

## 多能性幹細胞：Naive型とPrimed型多能性

友田 紀一郎

### 1. 多能性幹細胞の樹立

多能性とは、多細胞生物において、細胞が個体を構成するすべての胚葉（脊椎動物では外胚葉、中胚葉そして内胚葉の三胚葉）に分化できる能力のことを表す。通常、哺乳動物では、受精卵が数回の卵割を経て形成する桑実胚から、着床前の胚盤胞内にかけて形成する内部細胞塊および着床後のエピプラストと呼ばれる領域に存在する細胞にのみ認められる能力である（図1A, B）。胚盤胞の着床後、内部細胞塊はエピプラストを形成し、増殖、分化を経て体のすべての構造を作り出す（図1B）。

1950年代から70年代にかけて奇形腫や胎生期がんからEC (embryonic carcinoma) 細胞株が樹立され、それらが*in vitro*での培養後も分化能を維持していることが発見された。そしてこれらの発見を昇華させる形で、1981年には二つのグループがマウス胚盤胞からES細胞 (embryonic stem cells) を樹立し、この細胞が多能性を維持した状態で長期間培養可能であることを示した<sup>1,2)</sup>。マウスES細胞を注入した受精卵を擬妊娠マウスの子宮に戻すとキメラマウスが誕生することから、マウスES細胞は培養後も通常の個体発生に寄与できる能力を保っていることが判明した。このマウスES細胞樹立はマウス個体を用いた遺伝子組換え実験を可能にし、病態モデル動物作製や個体レベルでの遺伝子機能解析が発展した。さらに、これにより*in vivo*では短い発生期間でのみ発現する多能性が*in vitro*で培養条件を整えることにより固定化、維持できることが示された。

マウスES細胞樹立から17年後の1998年にはThomsonらにより、*in vitro*での人工授精と短期間培養によって得られたヒト胚盤胞を用いることでヒトES細胞の樹立が報告され、ES細胞を用いた再生医療の可能性が高まった<sup>3)</sup>。ヒ

トES細胞も、マウスES細胞と同様に多能性を保ったまま理論上、無限に増殖する。Thomsonらはこの特性を生かして大量培養調製したES細胞を神経や心筋へ分化誘導させ、パーキンソン病等の、1種類あるいは少数の細胞種の異常で発症する疾患に対して細胞移植療法を行える可能性を示した<sup>3)</sup>。しかし、ヒトES細胞から分化誘導した細胞を患者に移植する多くの場合、主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex : MHC) の違いにより拒絶反応を引き起こすことが考えられた。またヒト受精卵から樹立するES細胞を用いた治療そして研究は倫理的問題があり、国によって厳しい法規制や予算制限がかけられたため、発展の難しさがあった。これらの問題点を解消する方法として分化した体細胞を初期化し、多能性幹細胞を樹立するいくつかの方法が示唆された。

そのような状況の中、2006年にTakahashiとYamanakaらはマウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF) あるいは尾線維芽細胞に4遺伝子を導入することで多能性幹細胞の樹立が可能であることを示し、iPS細胞 (induced pluripotent stem cell) と名づけた<sup>4)</sup>。ネットで初めてこのニュースを読んだときには椅子からひっくり返るくらい驚いたことを今でも思い出す。その後、著者はYamanakaグループの一員となりヒトiPS細胞樹立を目指した研究を開始したが、自分の研究は遅々として進まなかった。しかし、著者にとっては幸運なことに、2007年にはYamanakaグループとThomsonグループが同日でヒトiPS細胞樹立を報告した<sup>5,6)</sup>。これらの報告を皮切りに、ヒト多能性幹細胞の樹立、使用がES細胞と比べて格段に簡単になり、幅広い疾患に対する多能性幹細胞を用いた基礎研究や再生医療が現実味を帯び、関連する研究が爆発的に進展した。

### 2. Naive型とPrimed型多能性幹細胞

ヒトES細胞が樹立され、その研究が進展するにつれて明白になったのはヒトとマウスES細胞の差異であった。特徴的なのはそれぞれの細胞が形成するコロニー形態や、多能性を保ったまま増殖を促すために必要な培養条件（増殖因子およびその下流のシグナル伝達経路）の違いである。これらは種差に起因するという可能性が第一に考えられたが、二つのグループが着床後（胎生5.5日以降）のマウス胚中エピプラスト部分からの多能性幹細胞 (epiblast

大阪医科大学薬理学教室（〒569-8686 大阪府高槻市大学町2-7 総合研究棟4階薬理学教室）

**Pluripotent Stem Cells: Naive and Primed Pluripotency**

Kiichiro Tomoda (Department of Pharmacology, Osaka Medical College, 2-7 Daigaku-machi, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900187

© 2018 公益社団法人日本生化学会



**図1** Naive型とPrimed型多能性幹細胞の特徴  
(A)マウス胚盤胞（胎生4.5日）の写真。矢印が内部細胞塊。（B）着床前後のマウス胚。内部細胞塊は着床後、エピプラストを形成する。エピプラストは体中のすべての細胞のもととなる。内部細胞塊が形成される際には胎盤等の胚体外組織のもとになる極栄養外胚葉や壁栄養外胚葉への分化はすでに進んでいる。（C）マウスにおけるNaive型とPrimed型多能性幹細胞の特徴をまとめた。表中の必要なシグナル因子等とは、培養液中に添加する未分化能、多能性そして自己複製能を維持するために必要な因子群のことを示す。2iはMEKおよびGSK3キナーゼの特異的阻害剤。（D）我々が新たに発見した条件下で培養したヒト多能性幹細胞のコロニー。マウスNaive型多能性幹細胞のようなドーム型の形態を示す。（E）現在、広く使用されているヒト多能性幹細胞（Primed型）のコロニー。偏平な形態を示す。フィーダー細胞を使用しない条件で培養。（D）と（E）の画像は同じ倍率で撮影。

stem cells : EpiSCs) の樹立を報告<sup>7,8)</sup> したことにより、別の可能性が浮上した。この新たに樹立されたEpiSCsにおいては、形成するコロニー形態、多能性を維持するために必要な増殖因子群や多能性マーカー群の遺伝子発現の状態

が、ヒトES細胞と類似していた。これらの結果から、1) マウスにおいては、着床後の発生が進行した胚からも多能性幹細胞樹立が可能であること、2) *in vitro*で細胞が多能性を保持する状態と、多能性を維持するための培養条件に

は複数種類が存在すること、3) ヒトES細胞は着床前の受精卵から樹立されたにもかかわらず、着床後の受精卵から樹立されたマウスEpiSCsと、多能性幹細胞としての性質が類似していることが明らかになった。

EpiSCsの報告からほどなく、NicholsとSmithらにより多能性をNaive型(Naive pluripotency)とPrimed型(Primed pluripotency)という異なる細胞状態に分ける概念が提唱された<sup>9)</sup>。Naive型は着床前の内部細胞塊でみられる多能性に近い状態であり、Primed型は着床後のエピブラスト内でみられる多能性に近い状態である。図1CにNaive型とPrimed型の代表的な特徴をまとめた。マウスES細胞やマウスiPS細胞はNaive型の特徴を示すのに対して、マウスEpiSCsおよびヒトES細胞はPrimed型の特徴を示す。ここで注目すべき点は、ヒトES細胞が、マウスES細胞と同様に着床前の受精卵から樹立されたにもかかわらず、Naive型でなくPrimed型の特徴を示していることである。これを受けて、1) ヒト内部細胞塊に存在する多能性細胞はPrimed型の状態にある、あるいは2) ヒトES細胞樹立を目的とした受精卵培養中に受精卵の分化が進行し、Primed型の状態で安定化した細胞がES細胞として樹立されている、という二つの可能性が浮上した。ヒト受精卵を用いた1細胞網羅的遺伝子解析やヒトES細胞樹立の過程を詳細に解析した結果から、現在では2)の可能性が高いと考えられている。

### 3. ヒトNaive型多能性幹細胞の樹立

通常のヒトES細胞、iPS細胞はPrimed型の状態にある(これらのヒト多能性幹細胞の特徴を考えると完全にPrimed型ではなく、Naive型とPrimed型の間に位置すると考えられる。しかし、ここでは便宜上、Primed型と記載する)。ヒトNaive型多能性幹細胞の樹立は可能なのだろうか? 2010年のJaenischらによるヒトNaive型多能性幹細胞樹立を試みた報告<sup>10)</sup>を皮切りに転写因子等の過剰発現、シグナル伝達経路やエピジェネティックを制御する分子に作用する薬剤等を用いてヒトNaive型多能性幹細胞の樹立に取り組む研究が盛んになった。現在までに、複数のグループがそれぞれ若干異なる条件を用いてマウスNaive型多能性幹細胞に特徴が類似したヒト多能性幹細胞株の樹立を報告している。報告された新たなヒト多能性幹細胞の特徴をまとめると、1) 図1Dのようなドーム状の立体的なコロニー形態をとること、2) 女性ドナーから樹立された細胞では2本のX染色体が転写活性化状態にあること、3) 染色体DNA全体が低メチル化状態になること、4) ヘテロクロマチン形成に関与するヒストン修飾レベルの低下が起ることが認められている。これらはマウスNaive型多能性幹細胞が示す特徴に近い。また、既存のヒト多能性幹細胞

と比較して、新たな細胞はヒト内部細胞塊中の細胞により近い遺伝子発現パターン(内源性レトロウイルス群の発現パターンも含む)を示すことも報告されている。

Naive型とPrimed型多能性幹細胞の違いの一つに個体形成へ寄与する能力における差がある。マウス多能性幹細胞を導入したマウス受精卵を擬妊娠母体に戻した場合、Naive型は高頻度で個体発生に寄与し、キメラ個体として生殖系列形成にも関与できるのに対して、Primed型はその能力が劣る。ヒト多能性幹細胞に関しては、この能力を検定することは倫理上難しいが、ヒト多能性幹細胞をマウスやブタ受精卵に導入後、その細胞の個体発生への取り込みを検定するアッセイも行われている。異種の動物の個体形成に対する寄与で評価する点で、ヒトNaive型とPrimed型多能性幹細胞を識別するアッセイとしての正当性には疑問が残るものの、新たに樹立されたマウスNaive型細胞に似た特徴を持つヒト多能性幹細胞株はNaive型であると結論づけられている。

### 4. 培養環境が多能性幹細胞の性質に与える影響

我々は複数のヒトiPS細胞株の性質を解析する過程で、我々のグループが女性ドナーから樹立したほとんどの細胞株で、X染色体上に存在する遺伝子群(X-linked遺伝子)が男性ドナーから樹立した細胞株と比べて発現量が1.5~2倍程度高いことを見いだした<sup>11)</sup>。このX-linked遺伝子群の発現量上昇はX染色体全体で認められたことから、2本あるX染色体の両方が転写活性化していることが予想され、実際に、RNA-FISH等を用いたさまざまな解析によって裏づけられた。初期化前のドナー体細胞では1本のX染色体しか活性化されておらず、iPS細胞として樹立された後の長期培養中に不活性化していたX染色体が再活性化していた。上述したように女性ドナー由来の細胞において2本のX染色体が転写活性化状態にあることはマウスNaive型多能性幹細胞の特徴の一つである。しかし、我々が樹立したヒトiPS細胞株においてはNaive型の指標とされているその他の特徴は顕著ではなかった。また、我々が解析に用いた細胞株は、最初のヒトiPS細胞樹立を報告した論文で用いた方法で初期化そして培養したものであり、ヒトNaive型多能性幹細胞樹立を行う際に用いるさまざまな阻害剤等を使用していなかった。他のグループが女性ドナーから樹立した多くのヒトPrimed型多能性幹細胞においては、体細胞と同様に、1本のX染色体しか転写活性化されていないと報告されていたことから、我々の結果は予想外であった<sup>11)</sup>。

なぜ我々が樹立したiPS細胞株では、特別な阻害剤等を使用せずとも、2本のX染色体が活性化状態となったのか? 多能性幹細胞の性質を維持しながら培養する方法



の一つに多能性幹細胞をサポートする細胞（フィーダー細胞）を用いる方法がある。フィーダー細胞は未分化能や自己複製能の維持に必要な因子群を産生する。多くのグループは細胞初期化や培養の際にMEFをフィーダー細胞として使用しており、一方、我々はMEFから不死化されたSNL（STO/Neomycin耐性遺伝子／LIF）細胞を使用していた。そこであらためてMEFフィーダー細胞を用いて女性ドナー由来ヒトiPS細胞を樹立して解析したところ、従来の報告どおり1本のX染色体しか活性化されてこないことが判明した。

SNL細胞は、MEF細胞と異なり、サイトカイン leukemia inhibitory factor（LIF）を高レベルで産生する。LIFはマウスおよびヒトNaive型多能性幹細胞の未分化状態を維持するのに必要である。そこで、MEFフィーダー細胞を用いてヒトiPS細胞を培養する際に、LIFを添加したところ、一部のX-linked遺伝子群の発現量が上昇していた。以上より、SNLフィーダー細胞を用いたiPS細胞培養条件下では2本のX染色体が転写活性化状態になり、その活性化にLIFが関与していると結論づけた<sup>11)</sup>。

SNLフィーダー細胞を用いた培養条件は何が特別なのだろうか？ 我々はSNL細胞培養液中に、LIFに加えて他にもX染色体を活性化する因子が存在していると仮定し、マウス多能性幹細胞におけるX染色体転写活性化状態を指標にその因子の同定を試みた。その結果、X染色体再活性化を促進する因子としてLIF、アスコルビン酸、bone morphogenetic protein（BMP）4そしてリゾホスファチジン酸（LPA）を見だし、さらに、阻害する因子としてbasic fibroblast growth factor（bFGF）とActivin Aが働いていることを明らかにした<sup>12)</sup>。興味深いことに、アスコルビン酸、BMP4、LPAそしてbFGFはMEF細胞培養液中にも同レベルで存在していた。一方で、LIFは予想どおりSNLに特異的に、Activin AはMEF培養液中に高レベルで存在していた。基本培地中にLIF、アスコルビン酸、BMP4そしてLPAのみを加え、1本のX染色体が不活性化しているマウスPrimed型多能性幹細胞を培養すると、高頻度かつ短期間でこのX染色体の再活性化が起こった。このX染色体が2本とも活性化状態にある細胞を調べるとNaive型多能性幹細胞の特徴を有していた。よってLIF、アスコルビン酸、BMP4そしてLPAの組み合わせはマウスPrimed型多能性幹細胞を強力にNaive型へ変換する活性を持つと結論を下した<sup>12)</sup>。

この因子の組み合わせはヒトPrimed型多能性幹細胞もNaive型へと変換するのであろうか？ マウス実験と同様の条件（因子の組み合わせ、濃度）でヒトPrimed型多能性幹細胞のNaive型への変換を試みたが、未分化状態の細胞を維持、培養することはできなかった。この原因として、種差あるいはヒト多能性幹細胞は完全なPrimed型ではな

くNaive型とPrimed型の中間に位置しているという細胞状態の違いが考えられた。そこでNaive型多能性幹細胞の示すコロニー形態を指標に、因子の組合わせ等を変更しながらヒトPrimed型細胞の培養を続けたところ、高頻度で図1Dのようなドーム型のコロニー形態を持つ細胞が出現する培養条件を見いだした。この細胞がヒトNaive型であるかどうかは今後の詳細な解析が必要であるが、コロニー形態の変化のみならずエピジェネティック状態や遺伝子発現の変化等からマウスNaive型多能性幹細胞類似の細胞状態に変換されていると考えられた。以上より、ヒトPrimed型多能性幹細胞をNaive型多能性幹細胞の特徴を持つ細胞へ変換することは可能であり、その変換を可能にする培養条件は複数存在することがあらためて示唆された。

## 5. ヒトNaive型多能性幹細胞の有用性

現在、用いられているヒトPrimed型多能性幹細胞をNaive型に変換する、あるいは初めからNaive型多能性幹細胞を樹立して研究等に活用する有用性はあるのか？ Primed型多能性幹細胞は分化が少し進んだ状態にあり、その進み方も細胞株により異なる。分化の進み方に依存して、たとえば、神経などの外胚葉系へ偏った未分化状態にある細胞株では中内胚葉系への分化効率が低下することが予想できる。また、Primed型多能性幹細胞は長期間の培養中にエピジェネティック状態が変化し、分化能が低下することも報告されている。Primed型からNaive型への変換は染色体全体でのヒストン修飾や染色体DNAメチル化状態の変化を伴う。この変換により分化状態やエピジェネティック状態の初期化が可能なら、Primed型で問題となる分化能の偏りや低下が解消される可能性が高い。この可能性を検証するためには再現性高く安定的にNaive型多能性幹細胞を樹立、維持できる方法を確認し、数多くのPrimed型幹細胞株をNaive型に変換後、それぞれの分化能や分化細胞の機能を詳細に比較する必要がある。Naive型多能性幹細胞の普及にはこのような研究の進展が待たれるところである。

## 6. おわりに

今回紹介した、多能性幹細胞樹立の歴史も含めた、多くの研究結果を考えると、多能性幹細胞を日ごろ維持培養する環境が細胞の未分化状態、分化能やエピジェネティック状態に与える影響の大きさがわかる。そして、その培養条件の変化が極端な場合、細胞特性への影響がNaive型とPrimed型の差異に該当するほど顕著になると考えられる。上述したようにヒトNaive型多能性幹細胞がPrimed型をしのぐほど機能的に優れているという報告はまだ少なく、今

後の研究の進展が待たれる。しかし、現在のヒト多能性幹細胞が誰にでも簡単に扱え、どの細胞株を使用しても多種類の分化細胞を効率よく誘導できるわけでないことは明白である。よって、その細胞機能を改善するための培養条件のさらなる検討は必要である。

本稿ではふれなかったが、多能性幹細胞は通常、胎盤などを形成する胚体外細胞、組織（図1B）には高効率で分化、寄与できないと考えられている。しかし最近、培養条件を変えることで、多能性を保ちながら胚体外細胞、組織へも効率よく分化、寄与できる幹細胞の樹立が報告された。またNaive型で問題とされる極端な染色体DNA低メチル化状態の解消を目指した研究も行われている。これらは多能性幹細胞の機能を向上させるための培養条件を検討する研究と捉えることができ、多能性幹細胞を利用した再生医療をはじめとする応用研究や基礎研究を効率化、加速化するために必須である。ますますの研究の発展とそれによる細胞機能の進化を期待したい。

## 謝辞

紙面の都合上、引用できなかった多くの研究を行った研究者の方々にこの場を借りてお詫びいたします。これまでの研究をサポートしていただいた山中研究室および共同研究者の方々、朝日研究室のメンバーに感謝いたします。

## 文 献

- 1) Evans, M.J. & Kaufman, M.H. (1981) *Nature*, **292**, 154–156.

## 著者寸描

### ●友田 紀一郎（ともだ きいちろう）



大阪医科大学薬理学教室講師。博士（バイオサイエンス／奈良先端科学技術大学院大学）。

■略歴 多能性、全能性を制御する分子メカニズムの解明、そのメカニズムを利用した細胞のコントロール。iPS細胞を用いた病態モデルの作製と創薬。

■ウェブサイト <https://www.osaka-med.ac.jp/class/pha.html>

- 2) Martin, G.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7634–7638.
- 3) Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., & Jones, J.M. (1998) *Science*, **282**, 1145–1147.
- 4) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, **126**, 663–676.
- 5) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007) *Cell*, **131**, 861–872.
- 6) Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., & Stewart, R. Slukvin, II, & Thomson, J.A. (2007) *Science*, **318**, 1917–1920.
- 7) Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., & Vallier, L. (2007) *Nature*, **448**, 191–195.
- 8) Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., & McKay, R.D. (2007) *Nature*, **448**, 196–199.
- 9) Nichols, J. & Smith, A. (2009) *Cell Stem Cell*, **4**, 487–492.
- 10) Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., & Jaenisch, R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9222–9227.
- 11) Tomoda, K., Takahashi, K., Leung, K., Okada, A., Narita, M., Yamada, N.A., Eilertson, K.E., Tsang, P., Baba, S., White, M.P., Sami, S., Srivastava, D., Conklin, B.R., Panning, B., & Yamanaka, S. (2012) *Cell Stem Cell*, **11**, 91–99.
- 12) Kime, C., Sakaki-Yumoto, M., Goodrich, L., Hayashi, Y., Sami, S., Derynck, R., Asahi, M., Panning, B., Yamanaka, S., & Tomoda, K. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 12478–12483.