

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 JJ, 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 β 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, 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
- 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

読者の意見 (Letters to the Editor) 原稿募集

本誌では「読者の意見 (Letters to the Editor)」を設けております。読者交流の場として意見交換にご利用いただきたく、下記の要領で編集室宛に原稿をお寄せください。また、読者アンケートを三輪書店のウェブサイト (URL : <http://www.miwapubl.com/>) で受け付けておりますので、ご協力をお願いいたします。

趣 旨

- ①掲載論文に対する意見。
 - ②編集方針に対する意見、希望など。
- *①に関しては、著者側からのコメントも掲載いたします。

執筆内容

- ①本文は図表も含め1,200字以内 (文献は3文献以内、写真・図・表は1点以内とし、その数に応じて本文を減じてください)。
- ②筆者名、所属名を明記してください。
- ③著者側からのコメントは600字以内。

採 否

編集委員会で決定いたします。不採用の場合は速やかに連絡いたします。また、採否のいかんにかかわらず、原稿は返却いたしません。

そ の 他

- ・論文掲載後6カ月以内に意見をお寄せください。
- ・文章は書簡の形式 (口語体) としてください。
- ・原稿は多少の字句の変更をさせていただくことがありますので、ご了承ください。
- ・採用の場合は掲載誌1部をお送りいたします。

【脊椎脊髄ジャーナル】編集委員会

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¹⁾ 辻 収彦¹⁾²⁾ 岡野 栄之¹⁾

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 整形外科科学教室

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¹⁾⁻³⁾。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な問題 (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⁴⁾⁻⁶⁾。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, Kyoko¹⁾ / Tsuji, Osahiko¹⁾²⁾ / Okano, Hideyuki¹⁾

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⁷⁾。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た場合、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1 a)。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⁸⁾。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⁹⁾。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⁹⁾。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¹⁰⁾。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¹¹⁾。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い

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¹²⁾。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¹³⁾⁻¹⁶⁾、蛋白質導入によるiPS細胞作製^{19) 20)}、および薬剤による導入遺伝子の一部置き換え^{21) 22)}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

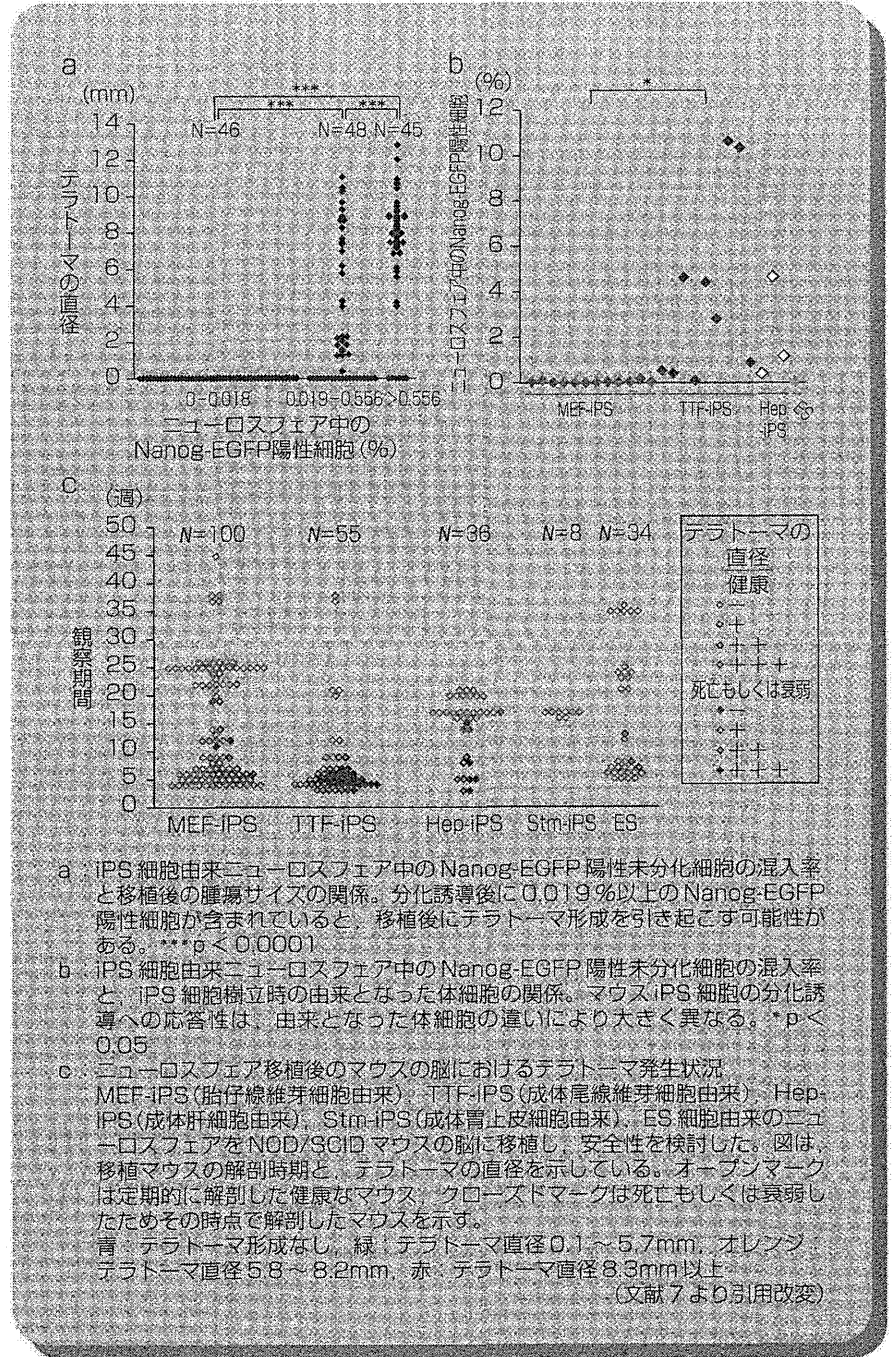


図1 IPS細胞の分化誘導への応答性と移植後の安全性は由来となった体細胞の種類によって異なる(→巻頭 Color Gravure 参照)

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。どのような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生できないため、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示すことに成功した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ジングの結果、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

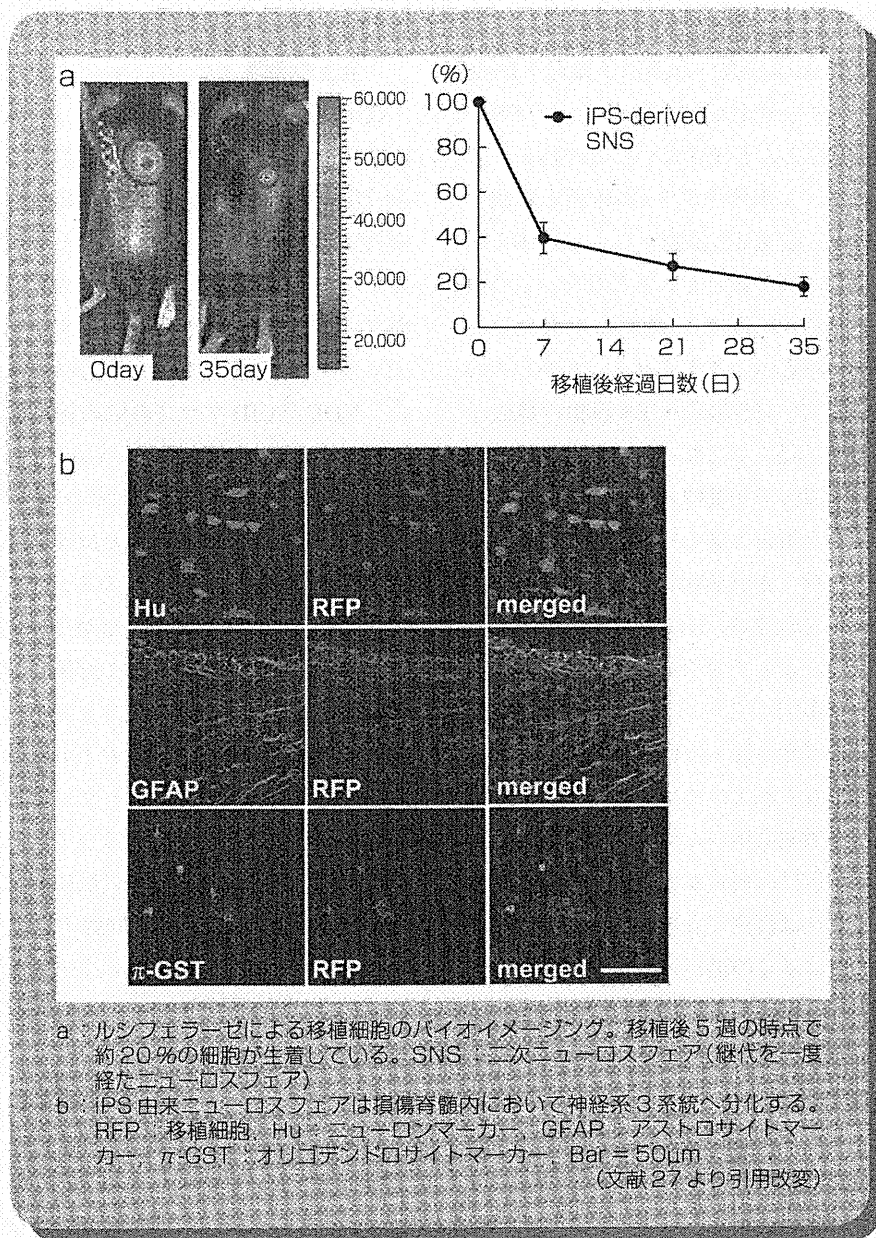


図2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株由来ニューロスフェアの動態(→巻頭Color Gravure参照)

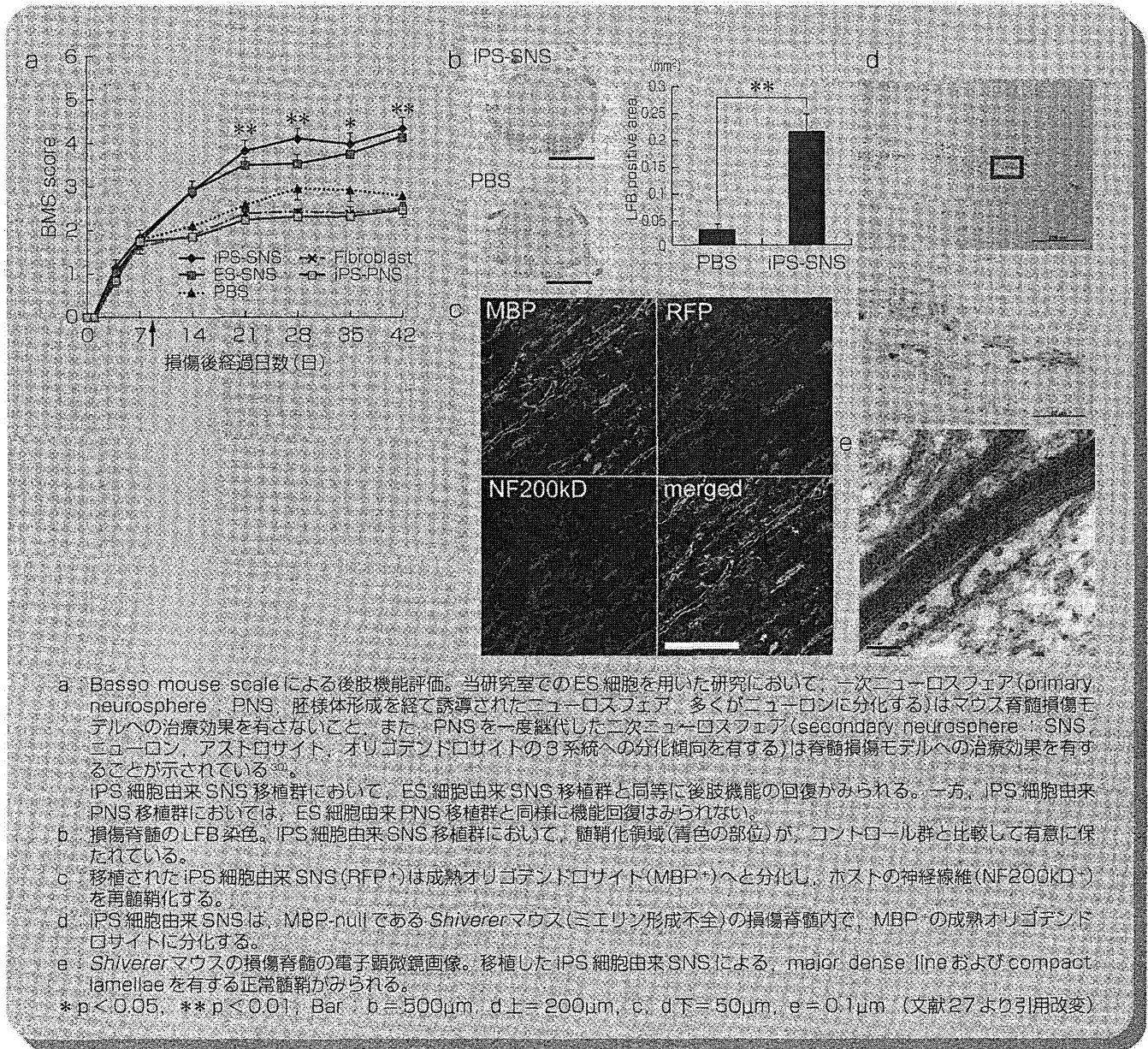


図3 “安全な” iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復(→巻頭Color Gravure参照)

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²⁶⁾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、満たす必要条件是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。臨床应用到直結する研究、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, 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
- 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

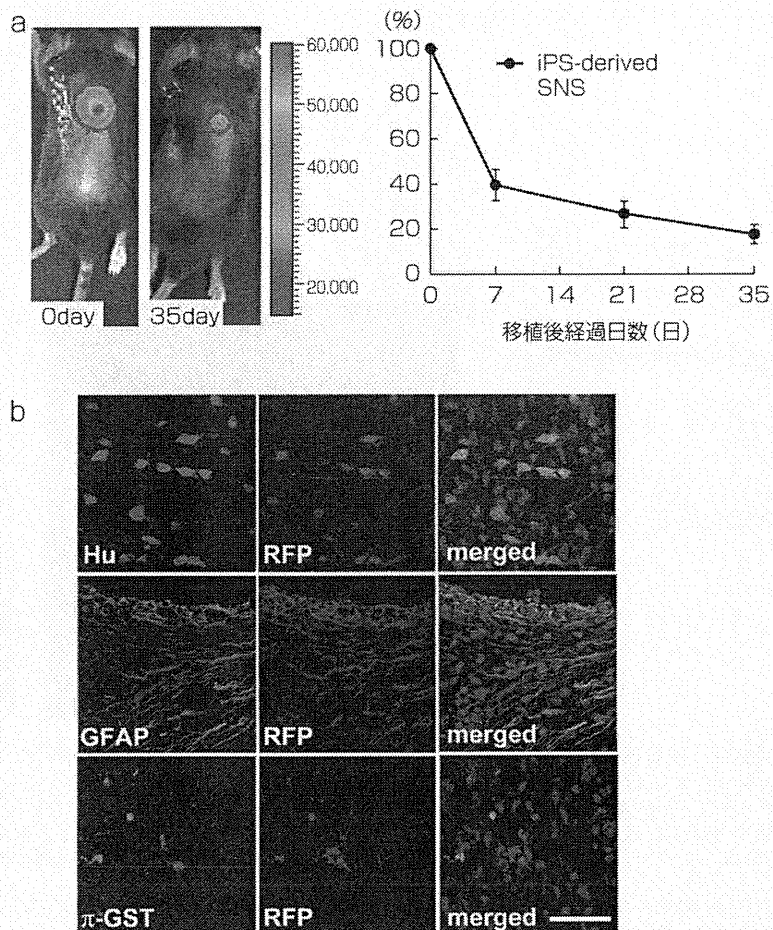


図2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株由来ニューロスフェアの動態

- 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)

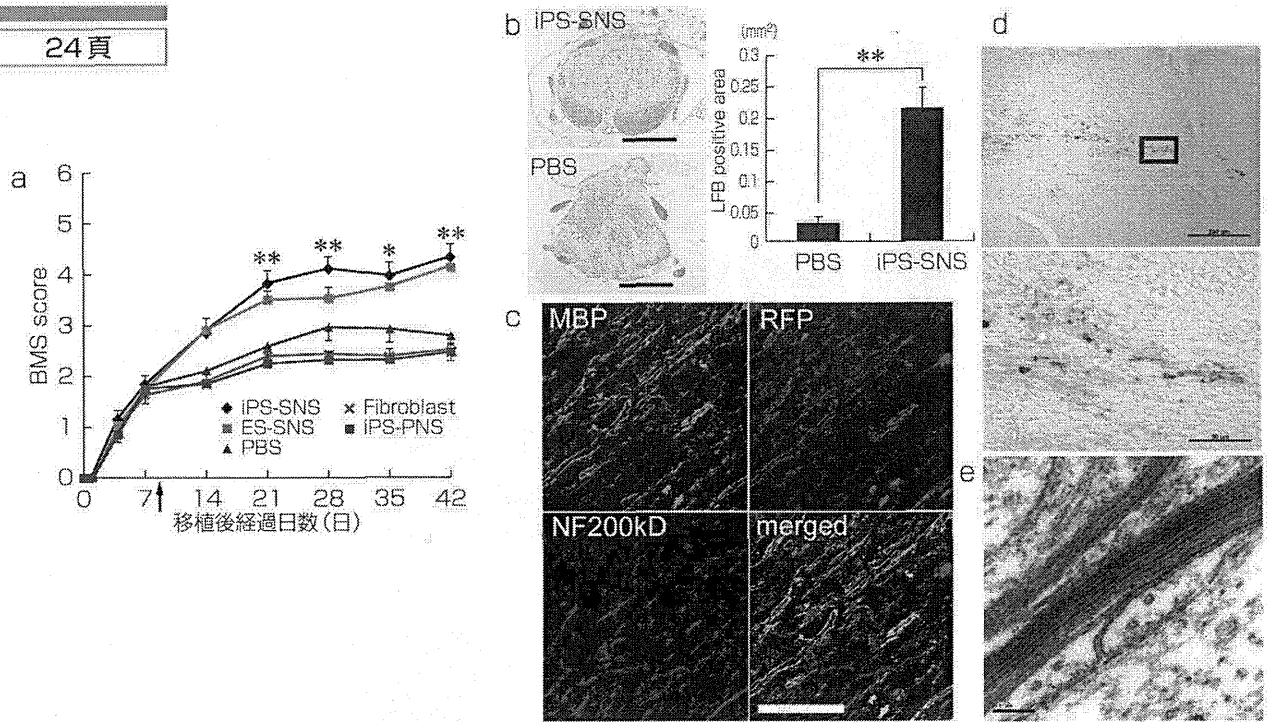


図3 “安全な” iPS 細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復

- 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²⁹⁾。
 - 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 = 500μm, d上 = 200μm, c, d下 = 50μm, e = 0.1μm (文献27より引用改変)

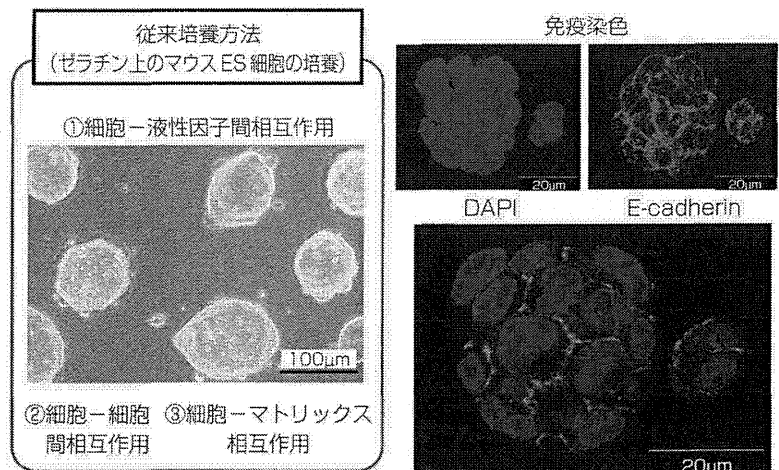


図3 従来のコロニー形成型ES/iPS細胞培養法の重大な欠点

iPS細胞を利用した神経再生

Regenerative medicine of damaged CNS utilizing iPS cell

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

ラット胎仔由来神経幹細胞や胚性幹細胞 (ES細胞) 移植による機能回復の報告以降、脊髄損傷に対する幹細胞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が大きな障壁となっており、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) に大きな注目が集まっている。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。また1999年には、McDonaldらによりマウス胚性幹細胞 (以下ES細胞) 移植の脊髄損傷への有効性も報告され、21世紀に

入り幹細胞移植による脊髄損傷治療の機運が大きく高まった。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齒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モセット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

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

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

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

1) 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 TEL 03-5363-3812 FAX 03-3353-6597

2) 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 TEL 03-5363-3747 FAX 03-3357-5445

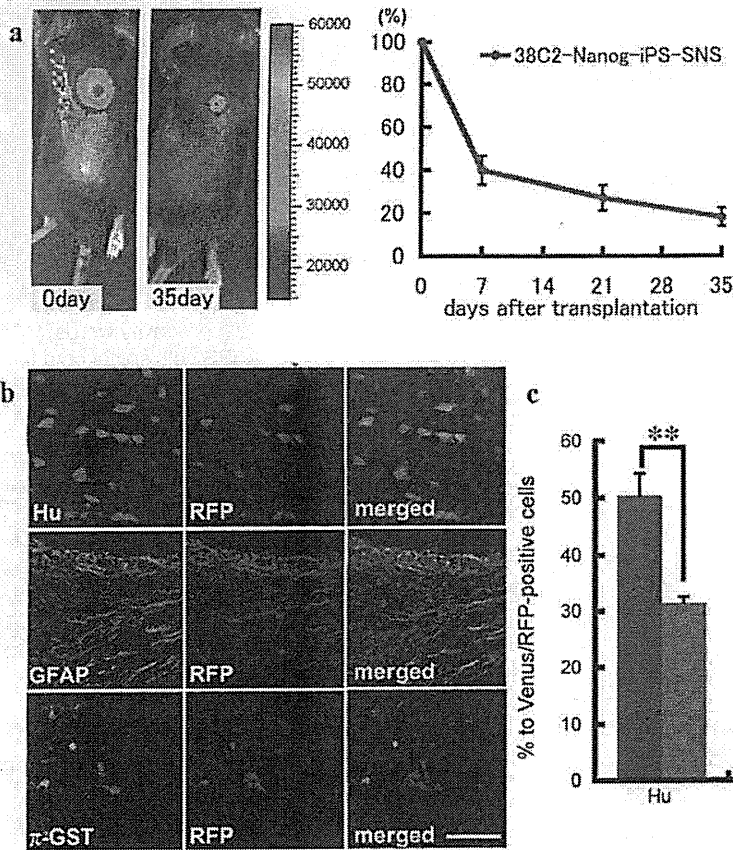


図1 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株(38C2)由来ニューロスフェアの動態(文献6より引用・改変)

a. ルシフェラーゼによる移植細胞のバイオイメージング。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

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: 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)

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、3胚葉に由来する細胞を含む胚様体(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、Nanogを指標として樹立されたNanog-iPS細胞⁵⁾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Neuron, Astrocyte, Oligodendrocyte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⁶⁾。次いで、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(B細胞, T細胞を欠失しており、免疫拒絶反応がないと言われている)の脳(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の有無とは腫瘍形成能との相関は無く、唯一統計学的有意差があったのは樹立時に用いた細胞の由来(origin)であった⁷⁾。即ち、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療法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脳への移植実験を経て24週間にわ

たつ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”。

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⁶⁾。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キングで動物を生きのまま経時的にモニタリングを行い⁸⁾, 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 (図1)。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, 分化効率はそれぞれニューロン; 約30%, アストロサイト; 約50%, オリゴデンドロサイト; 約15%であった (図1)。マウスの後肢機能をBasso Mouse Scale (以下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

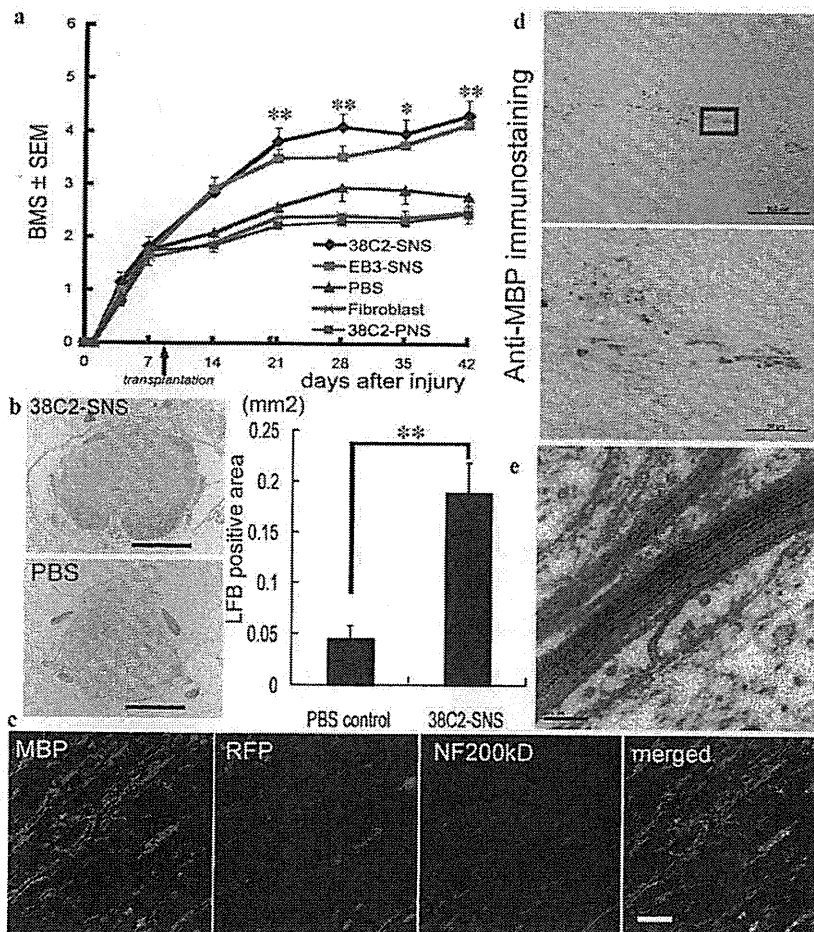


図2. “安全な” iPS 細胞由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復・再髄鞘化 (文献6より引用・改変)

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。

ーロスフェア（以下38C2-NS）移植群は、マウスES細胞由来ニューロスフェア（以下ES-NS）とは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2）。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2）。これにより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⁶⁾。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。

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

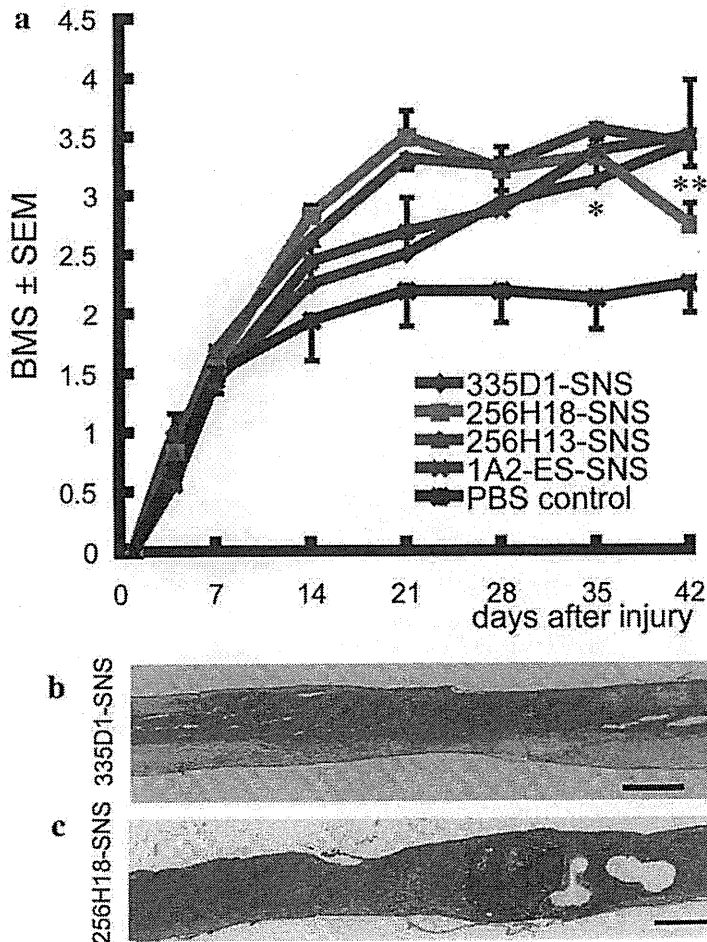


図3. TTF-iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復（文献6より引用・改変）
 a. Basso Mouse Scaleによる後肢機能評価。“安全な”335D1-SNS移植群では、PBS control群と比較して、損傷後5週目以降に有意な機能回復が見られる。“危険な”256H18-SNS移植群では損傷後6週目において得られていた機能回復の低下が見られた。
 b. “安全な”335D1-SNSを移植された損傷脊髄像。腫瘍形成を認めない。
 c. “危険な”256H18-SNSを移植された脊髄。奇形腫形成を認めた。

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検討してあれば、脊髄損傷治療への有用な細胞源となりうる可能性を有していることが示された⁹⁾。

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、極めて大きな第一歩となった。近年ヒト皮膚の線維芽細胞からiPS細胞を樹立すること⁹⁾、一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¹⁰⁾、iPS細胞の研究は急速な勢いで進歩している。しかし、実際の臨床応用に向けてはまだ解決すべき課題は多い。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、臨床応用の実現に向けて、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, Desponts 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胎丸プロジェクト

0914-4412/10/¥400/論文/JCOPY

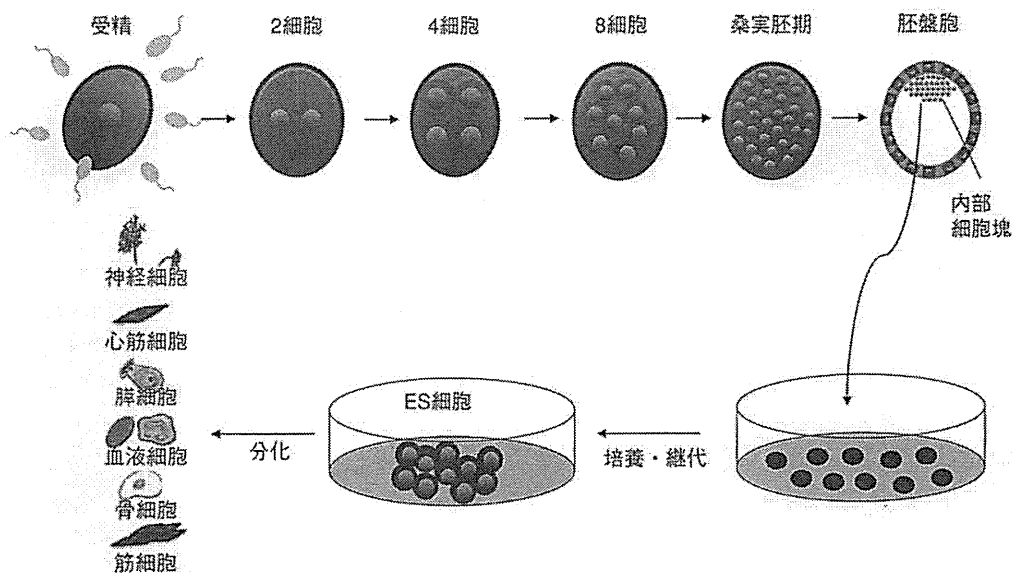


図1 ES細胞の樹立

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、