

図2 マーモセット脊椎における従来のMRIと拡散テンソルMRI  
 コモンマーモセット脊椎(軸位断像)におけるT2強調像(T2 weighted image: T2WI, a)とDTI(b, c)を示す。FAマップ(b)では、異方性の大きい白質線維は高信号を呈している。カラーマップ(c)は異方性を軸ごとに色でコードしており、左右方向は赤、頭尾側方向は青、前後方向は緑でコードすることが多い(RBGカラー)。白質線維は青で描出されており、白質が頭尾側方向の軸索線維から構成されていることを示している。

等方性拡散においては $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_3 = \langle D \rangle$ となりFAは0となる。

異方性が強くなると $\lambda_1 \gg \lambda_2 = \lambda_3$ となりFAは1に近づいていく。

FAマップにおける信号の強弱はFAの大きさを表し、従来のDWIと違い定量的である。脳梗塞、出血などの病変部においてFAが低下することが知られているが、われわれはwaller変性においてもFAが低下することを報告している<sup>21)</sup>。拡散テンソルはFAなどで異方性の定量が可能であるだけでなく、方向性を解析できるという画期的な面をもっている。

## ② カラーマップとRBGカラー

FAマップにおける異方性を軸ごとに色分けしたものをcolor coded FAマップ(通称カラーマップ)という。カラーマップはいろいろな線維をその走行方向から識別することが可能である。色は任意であるが、左右方向が赤(red)、縦方向は青(blue)、前後方向は緑(green)に割り当てることが多く、RBGカラーと呼ばれる<sup>19)</sup>。FAマップ、カラーマップなどテンソル解析によって得たMRI全体がDTIである。広義にはDTTもDTIに属するが、あえて区別することが多いように思われる。コモンマーモセット脊椎の軸位断像におけるカラーマップをみると、青の部分が頭尾側方向に走行する白質であることがわかる(図2)。

## ③ 拡散テンソルtractographyの構築

ボクセルごとに楕円体の長軸方向、つまり異方性の最大方向を追跡し3次元構築することで白質などの線維走行を追跡したものが拡散テンソルtractography(DTT)である。異方性の追跡には無数のアルゴリズムが存在するが、fiber assignment by continuous tracking(FACT)<sup>18)</sup>が有名である。あえて誤解を恐れずに端的にいうなら、隣り合うピクセル(ボクセル)ごとに最も大きい拡散楕円体の長軸を追跡して行くことでトラクトが構築される。DTTは、従来のMRIでは描出することが困難であった脳内の皮質脊髄路や脳梁などの白質線維の走行を明瞭に描出することが可能であり、脳神経外科領域では手術のナビゲーションにも用いられた報告もある<sup>10)</sup>。DTTは関心領域(region of interest: ROI)と呼ばれる関心領域を設定することで、見たい情報を選択的に何度でも構築できる利点がある。DTTの解析にはいくつかのソフトが開発されているが、本稿における拡散テンソル解析とDTTの構築には、東京大学医学部放射線科で開発されたフリーソフトであるVOLUME-ONEとdTV II SRを使用している<sup>16)</sup>。

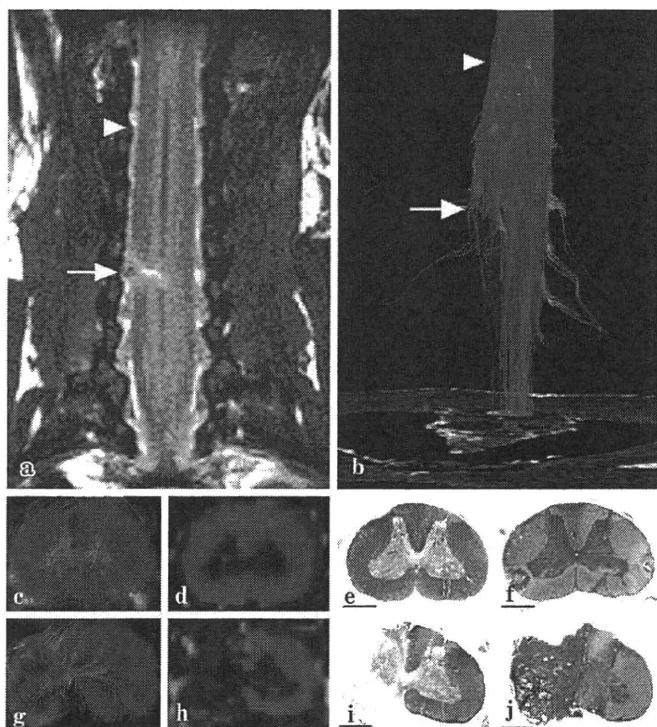


図3 マーモセット脊髄半切モデルにおけるMRI, DTTおよび組織像 (文献7より引用)

半切損傷 (C5/6 椎体高位) 後2週で撮影したコモンマーモセット頸髄 (死後モデル)。従来のMRIではAのようにT1, T2コントラストとしてしか描出されなかった半切脊髄が, DTTによって神経線維の途絶として描出されている (b)。HE染色 (f, j) やLFB染色 (e, i) による組織学的評価によって, 得られたDTT (b, c, g), カラーマップ (d, h) が組織像を反映していることが明らかとなった。c~gは半切高位から2cm頭側における脊髄であり, g~jは半切高位における脊髄を示す。

## 脊髄における拡散テンソル tractography

### I 脊髄における DTT の必要性

脊髄白質は多くの神経線維束からなるが, 組織標本においては一見すると均一な組織であり, 特殊な染色をしない限り個々の投射路を観察することは不可能である。また, 投射路の違いによるプロトンの緩和時間の差もほとんどないため, T1やT2による明暗のコントラストとしても識別不能である。したがって, 脊髄における投射路および軸索の情報は非常に重要であるが, 生体においてそれらを可視化するのは困難であった。アーチファクトを軽減する最新のシークエンスや高磁場のMRI装置を使用しても, 脊髄白質は均一な組織として描出され, 投射路を識別することは不可能である。われわれがこれまで取り組んできた脊髄損傷においても, 軸索がどこで破綻しているのか, どの程度の軸索が損傷を免れて残存しているのかを知ることは, 予後予測, 治療選択の面から

も非常に重要であるが, これまではT1, T2強調画像から損傷の局在と圧迫の程度を知るのみであった。

一方, DTTは脳内白質神経線維を可視化できる方法として10年ほど前から多くの報告がなされていた。しかし, 脊髄は脳に比べて小さく, 体の深部に位置し, 狭い範囲に脊髄実質, 脳脊髄液, 椎骨, 筋肉, 空気など磁化率の異なる組織が混在するため, 高分解能データを得るのが困難であった<sup>2,15)</sup>。このためヒトにおける脊髄のDTTの報告は散見されるものの, その精度は低く, 組織学的な検討を加えた報告はほとんどなかった<sup>5,6,22)</sup>。脊髄のDTTを臨床応用するためには, DTTと組織を詳細に比較検討し, 精度検証を行う必要があった。そこで, われわれは霊長類コモンマーモセットの脊髄においてDTTの撮像を行い, 組織と比較検討しその精度検証を行ってきた。

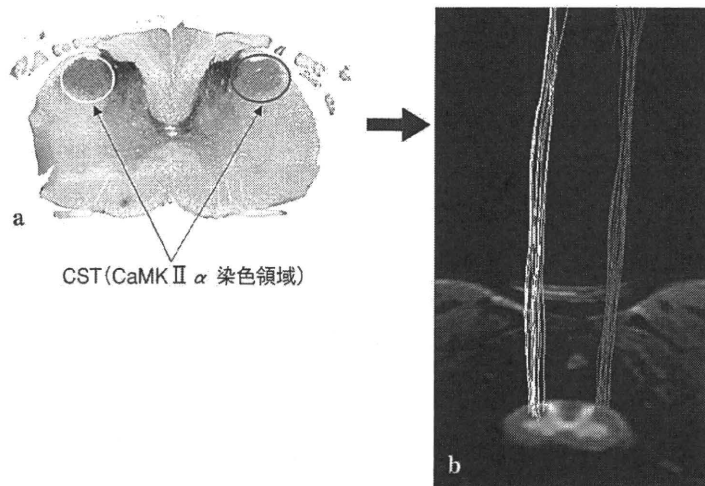


図4 皮質脊髄路選択的 DTT の構築方法

DTT は解剖組織学的知見に基づき、ROI と呼ばれる関心領域を設定することでみたい情報のみを構築することが可能である。マーモセットの皮質脊髄路 (corticospinal tract: CST) は CaMK (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase) II α 染色によって脊髄側索に同定でき (a)、ここに ROI を設定することで皮質脊髄路選択的な DTT (b) を構築することが可能である。

## ② 霊長類コモンマーモセット頸髄における DTT

われわれはヒトに近縁である霊長類コモンマーモセットを用いて再現性のある脊髄損傷モデルを作製し、ヒト神経幹細胞移植が機能回復に寄与することを報告してきた<sup>8,9)</sup>。残念ながらいまだにヒトの脊髄完全損傷の治癒の報告はないが、約 5~10%の軸索が損傷を免れれば機能回復が見込めることもわかってきている。動物実験レベルでは大脳的一次運動野 (primary motor cortex) に biotin dextran amine (BDA) などのトレーサーを注入することで損傷軸索を組織学的に評価することは可能であるが、当然のことながら臨床応用は不可能であった。そこで、前述した DTT の優れた特徴に着目し、コモンマーモセット損傷脊髄を対象として DTT の有用性を検討した。動物実験用 7 Tesla MRI のもと<sup>注3)</sup>、スピエコー法で撮像を行った。結果、世界で初めて霊長類実験動物脊髄の明瞭な DTT の描出に成功した<sup>7)</sup>。DTT が軸索の状態を反映しているかどうかをみるために、よりシンプルなモデルとして頸髄半切損傷 (C5/6 椎体高位) モデルを作製し、2 週後に DTT を撮

影した (死後モデル)。DTT は従来の MRI では T1, T2 コントラストとしてしか描出されなかった半切脊髄を、神経線維の途絶を可視化することで明瞭に描出していた (図 3)。Hematoxylin-eosin (HE) 染色や luxol fast blue (LFB) 染色による組織学的評価によって、得られた DTI および DTT が組織像を反映していることを証明した。死後モデルにおける知見を踏まえ、至適な麻酔深度の設定をしたこと、呼吸性変動や脳脊髄液の拍動などのアーチファクトの原因になる要素をさまざまな工夫によって最小限に軽減することで、現在では生きているコモンマーモセット脊髄の DTT を投射路ごとに再現性をもって構築することが可能である (図 4, 5)。さらに、これまで DTT では描出困難といわれていた錐体交叉の描出にも成功しており (図 6, 7)、DTT が従来のトレーサーにかわる fiber tracking のツールとしてきわめて有用であることが証明された。

注3) テスラ (Tesla) とは磁場強度を表す単位で、1 Tesla=10,000 Gauss (ガウス) である。

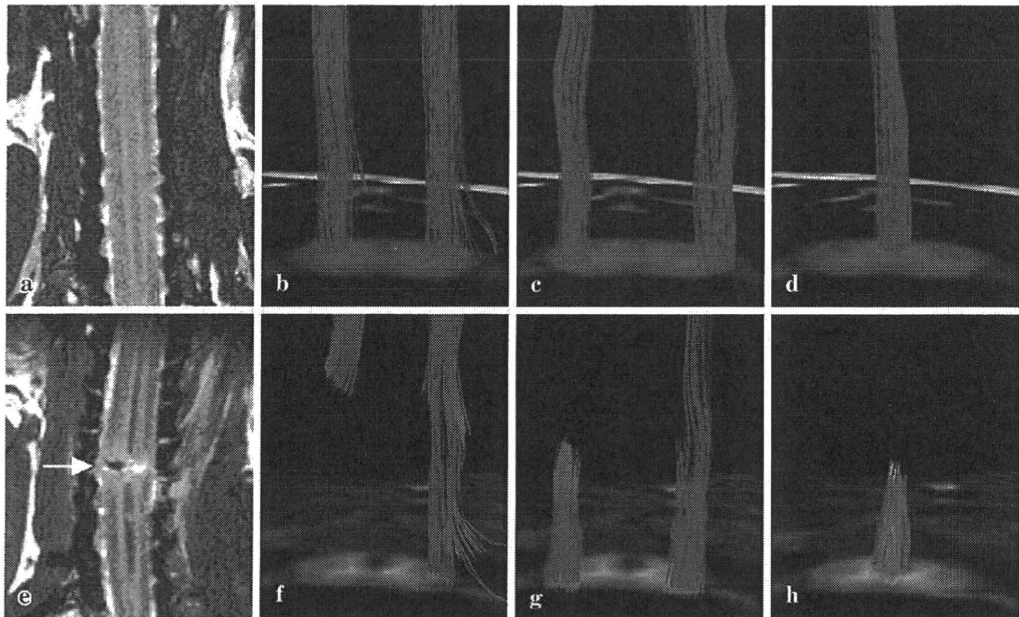


図5 マーモセット脊髄における投射路選択的 DTT (文献7より引用)  
ROIの設定を変えることで、生きているコモンマーモセットの頸髄の投射路選択的 DTT を描出した。a~d は正常な頸髄であり、e~h は脊髄半切モデルである。a, e: T2 強調 MR 像。b, f は皮質脊髄路の DTT, c, g は脊髄視床路, d, h は後索路を示している。DTT は脊髄半切損傷を反映していた。

## DTT の問題点と展望

### ① 解像度

よくある質問であるが、DTT は軸索そのものを描出しているのではない。前述のように DTT はボクセルごとに異方性を解析することで構築されるが、ボクセルサイズは軸索径よりもはるかに大きく、実際には  $10^2$  オーダー以上の軸索が集まった線維束の拡散異方性をみていることになる。図2におけるピクセル(ボクセル)サイズは  $0.215\text{ mm}$  であるのに対し、軸索径は平均  $5\text{ }\mu\text{m}$  程度である。

### ② 複雑な神経走行の描出

解像度の問題とも密接に関係するが、方向の異なる線維が同一ボクセル内に存在すると partial volume 効果によって異方性が相殺され、追跡を止めてしまうことがある。反対に異方性をもちさえすればトラクトをしつづけ、実際にはありえない構造を描出することもある。この事実は、

DTT が実際の解剖学的構造を必ずしも反映しないことを示している。われわれは誤ったトラクトを描出する確率を減少させるため、FA に閾値を設定したり、異方性の追跡の際に急な方向転換を防ぐために追跡角度にも閾値を設定したりすることで対処している。現段階においては通常の MRI の読影と同じように、解剖組織学的知識を総動員しながら慎重に解釈する必要があると考えている。

複雑な神経走行の描出に対しては high b value を用いた多軸神経走行<sup>20,23)</sup>の解析が有用であり<sup>24)</sup>、われわれも視神経交叉や脳神経の鮮明な描出に成功しているが、これらの方法は膨大な撮像時間を要するために臨床応用には至っていない。

### ③ DTT の臨床応用

われわれはこれまでのマーモセット脊髄における DTT の知見を生かし、すでにかなり多くの症例に対して臨床応用を行っている。脊髄損傷だけでなく、頸椎症性脊髄症、後縦靭帯骨化症、脊髄

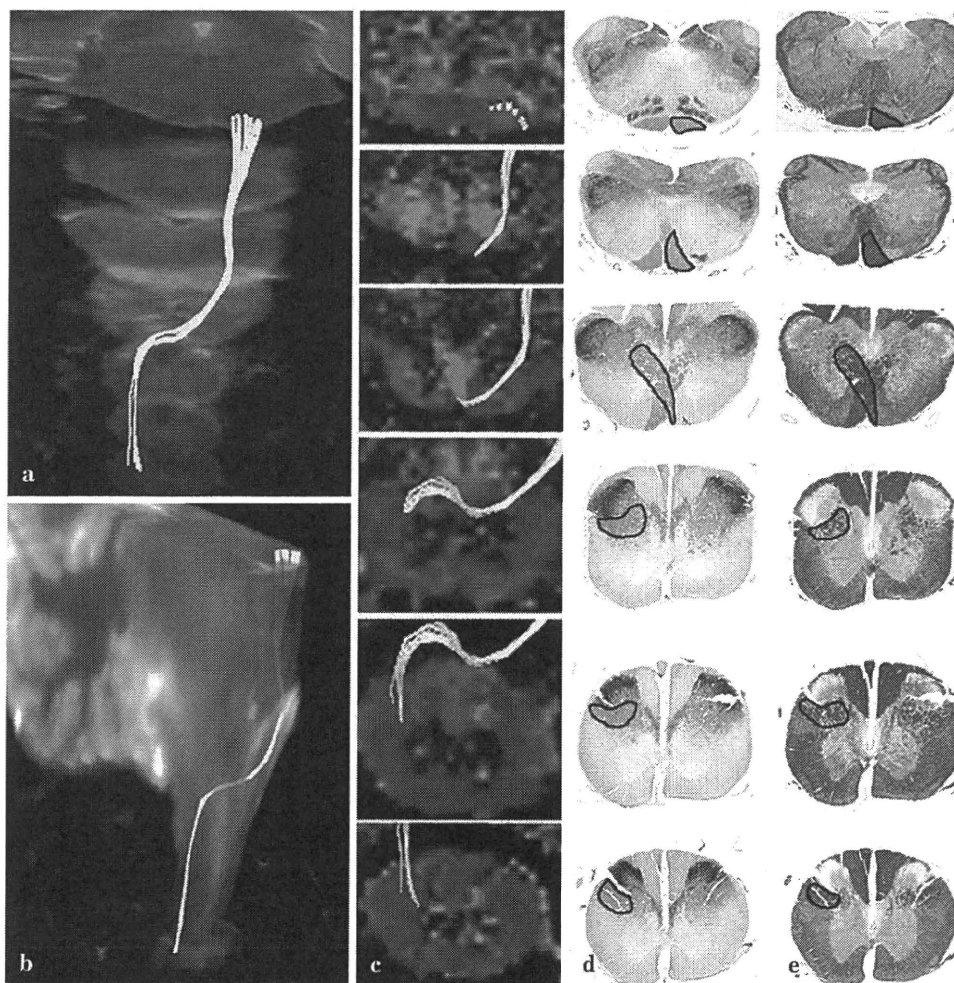


図6 マーモセット錐体交叉におけるDTT (文献7より引用)

われわれは、皮質脊髄路の唯一の解剖学的特徴である延髄錐体交叉の明瞭なDTTを描出することに成功した(a, b)。FAマップとDTTをsuperimposeした画像(c)とCaMK II  $\alpha$ 染色(d)、LFB染色(e)を比較すると、描出したトラクトは確かに延髄で交叉し、対側の上位脊髄側索を下降していることがわかる。

腫瘍などにおけるDTTの有用性も同時に検討しているところである。頸部の症例に限局している

のは、体幹部では高分解能の画像を得にくく、詳細な解析が困難だからである。今後、MRIにおけ

<sup>注4)</sup> bとはb value (b値)のことで、DWIにおける拡散の設定に関する値である。b valueは磁気回転比を $\gamma$  (MHz)、MPGの大きさをG (mT/m)、MPGの印加時間を $\delta$  (msec)、1対の傾斜磁場のそれぞれの始まりの時間を $\Delta$  (msec)、とすると以下の式で表される。

$$b = \gamma^2 G_x^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$$

つまり、b valueは拡散の程度を表す指標であ

り、b valueが高いほうがより拡散を強調していることになる。本稿でわれわれが得ているDTTは $b=1,000$ で撮影している。これに対し、high b valueとはbを2,500以上に上げることで、従来のDWIではとらえることができなかった細胞内の拡散や、複雑な神経走行の拡散を検出することが可能となる。

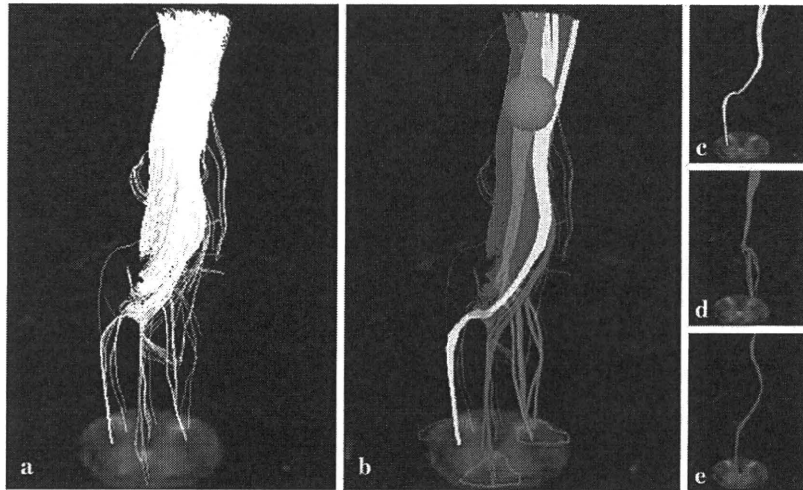


図7 マーモセット延髄における皮質脊髄路のDTT (文献7より引用)  
 延髄錐体部における皮質脊髄路は90%が錐体交叉を通るが(c), 数%は同側の側索を下降する線維(赤, d)や, 対側の前索を下降する線維(青, e)が存在することが知られている。DTTはどの経路も明瞭に描出した(b~e)。これらの画像は上位と下位の2カ所にROIを設定することにより描出した。本結果はDTTがある程度の信頼性をもって投射路を描出できることを示唆している。

るハードとソフトの開発が進み、撮影時間の長さや解像度の問題は克服されていくことを期待する一方、解剖構造的な情報であるトラクトに機能的な情報を付加することによって、さらに脊髄疾患の病態に迫れると考えている。

文献 (太字番号は重要文献)

- 1) 青木茂樹, 阿部 修, 増谷佳孝(編): 新版 これまでわかる拡散MRI. 学研メディカル秀潤社, 2005
- 2) Basser PJ, Jones DK: Diffusion-tensor MRI: theory, experimental design and data analysis—a technical review. *NMR Biomed* 15: 456-467, 2002
- 3) Burdette JH, Elster AD, Ricci PE: Acute cerebral infarction: quantification of spin-density and T2 shine-through phenomena on diffusion-weighted MR images. *Radiology* 212: 333-339, 1999
- 4) Burdette JH, Ricci PE, Petitti N, et al: Cerebral infarction: time course of signal changes on diffusion-weighted MR images. *AJR Am J Roentgenol* 171: 791-795, 1998
- 5) Ducreux D, Lepeintre JF, Fillard P, et al: MR diffusion tensor imaging and fiber tracking in 5 spinal cord astrocytomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 27: 214-216, 2006
- 6) Facon D, Ozanne A, Fillard P, et al: MR diffusion tensor imaging and fiber tracking in spinal cord compression. *AJNR Am J Neuroradiol* 26: 1587-1594, 2005
- 7) Fujiyoshi K, Yamada M, et al: *In vivo* tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J Neurosci* 27: 11991-11998, 2007
- 8) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al: Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80: 182-190, 2005
- 9) Iwanami A, Yamane J, Katoh H, et al: Establishment of graded spinal cord injury model in a nonhuman primate: the common marmoset. *J Neurosci Res* 80: 172-181, 2005
- 10) Kamada K, Todo T, Masutani Y, et al: Combined use of tractography-integrated functional neuronavigation and direct fiber stimulation. *J Neurosurg* 102: 664-672, 2005
- 11) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al: MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 161: 401-407, 1986
- 12) Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, et al: Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology* 168: 497-505, 1988
- 13) Le Bihan D, Mangin JF, Poupon C, et al: Diffusion tensor imaging concepts and applications. *J Magn Reson Imaging* 13: 534-546, 2001
- 14) Le Bihan, D, van Zijl P: From the diffusion coefficient

- to the diffusion tensor. *NMR Biomed* 15 : 431-434, 2002
- 15) Maier SE, Mamata H : Diffusion tensor imaging of the spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* 1064 : 50-60, 2005
  - 16) Masutani Y, Aoki S, Abe O, et al : MR diffusion tensor imaging : recent advance and new techniques for diffusion tensor visualization. *Eur J Radiol* 46 : 53-66, 2003
  - 17) Mori S, Zhang J : Principles of diffusion tensor imaging and its applications to basic neuroscience research. *Neuron* 51 : 527-539, 2006
  - 18) Mori S, van Zijl PC : Fiber tracking : principles and strategies—a technical review. *NMR Biomed* 15 : 468-480, 2002
  - 19) Pajevic S, Pierpaoli C : Color schemes to represent the orientation of anisotropic tissues from diffusion tensor data : application to white matter fiber tract mapping in the human brain. *Magn Reson Med* 42 : 526-540, 1999
  - 20) Schmahmann JD, Pandya DN, Wang R, et al : Association fibre pathways of the brain : parallel observations from diffusion spectrum imaging and autoradiography. *Brain* 130 : 630-653, 2007
  - 21) Takagi T, Nakamura M, Yamada M, et al : Visualization of peripheral nerve degeneration and regeneration : monitoring with diffusion tensor tractography. *Neuroimaging* 44 : 884-92, 2009
  - 22) Tsuchiya K, Fujikawa A, Suzuki Y : Diffusion tractography of the cervical spinal cord by using parallel imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 26 : 398-400, 2005
  - 23) Tuch DS, Reese TG, Wiegell MR, et al : Diffusion MRI of complex neural architecture. *Neuron* 40 : 885-895, 2003
  - 24) Yamashita T, Kwee TC, Takahara T : Whole-body magnetic resonance neurography. *N Engl J Med* 361 : 538-539, 2009
-

## 脊髄損傷に対する iPS 細胞および 神経堤幹細胞移植<sup>\*1</sup>

辻 収彦<sup>\*2,3</sup> 名越 慈人<sup>\*2,3,4</sup> 藤吉 兼浩<sup>\*2,3</sup>  
戸山 芳昭<sup>\*2</sup> 岡野 栄之<sup>\*3</sup> 中村 雅也<sup>\*2</sup>

### はじめに

難治性神経疾患に対する細胞移植治療の有効性は、研究レベルにおいて多数報告されている。当研究室においても、これまでに脊髄損傷に対する齧歯類胎仔由来神経幹細胞移植の有効性<sup>20,21,23)</sup>や、ヒト胎児由来神経幹細胞移植の霊長類コモンマーマセット脊髄損傷モデルへの有効性<sup>8,9)</sup>を報告してきた。しかし、これらの研究で使用されている移植細胞の多くは胎仔/胎児由来の幹細胞であり、倫理的な問題から臨床応用へと踏み切るのが難しい状況である。また、骨髄や脂肪などの成体組織において、神経細胞を生み出す幹細胞が存在し、それらを用いた移植研究の報告が散見されるが、移植細胞自体の発生学的根拠が明らかでないことが多い。そんな中、2006年に京都大学の山中のグループ<sup>32)</sup>により人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) が世界で初めて報告

された。iPS 細胞は線維芽細胞などの体細胞に初期化因子 (例 : *Sox2*, *Oct3/4*, *Klf4*, *c-Myc* などの遺伝子) を導入することにより、胚性幹細胞 (ES 細胞) と同等にリプログラミングされ、多能性を獲得した幹細胞である。また、iPS 細胞に加えて、われわれ<sup>18)</sup>は成体幹細胞である神経堤幹細胞にも着目して研究を進めてきた。iPS 細胞および神経堤幹細胞は成体の自家組織から採取が可能であるため、安全性が高く、倫理的・免疫学的問題を克服できる可能性が高く、将来の臨床応用が期待されている。本稿では、iPS 細胞および神経堤幹細胞についての最近の知見を解説し、再生医療への応用について概説する。

### マウス iPS 細胞の安全性についての検討

われわれは2006年の山中のグループによる iPS 細胞の発表以降、慶應義塾大学と京都大学で、脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経幹細胞移植の共同研究を開始した<sup>32)</sup>。まず、当研究室の岡田ら<sup>22)</sup>が独自に開発したマウス ES 細胞の神経幹細胞への誘導培養法をマウス iPS 細胞に応用し培養

#### Key words

脊髄損傷 (spinal cord injury)  
人工多能性幹細胞  
(induced pluripotent stem cell : iPS cell)  
神経堤幹細胞 (neural crest stem cell)

<sup>\*1</sup> Cell Therapy for Spinal Cord Injury Using Induced Pluripotent Stem Cells and Neural Crest Stem Cells

<sup>\*2</sup> 慶應義塾大学医学部整形外科教室 [〒162-8582 新宿区信濃町 35] / Osahiko TSUJI, Narihito NAGOSHI, Kanehiro FUJIYOSHI, Yoshiaki TOYAMA, Masaya NAKAMURA : Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

<sup>\*3</sup> 慶應義塾大学医学部生理学教室 / Hideyuki OKANO

<sup>\*4</sup> 国立病院機構村山医療センター整形外科



を行った。この方法は、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を取り除いて未分化 iPS 細胞の浮遊培養を行い、3 胚葉に由来する細胞を含む胚様体 (embryoid body : EB) を形成させ、その後いわゆる “ニューロスフェア法<sup>26,27)</sup>” により神経幹/前駆細胞を多く含むニューロスフェアを得る方法である<sup>13)</sup> (詳細は本特集の熊谷らの論文を参照)。この方法により、*Nanog* 遺伝子発現を指標として樹立された *Nanog*-iPS 細胞<sup>21)</sup> の各クローンからニューロスフェアの作製に成功し、これらのニューロスフェアは接着培養によりニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの神経系 3 系統へと分化する多分化能を有することが示された (図 1)。

ついで、これらのニューロスフェアの安全性を確認するため、当研究室の三浦ら<sup>17)</sup> はマウス iPS 細胞 36 クローンから誘導したニューロスフェアを用いて、それぞれを免疫不全マウスである NOD/SCID マウス (B 細胞, T 細胞を欠失しており、免疫拒絶反応がないといわれている) の大脳 (線条体) に移植を行い、腫瘍形成能と樹立時の *c-Myc* 遺伝子の有無や薬剤選択の有無<sup>19)</sup> との相関について解析を行った。予想と反して、癌遺伝子である *c-Myc* の有無は腫瘍形成能との相関がなく、樹立時に用いた細胞の由来 (origin) のみで統計学的有意差があった。すなわち、樹立時の細胞が胎児由来のものであるか (例; mouse embryonic fibroblast : MEF 由来)、成体由来のものであるか (例; tail tip fibroblast : TTF 由来) によって、最も強く規定されていた。成体由来 iPS 細胞はより腫瘍形成をしやすい傾向があり、将来の臨床応用に向けては、成体から自身の細胞より iPS 細胞を樹立して移植を目指すのが現時点での理想的な戦略ではあるが、移植前に慎重な安全性の検討を行うことが重要という結果であった。また、腫瘍形成能は、成体由来 iPS 細胞より低いとはいえ、胎児由来 iPS 細胞も腫瘍を形成するかどうかは、ニューロスフェアまで分化誘導した際に残存する未分化細胞の比率と関係があることも明らかとなった。さらに、iPS 細胞ニューロスフェア移

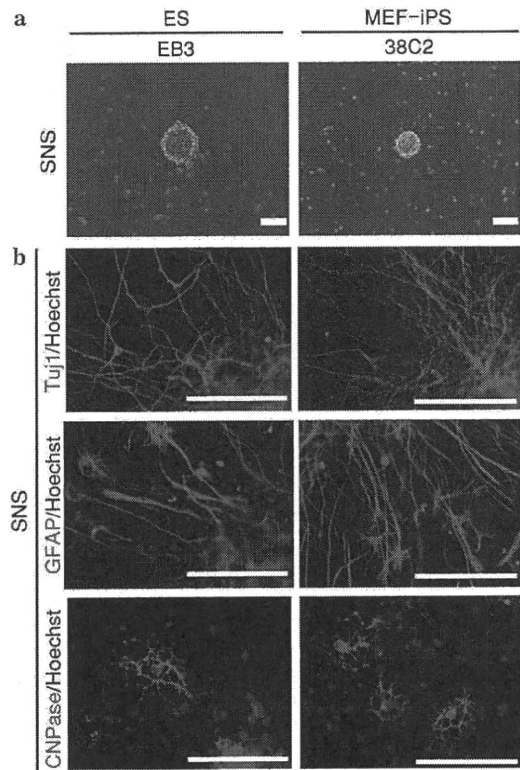


図 1 *Nanog*-iPS 細胞 (38C2 クローン) から誘導したニューロスフェア (文献 34 を改変)

- a : ES 細胞 (EB3) と *Nanog*-iPS 細胞 (38C2 クローン) から誘導したニューロスフェアの明視野像。SNS : 二次ニューロスフェア (継代を一度経たニューロスフェア)。Scale bar : 100  $\mu$ m。
- b : *In vitro* で分化誘導した ES 細胞および *Nanog*-iPS 細胞由来ニューロスフェア。TuJ1 陽性のニューロン、glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性のアストロサイト、2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) 陽性のオリゴデンドロサイト (それぞれ赤色) の神経系 3 系統へと正常に分化している。Scale bar : 100  $\mu$ m。

植に向けては、未分化細胞がほとんど含まれておらず、かつ免疫不全マウス大脳への移植実験を経て 24 週間にわたって腫瘍をまったく形成しなかった、安全なクローンを選ぶべき、との結果であった<sup>17)</sup>。

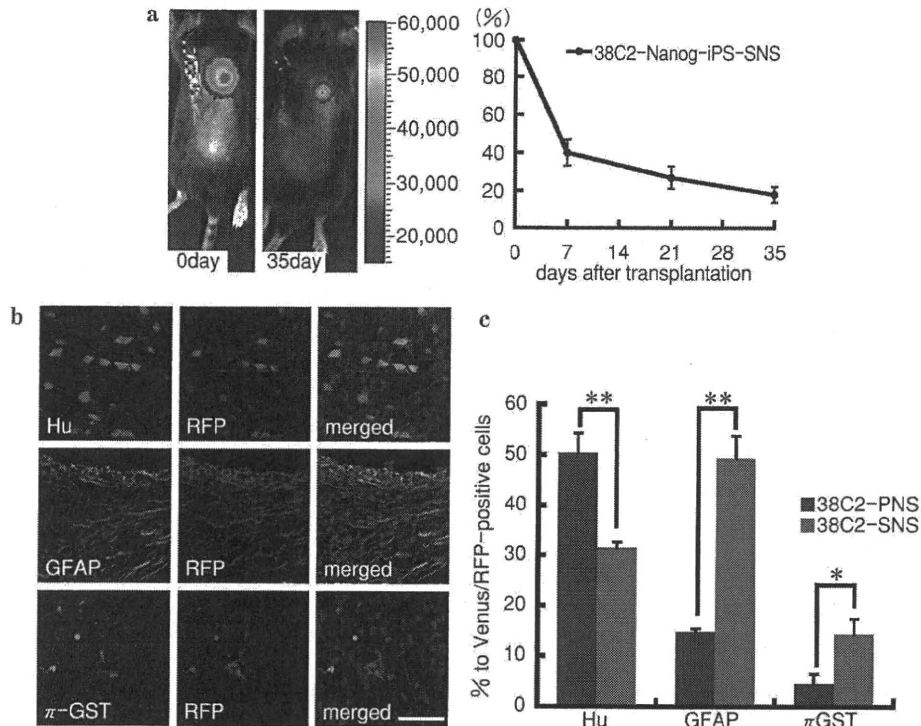


図 2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株(38C2クローン)由来ニューロスフェアの動態(文献34を改変)

- a: ルシフェラーゼによる移植細胞のバイオイメーキング。移植後5週の時点で約20%の細胞が生着している。  
 b: iPS細胞由来ニューロスフェアは損傷脊髄内において神経系3系統へ分化する。RFP:移植細胞, Hu:ニューロンマーカー, GFAP:アストロサイトマーカー,  $\pi$ -GST:オリゴデンドロサイトマーカー。Scale bar: 50  $\mu$ m。  
 c: 38C2クローン由来ニューロスフェアの*in vivo*での分化効率。PNS:一次ニューロスフェア, SNS:二次ニューロスフェア。\*: $p < 0.05$ , \*\*: $p < 0.01$ 。

## “安全な”iPS細胞クローン由来ニューロスフェアを用いた脊髄損傷治療

前記の免疫不全マウスへの移植実験を経て、6カ月にわたり腫瘍をまったく形成しなかった“安全な”クローンのうち、まずMEF由来(Nanog-EGFPトランスジェニックマウス由来のMEF)のクローンである38C2クローンを用いて作製されたニューロスフェアを用いて、われわれは脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った<sup>34)</sup>。雌の8週齢C57Bl6/Jマウスを用いて、第10胸椎高位にInfinite Horizon (IH) impactorを用いてコンピュータ制御下に圧挫損傷を作製し、損傷後亜急性期となる9日目<sup>20,21)</sup>に $5 \times 10^5$ 個を損傷中心部へと移植した。移植細胞にはレンチウイルスを用い

て、移植前にホタル発光酵素ルシフェラーゼの一種である*CBRLuc*遺伝子と、単量体赤色蛍光タンパク質である*mRFP*遺伝子を導入しておき、移植細胞の生存をルシフェラーゼ発光によるバイオイメーキングで、動物を生かしたまま経時的にモニタリングを行い<sup>21)</sup>、損傷後6週に灌流固定を行い、組織学的検討も行った。その結果、移植細胞はバイオイメーキングを用いた定量的評価により、移植後5週の時点で約20%が生着しており、明らかな発光量の増大を認めず、組織学的検討においても腫瘍形成を認めなかった(図2)。移植細胞はHu陽性のニューロン、glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性のアストロサイト、glutathione S-transferase  $\pi$  (GST- $\pi$ )陽性のオリゴデンドロサイトへと分化しており、分化効率は

図3 “安全な” iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復 (文献34を改変)

Basso Mouse Scale (BMS) による後肢機能評価。当研究室でのES細胞を用いた研究において、一次ニューロスフェア (primary neurosphere: PNS, 胚様体形成を経て誘導されたニューロスフェア, 多くがニューロンに分化する) は脊髄損傷モデルマウスへの治療効果がないこと, また, PNSを一度継代した二次ニューロスフェア (secondary neurosphere: SNS, ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトの神経3系統への分化傾向を有する) は脊髄損傷モデルへの治療効果を有することが示されている<sup>13)</sup>。

iPS細胞由来 SNS 移植群において, ES細胞由来 SNS 移植群と同等に後肢機能が回復する。一方, iPS細胞由来 PNS 移植群においては, ES細胞由来 PNS 移植群と同様に機能回復はみられない。

PBS: リン酸緩衝液, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ 。

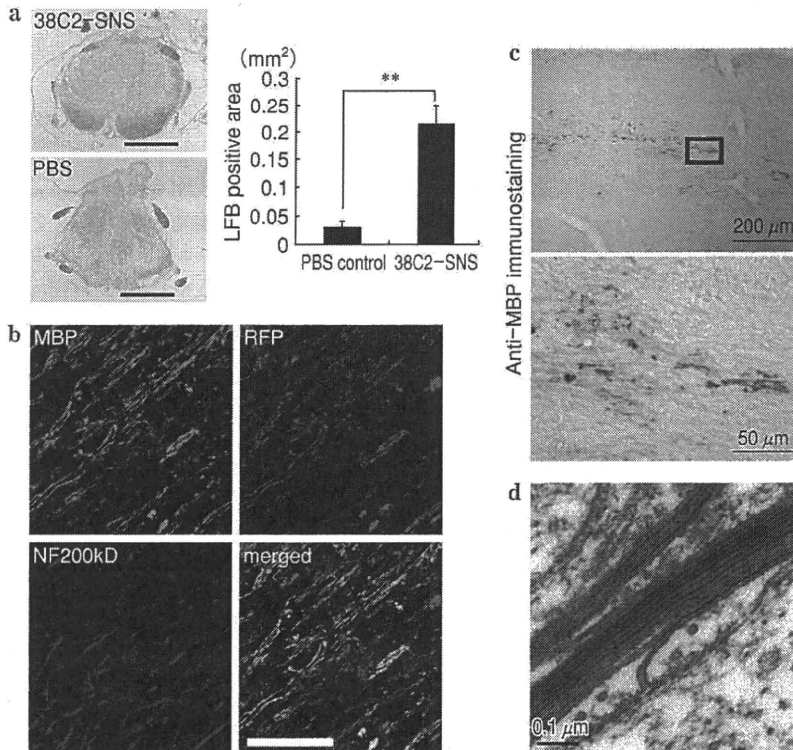
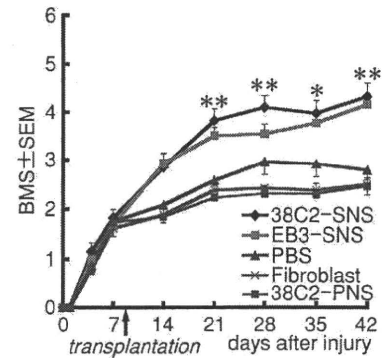


図4 “安全な” iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植による再髄鞘化 (文献34を改変)

a: 損傷脊髄のLFB染色像。iPS細胞由来 SNS 移植群において, 髄鞘化領域 (青色) がコントロール群と比較して有意に保たれている。Scale bar:  $500 \mu\text{m}$ , \*\*:  $p < 0.05$ 。

b: 移植されたiPS細胞由来 SNS (RFP陽性) は成熟オリゴデンドロサイト (MBP陽性) へと分化し, ホストの神経線維 (NF200 kD陽性) を再髄鞘化する。

c: iPS細胞由来 SNS は, MBP-nullであるshivererマウス (ミエリン形成不全) の損傷脊髄内で, MBP陽性の成熟オリゴデンドロサイトに分化する。Scale bar:  $50 \mu\text{m}$ 。

d: shivererマウスの損傷脊髄の電子顕微鏡像。移植したiPS細胞由来 SNS による, major dense line および compact lamellae を有する正常髄鞘がみられる。

それぞれニューロンが約30%, アストロサイトが約50%, オリゴデンドロサイトが約15%であった (図2)。マウスの後肢機能を Basso Mouse

Scale (BMS) を用いて経時的に評価を行ったところ, 38C2クローン由来ニューロスフェア (38C2-NS) 移植群は, マウスES細胞由来ニュー

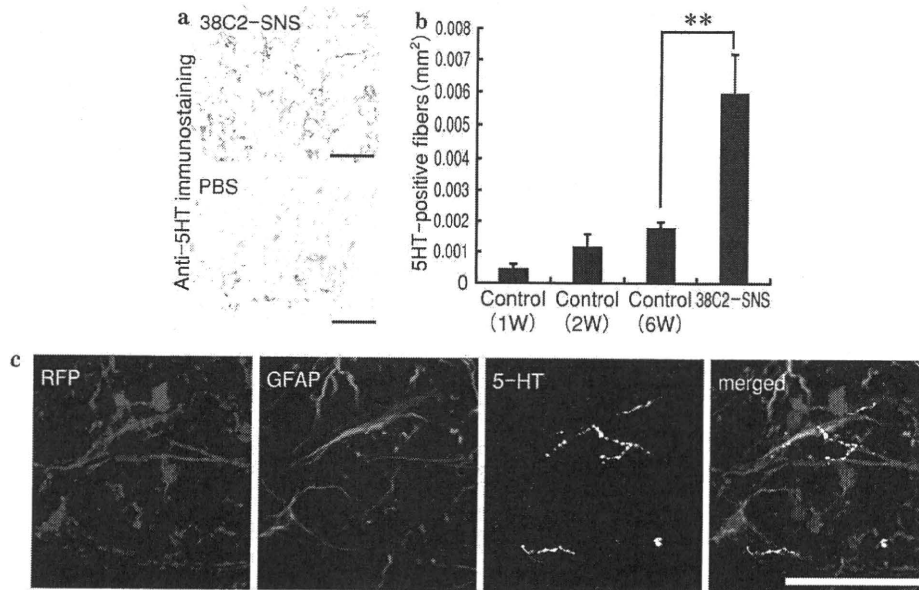


図5 “安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの移植による縫線核脊髄路軸索伸長の促進 (文献 34 を改変)  
 a, b : 損傷部から 4 mm 遠位部での 5-HT 陽性の神経線維染色像。移植群において有意に促進されている。  
 Scale bar : 100  $\mu$ m, \*\* :  $p < 0.01$ .  
 c : 移植細胞由来の GFAP 陽性の幼若アストロサイトに近接した 5-HT 陽性の神経線維。 Scale bar : 50  $\mu$ m.

ロスフェア (ES-NS) 移植群とほぼ同等の機能回復を呈し、培養液のみを注入した vehicle control 群と比較して有意な下肢運動機能の回復が得られていた (図 3)。この機能回復のメカニズムを解析したところ、移植された 38C2-NS が myelin basic protein (MBP) 陽性の成熟オリゴデンドロサイトへと分化し、損傷により脱髄した神経線維を再髄鞘化していた (図 4)。これにより、Luxol Fast Blue (LFB) 染色にて陽性となる髄鞘面積が vehicle control 群と比較して、38C2-NS 移植群において有意に増加していた (図 4)。さらに、移植細胞が双極性の突起をもつ幼若アストロサイトへと損傷脊髄内で分化し、軸索再生のガイダンスとして働いた可能性が考えられる。事実、この幼若アストロサイトの近傍に、齧歯類の運動機能に大きな役割をもつとされる 5-hydroxytryptamine (5-HT) 陽性の縫線核脊髄路神経線維が多数存在しており、損傷部から 4 mm 遠位部でこれら 5-HT 陽性線維を定量すると、移植群において有意に増加していた (図 5)。この移植細胞による再

髄鞘化と縫線核脊髄路線維への glial support が、38C2-NS 移植による後肢機能回復の主なメカニズムであることが示された<sup>34)</sup>。

### 成体組織由来の“安全な” iPS 細胞クローンと“危険な” iPS 細胞クローン

次に、われわれは、より現実的な臨床応用へのモデルに近い成体組織 (TTF) 由来の iPS 細胞を用いて、同様の移植実験を行った。当研究室の三浦ら<sup>17)</sup>が行った安全性の検討の中で使用したマウス iPS 細胞 36 クローンのうち、TTF 由来のクローンは 6 クローンあったが、そのうち安全性が確認できたものは 335D1 というクローンのみであった。この 335D1 クローンと同時に、同様に TTF 由来のクローンで腫瘍形成能が認められた“危険な”クローン (256H13, 256H18) も用いて、ニューロスフェアへと誘導後 38C2 クローンと同様に脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った。その結果、各クローン (335D1, 256H13,

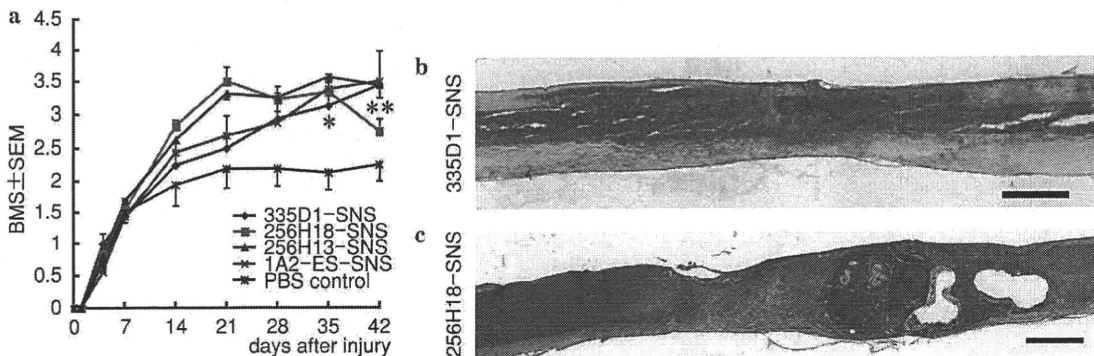


図6 TTF-iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復 (文献34を改変)  
 a: Basso Mouse Scaleによる後肢機能評価。“安全な”335D1-SNS移植群では、PBSコントロール群と比較して、損傷後5週目以降に有意な機能回復がみられる。“危険な”256H18-SNS移植群では損傷後6週目において得られていた機能回復の低下がみられる。\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .  
 b: “安全な”335D1-SNSを移植された損傷脊髄像。腫瘍形成を認めない。Scale bar: 1 mm.  
 c: “危険な”256H18-SNSを移植された脊髄像。奇形腫形成を認める。Scale bar: 1 mm.

256H18) 由来ニューロスフェアは、損傷脊髄への移植後に機能回復が得られたものの、“危険な”クローン由来ニューロスフェア移植群においては、一時的に得られていた機能回復が損傷後6週の時点で突然失われ、かつ大多数のマウスが突然死亡した(図6)。組織学的解析を行うと、“危険な”クローン由来ニューロスフェアを移植したマウスでは、脊髄内で巨大な奇形腫(teratoma)を形成していることが判明した(図6)。一方、“安全な”335D1クローンをを用いた場合には、予想どおりに移植された全マウスにおいて腫瘍形成を認めず、コントロール群と比較して有意に、かつES細胞由来ニューロスフェアと同等に機能回復を得ることができた。このことから、成体組織由来のiPS細胞クローンは胎仔組織由来のものと比較して危険性が高いものの、厳密にその安全性を事前に検討してあれば、脊髄損傷治療への有用な細胞源となり得る可能性を有していることが示された<sup>34)</sup>。

### 神経堤幹細胞の可能性

iPS細胞と並んで、近年、成体内に存在する組織幹細胞として、神経堤幹細胞も注目を集めている。神経堤細胞は脊椎動物のみにみられる細胞集団で、表皮外胚葉と神経板との相互作用によって

両者の境界部に誘導され、神経管が閉塞した直後に周囲の組織へ移動する細胞である(図7)。遊走した神経堤細胞は、感覚神経系および自律神経系のニューロンとグリア、副腎髄質、色素細胞のほか、頭部では骨格系(骨および軟骨)、歯(象牙芽細胞)、動脈系の血管平滑筋など、実にバラエティーに富んだ組織へ分化することが知られている。このように多分化能をもち、多くの器官発生の局面において重要な役割を果たすことから“第4の胚葉”とも呼ばれている<sup>14)</sup>。

遊走した神経堤細胞は、その目的地の微小環境下で細胞同士が集合して各組織へ分化する。しかし、その中の一部の細胞は未分化な状態で維持され、成体においても多能性を保持する細胞として、さまざまな組織に潜伏していると考えられている。これが神経堤幹細胞である。神経堤幹細胞は、自己複製能を有するとともに、ニューロン、グリアおよび筋線維芽細胞の3系統へ分化する多能性幹細胞であり、近年、自家組織由来の細胞供給源として注目を集めている<sup>4)</sup>。これまで、成体マウスの皮膚<sup>5)</sup>、腸管<sup>12)</sup>、心臓<sup>33)</sup>、角膜<sup>36)</sup>といったさまざまな組織に神経堤幹細胞が存在していることが報告されている。当研究室の名越ら<sup>18)</sup>は、神経堤細胞を特異的に標識できるP0-Cre/Floxed-EGFPおよびWnt1-Cre/Floxed-EGFPマウスを

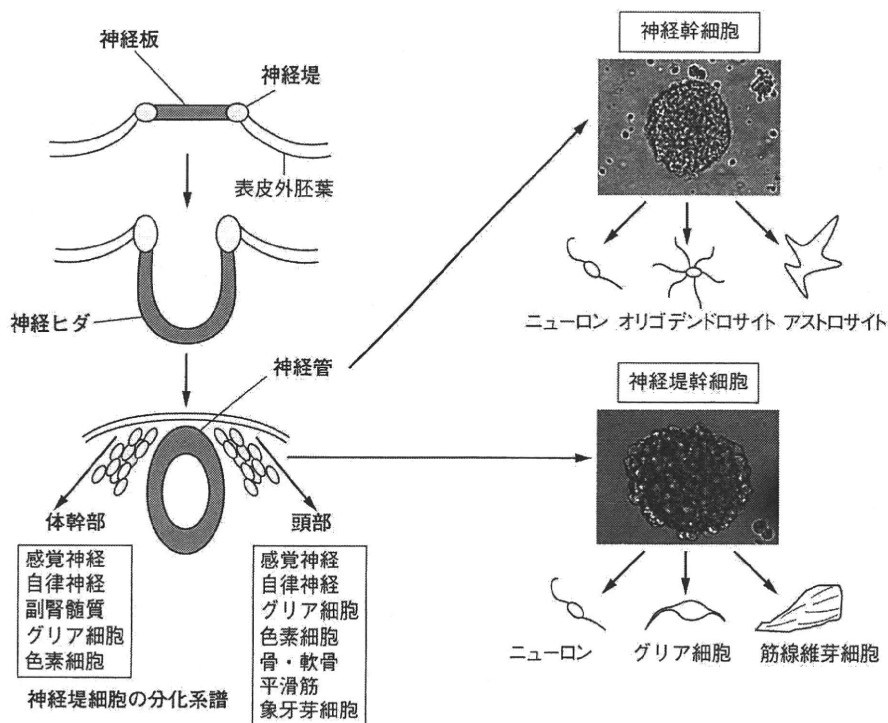


図 7 神経管と神経堤の発生

発生学的に、神経幹細胞は神経管内に存在し、神経堤幹細胞は神経管が閉塞する際に、その背側から遊離する。神経堤細胞は、体中に移動してさまざまな細胞へ分化する。

用いて、成体の後根神経節や骨髄にも神経堤幹細胞が存在することを突き止めている。特に骨髄において、これまで神経細胞を生み出す幹細胞の存在が多数報告されてきたが、その発生学的起源や分化能力に疑問がもたれていた。つまり、なぜ中胚葉由来の骨髄から外胚葉由来の神経細胞が分化するのか、その胚葉転換や脱分化といった現象を説明した報告はこれまでなかった。したがって、神経堤幹細胞が胎生期に血中を介して骨髄へ移動し、成体に至るまで潜伏し、ニューロンやグリアを生み出すというわれわれの理論は非常に合理的であり、画期的な発見と考えている。さらに、成体の後根神経節、皮膚および骨髄由来の神経堤幹細胞の性質を比較したところ、その分化能や遺伝子発現に大きな相違があった。すなわち、成体の各組織に潜伏している神経堤幹細胞は均一の性質をもっているのではなく、由来する組織によって固有の性質を保持していることが明らかになっ

た。したがって、神経堤幹細胞の臨床応用を目指すうえでは、さまざまな神経疾患の病態を十分に把握し、どの組織由来の神経堤幹細胞が移植治療に相応であるかを評価する必要があると考えられる。

## 神経堤幹細胞を用いた移植研究

神経堤幹細胞を用いた移植研究は、採取しやすい皮膚由来の細胞を用いた報告が、近年、散見されるようになった。Millerら<sup>10)</sup>は、皮膚由来神経堤幹細胞を Schwann 細胞へ分化させ、脱髄した中枢・末梢神経に移植したところ、再髄鞘化されることを確認した。また、この分化誘導した Schwann 細胞をラット脊髄圧挫損傷モデルに移植したところ、軸索の伸長と内在性 Schwann 細胞の集積が認められ、運動機能が回復したと報告している<sup>2)</sup>。しかし、どちらの報告においても、

用いられている神経堤幹細胞はマウスの新生児由来のものであり、臨床応用を考えた場合には成体由来の細胞を用いて評価することが重要である。同じ組織に存在する神経堤幹細胞でも、新生児期に回収した細胞に比べて成体の細胞はシグナルの応答性が低くなるという報告<sup>13)</sup>があり、成体由来の細胞を効率よく増殖・分化させることが今後の課題といえる。実際、マウス成体の皮膚由来神経堤幹細胞をマウス脊髄損傷モデルに移植した報告があるが、一部細胞の生着はみられたものの行動学的機能評価については言及しておらず、その有効性を示すためにはさらなる検討が必要である<sup>30)</sup>。神経堤幹細胞は皮膚以外にもさまざまな組織に存在しており、その特性を評価したうえで細胞を選択し、移植治療を行うことが重要と考えられる。

## 今後の課題と展望

以上のように、iPS細胞と神経堤幹細胞は自家移植の細胞供給源となり得る大きな可能性を秘めているといえる。近年、ヒト皮膚の線維芽細胞からiPS細胞を樹立すること、1滴の血液からもヒトiPS細胞を樹立することも可能になっており<sup>25,28,31)</sup>、iPS細胞の研究は急速な勢いで進歩している。しかし、iPS細胞樹立で初期化因子を導入する際に、レトロウイルスやレンチウイルスを用いているが、これらのウイルスは遺伝子のプロモーター付近に組み込まれることが多く、近傍の内在性遺伝子の発現状態を変化させて腫瘍化をもたらす危険性がある。実際、X連鎖重症複合免疫不全症(X-linked severe combined immunodeficiency: X-SCID)患者において、レトロウイルスベクターによる遺伝子治療を行った10例中2例で、白血病を発症した事例が報告されている<sup>7)</sup>。この問題に関しては、近年、急速に研究が進展し、レトロウイルスまたはレンチウイルスを用いない一過性の遺伝子発現によるiPS細胞の作製<sup>10,28,35,37)</sup>、タンパク質導入によるiPS細胞作製<sup>11,38)</sup>、および薬剤による導入遺伝子の一部置き

換え<sup>15,29)</sup>の成功が報告されている。細胞移植治療に用いる場合には、ゲノムに外来性の遺伝子が挿入されていないiPS細胞を使用することが好ましいと考えられる。しかし、これらの方法で作製されたiPS細胞が、レトロウイルスで作製されたiPS細胞と同等の多能性や*in vitro*での分化能力を有しているかどうかについては、今後、詳細に性質を比較する必要がある。

さらに、脊髄損傷の病態自体に目を向けると、実際の臨床応用に向けては、まだ解決すべき課題は多い。移植細胞が機能回復に寄与するメカニズムについては、①移植細胞によるシナプス形成(synaptic formation)・軸索再生、②移植細胞による再髄鞘化、③移植細胞による栄養的支援(trophic support)、の主に3つのメカニズムが提唱されている<sup>1)</sup>。実際に臨床応用に向けては、前記の3つのメカニズムについて、さらに詳細な検討・証明が必須であると考えられるが、実際の臨床においても、超急性期の状態での麻痺とその予後予測が一定しないことなど、いまだ脊髄損傷の病態そのものがブラックボックスに包まれている部分が多いといわざるを得ない。

損傷脊髄における微細な組織の変化を生きている動物において経時的に評価できないことが、現状を打破できない要因の1つと考えられるが、われわれはこの課題を一步一步克服すべく研究を進めている。当研究室の藤吉ら<sup>6)</sup>は、脊髄白質における拡散の異方性に着目し、MRIを用いた軸索特異的な新たな評価系である拡散テンソル tractography (diffusion tensor tractography: DTT) を構築することに成功し、現在は脊椎脊髄疾患患者に応用して解析を進めている。また、藤吉らは組織における拡散の変位に着目した q-space imaging (QSI) という最新のストラテジーを霊長類脊髄損傷モデルに応用し、さらに詳細な組織評価を可能としており、脊髄損傷に対する幹細胞移植療法の確立という悲願に向かって、“基礎と臨床が一体となって”夢の実現へ向け、日々努力を続けている。

謝辞 本稿を作成するにあたり、京都大学 iPS 細胞研究所の山中伸弥先生、慶應義塾大学医学部生理学教室の三浦恭子先生、岡田洋平先生に深く感謝を申し上げます。

文献 (太字番号は重要文献)

- 1) Barnabe-Heider F, Frisen J : Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 3 : 16-24, 2008
- 2) Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, et al : Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 27 : 9545-9559, 2007
- 3) Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, et al : Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 35 : 643-656, 2002
- 4) Crane JF, Trainor PA : Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22 : 267-286, 2006
- 5) Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, et al : A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 6 : 1082-1093, 2004
- 6) Fujiyoshi K, Yamada M, Nakamura M, et al : In vivo tracing of neural tracts in the intact and injured spinal cord of marmosets by diffusion tensor tractography. *J Neurosci* 27 : 11991-11998, 2007
- 7) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003
- 8) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al : Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80 : 182-190, 2005
- 9) Iwanami A, Yamane J, Katoh H, et al : Establishment of graded spinal cord injury model in a nonhuman primate : the common marmoset. *J Neurosci Res* 80 : 172-181, 2005
- 10) Kaji K, Norrby K, Paca A, et al : Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458 : 771-775, 2009
- 11) Kim D, Kim CH, Moon JI, et al : Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4 : 472-476, 2009
- 12) Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, et al : Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35 : 657-669, 2002
- 13) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, et al : Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 4 : e7706, 2009
- 14) Le Douarin N, Kalcheim C : *The Neural Crest*, 2nd ed. Cambridge University Press, New York, 1999
- 15) Maherali N, Hochedlinger K : Tgf $\beta$  signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19 : 1718-1723, 2009
- 16) McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, et al : Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci* 26 : 6651-6660, 2006
- 17) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27 : 743-745, 2009
- 18) Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, et al : Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2 : 392-403, 2008
- 19) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26 : 101-106, 2008
- 20) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al : Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 69 : 925-933, 2002
- 21) Okada S, Ishii K, Yamane J, et al : In vivo imaging of engrafted neural stem cells : its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J* 19 : 1839-1841, 2005
- 22) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, et al : Spatio-temporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26 : 3086-3098, 2008
- 23) Okano H : Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 69 : 698-707, 2002
- 24) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S : Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448 : 313-317, 2007
- 25) Park IH, Zhao R, West JA, et al : Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451 : 141-146, 2008
- 26) Reynolds BA, Rietze RL : Neural stem cells and neurospheres—re-evaluating the relationship. *Nat Methods* 2 : 333-336, 2005
- 27) Reynolds BA, Weiss S : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707-1710, 1992
- 28) Seki T, Yuasa S, Oda M, et al : Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7 : 11-14, 2010
- 29) Shi Y, Do JT, Desponts C, et al : A combined chemical



- and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2 : 525-528, 2008
- 30) Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, et al : Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 32 : 67-81, 2006
- 31) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007
- 32) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 33) Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y, et al : Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol* 170 : 1135-1146, 2005
- 34) Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al : Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 12704-12709, 2010
- 35) Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al : *piggyBac* transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458 : 766-770, 2009
- 36) Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, et al : Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea. *Stem Cells* 24 : 2714-2722, 2006
- 37) Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al : Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324 : 797-801, 2009
- 38) Zhou H, Wu S, Joo JY, et al : Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4 : 381-384, 2009
-

## iPS 細胞の安全性の担保

*Progress toward safe transplantation therapy using ES and iPS cells*

### Keywords

iPS 細胞  
神経系分化誘導  
細胞移植  
腫瘍化  
脊髄損傷治療  
安全性

三浦 恭子<sup>1)</sup> 辻 収彦<sup>1)2)</sup> 岡野 栄之<sup>1)</sup>

1) 慶應義塾大学医学部 生理学教室 ハダカデバネズミ研究ユニット

2) 慶應義塾大学医学部 整形外科教室

### Summary

Generation of iPS cells had great impact on the field of regenerative medicine. Prior to the clinical application of iPS cells to cell transplantation therapy, their quality and safety must be carefully evaluated. Recently, we reported the variation in the safety of mouse iPS cell clones. Neural differentiation and the safety of iPS cell clones varied significantly depending on the iPS cells' tissue of origin. We also reported that the transplantation of pre-evaluated 'safe' iPS cell clones promoted locomotor function recovery in spinal cord injury model mice. Thus, it will be essential to pre-evaluate each iPS cell clone carefully to guarantee a safety level before any clinical trial of human disorders using iPS cells. Here, we discuss about the quality and the safety of ES and iPS cells for future cell transplantation therapy.

### はじめに

体細胞に数種の遺伝子を導入することにより、胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞様の多分化能と増殖能をもつ人工多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞が作製された<sup>1)-3)</sup>。患者本人から iPS 細胞を樹立し、必要な細胞を分化誘導した後に移植するといったオーダーメイド細胞移植治療が可能となれば、ES 細胞の使用に伴う倫理的問題 (初期胚の破壊) や移植時の拒絶反応といった問題を回避できると考えられる。細胞移植治療に向けた iPS 細胞の研究は現在急速に進んでおり、ヒト iPS 細胞を用いた種々の体細胞の分化誘導法の開発や、マウス iPS 細胞を用いたモデルマウスの治療例が相次いで報告されている<sup>4)-6)</sup>。しかし安全性という観点からみると、ES 細胞と iPS 細胞に共通の多能性幹細胞であるがゆえの問題、また人工的

Miura, Kyoko<sup>1)</sup> / Tsuji, Osahiko<sup>1)2)</sup> / Okano, Hideyuki<sup>1)</sup>

1) Department of Physiology, School of Medicine, Keio University

2) Department of Orthopedics, School of Medicine, Keio University

E-mail: miura@z8.keio.jp

に初期化されたiPS細胞に特有の問題の多くははまだ未解決のままであり、研究の進展が望まれている。

### IPS細胞とES細胞に共通の課題

#### 1. 分化誘導後に残存する未分化細胞による腫瘍(テラトーマ)化の課題

ES細胞は半永久的な増殖能とさまざまな細胞に分化することのできる多能性を兼ね備えた細胞である。iPS細胞もこれらの点においてES細胞と類似した性質を有している。細胞移植治療に応用する際は、この多能性幹細胞から目的の細胞へ分化誘導を行った後に移植するという方法が一般的に考えられる。しかしこの際に問題となるのが、分化誘導後に残存した未分化細胞によって移植後に引き起こされる奇形腫(テラトーマ)形成である。我々は、マウスES細胞とiPS細胞から神経幹/前駆細胞を含むニューロスフェアを作製し、免疫不全であるNOD/SCIDマウスの脳線条体へ移植することにより、安全性の検討を行った<sup>7)</sup>。結果として、ES細胞由来ニューロスフェア移植マウス群の1割、iPS細胞由来ニューロスフェア移植マウス群の4割において、混入した未分化細胞由来のテラトーマ形成が観察された。iPS細胞には、未分化細胞のマーカであるNanog遺伝子のプロモーター下にEGFPを挿入したレポーターがあらかじめ導入してある。フローサイトメトリーで解析した結果、iPS細胞由来のニューロスフェア中に約0.02%以上の

EGFP陽性の未分化細胞が含まれている場合、移植後にテラトーマ形成が生じ得るということが明らかとなった(図1a)。この結果は、分化誘導後に残存する未分化細胞の除去を極めて慎重に行わなければならないことを示唆する。一方、マウスES細胞から神経幹/前駆細胞の分化誘導後、神経幹/前駆細胞マーカーであるSox1の発現を指標に純化して移植を行った場合、テラトーマ形成を回避できることが報告されている<sup>8)</sup>。またJaenischらは、マウスiPS細胞からドーパミン産生ニューロンを分化誘導し、未分化細胞のマーカであるSSEA-1陽性細胞をフローサイトメトリーにより除去した後に移植するとテラトーマ形成が起こらないと報告している<sup>9)</sup>。高純度の目的細胞が得られるような分化誘導法の確立、また、GMP対応のフローサイトメトリーなどの開発や、これらを駆使した目的細胞の純化方法の確立が重要であろう。

#### 2. 分化細胞移植による安全上の課題

前述のテラトーマ形成リスクを回避できたとしても、分化細胞を移植した後の腫瘍形成の可能性は、長期的かつ慎重に検討されなければならない。2008年に、ヒト胎児神経幹細胞を脳内に移植された毛細血管拡張性運動失調症の男児における、移植細胞由来の脳腫瘍の発生が報告された<sup>9)</sup>。ヒトiPS細胞やES細胞から分化誘導した神経幹/前駆細胞を移植するという試みは脊髄損傷やパーキンソン病などの

治療法の1つとして大きく期待されている手法であるが、場合によっては、増殖を停止させた細胞を用いた治療の検討や、万一の際に移植細胞を除去できるようにHSV-TKなどの自殺遺伝子をあらかじめ導入しておくなど、安全性担保のための新規手段が必要となる可能性がある。

### IPS細胞に特有の課題

#### 1. 遺伝子導入による安全上の課題

当初iPS細胞はOct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2という4因子をレトロウイルスベクターで導入することにより作製された。c-Mycは原癌遺伝子として有名であるし、その他の3因子も癌において高発現することが知られている遺伝子である。この4因子iPS細胞を用いて作製したキメラマウスおよびその仔らにおいては、約20%の確率で腫瘍が発生することが判明した<sup>10)</sup>。この腫瘍においては、レトロウイルスによってiPS細胞のゲノムへ組み込まれたc-Mycの発現が再活性化していたことから、c-Mycの導入による危険性が問題となった。しかしその後、c-Mycを除いた3因子でも低効率であるもののiPS細胞が樹立できることがわかった<sup>11)</sup>。3因子iPS細胞由来のキメラマウスにおいては100日間の飼育後も腫瘍は認められていない。この時点でc-Mycを用いないiPS細胞の作製は達成されたが、残りの3因子がレトロウイルスを用いてゲノムに挿入されているという課題は解決されていな

かった。レトロウイルスやレンチウイルスは遺伝子のプロモーター付近に組み込まれることが多く、近傍の内在性遺伝子の発現状態を変化させ腫瘍化をもたらす危険性がある。実際、X連鎖重症複合免疫不全症(X-linked Severe Combined Immunodeficiency: X-SCID)患者において、レトロウイルスベクターによる遺伝子治療を行った10症例中2例で白血病を発症した事例が報告されている<sup>12)</sup>。この問題に関しては近年急速に研究が進展し、レトロウイルスまたはレンチウイルスを用いない一過性の遺伝子発現によるiPS細胞の作製<sup>13)-16)</sup>、蛋白質導入によるiPS細胞作製<sup>19) 20)</sup>、および薬剤による導入遺伝子の一部置き換え<sup>21) 22)</sup>の成功が報告されている。細胞移植治療に用いる場合は、ゲノムに外来性の遺伝子が挿入されていないiPS細胞を使用することが好ましいと考えられる。しかしながら、これらの方法で作製されたiPS細胞が、レトロウイルスで作製されたiPS細胞と同等の多能性や*in vitro*での分化能力を有しているかどうかについては、今後詳細に性質を比較する必要がある。

## 2. 体細胞の初期化に伴う安全上の課題

iPS細胞誘導以外の初期化方法として、体細胞を卵子内に核移植する方法が知られている。核移植によるクローンマウスの出生率は非常に低く、胎盤の過形成、肥満や短寿命などの異常が見つかっており、これは体細胞核の初期化が不十分なためだと考えられてい

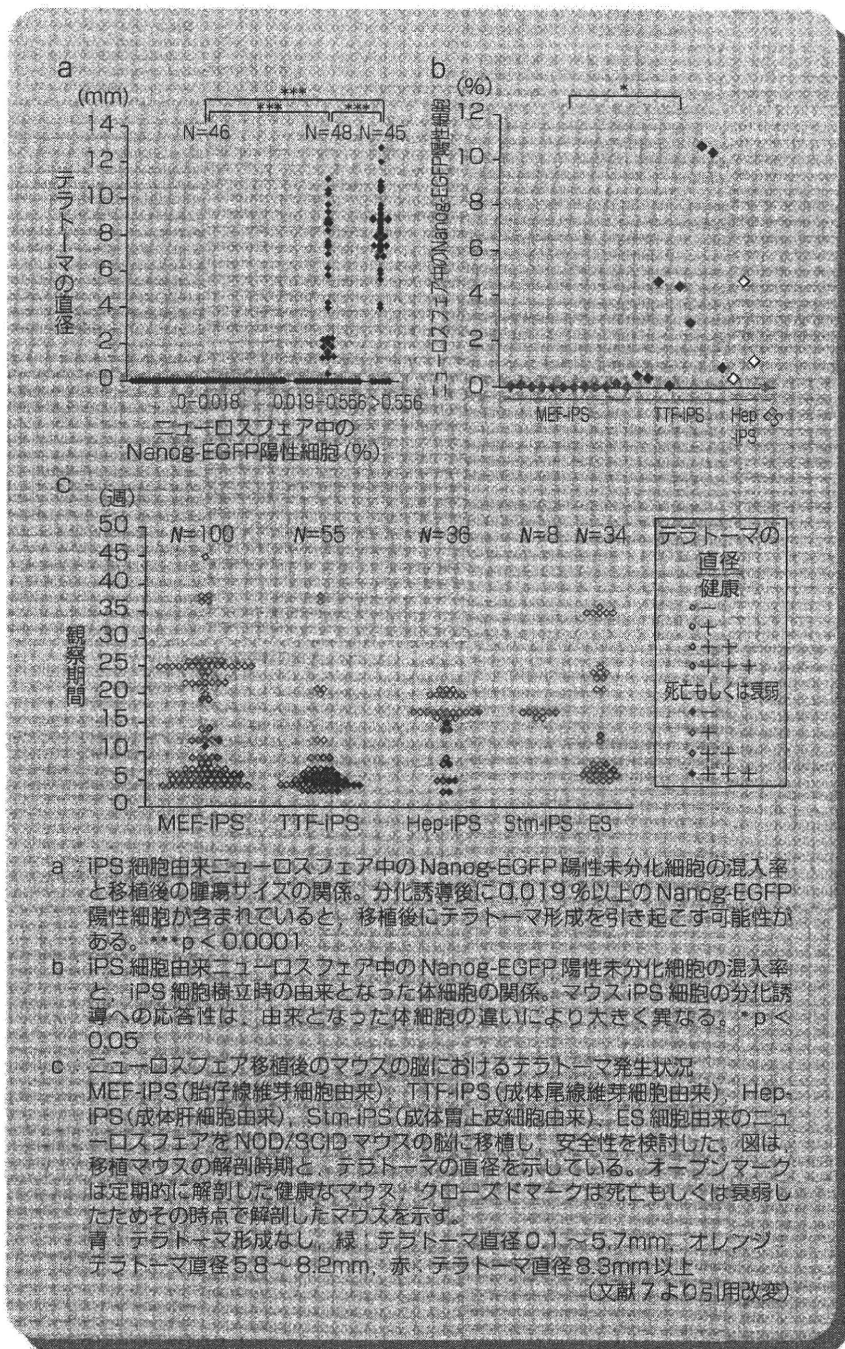


図1 iPS細胞の分化誘導への応答性と移植後の安全性は由来となった体細胞の種類によって異なる(→巻頭Color Gravure参照)