

る。一方、核移植後の胚盤胞から作製したntES細胞²³⁾は遺伝子発現やDNAのメチル化状態において通常のES細胞とほとんど差がないことがわかっており、4倍体キメラ*の作製も可能である。最近iPS細胞からも4倍体キメラの作製が報告されており²⁴⁾、この点ではiPS細胞はES細胞にかなり近い能力をもつと考えられる。しかしその一方で、iPS細胞とES細胞の遺伝子発現は同一ではなく、由来となった細胞の遺伝子発現様式を一部残しているという報告もある^{25) 26)}。さらに私たちは最近、iPS細胞の分化誘導への応答性や安全性が、由来となった体細胞の種類によって異なることを見出している(後述)。これらのことから、iPS細胞には元となった体細胞の何らかの性質が残されている可能性が高く、細胞移植治療に用いた場合、腫瘍の形成や、それ以外の何らかの異常を引き起こす可能性は否定できない。体細胞の初期化には多くの遺伝子が関与すると考えられるため、初期化の際の導入因子数を増やすことにより、より質の良いiPS細胞が作製できる可能性も存在する。どういう組成の初期化カクテルがベストなのか、今後の研究の進展が非常に期待される。

* 4倍体キメラ：4倍体の胚盤胞内に細胞を注入することにより作製されたキメラマウス。4倍体由来の細胞は胎盤にしか寄与できないため、生まれてくる仔の体はすべて注入された細胞由来となる。

3. 由来となる体細胞の違いによる安全上の課題

我々は最近、樹立時の元となった体細胞の違いによって、iPS細胞の神経系分化誘導に対する応答性と移植後の安全性が大きく異なるということを明らかにした⁷⁾。これまでに当研究室で樹立されたマウスiPS細胞36株を用いてニューロスフェアの分化誘導を行い、NOD/SCIDマウスの脳の線条体へ移植することにより、*in vitro*での分化能力と移植後の安全性の評価を行った。その結果、解析したほぼすべてのiPS細胞株はニューロスフェアに分化可能であった。しかしながら、フローサイトメトリーによって詳細に解析したところ、ニューロスフェア中に残存するNanog-EGFP陽性の未分化細胞の割合はiPS細胞の由来となった体細胞の種類により大きく異なっていた(図1b)。胎仔線維芽細胞(MEF)由来iPS細胞株はES細胞と同等の分化誘導への応答性を示し、ニューロスフェア中に未分化細胞はほとんど残存していなかった。これらのMEF-iPS細胞株由来ニューロスフェアを移植したマウス群における移植後のテラトーマ形成は、ES細胞株由来ニューロスフェア移植群と同等に低頻度かつ軽微であった。また、成体胃上皮細胞(Stm)から作製したiPS細胞2株の移植群においては、16週の観察期間中にテラトーマ形成は観察されなかった。一方、成体尾線維芽細胞(TTF)由来のiPS細胞株は有意に分化抵抗性を示し、分化誘導後のニューロスフェ

ア中に多くの未分化細胞が残存していた。これらのTTF-iPS由来ニューロスフェア移植マウス群においては、有意に大きなテラトーマ形成が観察され、多くのマウスが短期間のうちに衰弱もしくは死亡した。成体肝細胞(Hep)由来iPS細胞株の分化誘導への応答性および腫瘍形成能は、MEF-iPS細胞株とTTF-iPS細胞株の間であった(図1c)。一方で、c-Mycの導入の有無や樹立時の薬剤耐性レポーターによる初期化細胞の選抜の有無は、iPS細胞の分化誘導への応答性や移植後の安全性に影響を与えなかった。なぜ由来となった細胞の違いによってiPS細胞の分化能力に違いが出るのかについては、前述の通り、元となった体細胞に由来する遺伝子発現様式の残存の可能性が考えられるが、今後の詳細な性質の解析が急務である。

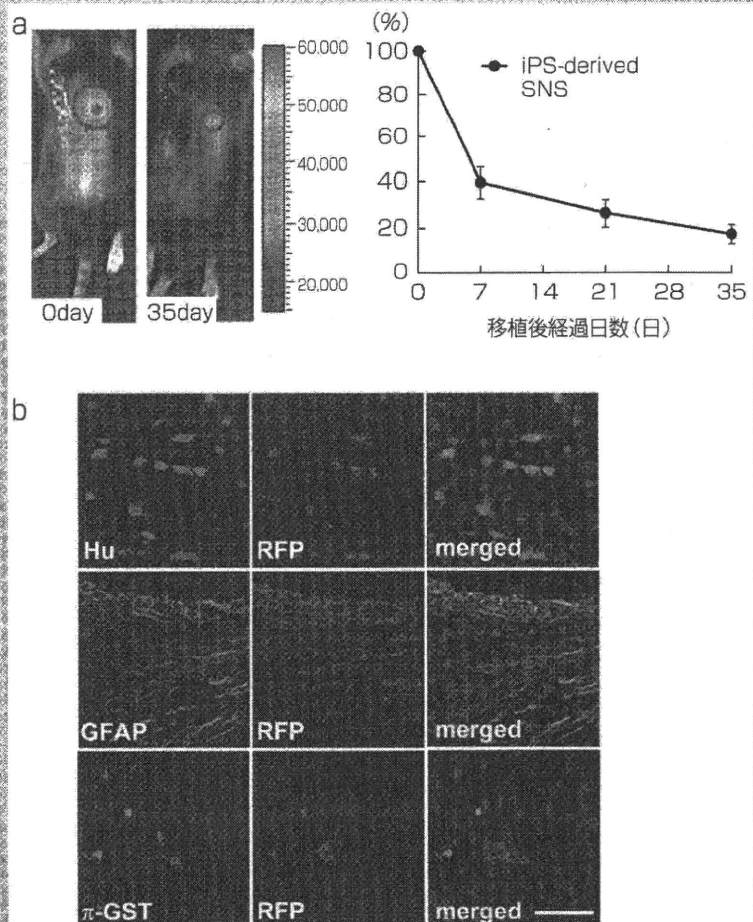
脊髄損傷に対する“安全な”マウスiPS細胞株由来神経幹細胞の移植

我々は、先述のようにNOD/scidマウス生体脳への移植による安全性の検討を経て、安全性が確認されたマウスiPS細胞クローン由来ニューロスフェアをマウス脊髄圧挫損傷モデルに移植し、有効性の検討を行った²⁷⁾。ニューロスフェアの移植は損傷後9日目の亜急性期に行っている。ルシフェラーゼによるバイオイメーキングの結果、約20%の移植されたニューロスフェアが損傷脊髄内に生着し(図2a)、神経系3系統に分化していた(図2b)。脊

髄圧性損傷後、損傷脊髄においては顕著な萎縮性変化と脱髄変化が生じるが、iPS細胞由来ニューロスフェア移植群においては、これらの変化が有意に抑制されていた(図3b)。Basso mouse scaleによる後肢機能評価を行ったところ、iPS細胞由来ニューロスフェア移植群において、コントロール群(PBS移植群、線維芽細胞移植群)と比較して有意に良好な機能回復がみられた(図3a)。この機能回復は、前述の萎縮性変化および脱髄変化の抑制に加え、縫線核脊髄路軸索進展の促進や移植細胞による再髄鞘化などの効果によると考えられる(図3c~e)²⁷⁾。これらの結果から、慎重に安全性を検討したiPS細胞株はマウス脊髄損傷モデルに対する治療効果を有することが明らかとなった。

どのようなiPS細胞の質が高く安全か?—目的に合わせた指標探索の重要性—

現在のところ、樹立されたiPS細胞の評価として一般的に行われる手法は、①未分化状態の細胞をマウスの皮下や精巣に移植しテラトーマを形成させることによる*in vivo*での三胚葉系への分化能力の検討、②胚盤胞に未分化細胞を移植することによるキメラマウスへの寄与度および生殖系列への寄与度の検討(ヒトiPS細胞には適用不可)、③マイクロアレイによるグローバルな遺伝子発現の解析、④核型解析やCGHアレイによるゲノム解析などである。しかしこれらの方法だけでは



a ルン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%の細胞が生きている。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)
b iPS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、π-GST：オリゴデントロサイトマーカー。Bar=50μm
(文献27より引用改変)

図2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株由来ニューロスフェアの動態(→巻頭Color Gravure参照)

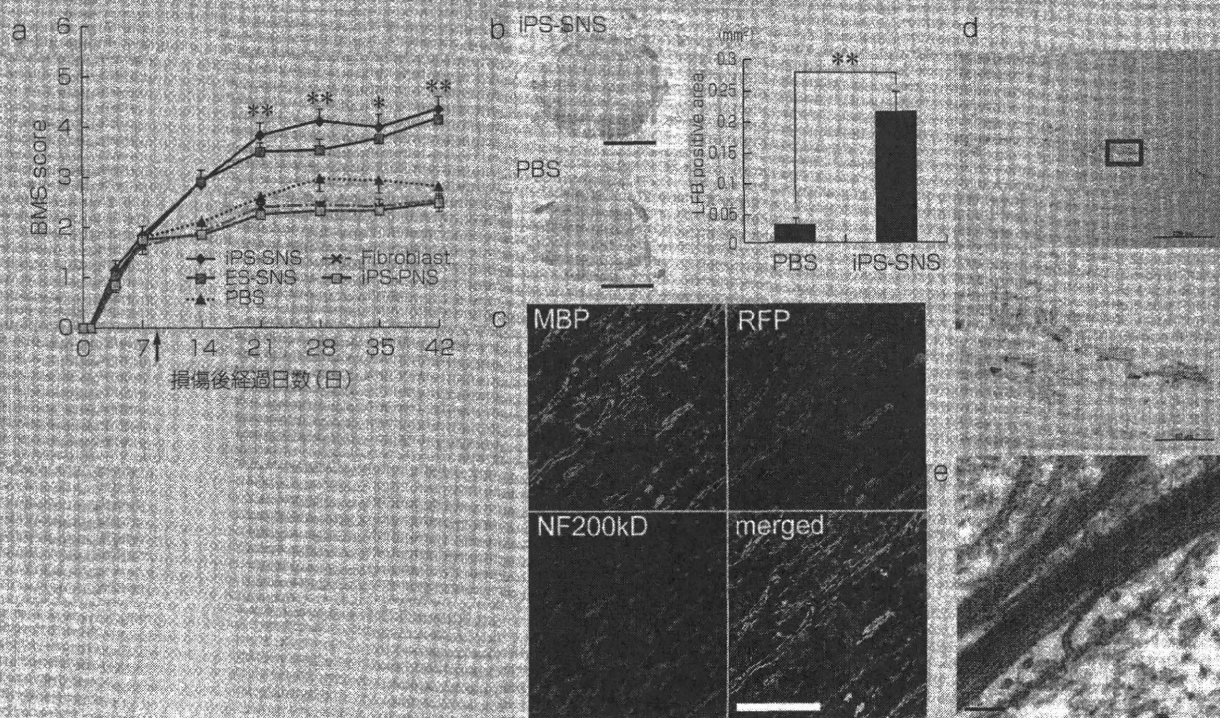


図3 “安全な” iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復(→巻頭Color Gravure参照)

iPS細胞の安全性を評価するには十分ではないかもしれない。我々の研究により、*in vitro*での分化誘導系による評価も極めて重要であることが明らか

となった。キメラマウスの生殖系列に寄与するようなiPS細胞株が、必ずしも*in vitro*での分化誘導への応答性も高いとは限らなかった。その一方で、

分化誘導への応答性が悪く、移植後に大きなテラトーマを形成するようなiPS細胞株のほとんどはキメラマウスに寄与することができている。これら

のことから、1つの評価系だけではiPS細胞の質や安全性は評価できず、多方面からの評価が必須であることがわかる。iPS細胞は簡便に多くの株を樹立できるというのが利点であるが、その一方で株間の質の差が大きいということも明らかになりつつある。個々の患者から樹立された複数のiPS細胞株から、質の高い株を選び出す作業が必要になると考えられるが、それぞれの株について多方面からの評価を行っていくのは、時間的にもコスト的にも超非現実的である。今後、簡便に質の良い株を選別できるようなスクリーニング系の確立が重要となってくるだろう。最近、ES/iPS細胞の生殖細胞への寄与能力・4倍体キメラへの寄与能力と、12番染色体上のDlk1-Dio3インプリンティング遺伝子クラスターの活性化が相関することが報告された²⁸⁾²⁹⁾。しかしながら、前述のように、生殖細胞への寄与能力やキメラマウスへの寄与能力の指標と、*in vitro*での分化能力の指標は異なる可能性が高い。また、何の分化細胞を作成し何に使用するか、利用目的によって、満たす必要条件はさらに異なってくると予想される。それぞれの目的に合わせた、分化誘導への応答性の指標となる種々マーカーの探索が必要であろう。

おわりに

iPS細胞の樹立は、自己由来の多能性幹細胞を用いた細胞移植治療の実現に向けての、極めて大きな第一歩と

なった。現在の全世界でのiPS細胞研究の進展の速さを考えると、実際に移植治療へと応用される日はそう遠くないような気がする。しかしながら、本稿で述べてきたように、iPS細胞の移植治療への応用にあたっての安全性の課題はいまだ多く、それらを解決して、初めてiPS細胞のヒトへの投与は可能となる。安全性を慎重に評価しつつ多角的に研究を進めていくことが重要である。臨床応用に直結する研究、臨床応用を視野に入れた基礎研究に加え、自由にさまざまな基礎研究を進め、情報を活発に討論し、統合していくことが重要であると考えられる。

筆者は現在慶應義塾大学医学部生理学教室にて、「ハダカデバネズミ」を用いた研究体制を立ち上げています。ハダカデバネズミ(naked mole rat: *Heterocephalus glaber*)はアフリカ産の体長10cm程度のげっ歯類で、ハチやアリに類似したカースト制の真社会性・異例の寿命の長さ(約30年以上)・生涯にわたる超癌化耐性(いまだ腫瘍形成が確認されていない)など、非常に興味深い特徴をもちます。社会性を制御する脳神経機構の研究・老化研究・癌研究などにおいて、新規モデル動物として非常に有用であると考えられます。ハダカデバネズミ研究はまだ歴史が浅いため、これらの面白い特徴のメカニズムは、ほとんどすべてが未解明です。Pioneerとして何でもできる、ハダカデバネズミを用いた萌芽研究にご興味のある学生さん・研究員

の方・その他共同研究などのお問い合わせは、miura@z8.keio.jpまでお願いいたします。

●文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-676, 2006
- 2) 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
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**: 1917-1920, 2007
- 4) Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al: Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**: 1920-1923, 2007
- 5) Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al: Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5856-5861, 2008
- 6) Xu D, Alipio Z, Fink LM, et al: Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 808-813, 2009
- 7) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* **27**: 743-745, 2009
- 8) Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, et al: Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation.

- Stem Cells 24 : 763-771, 2006
- 9) Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, et al : Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. PLoS Med 6 : e1000029, 2009
- 10) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S : Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 448 : 313-317, 2007
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science 322 : 949-953, 2008
- 14) 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
- 15) Kaji K, Norrby K, Paca A, et al : Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. Nature 458 : 771-775, 2009
- 16) Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al : piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature 458 : 766-770, 2009
- 17) Jia F, Wilson KD, Sun N, et al : A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. Nat Methods 7 : 197-199, 2010
- 18) 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
- 19) Zhou H, Wu S, Joo JY, et al : Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell 4 : 381-384, 2009
- 20) 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
- 21) Shi Y, Do JT, Despons C, et al : A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2 : 525-528, 2008
- 22) Maherali N, Hochedlinger K : Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. Curr Biol 19 : 1718-1723, 2009
- 23) Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, et al : Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. Science 292 : 740-743, 2001
- 24) Zhao XY, Li W, Lv Z, et al : iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. Nature 461 : 86-90, 2009
- 25) Chin MH, Mason MJ, Xie W, et al : Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell Stem Cell 5 : 111-123, 2009
- 26) Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, et al : Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. PLoS One 4 : e7076, 2009
- 27) 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
- 28) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, et al : Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. Nature 465 : 175-181, 2010
- 29) Liu L, Luo GZ, Yang W, et al : Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. J Biol Chem 285 : 19483-19490, 2010
- 30) 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

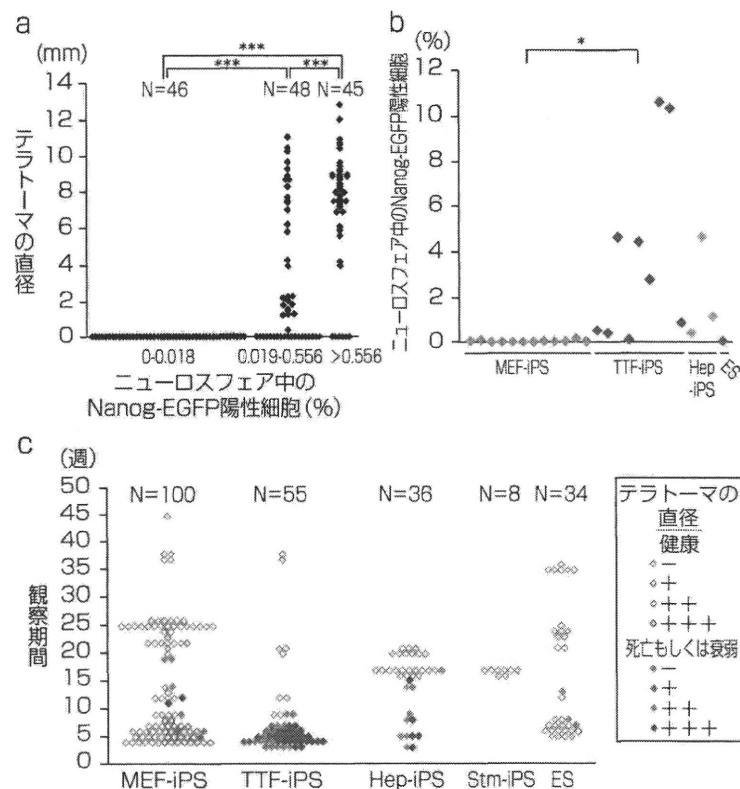


図1 iPS細胞の分化誘導への応答性と移植後の安全性は由来となった体細胞の種類によって異なる

a: iPS細胞由来ニューロスフェア中のNanog-EGFP陽性未分化細胞の混入率と移植後の腫瘍サイズの関係。分化誘導後に0.019%以上のNanog-EGFP陽性細胞が含まれていると、移植後にテラトーマ形成を引き起こす可能性がある。
*** $p < 0.0001$

b: iPS細胞由来ニューロスフェア中のNanog-EGFP陽性未分化細胞の混入率と、iPS細胞樹立時の由来となった体細胞の関係。マウスiPS細胞の分化誘導への応答性は、由来となった体細胞の違いにより大きく異なる。 $*p < 0.05$

c: ニューロスフェア移植後のマウスの脳におけるテラトーマ発生状況
MEF-iPS (胎仔線維芽細胞由来), TTF-iPS (成体尾線維芽細胞由来), Hep-iPS (成体肝細胞由来), Stm-iPS (成体胃上皮細胞由来), ES細胞由来のニューロスフェアをNOD/SCIDマウスの脳に移植し、安全性を検討した。図は、移植マウスの解剖時期と、テラトーマの直径を示している。オープンマークは定期的に解剖した健康なマウス、クローズドマークは死亡もしくは衰弱したためその時点で解剖したマウスを示す。

青: テラトーマ形成なし, 緑: テラトーマ直径0.1~5.7mm, オレンジ: テラトーマ直径5.8~8.2mm, 赤: テラトーマ直径8.3mm以上

(文献7より引用改変)

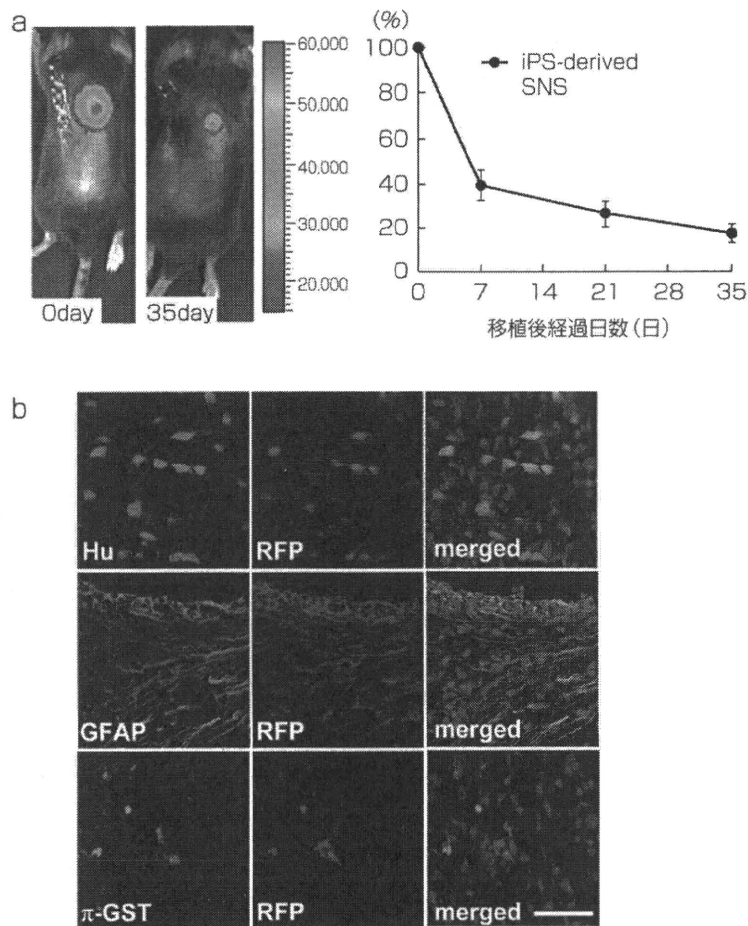


図2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株由来ニューロスフェアの動態

a: ルシフェラーゼによる移植細胞のバイオイメーjing。移植後5週の時点で約20%の細胞が生着している。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)

b: iPS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, π -GST: オリゴデンドロサイトマーカー, Bar = 50 μ m
(文献27より引用改変)

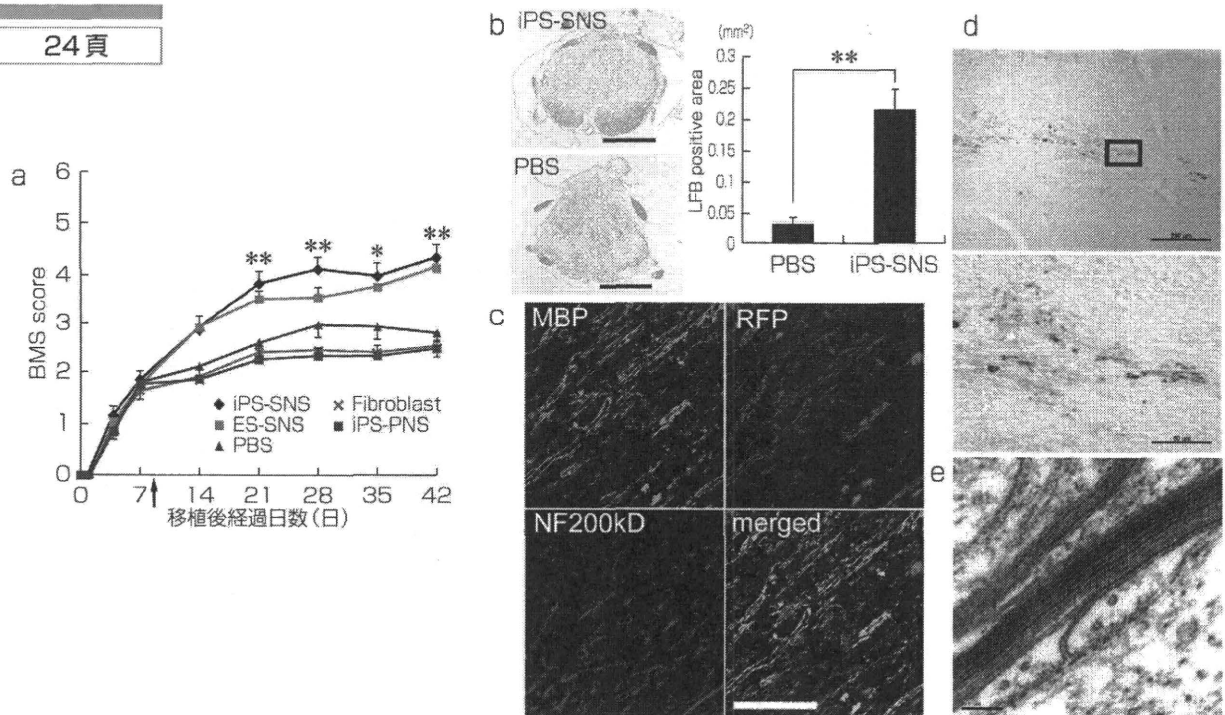
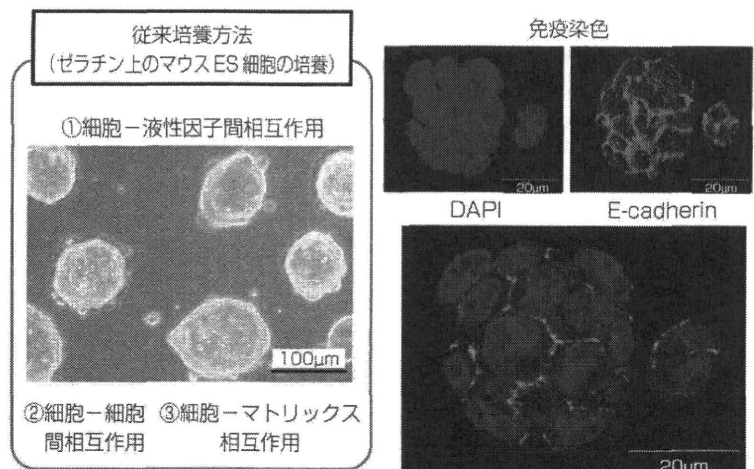


図3 “安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復

- a: Basso mouse scale 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) はマウス脊髄損傷モデルへの治療効果を有さないこと、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 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³⁰⁾。
- 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の回復がみられる。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。
- b: 損傷脊髄の LFB 染色。iPS 細胞由来 SNS 移植群において、髄鞘化領域 (青色の部位) が、コントロール群と比較して有意に保たれている。
- c: 移植された iPS 細胞由来 SNS (RFP⁺) は成熟オリゴデンドロサイト (MBP⁺) へと分化し、ホストの神経線維 (NF200kD⁺) を再髄鞘化する。
- d: 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⁺ の成熟オリゴデンドロサイトに分化する。
- e: *Shiverer* マウスの損傷脊髄の電子顕微鏡画像。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。
- * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Bar: b = 500 μm , d 上 = 200 μm , c, d 下 = 50 μm , e = 0.1 μm (文献 27 より引用改変)

図3 従来のコロニー形成型 ES/iPS 細胞培養法の重大な欠点



辻 収彦¹⁾・中村 雅也¹⁾・岡野 栄之²⁾

Tsuji Osahiko

Nakamura Masaya

Okano Hideyuki

Key words

iPS cell, spinal cord injury,
neural stem/progenitor cells,
transplantation therapy

要 約

ヒト胎仔由来神経幹細胞や胚性幹細胞 (ES細胞) による機能回復の報告以降, 脊髄損傷に対する幹移植療法に対して大きな期待が集まっている。しかし, 胎仔組織・受精卵を破壊するという倫理的問題きな障壁となっており, 未だ臨床応用の実現に至らない。これらに代わる移植細胞源として近年, 移植の細胞源となりうる人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; 以下iPS細胞) に大きな目が集まっている。本稿ではマウスiPS細胞を用いた脊髄損傷への治療効果, 及びiPS細胞の安全性について概説する。

はじめに

20世紀初頭にスペインの神経解剖学者Ramon y Cajalが “Once the development was ended, the founts of growth and regeneration....dried up irrevocably” と述べたように, 成体哺乳類の中樞神経系は一度損傷を受けると再生しないと定説として長い間考えられてきた。しかし, 1992年にReynoldsとWeissらにより神経幹細胞が同定されると, その多様な増殖能・分化能を生かして神経変性疾患や神経損傷においていつかは失われた神経系の細胞や組織を再生しようと試みがなされてきた。また1999年には, Donaldらによりマウス胚性幹細胞 (以下ES細胞) の脊髄損傷への有効性も報告され, 21世紀に幹細胞移植による脊髄損傷治療の機運が大きくなった。われわれの研究室においても, 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や, ヒト胎児由来神経幹細胞移植の霊長類コモンマーマウス脊髄損傷モデルへの有効性を報告してきた¹⁾²⁾。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児由来の幹細胞であり, 倫理的問題から臨床応用へと踏み切るのが難しい状況である。これは受精卵を破壊するという点でES細胞も同様である。そんな中, 2006年に京都大学の山中伸弥教授によりiPS細胞が世界で初めて報告された³⁾。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) を導入することにより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。iPS細胞は成体の自家組織から樹立が可能であるため, 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細胞の安全性及び脊髄損傷に対する有効性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。

1. マウスiPS細胞の安全性についての検討

われわれは2006年の山中教授らによる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。まず, 当研究室の岡田ら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⁴⁾をマウスiPS細胞に応用し培養を行った。この方法はLIFを取り除いて未分化iPS細胞の浮遊培養を行い,

慶應義塾大学医学部整形外科教室 2) 慶應義塾大学医学部生理学教室

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

Department of Physiology, School of Medicine, Keio University

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 TEL 03-5363-3812 FAX 03-3353-6597

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 TEL 03-5363-3747 FAX 03-3357-5445

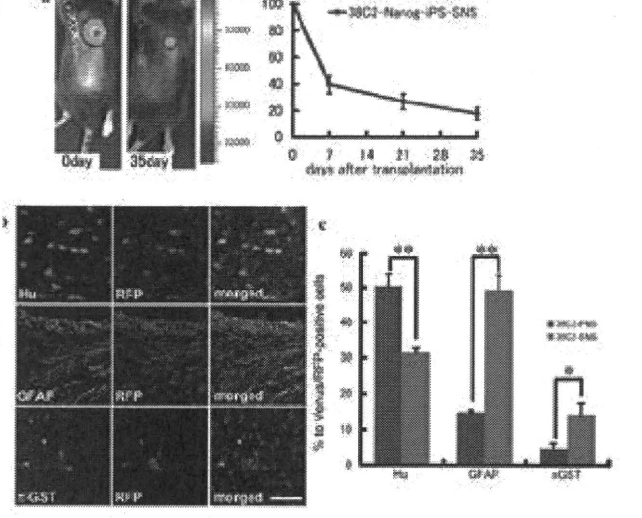


図1 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株(38C2)由来ニューロスフェアの動態(文献6より引用・改変)

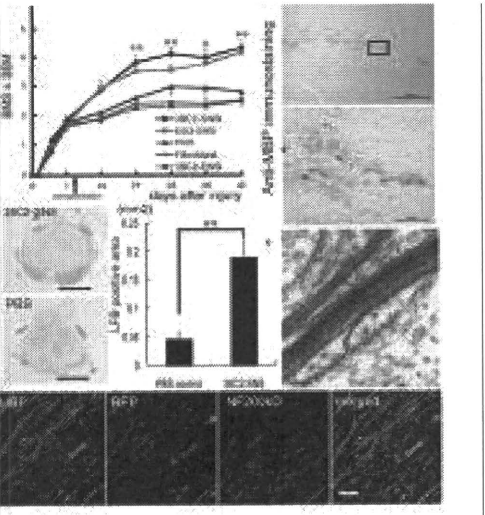
- ルシフェラーゼによる移植細胞のバイオイメーjing。移植後5週の時点で約20%の細胞が生着している。
- iPS由来ニューロスフェアは損傷脊髄内において神経系三系統へ分化する。RFP: 移植細胞, Hu: ニューロンマーカー, GFAP: アストロサイトマーカー, π -GST: オリゴデンドロサイトマーカー
- 38C2クローン由来ニューロスフェアのin vivoでの分化効率。PNS: 初代ニューロスフェア, SNS: 二次ニューロスフェア(継代を一度経たニューロスフェア)

胚葉由来細胞を含む胚様体(embryoid body以下EB)を形成させ、その後いわゆる“ニューロスフェア法”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。この方法により、inogを指標として樹立されたNanog-iPS細胞⁵⁾の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uron, Astrocyte, Oligodendrocyteの神経系3系統と分化する多分化能を有することが示された⁶⁾。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に、当教室の三浦らはマウス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マウス細胞, T細胞を欠失しており、免疫拒絶反応がなと言われている)の脳(線条体)に移植を行い、瘍形成能と樹立時のc-Myc遺伝子の有無や薬剤選の有無との相関について解析を行った。予想と反て癌遺伝子であるc-Mycの有無とは腫瘍形成能と相関は無く、唯一統計学的有意差があったのは樹時に用いた細胞の由来(origin)であった⁷⁾。即ち、立時の細胞が胎児由来のものであるか(例、use 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細胞より腫瘍形成をしやすい傾向があり、将来の臨床用に向けては、成体から自身の細胞よりiPS細胞樹立して移植療法を目指すのが現時点での理想的戦略ではあるが、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細胞も腫瘍形成を呈するものと呈しないものとの間には、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の関係も明らかとなった。さらに、iPS細胞ニューロスフェア移植に向けては、未分化細胞が殆ど含まれておらず、且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全く形成しなかった、安全なクローンを選ぶべき、との結果であった⁷⁾。

2 “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

以上の免疫不全マウスへの移植実験を経て、6ヶ月にわたり腫瘍を全く形成しなかった“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、我々は脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った⁸⁾。雌の8週齢C57Bl6/Jマウスを用いて、損傷は第10胸椎高位にI-H 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日目に 5×10^5 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、赤色蛍光タンパク質遺伝子mRFP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jingで動物を生かしたまま経時的にモニタリングを行い⁹⁾、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jingを用いた定量的評価



マウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復・再髄鞘化（文献6より引用・改変）

a. Basso mouse scaleによる後肢機能評価。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、機能回復はみられない。

b. 損傷脊髄のLFB染色。iPS細胞由来SNS移植群において、髄鞘化領域（青色の部位）が、コントロール群と比較して有意に保たれている。

c. 移植されたiPS細胞由来SNS（RFP+）は成熟オリゴデンドロサイト(MBP+)へと分化し、ホストの神経線維(NF200kD+)を再髄鞘化する。

d. 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+の成熟オリゴデンドロサイトに分化する。

e. shivererマウスの損傷脊髄の電子顕微鏡画像。移植したiPS細胞由来SNSによる、major dense line 及びcompact lamellaeを有する正常髄鞘がみられる。

り、移植後5週の時点で約20%が生着しており、かな発光量の増大は認めず、組織学的検討におも腫瘍形成を認めなかった（図1）。移植細胞u陽性のニューロン、GFAP陽性のアストロサ、GST- π 陽性のオリゴデンドロサイトへと分ており、分化効率はそれぞれニューロン；約、アストロサイト；約50%，オリゴデンドロト；約15%であった（図1）。マウスの後肢機Basso Mouse Scale（以下BMS）を用いて経時評価を行ったところ、38C2クローン由来ニューロスフェア（以下38C2-NS）移植群は、マウス細胞由来ニューロスフェア（以下ES-NS）とほ等の機能回復を呈し、培養液のみを注入したle control群と比較して有意な下肢運動機能のが得られていた（図2）。この機能回復のメカムを解析したところ、移植された38C2-NSが陽性の成熟オリゴデンドロサイトへと分化し、により脱髄した神経線維を再髄鞘化していた2）。これによりLFB染色にて陽性となる髄鞘面vehicle control群と比較して、38C2-NS移植群いて有意に増加していた（図2）。さらに、移植細胞が双極性の突起を持つ幼若アストロサイトへ傷脊髄内で分化し、軸索再生のガイダンスとしいた可能性が考えられる。事実、この幼若アスサイトの近傍に齧歯類の運動機能に大きな役割つとされる5-HT陽性の縫線核脊髄路神経線維数存在しており、損傷部から4mm遠位部でこ5-HT陽性線維を定量すると、移植群において増加していた⁹。この移植細胞による再髄鞘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。

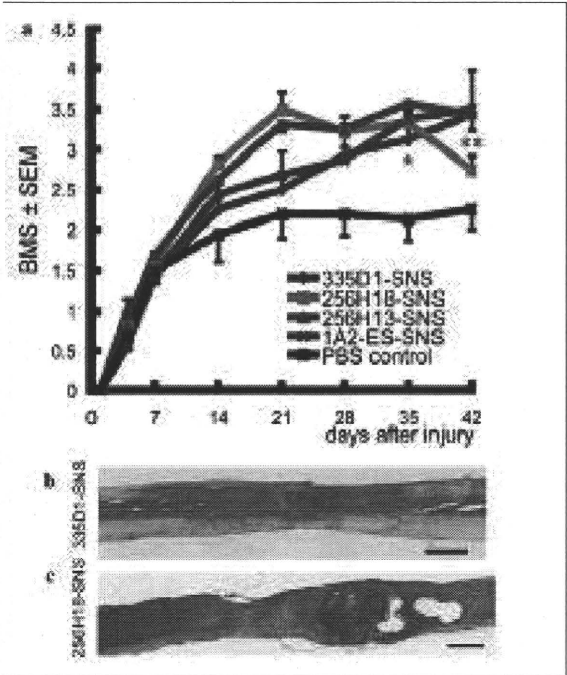
3. 成体組織由来の“安全な”iPS細胞クローンと“危険な”iPS細胞クローン

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。共同研究者である三浦ら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⁷。この335D1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, 256H18）由来の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、且つ大多数のマウスが突然死亡した（図3）。組織学的解析を行うと、危険なクローン由来のニューロスフェアを移植した動物では、脊髄内で巨大なteratomaを形成していることが判明した（図3）。一方で“安全な”335D1クローンを用いた場合は、予想通りに移植された全マウスにおいて腫瘍形成は認めず、コントロール群と比較して有意に、且つES細胞由来ニューロスフェアと同等に機能回

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検討してあれば、脊髄損傷治療への有用な細胞源なりうる可能性を有していることが示された⁶⁾。

4. 今後の課題と展望

iPS細胞の樹立は、自己由来の多能性幹細胞を用いた細胞移植治療の実現に向けての、極めて大きな一歩となった。近年ヒト皮膚の線維芽細胞からS細胞を樹立すること⁹⁾、一滴の血液からもヒトS細胞を樹立することも可能になっており¹⁰⁾、iPS細胞の研究は急速な勢いで進歩している。しかし、際の臨床応用に向けてはまだ解決すべき課題は多。実際にiPS細胞を移植治療に用いる場合は、ゲムに外来性の遺伝子が挿入されていないiPS細胞使用することが好ましいと考えられる。iPS細胞



3. 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6より用・改変）
Basso Mouse Scaleによる後肢機能評価。“安全な”5D1-SNS移植群では、PBS control群と比較して、損後5週目以降に有意な機能回復が見られる。“危険な”6H18-SNS移植群では損傷後6週目において得られてた機能回復の低下が見られた。
“安全な”335D1-SNSを移植された損傷脊髄像。腫形成を認めない。
“危険な”256H18-SNSを移植された脊髄。奇形腫形を認めた。

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¹¹⁾、タンパク質導入によるiPS細胞作製¹²⁾、および薬剤による導入遺伝子の一部置き換え¹³⁾の成功が報告されている。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、移植細胞として用いるのに本当に安全性高いの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。iPS細胞の有効性に加え、安全性を慎重に評価しつつ、多角的に研究を進めていくことが肝要であると言えよう。

文 献

1) 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 2002;69:925-33.
2) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. J Neurosci Res 2005;80:182-90.
3) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006;126:663-76.
4) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, et al. Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. Stem Cells 2008;26:3086-98.
5) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature 2007;448:313-7.
6) 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 2010;13:107:12704-9.
7) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. Nat Biotechnol 2009;27:743-5.
8) 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 2005;19:1839-41.
9) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007;131:861-72.
10) Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells. Cell Stem Cell 2010;7:11-4.
11) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science 2008;322:949-53.
12) Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell 2009;4:381-4.
13) Shi Y, Do JT, Despons C, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2008;2:525-8.

脊髄損傷に対する ES 細胞由来神経幹細胞移植

熊谷玄太郎^{*2,3} 岡田 洋平^{*4,6} 藤 哲^{*3}
戸山 芳昭^{*5} 中村 雅也^{*5} 岡野 栄之^{*4}

はじめに

1920 年代に神経解剖学の巨星 Santiago Ramón Y Cajal が報告して以来、「損傷された中枢神経は再生しない」と長い間信じられてきた。しかし、近年の神経科学の急速な進歩により、その概念は覆されつつある。中枢神経の変性疾患および外傷に対して、神経幹細胞を用いた新たな治療法が開発されつつあり、神経幹細胞の移植や内在性神経幹細胞の活性化といった方法が脚光を浴びている。神経幹細胞とは、未分化状態を維持しながら増殖し（自己複製能）、かつ中枢神経系を構成する3種類の細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトのいずれにも分化する能力（多分化能）をもつ神経系の前駆細胞である¹³⁾。さらに、1992年に Weiss のグループ^{14,15)}によって開発されたニューロスフェア（neurosphere）法により、必要十分量の細胞数を得ることが可能と

なり、細胞治療のためのドナー細胞として期待されてきた。特に脊髄損傷の研究においては、ラット脊髄損傷に対するラット胎仔脊髄移植の報告以降³⁾、著者らの研究室においても、ラット脊髄損傷に対して *in vitro* で培養・増殖させたラット胎仔脊髄由来神経幹細胞の損傷後亜急性期における移植の有効性¹⁰⁾、さらにはより臨床応用を目指した前臨床試験として、ヒト胎児脳由来神経幹細胞移植の霊長類コモンマーモセット脊髄損傷に対する有効性⁶⁾に関して、これまで検討を行い、良好な機能回復を報告してきている。しかし、ヒト神経幹細胞の臨床応用を阻む大きな要因として、あくまでも中絶胎児の脳から採取しなければならないという問題点があり、いまだわが国において臨床応用の目処が立っていないのが現状である。本稿においては、胎仔由来神経幹細胞に替わる細胞ソースとして可能性のある、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES 細胞）の *in vitro* での誘導培養および脊髄損傷への移植研究について概説する。

Key words

脊髄損傷（spinal cord injury）
ES 細胞（embryonic stem cell）
細胞移植治療（cell transplantation therapy）

^{*1} Cell Transplantation Therapy Using ES Cell-derived Neural Stem/Progenitor Cells after Spinal Cord Injury

^{*2} 青森労災病院整形外科〔〒031-8551 八戸市白銀町南ヶ丘 1〕/Gentaro KUMAGAI : Department of Orthopaedic Surgery, Aomori Rosai Hospital

^{*3} 弘前大学大学院医学研究科整形外科学講座/Satoshi TOH

^{*4} 慶應義塾大学医学部生理学教室/Yohei OKADA, Hideyuki OKANO

^{*5} 慶應義塾大学医学部整形外科学教室/Yoshiaki TOYAMA, Masaya NAKAMURA

^{*6} 慶應義塾大学医学部成体丸プロジェクト

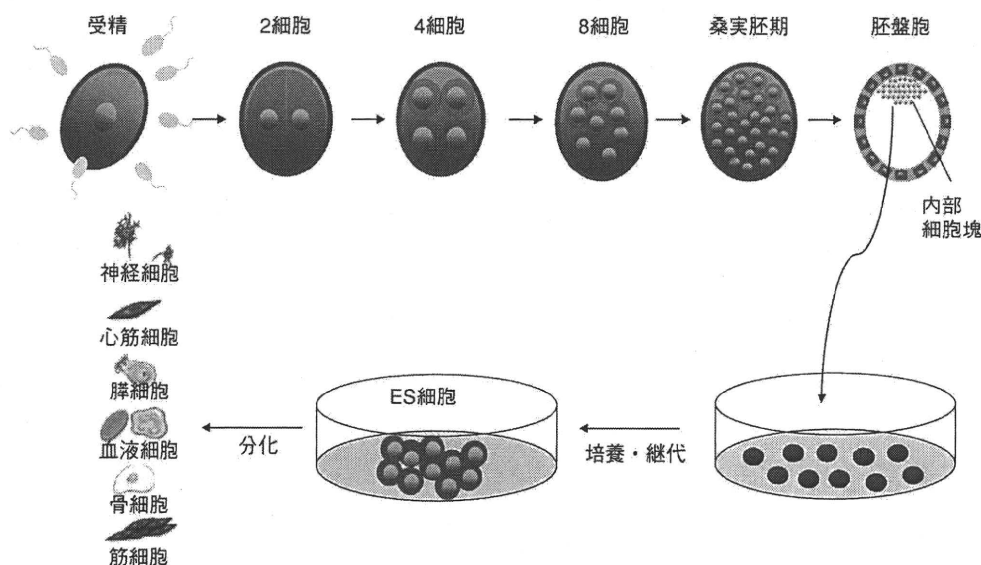


図 1 ES 細胞の樹立

受精卵が卵割してできた胚盤胞内の内部細胞塊を培養・継代することで ES 細胞を樹立することができる。ES 細胞を分化誘導することで、さまざまな疾患への臨床応用が期待されている。

マウス ES 細胞由来神経幹細胞誘導培養法

われわれの哺乳類は 200 種類以上の細胞から構成される複雑な生命体であるが、それらの細胞は 1 つの受精卵が増殖分化し、さまざまな細胞へ分化することによって生み出される。胎生初期の胚盤胞における内部細胞塊の細胞は、受精卵とは異なり、胎盤など胚対外組織への分化能を欠くものの、三胚葉のいずれにも分化できるという多能性 (pluripotency) をもつ。この内部細胞塊を取り出して培養したものが ES 細胞である (図 1)。ES 細胞は、フィーダー細胞 (支持細胞) や白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) の存在下で、未分化状態を維持したまま増殖することができる。また、あらゆる組織に分化し得る能力をもつ多能性幹細胞である。中枢神経系に対する再生医療の供給源として、ES 細胞から神経系細胞への誘導法は広く研究されているが²⁾、その特性を十分に理解しなければ臨床応用は期待できない。第 1 の特性として、ES 細胞は分裂速度が速く未分化状態を維持したまま増殖するので、必要

な細胞を大量に確保することが可能である。これは組織幹細胞などがもつ増殖速度が遅いという欠点を克服している。第 2 は、ES 細胞からは比較的容易に神経細胞が得られる点である。これは ES 細胞を各細胞種へ分化させる際に、外胚葉由来である中枢神経系の細胞は胚発生の初期につくられるため、後期過程に出現する内胚葉組織の細胞に比べて分化誘導が一般的には容易だからである。第 3 は、ES 細胞は誘導法を工夫することにより、体内のあらゆる細胞を生み出す可能性も持っている点である (図 1)。

当研究室の岡田ら^{11,12)}は、内部細胞塊由来のマウス ES 細胞を用いて、発生の比較的早い段階で存在する高い可塑性をもつ神経幹細胞を誘導する、すなわち *in vitro* で時間的・空間的特異性を反映した神経発生を再現する試験管内神経発生モデル培養システムを構築することに成功した (図 2)。その培養系とは、まず ES 細胞から未分化状態を維持するために必要な LIF を取り除き、浮遊培養することで三胚葉に由来する細胞を含む胚様体 (embryoid body : EB) を形成させる。この EB 中には比較的早期の神経幹細胞が含まれており、

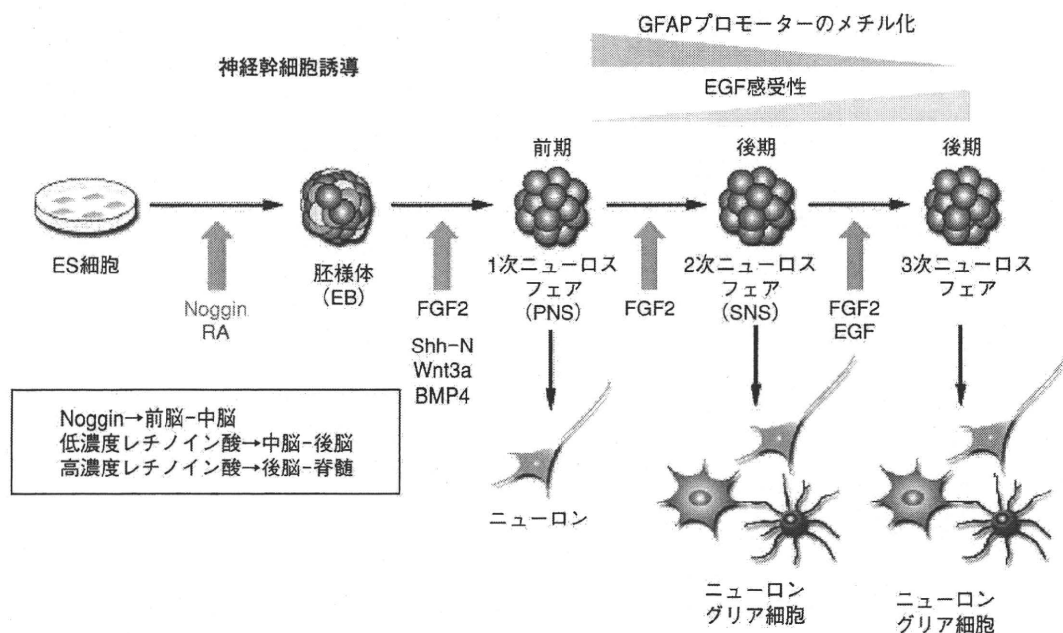


図2 マウスES細胞由来神経幹細胞による *in vitro* 神経発生モデルシステム (文献11を改変)
GFAP: glial fibrillary acidic protein, EGF: epidermal growth factor

これを無血清の神経幹細胞用の培地中で塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor 2: FGF2) 存在下に浮遊培養すると、ニューロスフェアとして神経幹細胞を選択的に培養することができる。さらに、EBの形成中に、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP) を阻害することで神経上皮への分化を促し、前脳の形成に重要な役割を果たすNoggin,あるいは神経誘導および後脳や前方脊髄の発生に重要な役割を果たすことで知られるレチノイン酸 (retinoic acid: RA) を低濃度で加えることで、EB中の神経幹細胞の割合を高め、ニューロスフェアの形成効率を高めることができる。このようにして形成させた1次ニューロスフェア (primary neurosphere: PNS) は、2次ニューロスフェア (secondary neurosphere: SNS), 3次ニューロスフェア (tertiary neurosphere) と継代培養することが可能であり、さらに興味深いことに1次ニューロスフェアからはほとんどニューロンしか誘導されないのに対し、2次、3次ニューロスフェアからはニューロンのみならずアストロサイト・オリゴデ

ンドロサイトなどのグリア細胞が誘導される (図2)。繰り返し継代培養が可能であること、神経系の3系統の細胞を産生する能力を有することにより、このマウスES細胞由来ニューロスフェアが自己複製能と多分化能をもつ神経幹細胞を含有していることがわかる。また、このような継代に伴う分化能の変化は、発生初期にはニューロンしか生み出されず、中期以降になって初めてグリア細胞が生み出される、*in vivo*における神経系の発生の時間的な変化をよく反映している。さらには、EB形成中にNogginを添加する、また加えるRAの濃度を変えることで、誘導される神経幹細胞の前後軸に沿った領域特異性を制御できる。また、1次ニューロスフェア形成時に腹側化因子であるSonic hedgehog (Shh) や、背側化因子であるBMP4やWnt3aを添加することで背腹軸に沿った領域特異性も制御することに成功している。このことから、培養中の適切な時期に適切な因子を加えることで、神経幹細胞の領域特異性を自在に制御できると考えられた (図2)。

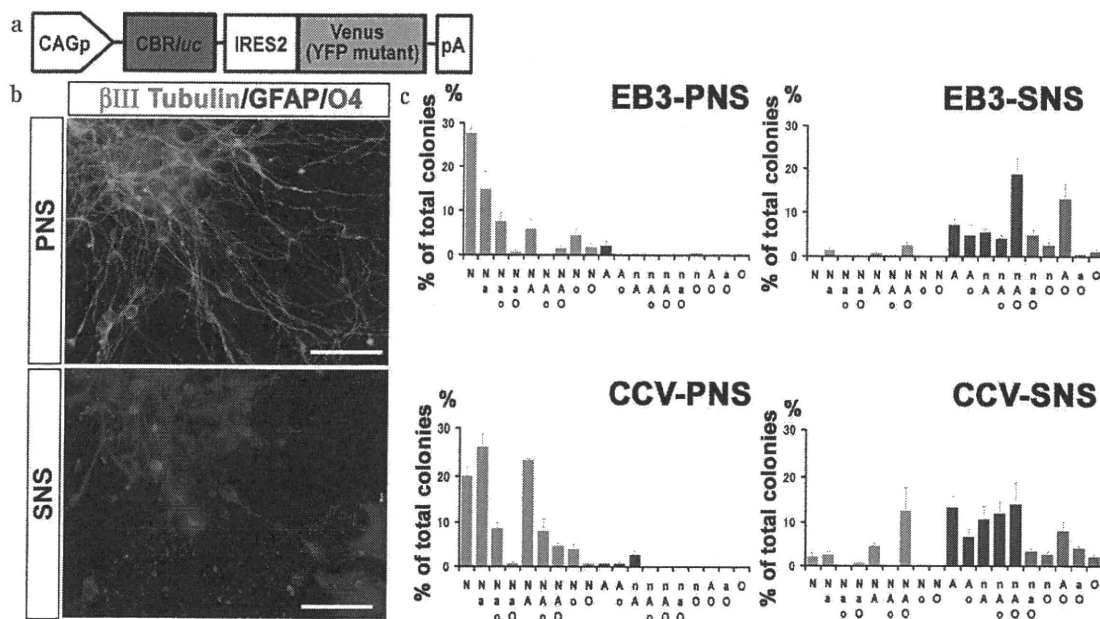


図 3 ES 細胞への遺伝子導入と神経幹細胞への分化誘導 (文献 8 より転載)

- a: ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼの改変遺伝子である CBRluc と組織切片中で移植細胞を同定するための Venus (YFP) を含んだ遺伝子をマウス ES 細胞に導入した。
- b, c: ES 細胞由来 1 次ニューロスフェア (PNS), 2 次ニューロスフェア (SNS) からのニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトへの分化誘導. PNS はニューロン優位に, SNS はアストロサイト, オリゴデンドロサイト優位に分化する. β III Tublin はニューロン, GFAP はアストロサイト, O4 はオリゴデンドロサイトのマーカーを示す. N, A, O はコロニーの中に 20 個以上の細胞が存在し, n, a, o は 20 個以下の少数の細胞が存在することを示す. CCV: CAG-CBRluc-IRES-Venus 遺伝子. Scale bar: 50 μ m.

損傷脊髄へのマウス ES 細胞由来神経幹細胞移植

マウス ES 細胞を用いて神経細胞へと誘導する方法はこれまでに広く研究され²⁾, ES 細胞由来の神経幹/前駆細胞は理想的な移植細胞ソースといえる. ES 細胞移植による脊髄損傷への有効性についてはこれまでに, 1999 年に McDonald ら⁹⁾がマウス ES 細胞を EB へと誘導し, ラット脊髄損傷モデルに移植し, 良好な機能回復を報告している. また, 2005 年に Keirstead ら⁷⁾はヒト ES 細胞から高純度のオリゴデンドロサイト前駆細胞へと効率的に誘導し, ラット脊髄損傷モデルに移植し, 脱髄した軸索の再髄鞘化と後肢機能回復を報告している. そのほか, ES 細胞からさまざまな神経系細胞へと誘導し, 脊髄損傷モデルに移植される研究が行われているが, どのような神経前駆

細胞が最も亜急性期の移植療法に適しているかは不明であった.

そこで, われわれ⁸⁾は, 前述した岡田の培養系で, マウス ES 細胞から EB 形成を経て誘導された 1 次ニューロスフェア (PNS) と, 一度継代を経た 2 次ニューロスフェア (SNS) を用いて, マウス脊髄圧挫損傷モデルに損傷後 9 日目の亜急性期に移植を行い, その有効性について検討を行った. また, PNS/SNS の損傷脊髄移植後の生着率あるいは腫瘍化形成の有無を検討するために, ホタルの発光酵素であるルシフェラーゼの改変遺伝子である CBRluc と組織切片中で移植細胞を同定するための Venus (黄色蛍光タンパク質: YFP) を含んだ遺伝子をマウス ES 細胞にあらかじめ導入した (図 3). 前述のように, PNS はほとんどがニューロンへと分化するのに対し, SNS はニューロンに加えてアストロサイト・オリゴデ

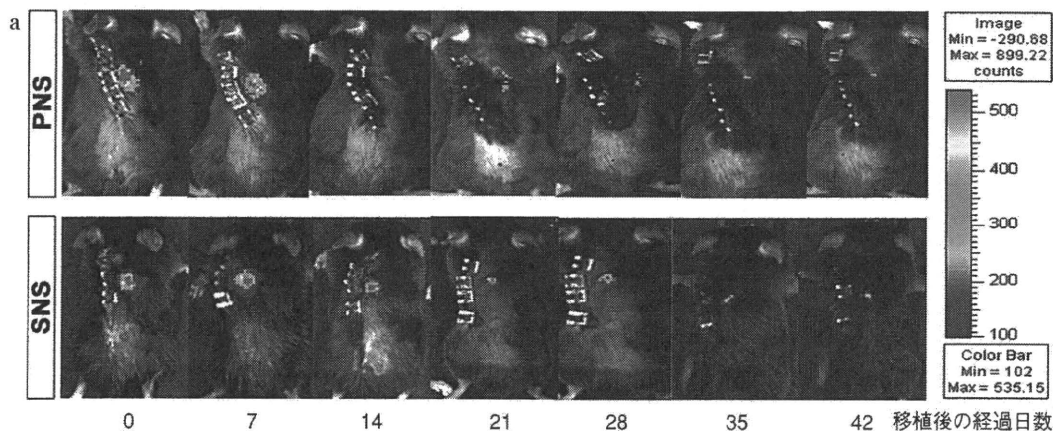
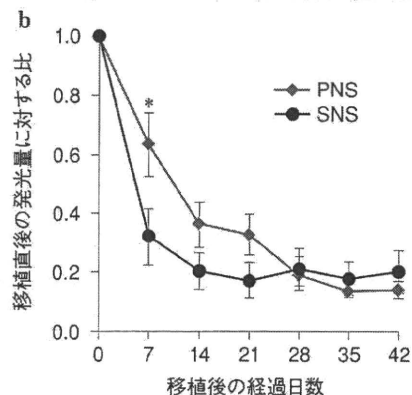


図4 移植されたES細胞由来PNS, SNSの動態(文献8を改変)

- 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。移植細胞による発光量は経時的に減少していった。
b: 移植直後の発光量に対する比。移植後42日(6週)の時点でPNS移植群, SNS移植群ともに移植直後の約20%の細胞が損傷脊髄内に生着したことを示す。経過中に腫瘍増殖に伴う異常発光を認めたマウスはいなかった。*: $p < 0.05$ 。



ドロサイトの3系統へ分化することがわかっている(図3)。損傷脊髄に移植されたPNSとSNSは、ルシフェラーゼによるバイオイメーキングにおいて移植後6週の時点で移植直後と比較して約20%の発光量を示し、いずれの移植細胞も約20%の細胞が生着したと考えられる(図4)。経過中にPNS移植群, SNS移植群ともにバイオイメーキングで腫瘍増殖を疑う異常発光は認めず、組織学的検討においても腫瘍化は認めなかった。移植されたPNS/SNSはともに神経系3系統へ*in vivo*においても*in vitro*と同様の分化傾向を呈していた(図5)。つまり、損傷脊髄内でPNSはニューロン優位に、SNSはアストロサイトあるいはオリゴデンドロサイト優位に分化していた(図5)。SNS移植群では圧挫損傷後の萎縮性変化と脱髄変化をControl群, PNS移植群と比較して有意に抑制していた(図6)。また、SNS移植群ではPNS移植群, Control群と比較して、血管新生や軸索再生が損傷脊髄内で有意に促進されていた。Basso Mouse Scaleによる後肢運動機能評価では、SNS移植群がPNS移植群, Control群と比較して有意差に良好な機能回復を示した(図

7G)。前述のように、PNSはニューロン優位に、SNSはアストロサイトあるいはオリゴデンドロサイト優位に*in vivo*でも*in vitro*でも分化する。この分化傾向の違いが機能回復の違いに影響を与えた可能性がある。機能回復のメカニズムの1つとして、SNS由来の未熟なアストロサイトが軸索再生のガイダンスとして機能したことが考えられる(図7A, B)。過去にもグリア前駆細胞やグリア前駆細胞由来アストロサイトを損傷脊髄に移植し、同様の効果が報告されている^{4,5)}。また、別の機序として血管新生を介した機能回復効果が考えられる¹⁾。アストロサイトは低酸素状態で血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)などの血管促進因子を分泌するといわれている¹⁶⁾。われわれ⁸⁾の結果でもSNS由来アストロサイトがVEGFを発現し、SNS移植群で血管新生が有意に促進されていた。また、機能回復の

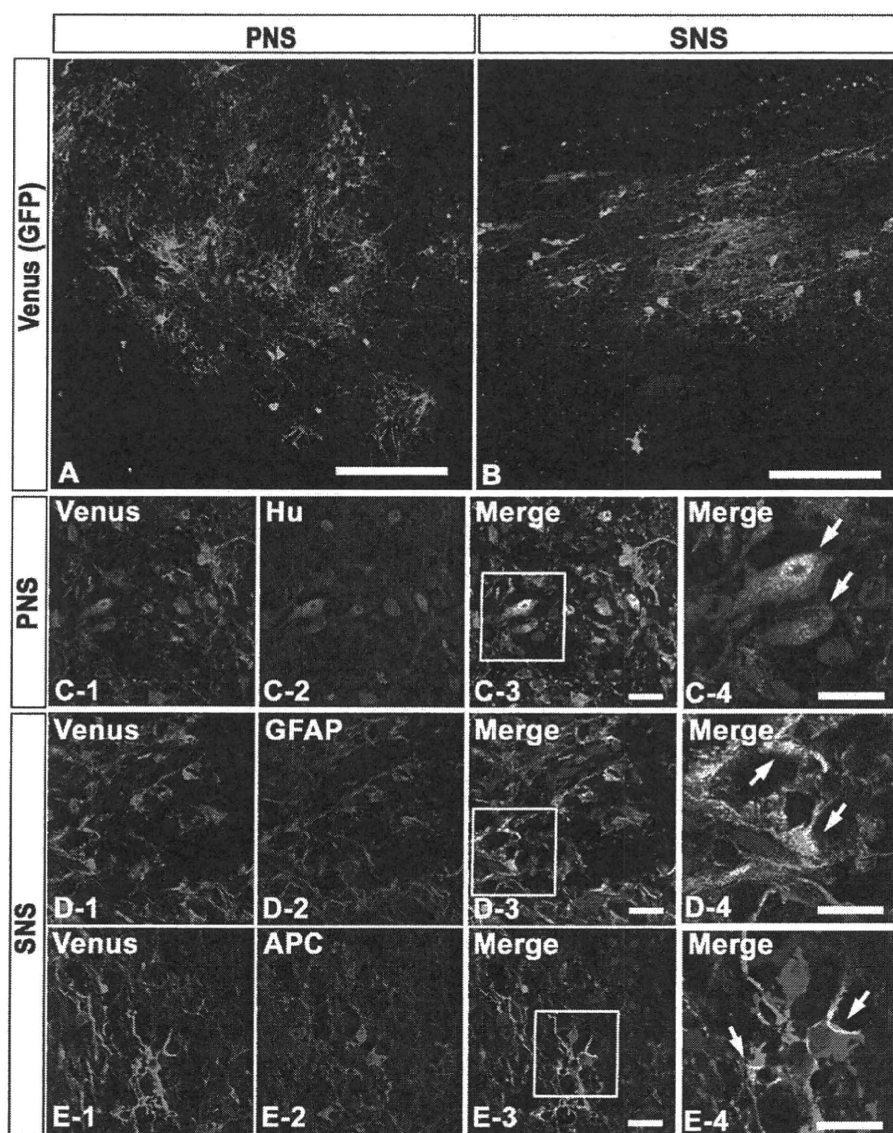
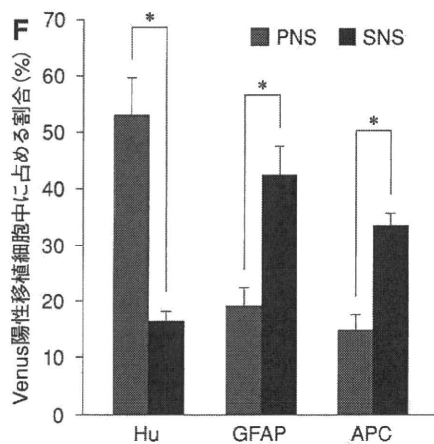


図 5 損傷脊髄内での PNS, SNS の分化

(文献 8 より A~E は転載, F は改変)

移植された PNS/SNS はともに損傷脊髄内で生着し (A, B), 神経系 3 系統への分化傾向を *in vivo* においても呈し, PNS はニューロン優位に (C), SNS はアストロサイト, オリゴデンドロサイト優位に分化していた (D, E). Venus (GFP) は損傷脊髄内で生着した移植細胞のマーカであり, Hu はニューロン, GFAP はアストロサイト, APC はオリゴデンドロサイトのマーカである. F は Venus 陽性の細胞の中で, Hu, GFAP, APC のそれぞれが占める割合を示したグラフである. A, B の scale bar: 100 μ m, C~E の scale bar: 20 μ m. *: $p < 0.05$.



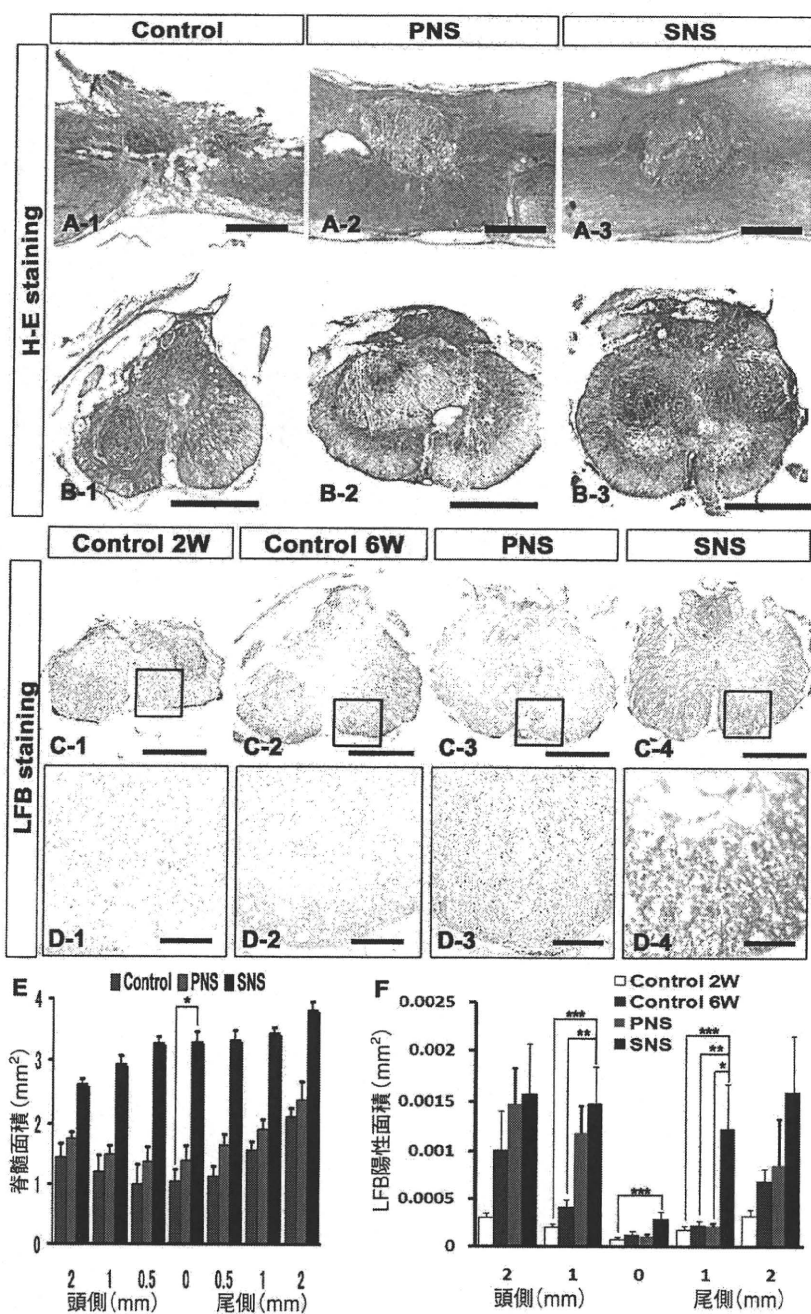


図 6 損傷脊髄の萎縮、脱髄に関する評価 (文献8よりA~Dは転載, E, Fは改変)
 A, B: Hematoxyline-eosin (H-E) 染色による損傷脊髄の萎縮の評価. SNS 移植群で萎縮が軽度である. 損傷脊髄中心部の矢状断像 (A), 横断像 (B). A, B の scale bar: 500 μ m.
 C, D: Luxol Fast Blue (LFB) 染色による脱髄の評価. SNS 移植群で脱髄が軽度であった. C の scale bar: 500 μ m, D の scale bar: 100 μ m.
 E: H-E 染色における脊髄面積の定量化. 損傷中心部で SNS 移植群は Control 群と比較して有意に萎縮が軽度であった. *: $p < 0.05$.
 F: LFB 陽性面積の定量化. SNS 移植群は PNS 移植群, Control 群と比較して有意に脱髄が抑制されていた. *~***: $p < 0.05$.

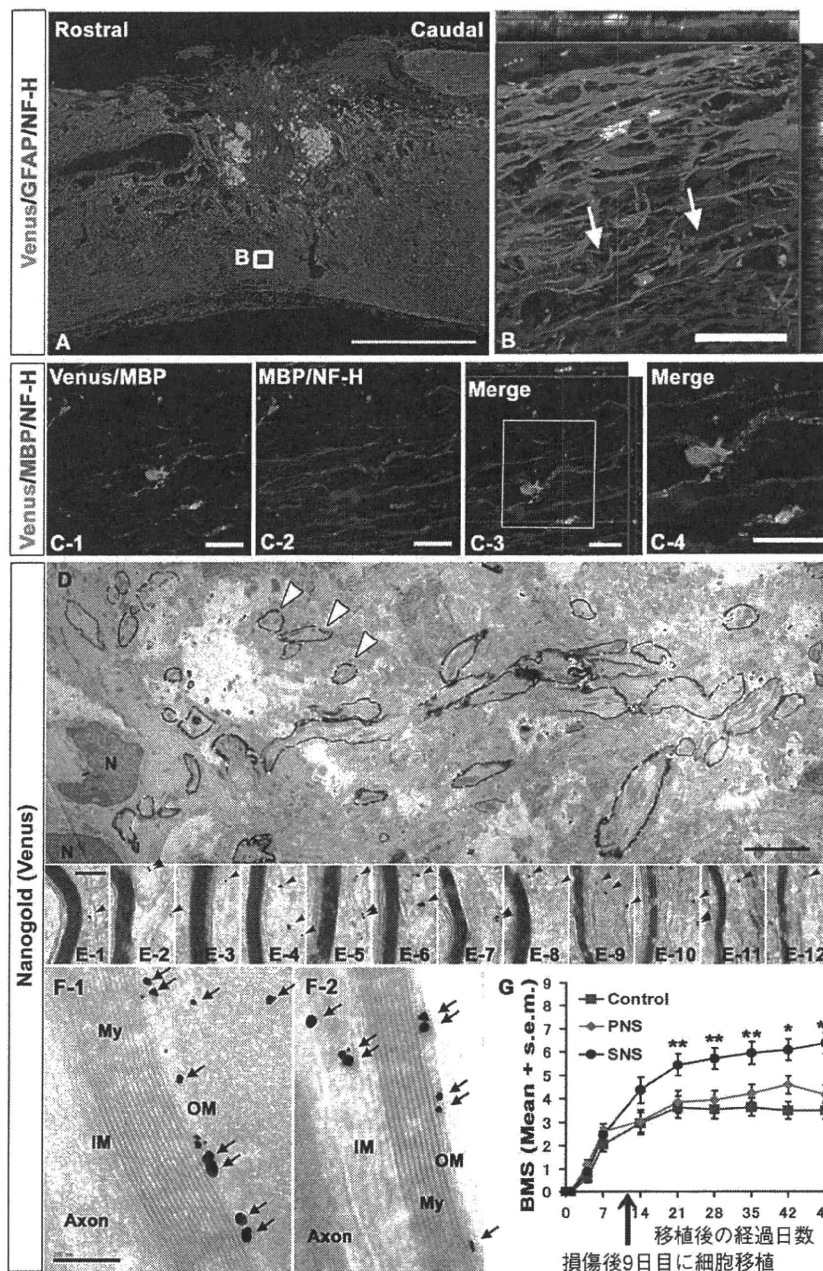


図 7 SNS 移植群における軸索再生と再髄鞘化, 運動機能の回復促進 (文献 8 より A~F は転載, G は改変)
 A, B : 損傷脊髄において内在性アストロサイトあるいは SNS 由来アストロサイトが再生軸索のガイダンスとなっている (白矢印). Venus は移植細胞, GFAP はアストロサイト, NF-H は軸索のマーカーを示す. A の scale bar : 500 μ m, B の scale bar : 50 μ m.
 C : SNS 由来のオリゴデンドロサイトが軸索を取り巻いている様子が観察される. MBP は髄鞘のマーカーを示す. Scale bar : 20 μ m.
 D~F : SNS 由来のオリゴデンドロサイトによる再髄鞘化 (白矢頭, 黒矢頭) の電子顕微鏡像を示す. 黒いドット (黒矢印) が Venus 陽性の移植細胞を示す. My は髄鞘, N は核, IM/OM はミエリン細胞質の軸索間膜の内外側を示す. D の scale bar : 5 μ m, E, F の scale bar : 200 nm.
 G : Basso Mouse Scale (BMS) による後肢運動機能評価では, PNS 移植群, Control 群と比較して SNS 移植群が有意差に良好な機能回復を示した. * : SNS vs Control ($p < 0.05$), ** : SNS vs PNS or Control ($p < 0.05$).