

エキスパートに聞く

No.15



「iPS細胞を使っの筋ジストロフィー治療戦略」

櫻井 英俊 先生 (京都大学 iPS 細胞研究所 講師)

聞き手 埜中 征哉 (公益財団法人 精神・神経科学振興財団 理事)

iPS 細胞とは、人工多能性幹細胞とか新型万能細胞と呼ばれていて、それは①あらゆる組織・臓器になる性質をもっている、②誰でも作れる、という点が画期的なのです。

あらゆる組織・臓器になれる万能細胞には「ES 細胞」がありました。しかしこれは受精卵から作製するため倫理的な問題があり、また誰からでも作れるわけではなかったのです。

2000 年頃から世界中の科学者が、どうにかして ES 細胞に代わる新しい万能細胞を作ろうと懸命に研究していました。同じころ京都大学の山中伸弥教授 (現 CiRA 所長) は ES 細胞にだけ発現している遺伝子を体細胞に入れることで、同じような細胞ができるのではないかと研究を進められました。当時研究員の高橋和利博士 (現 CiRA 講師) の努力により、たった 4 つの遺伝子を皮膚細胞に導入することにより、2006 年マウス iPS 細胞が、2007 年にはヒト iPS 細胞が誕生しました。現在、その 4 つの遺伝子は山中因子と呼ばれています。

iPS 細胞で、最も期待されているのが再生医療への応用です。心臓移植でしか助かる方法のない病気の患者さんには、患者さんの iPS 細胞から新しく心臓の筋肉の細胞を作り出し、移植してあげることで治療できると考えられています。原因がわかっていない筋疾患の患者さんの iPS 細胞から筋肉の細胞を作り出し、病気の筋肉細胞と健常な方の筋肉細胞とを比較することで、原因となる遺伝子やタンパク質の異常が解明されると期待されています。さらに病気の患者さんの iPS 細胞を使って原因が分かれば、その変化を抑える薬剤を作用させることで、どの薬に治療効果があるかを試験できます。筋ジストロフィーへの治療研究にも、iPS 細胞は大いに役立つと期待されています。

埜中：私たちの財団では年2回ニュースレターを発行しています。その中に「エキスパートに聞く」というコーナーを設けて、最近話題になっている精神や神経、筋疾患を取り上げてエキスパートからのお話をいただいています。最近では福山型先天性筋ジストロフィーについて本症の子育てから、分子生物学的研究成果、治療への挑戦を3回に分けて取り上げています。それを筋ジストロフィーのHPとリンクしたりすると、福山型の親御さん方から非常に良かったという反応がありました。私が外来をしていると、多くの患者さんから、iPS細胞を使って筋ジストロフィーをどのようにして治すのか。患者さんは皆さん京都に早く行きたい、行きたい、と。(笑)京都に行つて櫻井先生の外来を予約しておくで優先的に治療がうけられるのではないかと。(笑) 患者さん達の期待はとても大きいのです。そこで、表題のようなテーマについて、ご多忙な先生に貴重な時間を割いてお話をうかがうことにしました。

先生今日はどうぞよろしくお願ひします。

櫻井：こちらこそ、よろしくお願ひします。

腎臓病専門の臨床医が再生医学研究に方向転換

埜中：先生はもともと泌尿器科のお医者さんだったとお聞きしていたのですが……

櫻井：いいえ、腎臓内科です。

埜中：腎臓内科のお医者さんが基礎研究の道に入られたきっかけは何ですか？

櫻井：研修医を終えて腎臓内科医として勤務していたのです。腎臓内科では透析患者さんをたくさん扱っており、私自身は命が助かるからいいだろうと思って治療をしていたのです。しかし、患者さんの中には重い副作用に悩み、社会復帰が出来ない、治療を止めて死にたいとおっしゃる方もおられ、これでは駄目だな、と思いました。医者が治療した気になってはいけなかつたのです。やはり機能を改善させて社会復帰もできるような、そういう根本的な治療法を何とか作れないものだろうかという時に、ちょうど再生医療というものが話題になってきました。たまたまその時に京都大学に居られた西川伸一先生が、マウスのES(幹)細胞から血管の三次元構造の作製に成功したというのがネイチャーという世界一流の雑誌に発表されました。私は血管ができるなら、頑張つたら腎臓もできるのではないかと考えたのです。西川先生にその後電話をしまして、再生医療の研究をしたいのですがどうしたらいいですか、とお聞きまし

た。すると「やる気があるなら来い」と言っていたので、翌年から西川研究室の大学院生として研究を始めました。

埜中：では西川先生のところで4年間？

櫻井：そうですね。4年半かかりましたけれども。西川研究室が神戸の理化学研究所に移つたので、1年だけ京都でその後3年半は神戸で研究活動をしました。ES細胞を使った再生医療研究の駆け出しみたいな研究でした。

埜中：何かやりたいと思ったらすぐに電話して訴える先生の勇気と熱意が素晴らしいと思います。

櫻井：ありがとうございます。普通に臨床をしていると、なかなかそういう決心をつけにくいのですが、私の指導をされていた腎臓内科の部長先生は、その熱意があるなら君は研究をやったほうがいいよと後押ししてくれました。医局の教授も臨床にこだわることはない、好きなことをやっていいからとおっしゃっていただいて。

埜中：先生がiPS細胞と関わつたのはどこで？

櫻井：ES細胞を使っていきなり腎臓を作るとするのは無理なので、その前段階として中胚葉細胞を効率よく作るという研究を始めました。その後母校の名古屋大学に戻つて研究活動を続けていましたが、苦勞してデータを出しても欧米に先を越されたりで、やる気をなくしかけていた時があったのです。でもその時に山中先生がiPS細胞の作製に成功したというニュースを読んで、次の時代はやはりこれをやらないと、日本は世界に勝てないのではないかと思ひました。それで、また、今度は山中先生に「名古屋大学で研究をしている櫻井という者ですが」とメールを書きまして。(笑)

埜中：今度は電話ではなかつたのですか？(笑)

櫻井：さすがにお忙しいだろうと思って。(笑) そうしたら、最初のメールは自動返信で返つてきました。やはり非常にお忙しかつたみたいで、本当に山中に御用のある方はこちらのアドレスまでもう一度送つてくださいます。これでくじけてはいけなかつたと思って、もう一度そのアドレスに送り直したら「そういうことなら1回面接しましょう」と面接していただき、研究員として採用していただいたというのがiPS細胞研究へのきっかけです。

埜中：それは何年ぐらい前ですか？

櫻井：2007年の11月にヒトiPS細胞ができて、2008年の1月に僕がメールを送つていて、面談をしたのが2008年の4月ぐらいです。

埜中：山中先生の研究室で研究を始められたのですか？

櫻井：採用は山中研究室だったのですが、私の興味はそ

のとき筋肉に移っていました。山中先生は、iPS細胞を作ることは得意だけれども、それを応用することは全くわからない、とおっしゃいました。そして、骨格筋研究の第一人者、瀬原淳子先生の研究室を紹介してくださいました。そこで約2年間、勉強させていただきました。

埜中: 皆さん興味があると思いますが、一緒に働いて山中先生はどんな方ですか？

櫻井: そうですね。細かい実験のことはあれこれ言われませんが、大きなビジョンで研究の進むべき方向性を示してくださる方です。なので、当初私は再生医療を実践したいと思っていたのですが、山中先生は再生医療の研究は本当に時間がかかる。それより前に患者さんから作ったiPS細胞で薬を作るというプロジェクトも大事なことである。そういった方面での研究も是非進めてくださいということをおっしゃいました。考えてみると確かにそうだな、山中先生は大きなビジョンで物事を見てくださる先生だと思いますね。

iPS細胞から誘導された筋細胞 (iPS筋細胞) の作製

埜中: 先生が筋肉のほうに興味を持たれたのはどういきっかけからですか？

櫻井: 皆さんによく訊かれるのです。(笑) 最初に入った時は腎臓だったはずなのですが、中胚葉という分野を研究している時に、私は沿軸中胚葉と呼ばれる組織を効率よく分化させてそれを純化する方法を開発しました。沿軸中胚葉は骨・軟骨・骨格筋になるという能力を持っていることが分かり、大学院の研究はそこまで終わっていました。引き続いて研究員として再生医療をやるのなら、せっかく自分で作ったこの細胞をうまく役立てたいという思いがありました。調べてみると骨・軟骨は骨髄の間葉系幹細胞などを使っての再生医療がかなりの現実的なものになっていましたが、筋肉の再生医療については、ほとんど報告されていませんでした。

そこで、ひょっとしてES細胞から筋細胞を沢山作ることができたら、有意義な治療法になるのではないか、と思ったのです。筋肉の病気は治らない病気が多いし、未だに分化誘導も難しい。私が必要とされる分野は筋疾患ではないか。チャレンジする価値はあると思って、そこから筋肉の勉強を始めました。

埜中: 素晴らしいです。我々にとっては非常に心強いです。現在、先生自身が患者さんのiPS細胞を作ることを始められているとうかがっています。

櫻井: はい。私の研究室でやっています。国立精神・神

経医療研究センター (NCNP) 神経研究所の武田伸一先生のグループと2か所で筋疾患の患者さんのiPS細胞を作るというプロジェクトを進めています。

埜中: 色々な病気のバンク (レポジトリ) を作っていらっしゃるわけですか？

櫻井: そうですね。今のところ対象疾患がある程度限られた状況ではありますが、ゆくゆくは色々な筋疾患を揃えたようなバンクにしていきたいと思っています。

埜中: 採血してリンパ球を集め、それをiPS細胞にされる過程をお話願いますか？

櫻井: 採取したリンパ球にいわゆる山中因子と呼ばれる、4つの基本となる遺伝子、Oct3/4(オクトスリーフォー)・Sox2(ソックスツー)・Klf4(ケーエルエフフォー)・c-Myc(シーミック)を導入します。現在では、効率を良くするためにL-MycとかLin28とか、そういう新たに見つかったものも導入してiPS細胞を作製しております。どんな患者さんからでも必ずできますので、まず1回外来に来ていただいて血液からリンパ球を取らせていただければ、その後iPS細胞化へと進みます。

iPS筋細胞は病気の特徴をもつ (病態再現)。その病気を治す薬剤を見つける

埜中: 先生は患者さんのリンパ球からiPS細胞を作り、その細胞をどのように使っておられるのですか？

櫻井: まず病態再現といいまして、患者さんの身体の中で起こっていることを、iPS細胞から作った筋肉の細胞で(試験管の中で)再現するのです。

埜中: 筋肉細胞にするには筋細胞の分化に必要な遺伝子(MyoD)とかを入れるのですか？

櫻井: 今作っている方法は、先生がおっしゃるように、テトラサイクリンで誘導するMyoDを強制発現させる系で、非常に効率よく短期間で筋肉ができます(図1)。

埜中: まず病気のiPS筋細胞は正常なものとのどこが違うのか調べておられるのですね。

櫻井: その通りです。まずストレスを与えた時に健常の方の筋肉と比べてどんな変化が起こるかを詳細に観察します。その差が検出できるということになれば、病気による細胞の変化が起こらなくするような化合物を探すこととなります。

例えば、100個ぐらいの沢山のiPS細胞を並べて全部筋肉細胞にします。その筋細胞にそれぞれ1種類ずつ100種類の化合物を試して、治療効果のありそうなものを探す(スクリーニング)という研究をしています。

埜中：デュシェンヌ型に限らず、筋ジストロフィーでは筋細胞の壊死が主病変です。それを試験管内で再現する

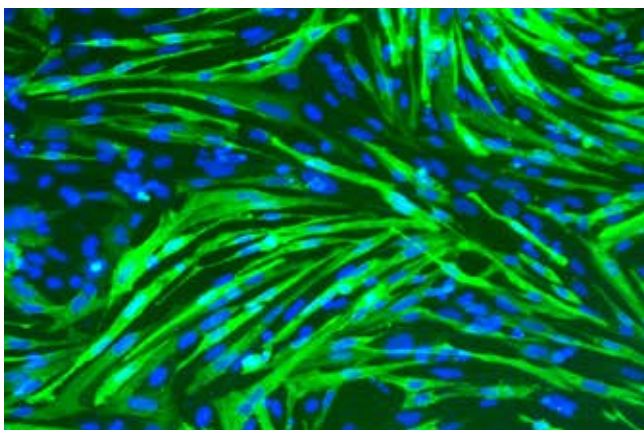


図 1 iPS 細胞から誘導された筋細胞 (緑色)。

細長く、電気刺激で収縮する。

ことは難しくありませんか？

櫻井：今論文を投稿中なのですが、私たちは再現に成功しています。何もせずにただ培養している筋肉の状態だと筋ジストロフィーと正常に差がなく、培養液中のクレアチンキナーゼ (CK) の値も差がないのです。

ところが、我々が見出した実験系では電気刺激を与えると、筋肉が収縮してくれるのですが、収縮させた時に細胞内のカルシウム濃度をみますと、デュシェンヌ型の患者さんからの細胞の方が、細胞内カルシウムが上がる。定常状態では差がないけれど、収縮した時に細胞内カルシウムの上昇というのが病態としてみられるようになる。ジストロフィンの発現を回復させると、患者さんの細胞でもカルシウム濃度が下がる。ということを見出しました。

埜中：デュシェンヌ型でみられる「筋細胞膜の脆弱性が細胞内へのカルシウム流入を促す」というプロセスを再現していることになり、とても興味があります。

櫻井：高カルシウム状態になった時に細胞にストレスが加わり、細胞がもろくなるのだと思います。実際にデュシェンヌ型の患者さんの筋組織では、カルシウムが異常に増加して、変性した細胞を顕微鏡下で見ることができるといわれています。

電気刺激を与えた時のカルシウム上昇が筋細胞の崩壊の引き金と考えていますので、筋収縮時のカルシウム濃度上昇を抑える薬があれば、筋細胞の崩壊を抑えられるはずで。患者さんの筋細胞でカルシウムが上がっていたものを、先ほど述べたスクリーニングの手法を使って、この化合物を入れたら上がらなくなる、というものを見つけ出そうとしているのです。

埜中：細胞レベルで筋ジストロフィーの病態を再現するようなものができた、それを用いて薬での治療研究を進めているということですね？

櫻井：その通りです。治療研究としては最も出口に近いところかもしれませんね。

iPS 細胞内で遺伝子操作、正常の筋細胞を作製、移植治療へ

埜中：試験管内で遺伝子治療した iPS 筋肉細胞を増やし、それを移植して、筋肉の力がつくかどうかというところを患者さんは期待されています。試験管内の遺伝子治療、具体的な方法をお教えいただけますか。

櫻井：今、比較的狙ったところに新しい遺伝子を挿入するという技術が発達しています。TALEN とか CRISPR という技術なのです。ある特殊な酵素を作用させると、本当は安定しているはずの遺伝子が、狙った場所だけ切れるのです。

埜中：その狙った場所というのはどのようにして見つけるのですか？

櫻井：それは付近の塩基配列 (15 ~ 20 塩基ぐらいの並び) を探して、他の配列にはなくて、そこだけに存在するようなものを探します。そこだけ切れるようなデザインを施す。酵素と一緒に入れることで、狙ったところが消える。さらにデュシェンヌ型でエクソン 45 欠損の方であれば、エクソン 45 そのものを挿入し、44 のすぐ隣に 45 が並ぶような形で修復してやれば、ゲノム上でも治ってしまう。

埜中：この方法だとエクソンスキッピングだけでなく、エクソンを補充することも可能になるわけですね。

櫻井：酵素を作用させるだけであればスキッピングの形になって、比較的簡単にできます。それだけではなく、修復される遺伝子配列をそこに一緒に入れることも、さらに付け足すこともできるのです。

点変異を治したような修復型の DNA を準備しておいて、切ったものと一緒にそれを入れてやると、切った後にそれがノリみたいにくっついて、修復されたものに置き換わるということもできます。

埜中：試験管内での遺伝子操作、思うがまま、ということですね。お話を聞いていると、理論的には遺伝子治療への道筋はできている。とても勇気づけられます。

遺伝子治療を受けた iPS 細胞は次にどのようなプロセスで再生治療へともっていかれるのですか？

櫻井：最初は iPS 細胞に筋線維の発育・分化を誘導する MyoD を加えた筋肉が使えるのではないかって実験

したのです。しかしその筋肉細胞はそんなに再生能力が高いわけではないというのがわかってきました。時間はかかるのですが、非常に有望な骨格筋の幹細胞に近いようなものが分化誘導できるようになりました。これは遺伝子操作はしないで、培養液の条件や成長因子をいろいろ工夫することで、筋肉になる性質を備えた細胞にすることが出来るのです。

埜中：それは素晴らしいですね。そしてその次の段階はどうされるのですか？

櫻井：今 iPS 細胞から遺伝子操作をせず筋肉ができるようになってきました。マウスの発生時には MyoD と同じように筋細胞の発育・分化に必要な Myf5 が筋幹細胞にも一部出ていっているとされています。そこで骨格筋分化の初期にも筋幹細胞にも出る遺伝子である Myf5 が、発現すると光るといふ iPS 筋細胞を作ったのです。これは先ほど言った CRISPR などの技術を使って、比較的簡単に出来たのです。Myf5 が発現すると光る細胞というのは、成熟した筋肉が沢山できた段階で、ごくわずかなのですがもう出現しているのです。その細胞を集めてきて移植したら、これが非常に高い再生能力を持っていた。

埜中：iPS 細胞に由来した筋細胞に、Myf5 が自然に発現してくる。そしてその細胞は移植治療に使えるということですね。

櫻井：そうなのです。自然に発現した Myf5 を持つ細胞を光らせるようにしたのです。それをレポーターラインと呼んでいます。

その細胞だけを純化して移植したところ、デュシェンヌ型のモデルマウス (DMD-null マウスといい、ジストロフィンという蛋白が完全に欠損している) の骨格筋と融合してジストロフィンを発現するというところまで明らかにしました。この細胞は移植治療に使えるのではないかと期待しています。

埜中：患者さんは全身治療を望んでおられると思うのですが、移植は筋細胞を筋肉内に注射することですか？

櫻井：そうです。筋注です。

埜中：最初は注射した場所だけ、すなわち局所的治療というわけですね。筋ジストロフィーが進行した患者さんには指1本も動かない人がいて、ナースコールもできないことがあるのです。ですから指1本でも思うように動くようになれば QOL は著明に改善することになります。

櫻井：私たちもそのように思っています。安全性試験が終わったら、手あるいは足の親指の付け根にある母指球筋に移植して、親指の機能を保持できないかな、と思っているのです。そうすると、手だと電動車いすが操作で

きるようになりますし、コンピューターをより簡単に操作できるようにもなります。まず親指からを目指しています。

埜中：患者さんたちが希望しているのは、もう少し広い範囲で、全身的に投与することができないかということです。その可能性はありますか。

櫻井：まだそこまでの実験はしてないのですが、先行研究を見る限りでは、筋肉の細胞を血管内に投与して全身に移植するというのは難しいように思います。もちろんそういった研究もしていかなければいけないと思うのですが、目前のゴールは呼吸筋を治し、人工呼吸器を不要にする。すなわち横隔膜と肋間筋を治せるくらいの量を、何とか筋注で移植できるところまで持って行きたいと思っています。

おっしゃるように全身投与できることに越したことはありません。それに先駆けて足の太い動脈に細胞をいれて、片足ずつ治す様なことを可能にしたい。ただ、それには細胞が血管壁を通過でき、その細胞が病気の筋肉の中に入って行けるような方法を開発しなければなりません。まずは筋注で、局所で上手くいくということを明らかにしつつ、動物実験で全身投与の研究を進めるということを考えています。

埜中：今までの先生のお話をまとめてみます。デュシェンヌ型の患者さんがいる、まず採血してリンパ球を集めそれを iPS 細胞にする、そして試験管内で遺伝子操作で治療をして、あとは誘導をかけて筋肉にして、それを注射する。ということですね (図2)。ちょっと心配なのは移植した筋細胞が癌化したりしないかということです。今のところ iPS は癌化はしないと言われていますが、心配はありませんか。

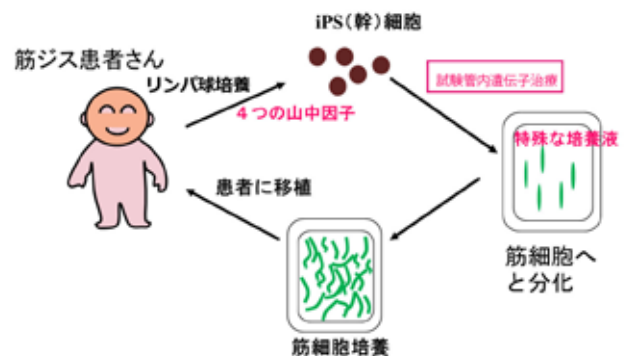


図2 筋ジストロフィーに対する細胞治療の概略

櫻井：理化学研究所の高橋政代先生が網膜の細胞で見ている限りは動物実験でもほとんど癌化はしないということなのです。筋肉でどうかは正直わからないので、そこは我々もきちんと動物実験などを通して明らかにしなければなりません。

iPS ストック細胞を使って、広く・多くの人に移植治療を

塾中：デュシェンヌ型の患者さんのリンパ球を増やしてiPS細胞化し、その細胞に遺伝子治療を施す。そして治療を受けた細胞を筋細胞にして移植する。移植する細胞は患者さん由来なので拒絶反応がない。というのが先生のお話の骨子だったと思います。移植しても拒絶がないというのが、他人の細胞や臓器移植と大きく異なることだと思います。

でも、デュシェンヌ型患者さんは患者さんごとによって遺伝子異常が大きく異なります。先生がいわれた方法をすべての患者さんに施すとなると、すぐにお金と時間がかかると思うのです。個別毎への対応は難しいのではと思うのですが、その点はいかがですか？

櫻井：デュシェンヌ型の患者さんの遺伝子変異はいろいろです。試験管内遺伝子改変は理論的には簡単なようですが、狙ったところだけと言っても、本当に他のところに傷がつかないかどうかはわかりません。細胞内遺伝子治療は思ったほど簡単でないかもしれません。

そこで、もう1つ京都大学で進めているプロジェクトで、iPS細胞ストック事業というものがあります。健康の方、病気でない方のボランティアで細胞の血液型であるHLA型をホモで持っている方が日本人だと1500～2000人に1人くらい居られると推定されています。HLAホモの方のiPS細胞を使えば、同じHLA型にマッチした方であれば、他人の細胞であっても、拒絶反応が少なく移植できるのではないかと考えられます。

まず日本人において最頻度のHLA型の方から10番目の頻度の方までHLAタイプを集めると、日本人全体の3割から4割くらいの方が、この10種類の細胞のどれかにHLAがマッチするという統計があるそうなんです。と言うことは、品質の良い10種類のiPS細胞を用意するだけでも日本人の3割くらいの患者さんには、拒絶反応の少ない細胞移植治療が可能になると考えられます。

それを京都大学で今作っていて、今後さまざまな種類のHLA型を持つiPS細胞が、どんどん蓄積されていき

ます。その安全性等が順次確認されていけば、脊髄損傷などで傷ついた神経に神経幹細胞を移植して、運動機能を回復させる臨床研究が始まると思います。それらの臨床研究で、ストックiPS細胞の有効性や安全性が評価されていきます。そういう情報を十分吟味して、筋ジストロフィーでも「このHLA型の方はまずこのストック細胞で」という選択になると思います。他人の細胞ではあるのだけれども、比較的拒絶が少ないと思います。

ただ免疫抑制剤を完全にゼロにするのは難しいでしょう。ですから究極的にはご本人のということになるのです。しかし、ご本人の遺伝子改変の安全性にまだ不透明なところがあります。これから数年間かけて研究を進めないといけない感じです。

塾中：でも、いろいろ問題はあっても、理論的には治療へと結びつく。今のお話で皆さんは希望を持つことができると思います。いつも患者さん達から言われるのですが、何年後ぐらいにヒトでの試みが開始できるのでしょうか？

櫻井：まあ計画書の段階ではあと7年で一応臨床研究は開始しますというふうには言っていますが、それはフェーズ1という安全性を見るような試験です。武田先生とも相談して、まずは足の指から開始しようかと計画しています。万が一癌化してしまっても、すぐに対応出来るように非常に狭い範囲で試みる。それを7年後に開始して、安全性がある程度認められれば、親指の臨床研究を10年後ぐらいに始めたいと考えています。

塾中：京都参りをしたいという人には、iPS細胞を使用しての再生治療はまだ研究段階で、ヒトへの応用はすこし先になるかもしれない。でも試験管内での研究成果では治療可能であることが証明されている。と希望をもってお話することになります。

櫻井：コストのこともあるので、まずはストックの細胞を使わせていただいて。

塾中：出来ればまずデュシェンヌから、ぜひそれを実現していただきたいとおもいます。

櫻井：頑張ります。

塾中：今日はお忙しいところありがとうございました。

収録 2014年11月28日収録