

【トピックス】

老化と再生—老化マウスからiPS細胞の樹立

磯部 健一、Zhao Cheng、伊藤佐知子、西尾 直美
名古屋大学医学部 免疫学

生物は発生から老化まで不可逆的に進行するのは当たり前のことと思われてきました。ところが、最近の発生工学の驚くべき進歩でこれらの常識が覆ろうとしています。すでにドーリーの誕生からこのことがスタートしています。その後、クローンマウス、クローン牛と多くの種で、既に分化が進んだ体細胞も人為的にリセット可能であることが証明されました。これらの技術は人に応用されることがクローン人間の誕生ということで倫理的に禁止されました。すでにマウスではES細胞から遺伝子改変マウスが盛んに作成され生物学医学研究になくはない実験手段になっています。そこで、ES細胞を人為的に望んだ細胞、組織に分化させ、再生医療に利用しようとする研究が多くおこなわれるようになりました。ところが、これも大きな倫理的問題に直面しました。すなわち、受精卵がないとES細胞は作成できないのです。また、他人のES細胞は移植には免疫抑制剤を使わざるを得ないという医学的問題もあります。そのような時期にiPS細胞が体細胞から得られるという発見は大きな衝撃を与えました。とりわけOct3/4, Sox2, Klf4 およびc-Mycといった4転写因子の遺伝子移入のみで多能性幹細胞が得られるという発見は発生学、分子生物学の常識に挑戦する事実を提供しました。発生学では細胞の周りの環境、細胞間相互作用が次々におこり、組織ができあがっていく、それに伴い特定の遺伝子が発現する。ところが、ある特定の転写因子は順序だった発生、分化を飛び越えてしまう。そればかりか発生を逆戻りさせてしまうのです。現実の環境中では細胞は細胞膜で囲まれていて、レセプターを介してシグナルが転写因子に伝わり、遺伝子が発現し、できた蛋白が、また、他のレセプター、シグナル伝達分子に影響を与えるといった分子間相互作用や、細胞間相互作用で発生が進み、細胞の機能が発現されます。これまで、老化研究では、遺伝子と環境要因が老化を誘導すること、その遺伝子の探索と環境要因の探索が行われてきました。多くの研究者は“老化を促進したり抑制する遺伝子として、Sir2, Daf-2, TOR等様々な背景遺伝子があり、その欠損株は寿命に影響を与える。様々な環境ストレスによる活性酸素あるいは細胞内で発生する活性酸素が細胞内の蛋白、遺伝子、脂質を障害し、その蓄積が細胞老化、組織老化、個体老化につながる。”というように理解していると思われます。すると、老化個体の細胞は多くの傷を持っていることになります。果たして老化個体からiPS細胞が作成可能でしょうか？また、もし、作製できたらそのiPS細胞は正常な組織細胞に分

化可能でしょうか？老化マウスから作成したiPSは分化させるとすぐに老化細胞になるのでしょうか？私たちはこれらの疑問に答えるために老化マウスからiPS細胞を樹立する実験に着手しました。今回はES細胞から骨格筋、軟骨、骨細胞への分化の研究、iPS細胞から胸腺上皮細胞への分化の研究、そして最後に老化マウスからiPS細胞の作成とその分化の研究を紹介します。

1) ES細胞から骨格筋、軟骨、骨への分化—高齢者の歩行機能障害の克服をめざして

私たちはLacZ陽性 ES細胞を2次元培養で中胚葉系細胞に分化させ、それを機能障害を作成したマウスに移植することにしました。

まず、ES細胞をコラーゲン上で10% Fetal Caif Serum (FCS)存在下に5日間培養しました。そして、細胞を抗体で染色し、セルソーターで中胚葉系細胞を分別し、あらかじめ挫減させたヌードマウスの筋肉内に注射しました。4週後注射部位の筋肉組織から組織標本をつくり、LacZ陽性細胞を検索しました。すると、LacZ陽性細胞が組織にみられました。他のマーカー染色から筋サテライト細胞であることが判明しました(1)。これは骨格筋の幹細胞ですから自立的増殖が可能です(図1)。

次に、FCSを除いた状態で bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)を添加し、TypeIVコラーゲン上で培養しました。これも同様に、中胚葉組織をセルソーターで分離し、ヌードマウスの挫減させた骨格筋に注射しました。するとなんと今度は軟骨細胞が増殖してきました。ところが、骨髄内に注射すると、骨芽細胞が増殖してきました(図2)。

私たちはさらにシャーレ内で、骨格筋、軟骨、骨細胞まで分化させることに成功しました(2)。将来、臨床で

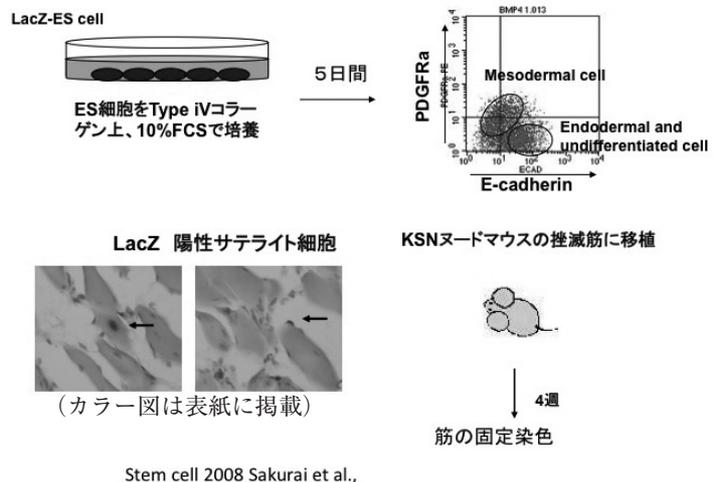


図1 ES細胞から筋肉の分化

使用できるように血清なしの培養にしました。

2) iPS細胞から胸腺上皮細胞への分化

老化すると、人を含めほ乳類は免疫機能が低下してきます。免疫機能の低下は主にT細胞機能の低下です。特にT細胞の発生場である胸腺上皮細胞の活性酸素による機能低下によることが判明しています(3, 4)。私たちはiPS細胞を胸腺上皮細胞に分化させることを計画しました。無血清培地での分化を試み、かなり難しい実験でしたが、培養内に加える因子を変化させることでFoxN1陽性の胸腺上皮様細胞への分化に成功しました(図3)。しかし生体内に移植してT細胞が発生することはまだ確かめていません(5)。

3) 老化マウスからのiPS細胞の樹立

山中らがiPS細胞を樹立してから世界中でこの分野の研究が始まり、次々に新しい発見が報道されています(6, 7)。私たちは老化マウスからiPSを作成することを試みました。マウスでは通常胎児繊維芽細胞からiPS細胞がつくられます。もちろん、生体からも、人体の各組織からもiPS作成の報告が相次いでいます。私たちは、C57BL/6マウス繊維芽細胞からiPS細胞作成までは順調に進みました。ところが老化マウスの繊維芽細胞からiPSを作成しようと試みましたがなかなかうまくいきません。通常iPS細胞作成は4因子を遺伝子移入してから2週間以上かかります。それまで細胞が生存することが必要です。私たちは老化マウスの骨髄をGranulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)で培養し、細胞が勢いよく増殖しているのを確認して、4因子を遺伝子移入しました。すると、通常の数倍の1ヶ月ごろに数個のコロニーが現れました。私たちはそれから2クローンを樹立し、Nanog, Oct-4の遺伝子発現を確かめました(図4)。

この細胞をC57BL/6の背中に注射すると、1ヶ月後に腫瘍が現れ、H&E染色と、免疫染色で3胚葉に分化していることがわかりました。現在作成したiPS細胞をマクロファージ、血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞に分化させる研究が進んでいます。もちろん、キメラマウス作成でiPS細胞が組み込まれた子が誕生すること、100%近いキメラを作成できたならそのマウスがどれだけ生存できるかが最も重要な研究です。

謝辞

桜井英俊、稲見裕太等の実験データを使用しました。文献に名前をあげます。この研究は文科省科学研究費、GCOEの一部の研究費を使用しました。

文献

- 1) Sakurai H, Okawa Y, Inami Y, Nishio N, Isobe K. Paraxial mesodermal progenitors derived from mouse embryonic stem cells contribute to mus-

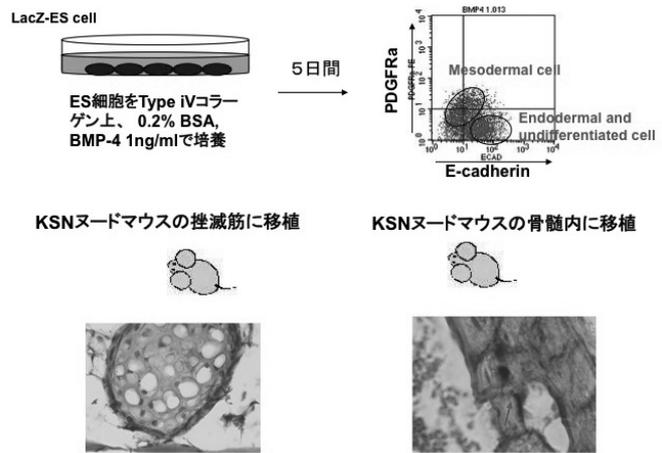


図2 ES細胞から軟骨、骨への分化

T細胞の老化はその発生場である胸腺上皮細胞の老化による。

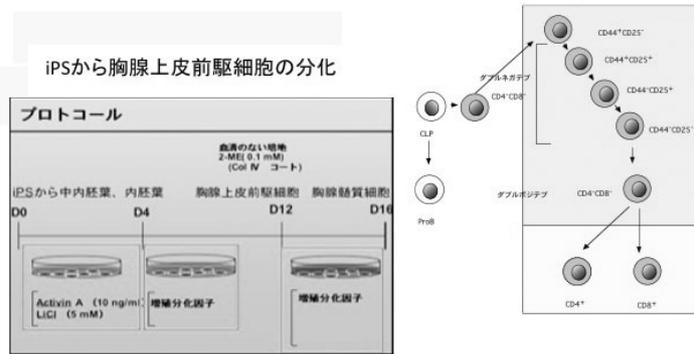


図3 無血清培地による胸腺上皮細胞への分化

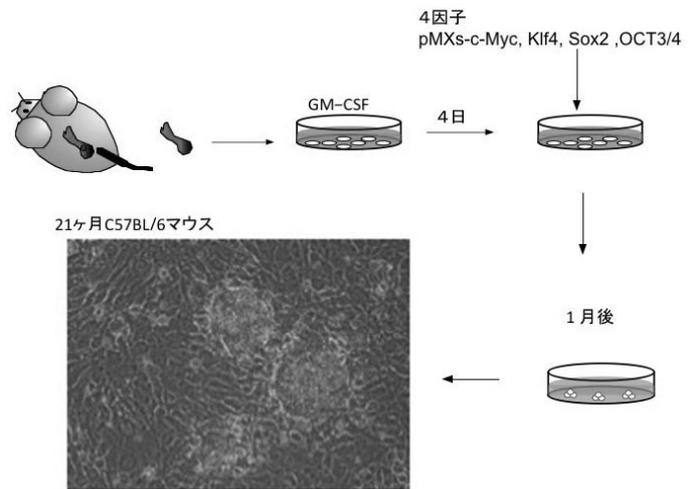


図4

cle regeneration via differentiation into muscle satellite cells. Stem Cells. 2008 Jul;26(7):1865-73.

- 2) Sakurai H, Inami Y, Tamamura Y, Yoshikai T, Sehara-Fujisawa A, Isobe K. Bidirectional induction toward paraxial mesodermal derivatives from mouse ES cells in chemically

- defined medium.
Stem Cell Res. 2009 Sep-Nov;3(2-3):157-69.
- 3) 磯部健一；免疫系の加齢変化；新老年学 2010年
 - 4) Uddin MN, Nishio N, Ito S, Suzuki H, Isobe K. Toxic effects of D-galactose on thymus and spleen that resemble aging. J Immunotoxicol. 2010 Jul-Sep;7(3):165-73.
 - 5) Inami Y, Yoshikai T, Ito S, Nishio N, Suzuki H, Sakurai H, Isobe KI. Differentiation of induced pluripotent stem cells to thymic epithelial cells by phenotype. Immunol Cell Biol. 2010 in press
 - 6) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
 - 7) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.