

図1 “安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの損傷脊髄への移植 (文献 20) を改変)

a: 蛍光蛋白質 RFP で標識された iPS 細胞由来ニューロスフェア (SNS: secondary neurosphere, 継代を繰り返したもの) は移植後に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) を再髄鞘化していた。

Scale bar: 50 μ m. (p.6 カラー図参照)

b: Basso Mouse Scale (BMS) による後肢運動機能評価. 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, 胚葉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無いこと, また, PNS を一度継代した二次ニューロスフェア (SNS, ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトへの神経系 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¹⁹⁾.

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運動機能が回復したが, 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確認出来なかった。

PBS: リン酸緩衝液 (細胞移植を行わない群に投与), *: p<0.05, **: p<0.01

たものは 335D1 というクローンのみであった¹⁹⁾. そこで, 335D1 と腫瘍形成能が認められた“危険な”クローンである 256H13 と 256H18 を用いて, ニューロスフェアへ誘導後にマウス損傷脊髄への移植実験を行った. いずれのクローン由来ニューロスフェアも移植後に

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, 損傷後 6 週に下肢運動機能が急速に失われ, さらに大多数のマウスがその後死亡した²⁰⁾. 組織学的解析の結果, 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

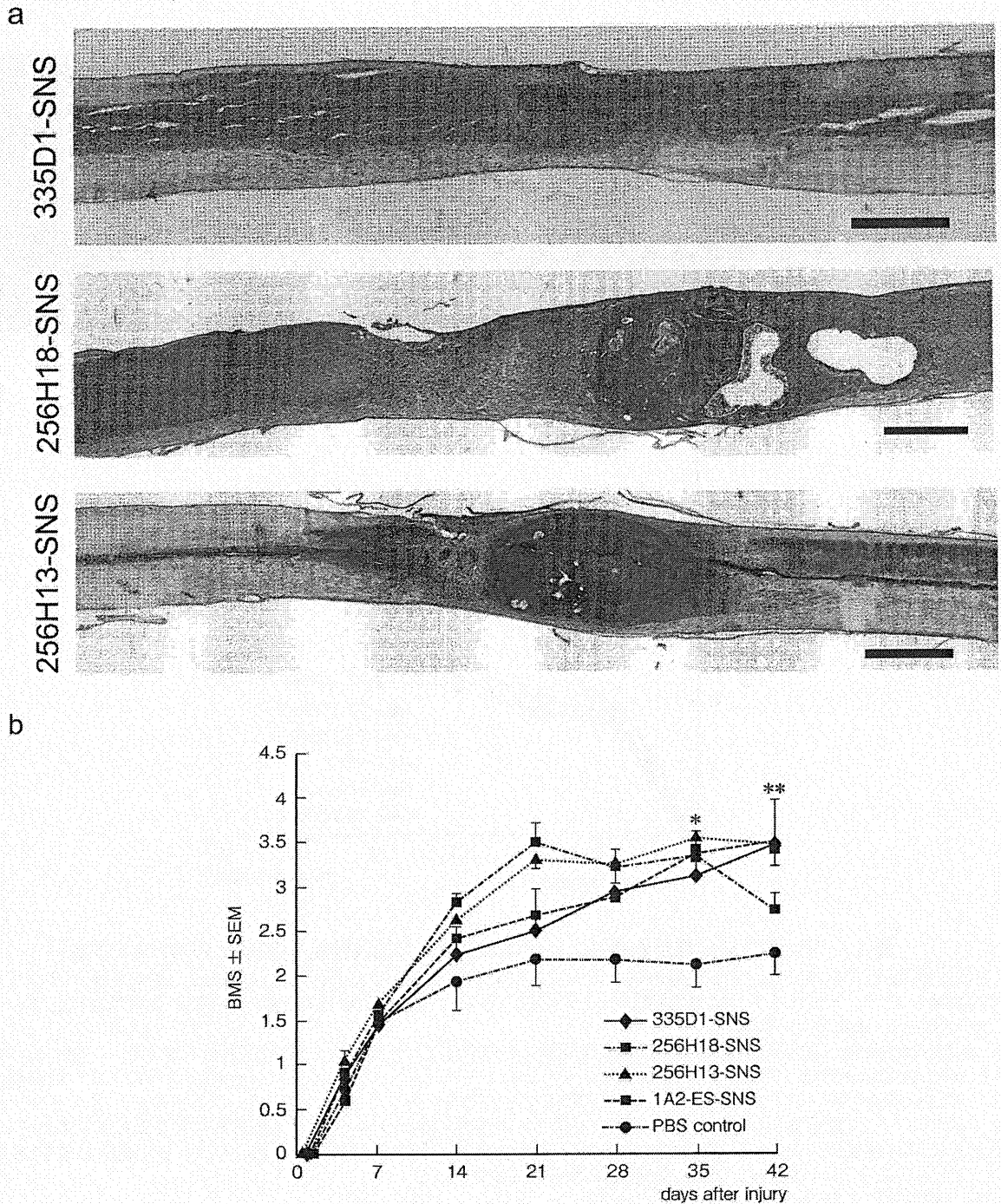


図2 成体マウス由来 iPS 細胞株由来ニューロスフェアの損傷脊髄への移植 (文献 20) を改変)

a: 細胞移植後の損傷脊髄像. 335D1-SNS: “安全な” 335D1-SNS 移植後の損傷脊髄像. 腫瘍形成は認めなかった. Scale bar: 1 mm. 256H18-SNS, 256H13-SNS: “危険な” iPS クローン由来のニューロスフェア移植後の損傷脊髄像. 奇形腫形成を認める. Scale bar: 1 mm. (p.7 カラー図参照)

b: BMS による後肢運動機能評価. “安全な” 335D1-SNS 移植群では, PBS 投与群と比較して, 損傷後 5 週目以降に有意な機能回復が認められた. “危険な” 256H18-SNS 移植群では損傷後 5 週目までに回復が認められた機能が 6 週目において低下した.

*: $p < 0.05$. **: $p < 0.01$

内で巨大な teratoma を形成していた。一方、“安全な” 335D1 クローンを用いた場合は、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復が得ることができた (図 2)。このことより、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評価すれば、脊髄損傷治療における有用な細胞源となり得ることが示された²⁰⁾。

III. 脊髄損傷治療として iPS 細胞 関連研究の課題と展望

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た大きな一歩となった。しかし脊髄損傷治療としては、移植の至適時期と細胞の誘導期間との兼ね合いや前述の腫瘍化の問題など、実際の臨床応用実現の前に解決すべき課題はまだ多い。

近年ヒト皮膚の線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立¹⁶⁾ に続き、一本の髪の毛²¹⁾ や一滴の血液²²⁾ からのヒト iPS 細胞樹立も報告された。実際に iPS 細胞を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²³⁾。iPS 細胞の樹立法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ずに、プラスミドベクターを用いた方法²⁴⁾、トランスポゾン的一种である piggyBac を用いた手法²⁵⁾、染色体外に挿入しいずれ消失するエピソームベクターの導入²⁶⁾、プラスミドベクターよりも長期間の発現が可能である minicircle vector²⁶⁾、薬剤による導入遺伝子の一部置き換えの成功^{28), 30)} など報告が相次いでいる。また培養法においても、動物種由来の血清(ウシ血清) やフィーダー細胞 (マウス由来) を用いずに iPS 細胞を樹立する方法も報告された³¹⁾。さらにマウス線維芽細胞から 1 週間程度で iPS 細胞へのリプログラミングを介さずに誘導した神経細胞である iN 細胞も報告された³²⁾。今後、glia 細胞も誘導可能になれば有望な移植細胞となり得る可能性がある。しかし、これらの方法で作製された iPS 細胞由来 NS/PC が、マウス脊髄損傷モデルへの移植効果が確認できたレトロウイルスで作製された iPS 細胞と同等の多能性や分化

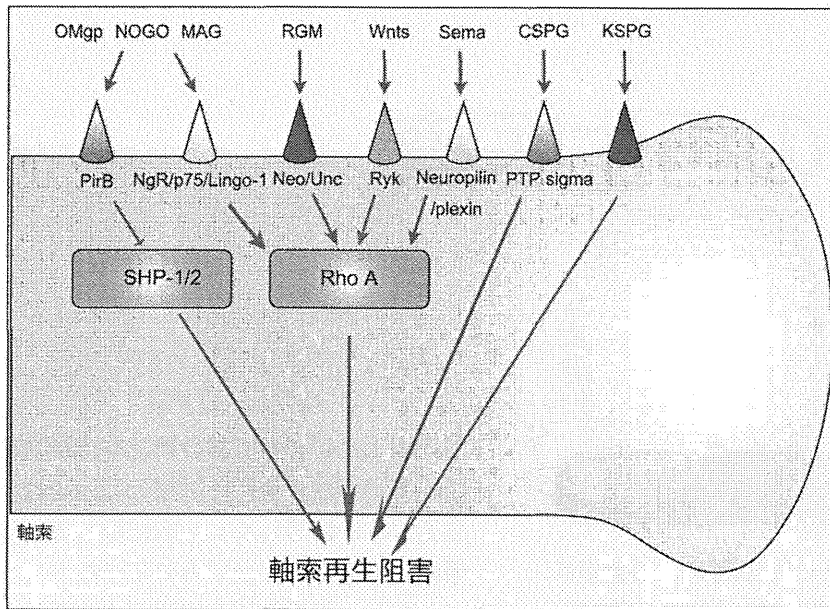
能力を有しているか、移植細胞として安全性が高いのかどうかについては、免疫不全動物への移植実験を経て今後詳細に評価する必要がある。iPS 細胞による脊髄損傷に対する再生医療の実現に向けて、安全性を慎重に評価しつつ、その有効性を検討していくことが肝要である。

参考文献

- 1) Lindvall O, et al : Transplantation strategies in the treatment of Parkinson's disease: experimental basis and clinical trials. *Acta Neurol Scand. Suppl* 126 : 197-210, 1989.
- 2) Diener PS, et al : Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 18 : 763-778, 1998.
- 3) Diener PS, et al : Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J Neurosci* 18 : 779-793, 1998.
- 4) Reynolds BA, et al : A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12 : 4565-4574, 1992.
- 5) Ogawa Y, 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.
- 6) Iwanami A, et al : Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80 : 182-190, 2005.
- 7) Yamane J, et al : Transplantation of galectin-1-expressing human neural stem cells into the injured spinal cord of adult common marmosets. *J Neurosci Res* 88 : 1394-1405, 2010.
- 8) McDonald J, et al : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 6126-6131, 1999.
- 9) Keirstead HS, et al : Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25 : 4694-4705, 2005.
- 10) Kumagai G, et al : Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. in *PLoS ONE* 4 : e7706, 2009.
- 11) Mayor S : First patient enters trial to test safety of stem cells in spinal injury. *BMJ* 341 : p. c5724, 2010.
- 12) Mason DW, et al : The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* 19 : 685-694, 1986.
- 13) Nicholas MK, et al : Rejection of fetal neocortical neural transplants by H-2 incompatible mice. *J Immunol* 139 :

- 2275-2283, 1987.
- 14) Cummings BJ, et al : Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 : 14069-14074, 2005.
 - 15) Takahashi K, et al : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006.
 - 16) Takahashi K, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007.
 - 17) Okada Y, et al : Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26 : 3086-3098, 2008.
 - 18) Okita K, et al : Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448 : 313-317, 2007.
 - 19) Miura K, et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 448 : 743-745, 2009.
 - 20) Tsuji O, et al : Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 : 12704-12709, 2010.
 - 21) Aasen T, et al : Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26 : 1276-1284, 2008.
 - 22) Seki T, et al : Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7 : 11-14, 2010.
 - 23) Hachein-Bey-Abina S, et al : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302 : 415-419, 2003.
 - 24) Okita K, et al : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322 : 949-953, 2008.
 - 25) Woltjen K, et al : piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458 : 766-770, 2009.
 - 26) Kaji K, et al : Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458 : 771-775, 2009.
 - 27) Yu J, et al : Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324 : 797-801, 2009.
 - 28) Jia F, et al : A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7 : 197-199, 2010.
 - 29) Maherali N, et al : Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19 : 1718-1723, 2009.
 - 30) Zhou H, et al : Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4 : 381-384, 2009.
 - 31) Hayashi Y, et al : Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS ONE* 5 : e14099, 2010.
 - 32) Vierbuchen T, et al : Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 : 1035-1041, 2010.

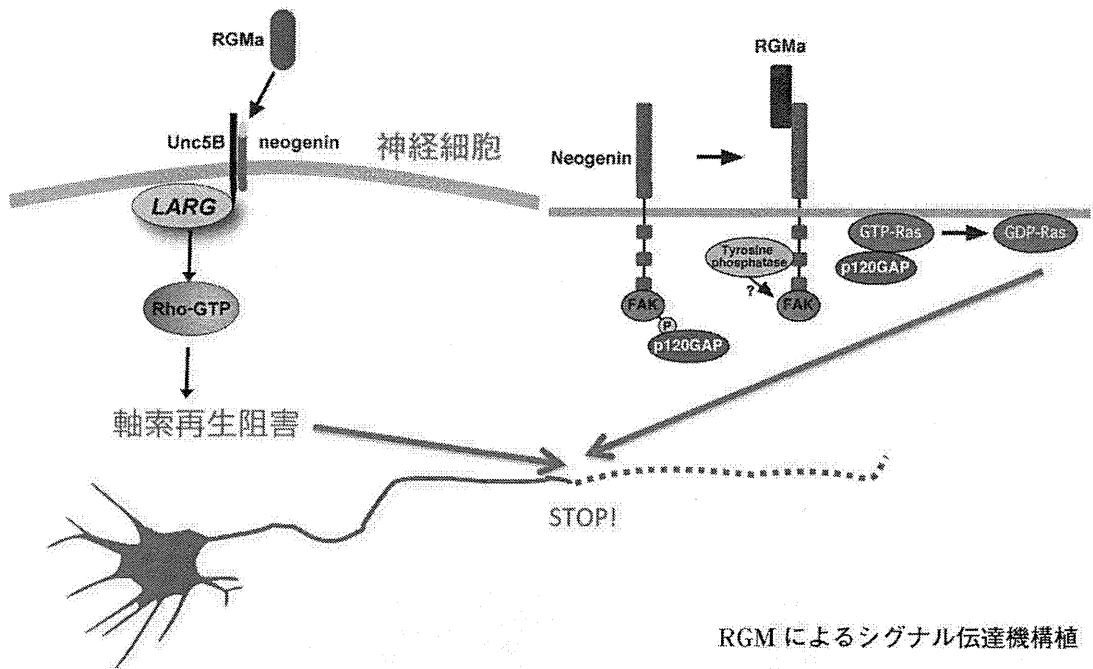
カラー図



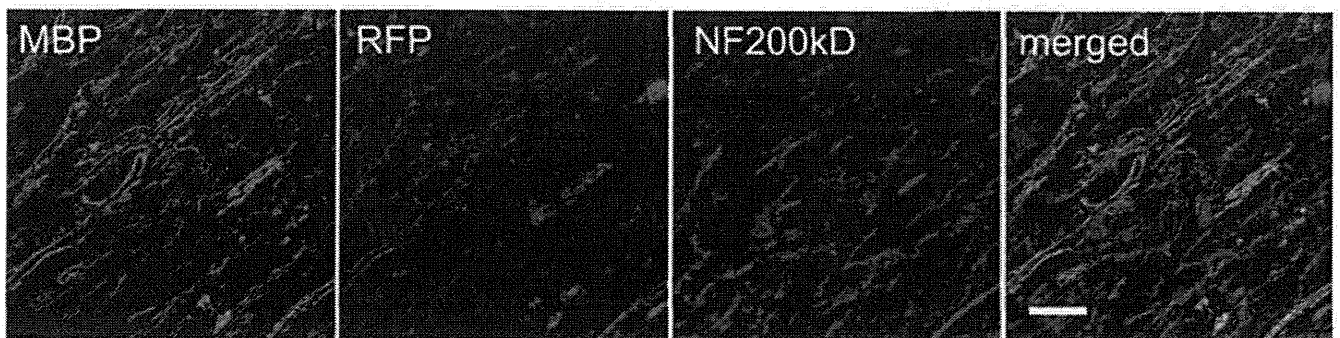
軸索再生阻害をもたらす複数のタンパク質 (p.20)

RhoAの活性化

Rasの不活性化



RGMによるシグナル伝達機構植 (p.20)



“安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの損傷脊髄への移植 (p.37)

損傷脊髄の再生医療

向野雅彦¹⁾ 中村雅也²⁾

はじめに

脊髄損傷は交通事故やスポーツ事故等により受傷するケースが多いとされ、毎年約5,000人以上の患者が新たに発生している。症状は四肢の運動麻痺が中心であり、高度な損傷により完全麻痺を呈する例も少なくない。その他にも、感覚障害、膀胱直腸障害、褥瘡等の合併症が発生し、患者のQOLを著しく阻害する。現在、国内で後遺症に苦しんでいる患者の総数は10

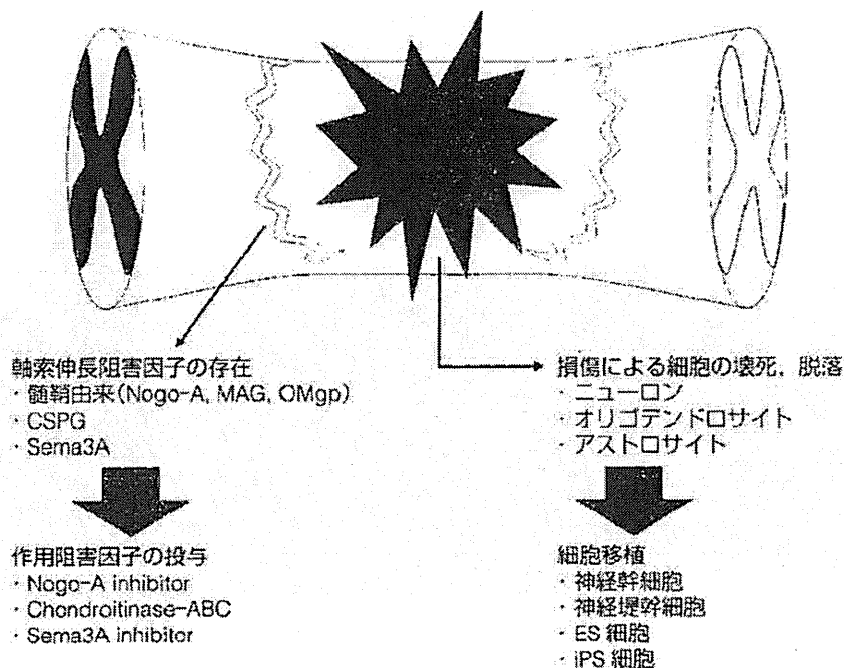
万人以上といわれており新たな治療法の出現が待ち望まれているが、現行の医療の範囲で機能改善を得る手立てはないに等しく、治療に際しては専ら二次損傷の予防のみに焦点が当てられてきた。

しかし、幹細胞研究に代表される近年の再生医療の分野における研究の進展により、中枢神経の損傷はいつたん完成してしまえば不可逆なもの、という常識は覆されつつある。再生医療の研究はさまざまな分野で行われているが、脊髄損傷の分野は研究が特に盛んに行われている分野のひとつである。1980年代のAguayoらのグループによるラット脊髄損傷モデルに対する末梢神経移植とそれに伴う軸索伸張の報告¹⁾に始まり、軸索伸長阻害因子のブロック、神経幹細胞の移植、さらに最近ではES細胞やiPS細胞といった万

¹⁾ Masahiko Mukaino MD PhD
慶應義塾大学月が瀬リハビリテーションセンター

²⁾ Masaya Nakamura MD PhD
慶應義塾大学医学部整形外科教室

■ 図 脊髄損傷に対する再生医学研究のターゲット



能幹細胞を用いた治療に至るまで、神経再生を実現し機能回復につなげようという試みが活発に行われている(図)。

本稿ではこれまで明らかにされた脊髄損傷の分野における再生医学研究の近年の進展について概説する。

軸索伸長阻害因子の発見

20世紀初頭に Ramon Y Cajal が中枢神経系の解剖について詳細にわたる報告²⁾を行い、中枢神経系においては新たな連絡の形成という意味での実質的な軸索の再生は起こらないと結論付けた。このことは疾患としての中枢神経損傷の示す経過ともよく符合しており、中枢神経系がそもそもそういった組織の再生を許容しない性質をもっているという事実は、神経生理学の分野においても常識として扱われてきた。しかし一方で、中枢神経において何が再生を阻害するのかというメカニズムについては合理的な説明はなされていなかった。

それが明らかとなってきたのは、1980年代に入り、Schwabらによって中枢神経の髄鞘(ミエリン)を構成する物質のなかに、軸索の再生を阻害する因子が存在することが発見されてからのことである³⁾。後にこの物質は Nogo-A という蛋白として同定されるわけであるが、この発見を端緒として、他にも MAG、OMgp といったミエリン由来の軸索伸長阻害因子が同定された^{4,5)}。実際に Nogo-A に対するモノクローナル抗体を損傷部脊髄に持続投与し、機能回復を認めたことが報告されたこともあり、この軸索阻害因子が治療のターゲットとして注目を集めることとなった。さらに、損傷周囲のグリア細胞から放出されるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)が軸索の伸展を阻害することも明らかとなった⁶⁾。CSPG による再生阻害にはグルコサミノグリカン鎖による修飾が必要であることがわかっており、Bradburyらは損傷部位にこのグルコサミノグリカン鎖を分解する酵素であるコンドロイチナーゼ ABC を投与することによって軸索の再生、運動機能の回復がみられたと報告した⁷⁾。その他にも神経回路形成に際しての軸索のガイダンス因子として、線維芽細胞性癩痕からはセマフォリン、エフリン等の軸索伸長阻害因子が供給されており、筆者らの研究グループにおいてもわが国の製薬企業のグループとの共同研究により、新規のセマフォリン 3A 阻害剤による脊髄の軸索再生誘導と機能回復に成功している⁸⁾。

こうした研究の結果を受けて、最近では軸索再生阻害因子の作用を制御し軸索の伸展を許容する環境をつ

くることが、再生医学の分野における1つの重要なテーマとなっている。しかしその一方で、これらの分子は損傷部の拡大を防ぎ、あるいは異常な sprouting を防ぐことによって損傷の修復に有利な一面をもつことも指摘されている。これらをターゲットとした治療的な介入を考慮するうえでは、損傷の拡大や allodynia の出現のような副作用の発生等のリスクも考慮に入れ、作用の両面についての理解を深めることが必要であると考えられる。

幹細胞医学の進展

1980年代以降、Aguayoらによるラット脊髄損傷モデルに対する末梢神経移植とそれに伴う軸索伸張の報告、Freundらによる脳への胎児黒質組織の移植に伴うシナプス形成の報告⁹⁾といったように、ある一定の条件下においては中枢神経組織が移植組織の存在を許容し、軸索を介した連絡をつくることが知られていたが、さらに神経幹細胞を移植材料として用いるところから移植医療の研究は大きく発展していった。神経幹細胞は中枢神経系に存在する組織幹細胞とよばれる未分化な細胞であり、神経組織を形成するニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトに分化し(多分化能)、分裂を繰り返して増殖する能力(自己複製能)を有している。神経生理学の発展のなかで成体の中枢神経内にも未分化な神経幹細胞が存在することが明らかにされ、さまざまな病態で組織修復に働いていることがわかってきたことから、培養した幹細胞を移植することによって組織修復を促進しようとする研究が行われるようになった。当初は損傷脊髄内では移植細胞のほとんどがアストロサイトへ分化していることから神経幹細胞移植の有用性を疑問視する向きもあったが、筆者らは急性期に分泌されるサイトカインや神経栄養因子によりこういった分化の誘導がコントロールされている可能性を考え、亜急性期に移植を行うことで組織への新たなニューロンやオリゴデンドロサイトの供給、またその結果として有意な機能回復の改善効果が得られることを報告した¹⁰⁾。さらに、コモンマーモセットを用いた霊長類での脊髄損傷モデルに、ヒト中絶胎児由来の神経幹細胞を移植し、同様に in vivo におけるニューロン分化や有意な機能改善がみられることも明らかとなった¹¹⁾。

こうした結果から、次に期待されるのは臨床への応用ということになるが、実際には神経幹細胞は胎児組織から採取するため、臨床応用の実現は非常に困難である。中絶胎児から採取することに唯一実現の可能性

があるが、それが倫理上許されるかどうかについては議論の分かれるところである。そのような背景から、最近では実際の臨床応用を見据え、細胞の供給源をより倫理的な障害の少ない皮膚、骨髄等の成体の組織由来で神経への分化能もつ神経堤幹細胞、あるいは組織幹細胞よりもさらに未分化な形態である受精卵由来の胚性幹細胞(ES細胞)や線維芽細胞等への遺伝子導入により未分化な形質を獲得させた人工多能性幹細胞(iPS細胞)といった新たな手法を用いた幹細胞に関する研究が盛んに行われるようになってきた。Millerらは、皮膚由来神経堤幹細胞をシュワン細胞へ分化させたのちに、ラット脊髄圧挫損傷モデルに移植すると、軸索伸長と内在性シュワン細胞の集積を認め、さらに下肢運動機能が回復することを報告した¹²⁾。しかし、これらの研究で用いられた細胞は胎仔由来であり、臨床応用の鍵となる成体由来の細胞を用いた治療の有効性はいまだ報告されていない。

一方、神経幹細胞による治療の有効性が多くの研究で示されていることから、さらに未熟な細胞である胎性幹細胞(ES細胞)、さらには2006年に京都大学の山中教授らが発表したiPS細胞(人工多能性幹細胞)を神経幹細胞等に分化させ移植することが試みられており、これらの研究には一定の成果が報告されている¹³⁾。しかし、このアプローチにも移植細胞の腫瘍化という高いハードルが存在する。元来、ES細胞を含め多能性幹細胞にはすべての組織に分化する能力、自己複製を行う能力があるため容易に腫瘍を形成することが知られている。そこで安全性の検討のために、マウスES細胞とiPS細胞から神経幹/前駆細胞を作製し、免疫不全マウスの脳線条体へ移植したところ、ES細胞由来の神経幹細胞移植マウス群の1割、iPS細胞由来の細胞移植マウス群の4割において、混入した分化抵抗性細胞由来の奇形腫形成が観察された¹⁴⁾。この問題を解決するため、さまざまな手法で多能性を維持しつつ腫瘍化を予防するための研究が進められているが、現在のところはその懸念を完全に払拭するには至っていない。

とはいえ、幹細胞を移植することで細胞補充をするという考えかたは非常に魅力的であり、軸索伸長障害因子の中和抗体や分解酵素を用いた治療とともに、それらとの併用も視野に入れた今後の研究の進展が大いに期待される場所である。これらの努力によって安全性、倫理上の問題に答えが出され、幹細胞移植医療がさまざまな中枢神経疾患の治療における重要な選択肢のひとつとなる日もそう遠くはないかもしれない。

リハビリテーションの併用

これらの治療の臨床応用を考えた際に、介入の成果を実際の機能改善に結び付ける段階では、新たな神経ネットワークの形成のためのリハビリテーションが重要な役割を担うことが予想される。ただし、細胞移植、軸索再生、リハビリテーションについてはそれぞれ既に多くの報告でその有効性が実証されているものの、その併用についての報告は多くない。細胞移植に関してはKubasakらが嗅粘膜下のグリア細胞(幹細胞が含まれる可能性が示唆されている)の移植に訓練を組み合わせると、細胞単独よりもさらに軸索の伸展とともに機能の改善を認めたことを報告している¹⁵⁾。また、軸索再生の促進との併用効果については、Garcia-AllasらがCSPGの軸索伸長阻害作用をブロックするコンドロイチナーゼABCの投与と機能訓練を組み合わせることにより、コンドロイチナーゼ単独ではほとんどみられなかった機能改善が有意に観察され、軸索の連絡が改善したことを報告している¹⁶⁾。一方、Maierらの報告では同じく抗NogoA抗体による軸索伸長阻害のブロックと、トレッドミルを使った運動機能訓練がそれぞれ機能回復をもたらしたが、併用による効果の増強はみられなかったとしている¹⁷⁾。

このように一部では幹細胞移植あるいは軸索再生の促進とリハビリテーションの併用の有効性を示した報告もなされてはいるものの、数が少なく評価は一定していない。一方では、Hummらの報告のように運動負荷によるNMDA型グルタミン酸シナプスの活動増加がcytotoxicな環境をつくる可能性も指摘されており¹⁸⁾、このような併用効果の検討にあたっては、介入が与える影響、起こり得る事象について、メカニズムの全体像をもう少し明らかにする必要があるのかもしれない。

まとめ

脊髄損傷を対象とした再生医学研究の近年の進展について述べた。これまで長い間、中枢神経組織における障害は不可逆であるとの観点からその治療に関する研究は専ら損傷の拡大の予防に焦点が当てられてきたが、軸索再生、細胞移植を柱とする再生医療の研究のさらなる発展は、現在も重篤な麻痺等の後遺症に苦しむ多くの患者にこの先新たな希望をもたらすことができるかもしれない。本稿にあげたような基礎的な研究成果を積み重ねていくことで、安全かつ効果的な臨床応用を実現することが切に望まれる。

文献

- 1) David S, Aguayo AJ : Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214(4523) : 931-933, 1981.
- 2) Ramon Y Cajals : Structure and connections of neurons. *Bull Los Angel Neuro Soc* 17(1-2) : 5-46, 1952.
- 3) Schwab ME, Caroni P : Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8(7) : 2381-2393, 1988.
- 4) Mukhopadhyay G et al : A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 13(3) : 757-767, 1994.
- 5) Wang KC et al : Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417(6892) : 941-944, 2002.
- 6) McKeon RJ et al : Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 136(1) : 32-43, 1995.
- 7) Bradbury EJ et al : Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416(6881) : 636-640, 2002.
- 8) Kaneko S et al : A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12(12) : 1380-1389, 2006.
- 9) Freund TF et al : Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum : a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5(3) : 603-616, 1985.
- 10) Ogawa Y 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(6) : 925-933, 2002.
- 11) Iwanami A et al : Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 80(2) : 182-190, 2005.
- 12) Biernaskie J et al : Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 27(36) : 9545-9559, 2007.
- 13) Tsuji O et al : Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(28) : 12704-12709, 2010.
- 14) Miura K et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27(8) : 743-745, 2009.
- 15) Kubasak MD et al : OEG implantation and step training enhance hindlimb-stepping ability in adult spinal transected rats. *Brain* 131(Pt 1) : 264-276, 2008.
- 16) Garcia-alias G et al : Chondroitinase ABC treatment opens a window of opportunity for task-specific rehabilitation. *Nat Neurosci* 12(9) : 1145-1151, 2009.
- 17) Maier IC et al : Differential effects of anti-Nogo-A antibody treatment and treadmill training in rats with incomplete spinal cord injury. *Brain* 132(Pt 6) : 1426-1440, 2009.
- 18) Humm JL et al : Use-dependent exaggeration of brain injury : is glutamate involved? *Exp Neurol* 157(2) : 349-358, 1999.

iPS 細胞由来神経幹細胞

Cell therapy for spinal cord injury utilizing iPS cells

辻 収彦* 戸山 芳昭* 中村 雅也*
Tsuji Osahiko Toyama Yoshiaki Nakamura Masaya

抄録▶ 損傷脊髄の再生は不可能であると考えられてきたが、幹細胞研究の急速な進歩により、細胞移植治療が脚光を浴びようになっている。しかし胎仔組織、受精卵を破壊するという倫理的問題が大きな障壁となり、未だ臨床応用の実現に至っていない。これらに代わる移植細胞源として近年、自家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) に大きな期待が集まっており、本稿ではマウス iPS 細胞を用いた脊髄損傷研究について概説する。

Key Words iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells), 細胞移植 (cell transplantation), 脊髄損傷 (spinal cord injury), 安全性 (safety)

*慶應義塾大学医学部整形外科学教室

はじめに

20世紀初頭にスペインの神経解剖学者 Ramón y Cajal が “Once the development was ended, the fonts of growth and regeneration...dried up irrevocably” と述べたように、成体哺乳類の中枢神経系、特に脊髄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¹⁾、その後ヒトを含めた哺乳動物において神経幹細胞を含めた神経前駆細胞の培養法が確立され、発生過程および成体の哺乳類中枢神経系における神経幹細胞の分子生物学的特性が明らかにされると、その多分化能を生かして神経変性疾患や神経損傷においていったんは失われた神経系の細胞や組織を再生しようという試みがなされてきた。神経幹細胞は、未分化状態を維持しながら分裂・増殖して自己と同じ幹細胞を生み出す自己複製能をもち、神経系の構成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3種類の細胞を生み出すことができる多分化能を有している。さらには *in vitro* で neurosphere 法をはじめとするさまざまな方法で培養することが可能であり、必要十分量の細胞数を得ることが可能となるため、細胞治療のためのドナー細胞を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²⁾、筆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³⁾、マウス脊髄損傷に対するマウス胎仔線条体由来神経幹細胞移植の有効性および移植細胞のルシフェラーゼ発光によるバイオイメージング⁴⁾、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マウス脊髄損傷に対する有効性⁵⁾ 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。この結果は、*in vitro* で継代培養を行って培養・増

幅したヒト神経幹細胞の神経再生への応用を強く期待させる結果であった。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。

近年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⁶⁻⁸⁾。患者本人からiPS細胞を樹立し、神経幹・前駆細胞へ分化誘導後に脊髄損傷部位へと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、倫理的な問題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。

本稿では、これまで行われてきた脊髄損傷に対する細胞移植研究、さらにはわれわれが行ってきたiPS細胞を用いた研究について概説し、最後にiPS細胞関連の研究における問題点と今後の展望に関しても言及したい。

胎児(胎仔)および胚性幹(Embryonic stem, 以下ES)細胞由来神経幹/前駆細胞を用いた脊髄損傷治療の検討

中枢神経である脊髄は、再生能力が非常に低く、一度損傷を受けると再生は困難であると考えられてきた。近年、幹細胞研究の急速な進歩により、動物実験レベルでは、細胞移植をはじめ、損傷脊髄の修復が得られる治療法が多数報告されるようになった。基礎研究で得られた結果を臨床の現場で応用できれば、脊髄損傷に対して新たな治療法を確立することも夢ではないと考えられる。

細胞移植は古くから注目を集めており、1980年代にスウェーデンLund大学のLindvallのグループが、パーキンソン病患者の脳へ胎児中脳を移植し、機能の回復が得られることを報告した⁹⁾。その後、脊髄損傷に対しても、胎児脊髄

移植の有効性が示された^{10,11)}。しかし、胎児組織の移植には多くを一度に得られない量的制約などが問題となり、神経幹細胞が脚光を浴びるようになった。

1. 神経幹・前駆細胞

神経幹・前駆細胞(NS/PC)とは、中枢神経系を構成するニューロンやグリア細胞へ分化する多分化能を有し、自己複製能も持つ未分化な細胞である。1992年にReynoldsとWeissにより、NS/PCを効率よく増殖できるneurosphere法が報告され¹⁾、必要十分量の細胞数を*in vitro*で増殖させることが可能となり、細胞移植材料として期待されるようになった。

当研究室でも脊髄損傷治療の研究において、ラット胎仔脊髄由来NS/PC移植のラット脊髄損傷への有効性³⁾、さらにはヒト胎児前脳由来NS/PC移植の霊長類コモンマーモセット脊髄損傷モデルへの有効性⁵⁾を報告してきた。いずれも、運動機能の回復および組織学的評価において良好な結果が得られたことから、胎仔/胎児由来NS/PCは脊髄損傷治療に非常に有用な移植細胞と考えてきた。しかし、脊髄損傷患者への臨床応用を考慮すると、中絶胎児からの細胞採取が必要となるため、倫理的観点から現時点ではわが国において臨床応用の実現は不可能といわざるを得ない。

2. ES細胞

胚性幹(Embryonic Stem; 以下ES)細胞は、受精卵の胚盤胞期の胚の一部である内細胞塊から作製される細胞で、理論上すべての細胞になる能力を有することから“万能細胞”ともいわれる。神経組織も含む胎児の全細胞は内細胞塊に由来しており、脊髄損傷治療の研究においても注目されてきた。1999年にはMcDonaldらがES細胞から形成したNS/PCをラット損傷脊髄へ移植し、良好な機能回復を報告し¹²⁾、2005年にはKeirsteadらがヒトES細胞から高純度へ誘導したオリゴデンドロサイト前駆細胞のラット脊

髄損傷モデルへの移植で、損傷脊髄内で脱髄した軸索の再髄鞘化と後肢の機能回復を報告している¹³⁾。当研究室においてもマウスES細胞由来NS/PCを用いたマウス脊髄損傷治療の検討を行い、その有効性を確認した¹⁴⁾。しかし、ES細胞の作製には精子と卵子が結合した後の受精卵が必要となり、不妊治療で生じた余剰胚を用いるとはいえ、臨床応用を考えると倫理的な問題が避けられない(ES細胞由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞移植については、2010年10月に米国Geron社が実際に脊髄損傷患者への臨床試験を行ったと発表しており、世界的な注目を集めている)。

3. 免疫拒絶反応

胎児およびES細胞由来NS/PCを移植治療に用いる際、通常では他人の細胞を移植するallograftとなるため、免疫拒絶反応が起こる可能性がある。拒絶反応には臓器障害を含む患者の全身反応も含まれるが、中枢神経においても他の臓器と同様に、MHC(主要組織適合遺伝子複合体)の違いによる免疫拒絶により組織の生着を妨げる¹⁵⁾。脊髄損傷に対する細胞移植後の機能回復には、移植細胞からの液性因子のみならず、生着し分化した細胞が関与しているという報告が近年散見されており¹⁶⁾、細胞移植治療における免疫拒絶の問題は臨床応用を阻む大きな要因となっている。

iPS細胞を用いた脊髄損傷治療

これまで述べたような諸問題に解決の糸口を与えたのが、2006年、2007年に京都大学山中伸弥教授らにより、それぞれマウス、ヒトの線維芽細胞より樹立された人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; 以下iPS細胞)である^{6,7)}。iPS細胞は、マウス/ヒト線維芽細胞にOct3/4, Sox2, Klf4, (c-Myc)などの初期化遺伝子を導入しリプログラミングすることで、ES細胞と同等の増殖能・分化能を持った多能性幹

細胞である。iPS細胞は患者自身の体細胞から樹立することが可能であるため、先に述べた倫理的問題・免疫拒絶反応などの問題を解決する技術として期待されている。当研究室では、マウスES細胞のNS/PCへの誘導培養法¹⁷⁾をマウスiPS細胞に応用し、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を確認した。脊髄損傷に対するマウスES細胞由来NS/PCの治療効果をすでに確認していたことから、iPS細胞でも同様の効果が期待できる。しかし、iPS細胞における最も大きな問題である移植細胞による腫瘍化の検討が重要と考え、以下の研究を行った。

1. iPS細胞由来の神経幹/前駆細胞の安全性

これまで脊髄損傷モデルへの移植検討を行ってきたiPS細胞では、ウイルスなどによる染色体への外来遺伝子挿入による遺伝子変異からES細胞にも増して腫瘍化の危険性が危惧される。そこで三浦らは、36種類の個別に独立したマウスiPS細胞株よりNS/PCを分化誘導し、その安全性の検討を行った¹⁸⁾。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との相関についての解析では、予想と反して前癌遺伝子であるc-Mycの有無とは腫瘍形成能との相関はなく、統計学的有意差があったのはiPS細胞樹立時の起源細胞(origin)のみであった。つまり、腫瘍形成能はiPS細胞が胎児由来(例、mouse embryonic fibroblast; MEF由来)か成体由来であるか(例; tail tip fibroblast; TTF由来)によって最も強く規定されていた¹⁸⁾。臨床応用に向けては、成体由来細胞を用いてiPS細胞を樹立して移植療法を目指すのが理想的ではあるが、成体由来iPS細胞はより腫瘍形成をしやすいという結果となった。また、成体由来iPS細胞より低いとはいえ、胎児由来iPS細胞にも腫瘍形成を示すものが存在し、ニューロスフェアまで分化誘導した際に残存する分化抵抗性の未分化細胞の比率が腫瘍形成と関連していた。iPS細胞由

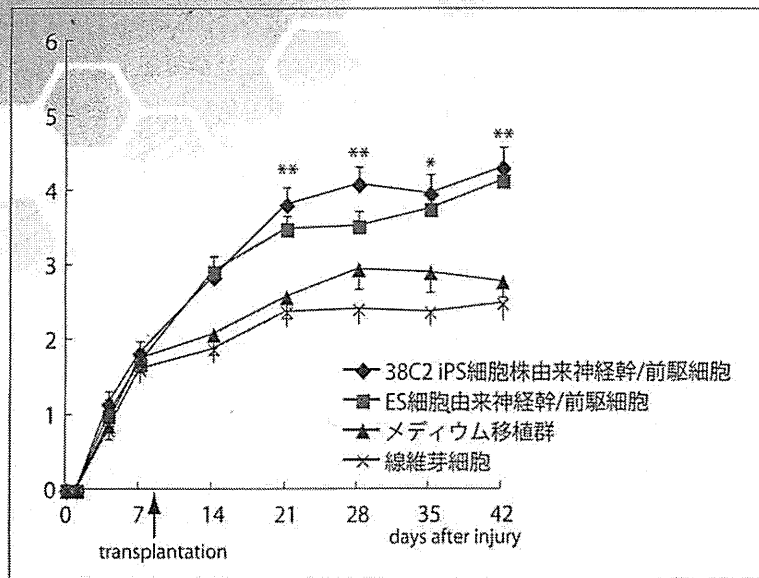


図1 Basso Mouse Scale (BMS)による後肢運動機能評価

安全性の確認されたiPS細胞株(38C2)由来NS/PC移植群において、ES細胞由来NS/PC移植群と同等の後肢運動機能回復を認め、メディウム移植群・線維芽細胞移植群と比較して、損傷後3週以降に有意な回復を呈していた。(文献19より引用・改変)

来NS/PCによる移植治療に向けては、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全く形成しなかった、“安全な”クローンを選ぶことが重要である。

2. iPS細胞由来NS/PCの脊髄損傷モデルへの有効性

前述の24週間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、まずマウス胎仔由来線維芽細胞MEF由来のクローンから作製されたニューロスフェアを用いて、当研究室では脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った¹⁹⁾。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を導入することで、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ジングを用いて動物生存下に経時的モニタリングを行い、損傷後6週間の観察ののち組織学的検討を行った。その結果、移植細胞はバイオイメージ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、明確な発光量の増大は認めず、組織学的検討においても腫瘍形成を認めなかった。移植細胞はHu陽性のニューロン、GFAP陽性のアストロサイト、GST- π 陽性のオリゴデンドロサイトへと分化しており、分化効率はいずれもニューロンが約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。マウスの後肢運動機能をBasso Mouse Scale (以下BMS)を用いた運動機能評価では、iPS細胞由来NS/PC移植群はマウスES細胞由来NS/PC移植群とほぼ同等の回復を示し、後肢で体幹を支持しながら歩行できるまでに改善していた(図1)。一方、メディウムのみを注入したvehicle control群、および線維芽細胞移植群では後肢で体幹を支持で

きなかった(図1)。以上より、iPS細胞由来NS/PC移植により有意な下肢運動機能回復が得られることが明らかとなった。移植されたiPS細胞由来NS/PCが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。LFB染色でも損傷部髄鞘面積がvehicle control群と比較して、iPS細胞由来NS/PC移植群で有意に増加していた。また、移植細胞が双極性の突起を持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た。事実、この幼若アストロサイトの近傍に運動機能に大きな役割を持つとされる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4mm遠位部での定量で5-HT陽性線維は、移植群において有意に増加していた¹⁹⁾。

以上の結果より、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、iPS由来NS/PC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唆された。

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

自家組織からの移植が可能となれば、iPS細胞を用いた脊髄損傷治療の実現に向けた大きな一歩となる。そのためより現実的なモデルである成体組織(TTF)由来のiPS細胞を用いて同様の移植実験を行った。三浦らが行った安全性の検討において使用したマウス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¹⁸⁾。そこで、335D1と腫瘍形成能が認められた“危険な”クローンである256H13と256H18を用いて、ニューロスフェアへ誘導後にマウス損傷脊髄への移植実験を行った。いずれのクローン由来ニューロスフェアも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、損傷後6週に下肢運

動機能が急速に失われ、さらに大多数のマウスがその後死亡した¹⁹⁾。組織学的解析の結果、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を形成していた。一方、“安全な”335D1クローンを用いた場合は、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、かつES細胞由来ニューロスフェアと同等に機能回復が得ることができた。

このことより、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評価すれば、脊髄損傷治療における有用な細胞源となりうることを示された¹⁹⁾。

脊髄損傷治療としてiPS細胞関連研究の課題と展望

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た大きな一歩となった。しかし脊髄損傷治療としては、移植の至適時期と細胞の誘導期間との兼ね合いや前述の腫瘍化の問題など、実際の臨床応用実現の前に解決すべき課題はまだ多い。

近年ヒト皮膚の線維芽細胞からのiPS細胞の樹立²¹⁾に続き、一本の髪の毛²⁰⁾や一滴の血液²¹⁾からのヒトiPS細胞樹立も報告された。実際にiPS細胞を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。iPS細胞の樹立法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ずに、プラスミドベクターを用いた方法²²⁾、トランスポゾン的一种であるPiggy Bacを用いた手法²³⁾、染色体外に挿入しいずれ消失するエピソームベクターの導入²⁴⁾、プラスミドベクターよりも長期間の発現が可能であるminicircle vector²⁵⁾、薬剤による導入遺伝子の一部置き換えの成功²⁶⁾など報告が相次いでいる。また培養法においても、動物種由来の血清(ウシ血清)や

フィーダー細胞(マウス由来)を用いずにiPS細胞を樹立する方法も報告された²⁷⁾。さらにマウス線維芽細胞から1週間程度でiPS細胞へのリプログラミングを介さずに誘導した神経細胞であるiN細胞も報告された²⁸⁾。今後, glia細胞も誘導可能になれば有望な移植細胞となり得る可能性がある。しかし, これらの方法で作製されたiPS細胞由来NS/PCが, マウス脊髄損傷モデルへの移植効果が確認できたレトロウイルスで作製されたiPS細胞と同等の多能性や分化能力を有しているか, 移植細胞として安全性が高いのかどうかについては, 免疫不全動物への移植実験を経て今後詳細に評価する必要がある。また, 研究室の海苔らはヒトiPS細胞由来NS/PCの, 免疫不全マウス脊髄損傷モデルへの有効性を報告した²⁹⁾。iPS細胞による脊髄損傷に対する再生医療の実現に向けて, 安全性を慎重に評価しつつ, その有効性を検討していくことが肝要であるといえよう。

文 献

- 1) Reynolds BA, Weiss S : Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707-1710, 1992
- 2) Bregman BS, Kunkel-Bagden E et al : Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Exp Neurol* 123 : 3-16, 1993
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 7) 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
- 8) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al : Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318 : 1917-1920, 2007
- 9) Lindvall O : Transplantation into the human brain: present status and future possibilities. *J Neurol Neurosurg Psychiatry Suppl* : 39-54, 1989
- 10) Diener PS, Bregman BS : Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J Neurosci* 18 : 779-793, 1998
- 11) Diener PS, Bregman BS : Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. *J Neurosci* 18 : 763-778, 1998
- 12) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y et al : Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 1410-1412, 1999
- 13) Keirstead HS, Nistor G, Bernal G et al : Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25 : 4694-4705, 2005
- 14) 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
- 15) Mason DW, Charlton HM, Jones AJ et al : The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience* 19 : 685-694, 1986
- 16) Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ et al : Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 : 14069-14074, 2005
- 17) 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* 26 : 3086-3098, 2008
- 18) Miura K, Okada Y, Aoi T et al : Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27 : 743-745, 2009
- 19) Tsuji O, Miura K, Okada Y et al : Therapeutic po-

- tential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 12704–12709, 2010 (Epub 2010 Jul 6)
- 20) Aasen T, Raya A, Barrero MJ et al : Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26 : 1276–1284, 2008
 - 21) 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
 - 22) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H et al : Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322 : 949–953, 2008
 - 23) Kaji K, Norrby K, Paca A et al : Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458 : 771–775, 2009
 - 24) 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
 - 25) Jia F, Wilson KD, Sun N et al : A nonviral minicircle vector for deriving human iPSCs. *Nat Methods* 7 : 197–199, 2010
 - 26) Maherali N, Hochedlinger K : Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19 : 1718–1723, 2009
 - 27) Hayashi Y, Chan T, Warashina M et al : Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One* 5 : e14099, 2010
 - 28) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP et al : Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 : 1035–1041, 2010
 - 29) Nori S, Okada Y, Yasuda A et al : Grafted human induced pluripotent stem cell-derived neurospheres promotes motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011 (in press)

* * *

【iPS細胞の安全性と脊髄損傷への応用】

Therapeutic potentials of safe iPS cells for SCI

辻 収彦¹⁾ ・ 三浦 恭子²⁾ ・ 中村 雅也¹⁾ ・ 岡野 栄之²⁾

Osahiko Tsuji

Kyoko Miura

Masaya Nakamura

Hideyuki Okano

Key words

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

要 約

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、その治療応用への可能性に大きな期待が集まっている。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。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、また人工的に初期化されたiPS細胞に特有の問題の多くはいまだ未解決のままであり、研究の進展が望まれている。本稿ではiPS細胞の問題点と安全性の担保、マウスiPS細胞を用いた脊髄損傷への治療効果について概説する。

1. 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様々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り、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¹⁾。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。フローサイトメーターで解析した結果、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た場合、移植後にテラトーマ形成が生じ得る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。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ーターにより除去した後に移植するとテラトーマ形成が起らないと報告している²⁾。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ーター等の開発や、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

①で論じた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。

1) 慶應義塾大学医学部整形外科学教室 2) 慶應義塾大学医学部生理学教室

Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University ¹⁾

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

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 TEL:03-5363-3812 ¹⁾ 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 TEL:03-5363-3747 ²⁾

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²⁾。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等の治療法のひと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。

2. 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³⁾。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分かった⁴⁾。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。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⁵⁾、タンパク質導入によるiPS細胞作製⁶⁾、および薬剤による導入遺伝子の一部置き換えの成功⁷⁾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 由来となる体細胞の違いによる安全上の課題

我々は、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⁸⁾。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且つ軽微であった。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、上述の通り、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。

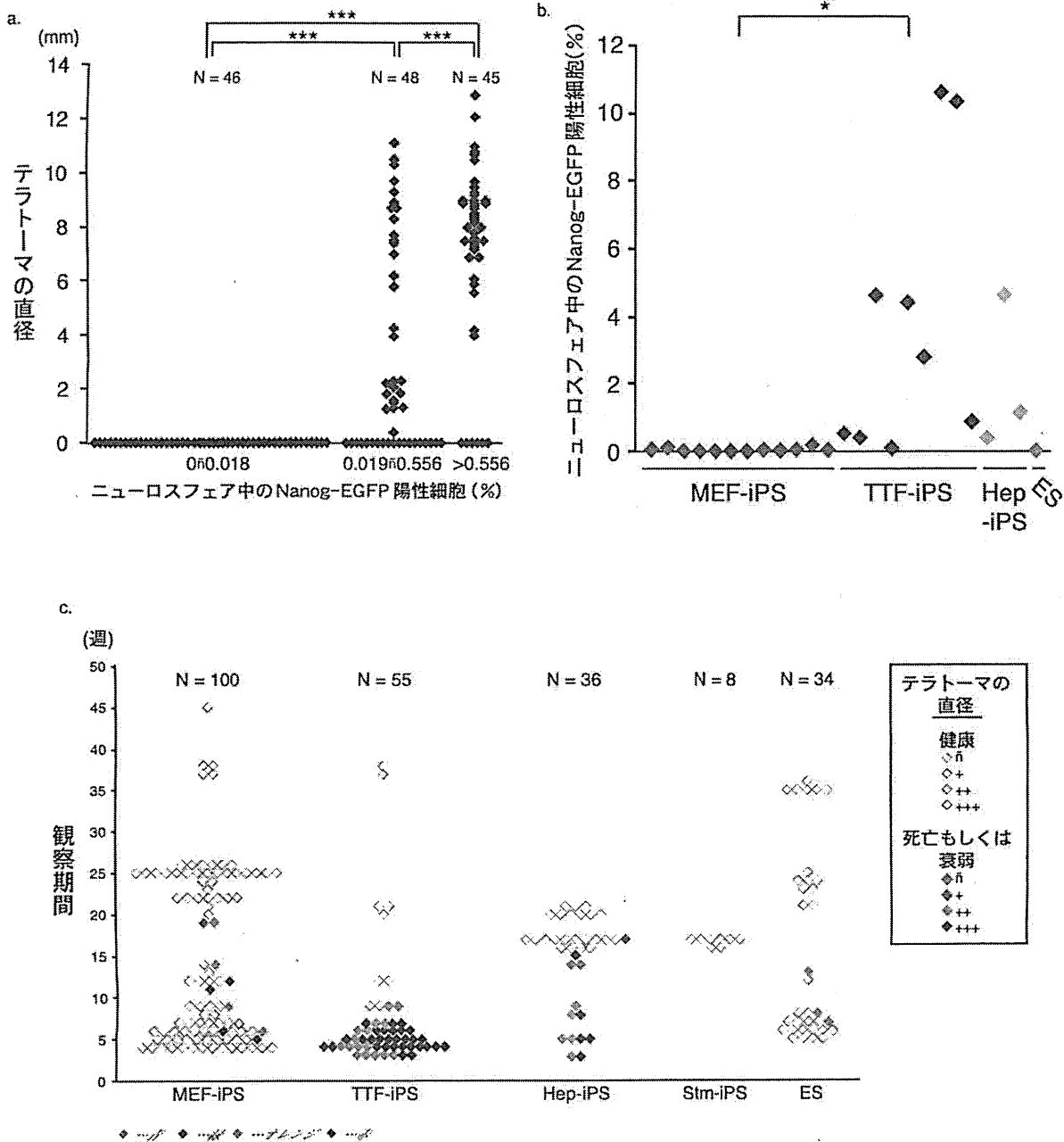


図1 iPS細胞の分化誘導への応答性と移植後の安全性は由来となった体細胞の種類によって異なる (文献1より引用・改変)

- 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 値 < 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 値 < 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: テラトーマ形成無し 緑: テラトーマ直径 0.1-5.7 mm
オレンジ: テラトーマ直径 5.8-8.2 mm 赤: テラトーマ直径 8.3mm 以上

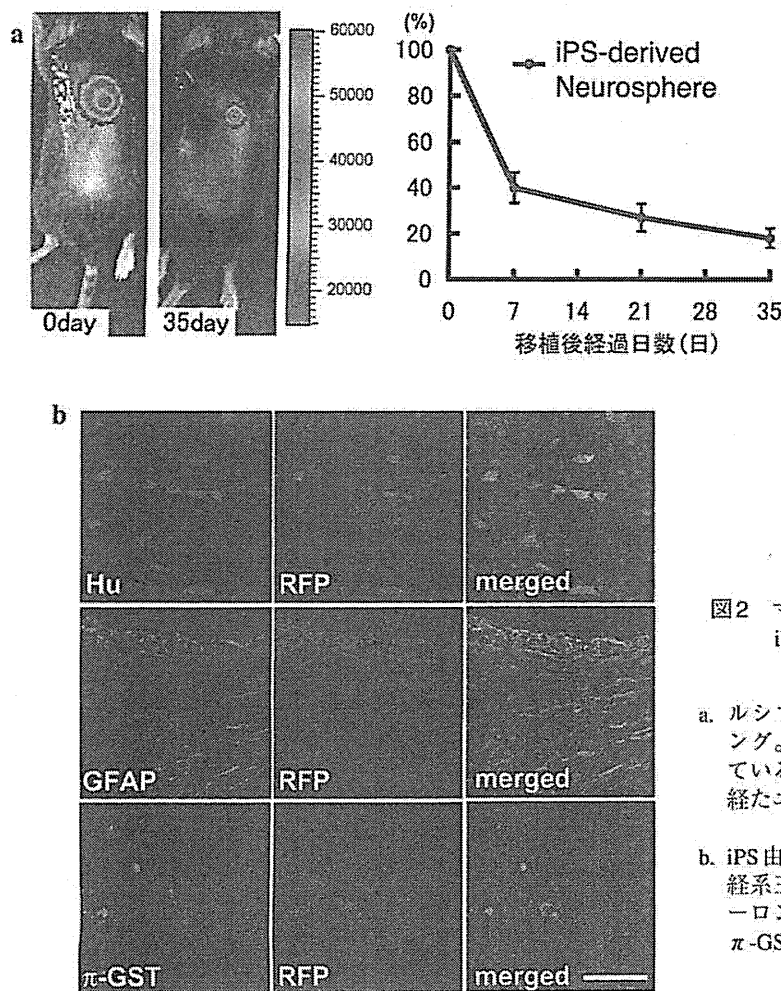


図2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株由来ニューロスフェアの動態 (文献9より引用・改変)

- 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。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

3. 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

われわれは、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、その有効性の検討を行った⁹⁾。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)。圧挫損傷後、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)と比較して統計学的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、縫線核脊髄路軸索伸展の促進や移植細胞による再髄鞘化等の効果であると考えられる(図3c-e)⁹⁾。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。

4. 今後の展望と課題

我々の研究により、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ない。これらのことから、ひと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