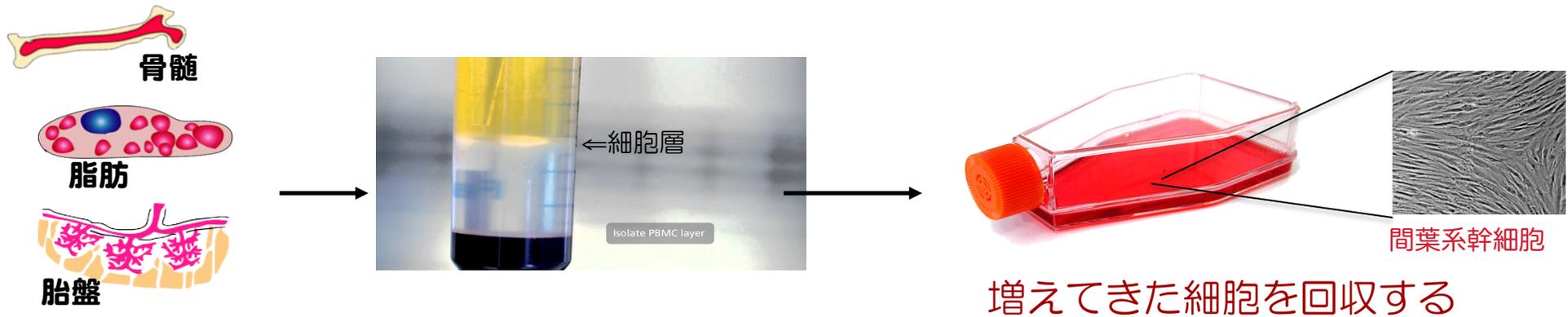
一生にわたって
血液を作り続ける
根治治療



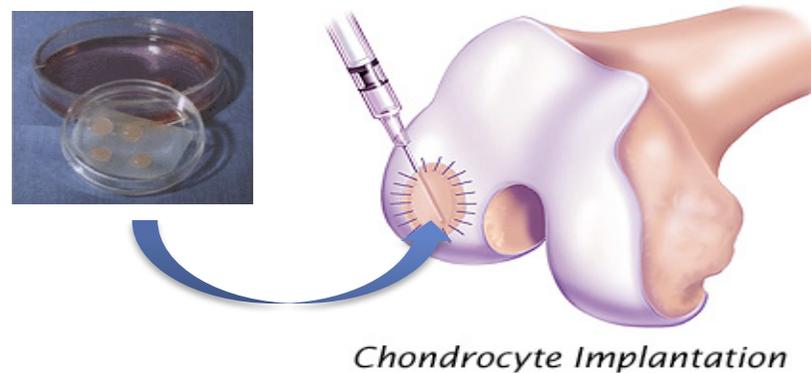
骨髓に含まれている2つの幹細胞



一般的な間葉系幹細胞の分離法



比較的簡単に採取できて、試験管内で増やしたり、骨や軟骨に分化させたりできる



生体材料として広く応用

低ホスファターゼ症患者 に対する間葉系幹細胞治療



Shimane University

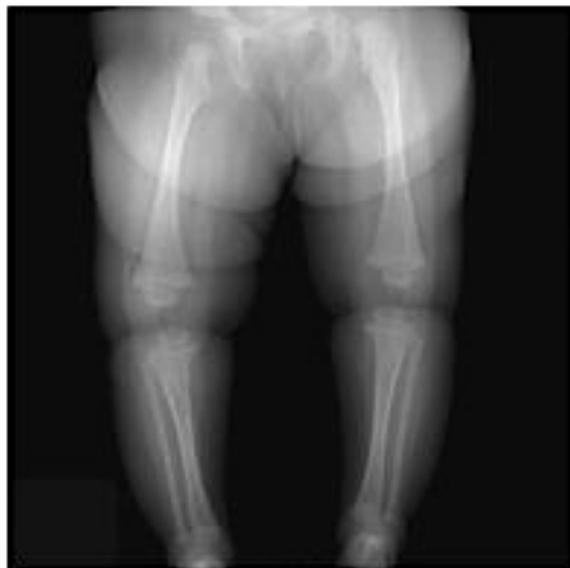
島根大学医学部小児科
教授 竹谷 健



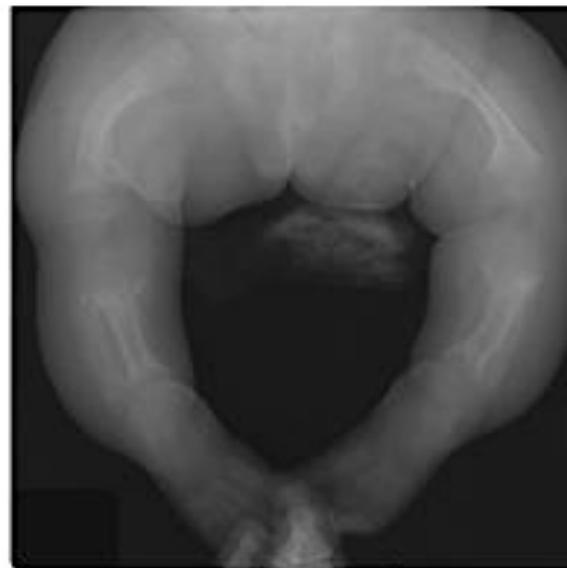
Shimane University

低ホスファターゼ症

生まれつき、骨がもろくて、成長とともに骨がなくなってしまう病気



Normal

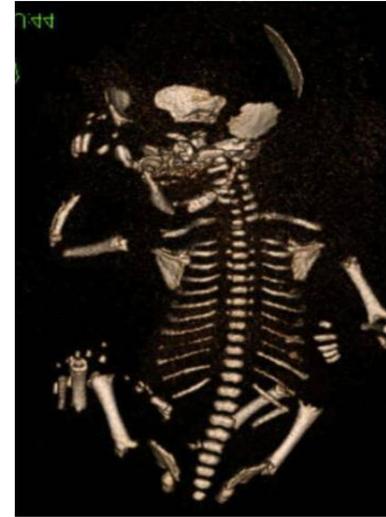


Hypophosphatasia

- アルカリホスファターゼ(酵素)欠損を原因とする希少な骨疾患で、多くの場合生後まもなく致死
- 骨芽細胞から骨を作る時に、アルカリホスファターゼ欠損により骨石灰化ができないため、くる病や骨軟化症を示す（硬い骨が作れない）
- 2015年から酵素補充療法が可能になったが、それ以前は治療法がなかった

低ホスファターゼ症

- ✓ 生まれつき、骨がもろくて、成長とともに骨がなくなってしまう病気



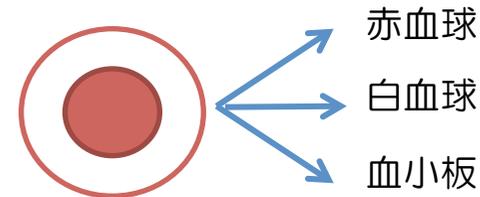
産まれてすぐ



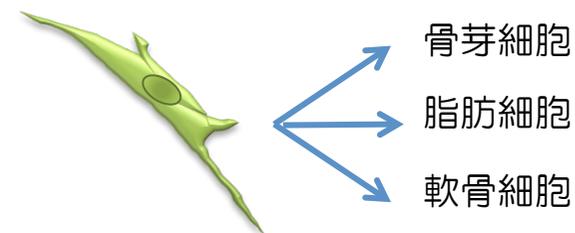
1歳

間葉系幹細胞による骨再生

- ✓ 血液を回復させるためには、
 - ✓ 血液を作る元の細胞＝造血幹細胞を移植すれば、血液ができる
- 骨を再生させるためには、
 - ✓ 骨の作る元の細胞＝**間葉系幹細胞**を移植すれば、骨ができるのでは？！



造血幹細胞



間葉系幹細胞

低ホスファターゼ症患者に対する間葉系幹細胞治療

移植前



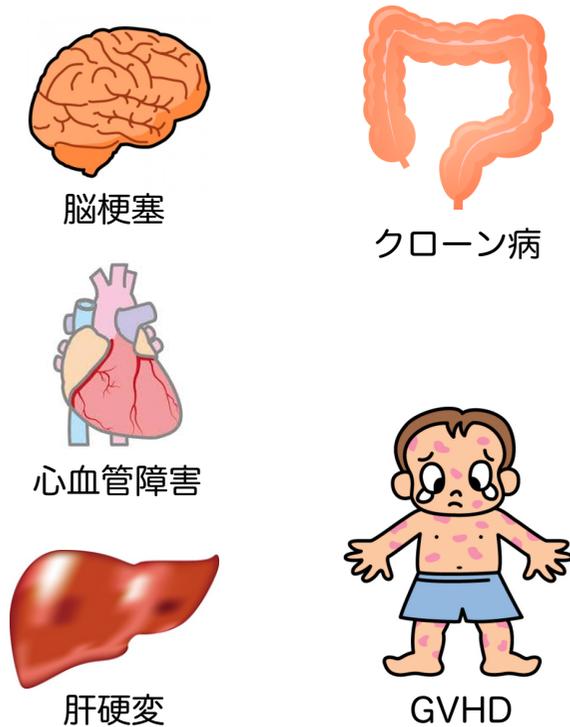
移植後3年



間葉系幹細胞の細胞性能と適用疾患

細胞治療

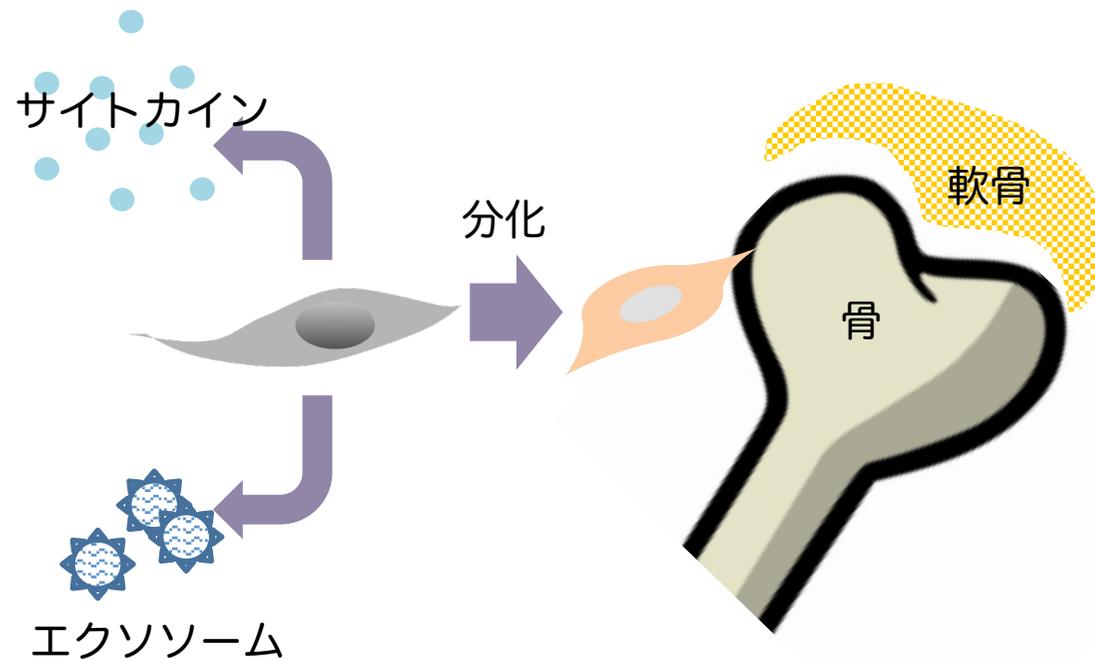
MSCが薬として働く
(組織修復・免疫調整)



一過性

細胞移植

正常なMSCが病気のMSCと
置き換わる

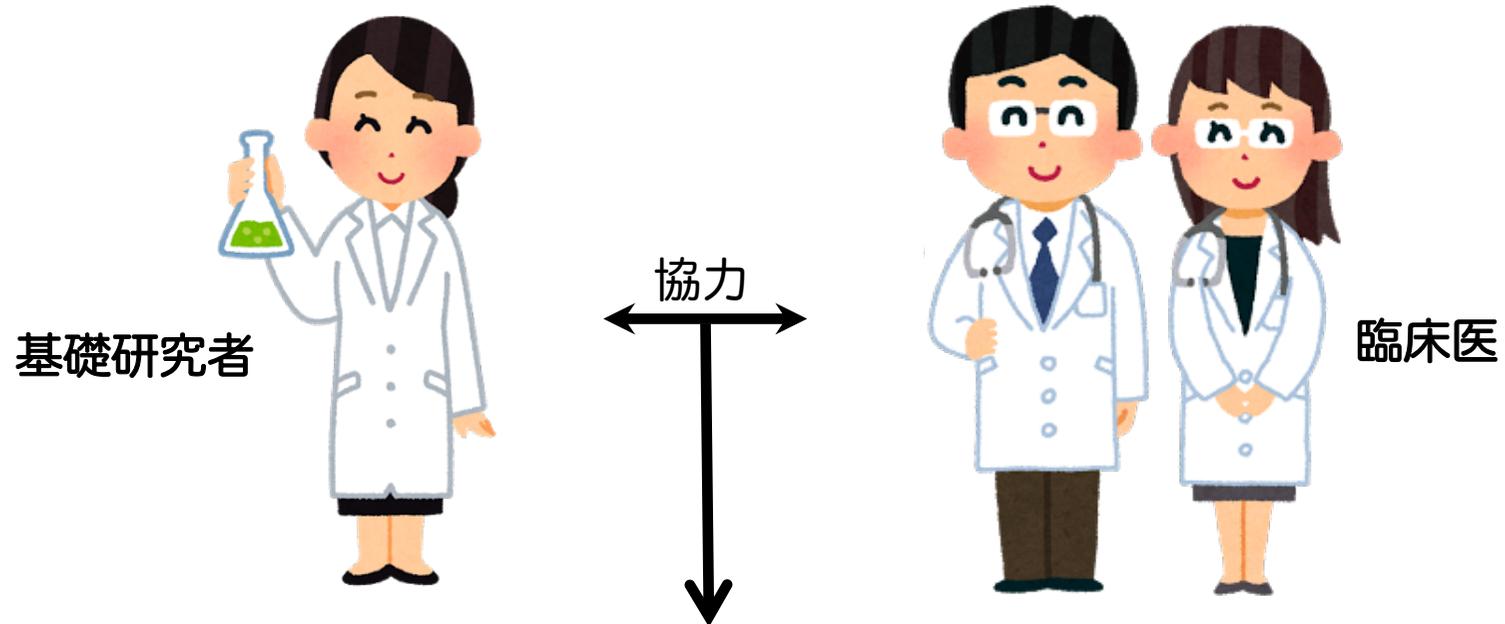


長期

再生医療への応用が期待される3つの幹細胞

代表的なヒト幹細胞	ES細胞	iPS細胞	組織幹細胞
由来	初期胚	体細胞	体細胞
拒否反応	あり	なし	なし
倫理的問題	あり	なし	なし
多分化能	多能性	多能性	限定的
腫瘍形成リスク	高	高	低
コスト	高	高	やや低
樹立までの時間	胚提供より2ヶ月程度	3-6か月	2-6週間

基礎医学研究者として私達がめざすもの



安全で 効果的な 細胞治療の確立

高純度ヒト間葉系幹細胞を用いた安全かつ有効な治療の
早期実現を目指す