

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*

Tsujii 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るようになってきている。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モセット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²⁾、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³⁾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

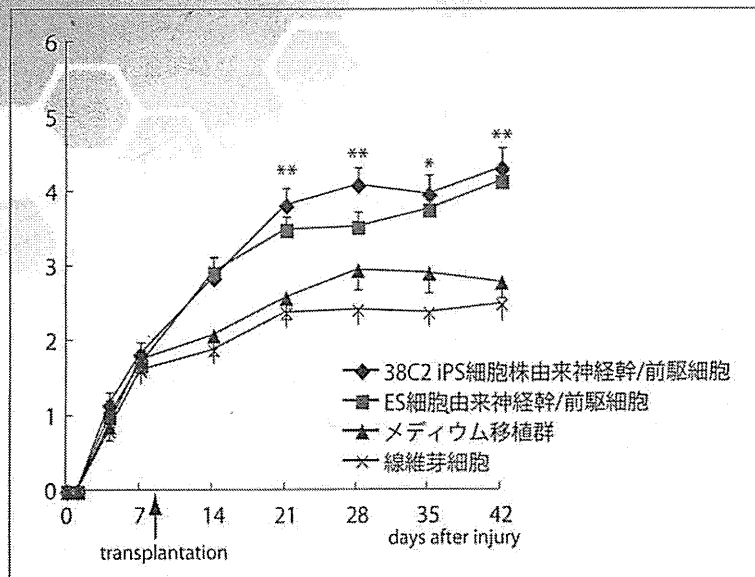


図1 Basso Mouse Scale (BMS)による後肢運動機能評価

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週以降に有意な昨日回復を呈していた。(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。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⁷⁾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⁾、染色体外挿挿入し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, Poca 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 iPS cells. *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は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こ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。

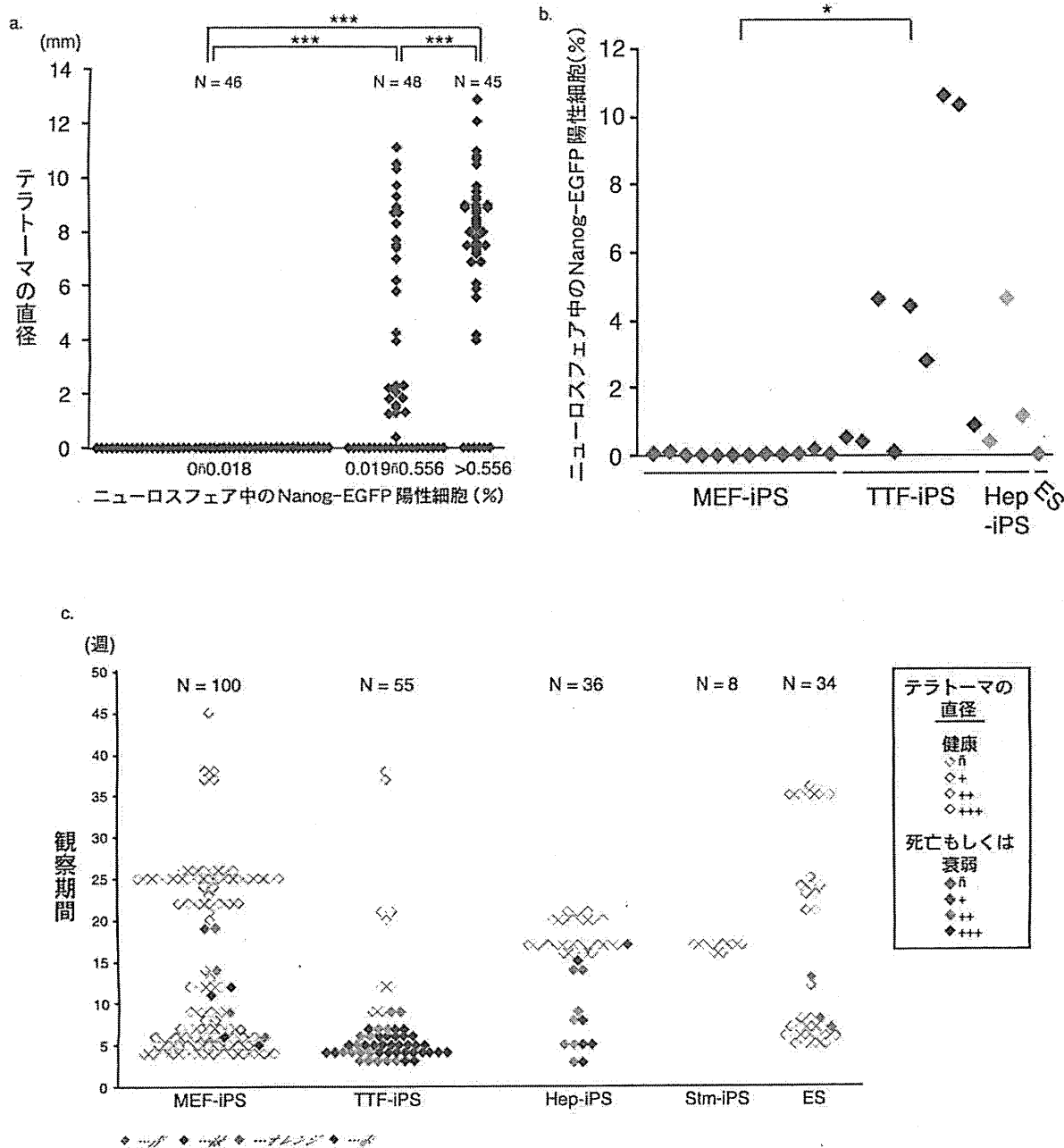


図1 iPS細胞の分化誘導への応答性と移植後の安全性は由来となった体細胞の種類によって異なる (文献1より引用・改変)

- 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

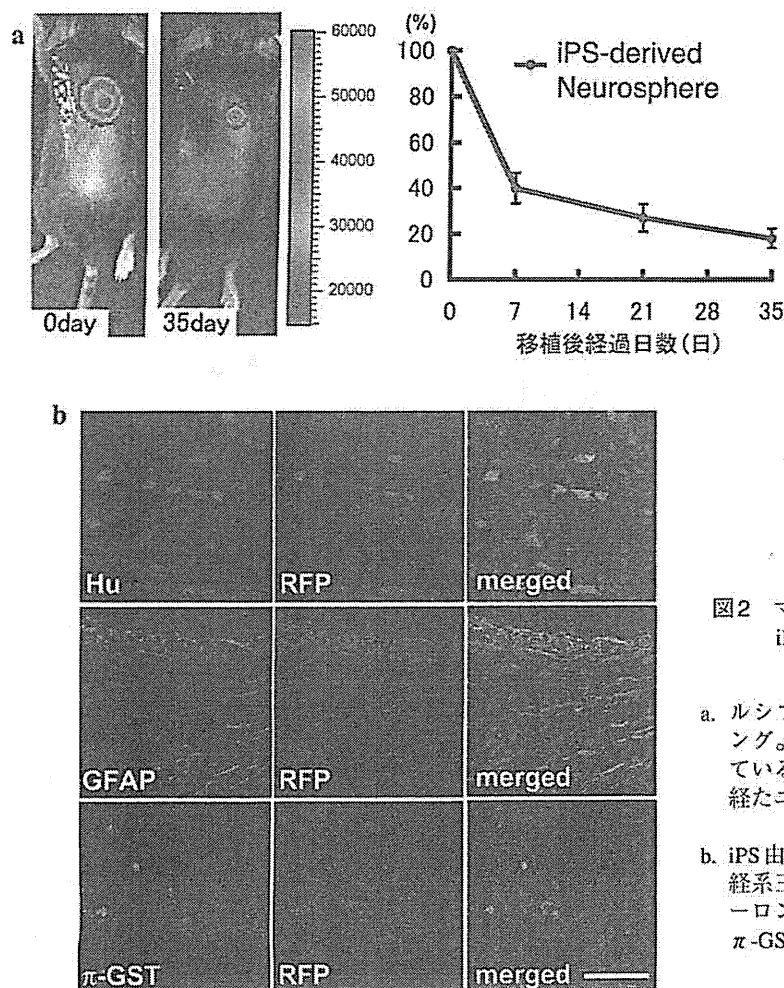


図2 マウス脊髄損傷モデルに移植された“安全な”iPS細胞株由来ニューロスフェアの動態 (文献9より引用・改変)

- 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る。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

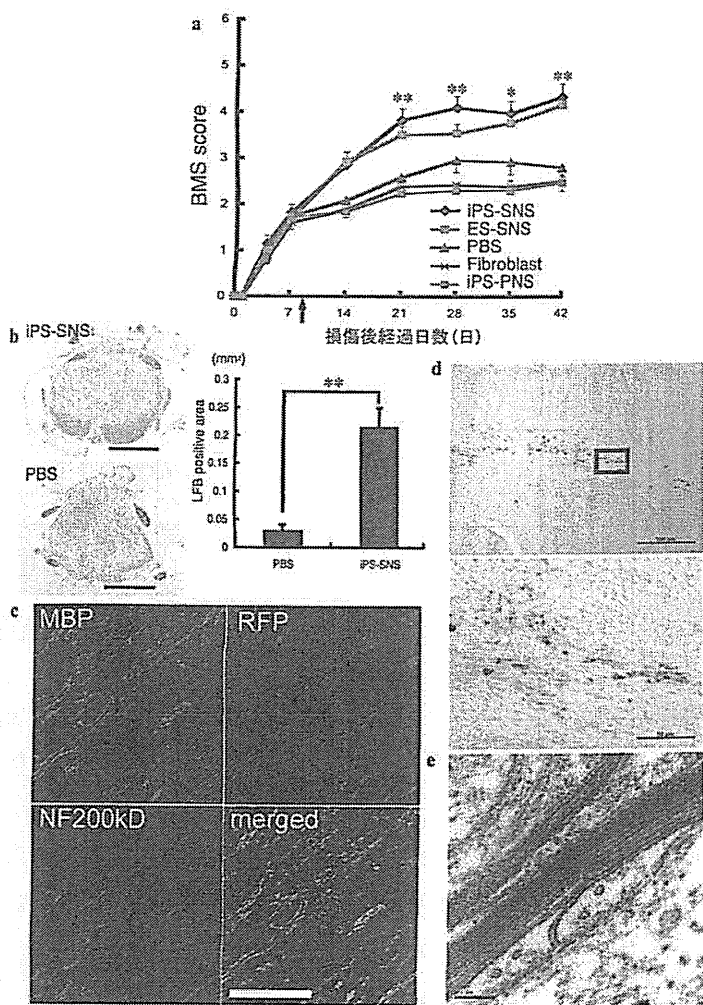


図3 “安全な” iPS細胞株由来ニューロスフェアの移植によるマウス脊髄損傷モデルの後肢機能回復 (文献9より引用・改変)

- 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: secondary neurosphere, ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトの三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が回復する。一方, iPS細胞由来PNS移植群においては, ES細胞由来PNS移植時と同様に機能回復はみられない。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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による髄鞘化がみられる。

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。安全性を事前に厳密に評価して用いれば, 脊髄損傷治療への応用が期待できる。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。また, 実際に脊髄損傷の患者さんへと移植する前に, 前臨床試験として霊長類を用いた実験¹⁰⁾が必須であると言えよう。今後厳密な安全性の評価を経た後, 脊髄損傷に対するヒトiPS細胞由来神経幹細胞移植が早期に実現するよう願ってやまない。

参考文献

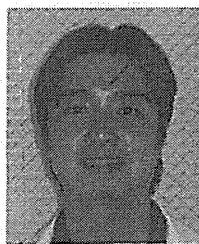
- Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009;27:743-5.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's

- disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5856-61.
- Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009;6:e1000029.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448:313-7.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101-6.
- 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.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:381-4.
- 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.
- 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.
- 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* 2005;80:172-81.

3 iPS 細胞を用いた 脊髄再生医療の最前線

こばやし よしおみ のり さとし
 ■ 小林 喜臣 1) ・ 海苔 聡 1)
 やすだ あきまさ おかだ ようへい
 安田 明正 1) ・ 岡田 洋平 2)
 ふじよし かねひろ つじ おさひこ
 藤吉 兼浩 3) ・ 辻 収彦 1)
 とやま よしあき なかむら まさや
 戸山 芳昭 1) ・ 中村 雅也 1)
 おかの ひでゆき
 岡野 栄之 2)

1) 慶應義塾大学医学部整形外科
 2) 慶應義塾大学医学部生理学教室
 3) 独立行政法人国立病院機構村山医療センター



小林 喜臣
 2004年慶應義塾大学医学部卒業。06年
 初期臨床研修終了。同年慶應義塾大学
 医学部整形外科学教室入局。09年慶應
 義塾大学医学部医学研究科博士課程専
 攻。研究テーマはヒトiPS細胞由来神
 経幹細胞による脊髄損傷に対する治療
 の検討。

Key words : 脊髄損傷, 人工多能性幹 (iPS) 細胞, 神
 経幹/前駆細胞, 胚性幹 (ES) 細胞, 細胞移植

Abstract

脊髄損傷は外傷などにより脊髄実質が損傷を受けることで、損傷部以下の知覚・運動・自律神経系の麻痺を呈する病態である。'生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' という通説が長く信じられてきたが、近年の神経科学、特に stem cell biology の著しい進歩により脊髄再生への期待が高まっている。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を中心に脊髄再生の基礎研究の現状とその課題について概説し、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ついて言及する。

はじめに

脊髄損傷は、損傷部以下の知覚・運動・自律神経系の麻痺を呈する病態である。集学的医療の進歩により脊髄損傷患者の平均余命は健常人と変わらなくなってきたが、損傷した脊髄そのものを治すことはいまだできないため、日常生活の不自由さや精神的負担が長期間にわたり患者を苦しめる結果となり、社会的問題となっている。しかし基礎研究では 1990 年代に、ラット

脊髄損傷に対するマウス ES 細胞由来神経前駆細胞移植の有効性が報告され、損傷した脊髄でも微小環境が整えば再生することが示され '中樞神経系は一度損傷を受けると再生しない' という通説が覆された¹⁾。

中樞神経系の再生医学の戦略は、神経栄養因子や軸索伸展阻害因子の阻害剤²⁾などを組み合わせた細胞移植療法以外の治療法と神経幹細胞・ES 細胞・iPS 細胞などを用いた細胞移植療法の 2 つのアプローチに大別される³⁾。これらの方法を組み合わせた治療を行うことで、損傷された神経組織を再生し機能を回復させることができれば、脊髄損傷の治療に新たな可能性が開けてくるであろう。本稿では現在再生医療における移植細胞の供給源として注目されている神経幹細胞・ES 細胞・iPS 細胞を中心にその移植療法について概説する。

1. 細胞移植療法

われわれは細胞移植の時期として脊髄損傷後 9 日目を至適時期と考えている。これは、急性炎症が沈静化した時期でかつグリア瘢痕が

Cell therapy for spinal cord regenerative medicine using induced pluripotent stem cells. † Yoshio Kobayashi¹⁾, Satoshi Nori¹⁾, Akimasa Yasuda¹⁾, Youhei Okada²⁾, Kanehiro Fujiyoshi³⁾, Osahiko Tsuji¹⁾, Yoshiaki Toyama¹⁾, Masaya Nakamura¹⁾, Hideyuki Okano²⁾, 1) Department of Orthopaedic Surgery, Keio University School of Medicine, 2) Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 3) National Hospital Organization Murayama Medical Center

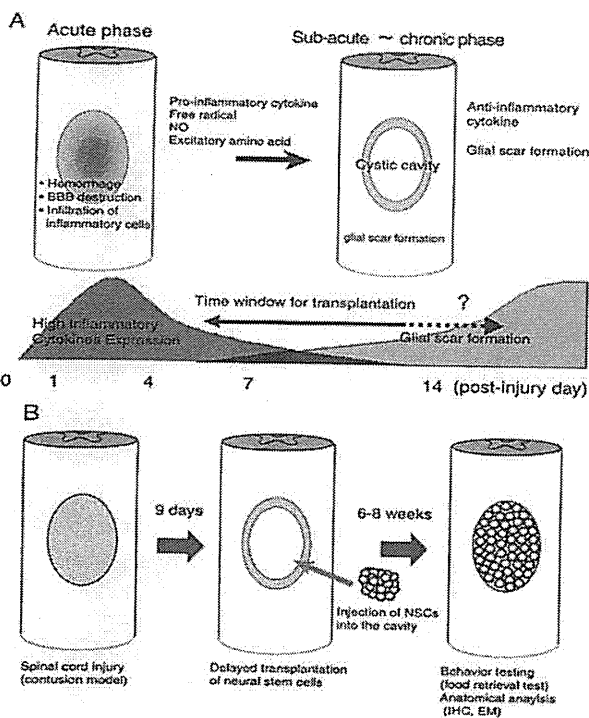


図1 脊髄損傷後の損傷部の微小環境の変化及び移植に適した time window。われわれは急性炎症が沈静化した時期でかつグリア瘢痕が完全に形成される慢性期まで至らない時期である脊髄損傷後9日目が細胞移植の至適時期として考えている。

完全に形成される慢性期まで至らない時期であり、移植細胞の生着率の上昇や neuron や oligodendrocyte への分化が起こるタイミングと考えているからである⁹⁾(図1)。

移植に使用する神経幹細胞の選択的培養としては、Weissらによって開発された Neurosphere 法⁹⁾が使われることが多い。この方法は、胎生期中枢神経系より採取した神経幹細胞を含む細胞群を分離した後に非接着性培養皿で EGF (epidermal growth factor) や FGF2 (fibroblast growth factor 2) の存在する無血清培地により培養する方法で、さまざまな細胞群の中に含まれている神経幹細胞が増殖因子に反応して、選択的に浮遊した状態で増殖し Neurosphere と呼ばれる細胞塊を形成する。

これらの細胞塊を分離し、同様の条件で培養すると再び Neurosphere が形成され、継代を

繰り返しても同様に Neurosphere が形成される(自己複製能)。これらの細胞は、接着培地皿上で、培地から増殖因子 (EGF, FGF2) を除くと neuron, astrocyte, oligodendrocyte に分化する(多分化能)。ES 細胞, iPS 細胞から神経幹細胞への分化誘導と継代は、当研究室で確立された独自の Neurosphere 法を用いている⁹⁾。

2. 神経幹細胞

神経幹細胞は未分化な状態を保ったまま増殖し継代することができる‘自己複製能’と中枢神経系を構成する neuron, astrocyte, oligodendrocyte の3種類の細胞に分化することができる‘多分化能’を併せ持つ細胞と定義される。成体中枢神経系における神経幹細胞の局在は側脳室に面する脳室下層や脊髄中心管周囲であることが示唆されている。われわれは、自己複製能と多分化能を兼ね備えた胎児由来神経幹/前駆細胞 (Neural stem/precursor cell, 以下 NS/PC) に着目し、ラット NS/PC をラット損傷脊髄に、さらにヒト NS/PC をサル (コモンマモセット) 損傷脊髄へと移植を行い、運動機能評価および組織学的評価において良好な結果を報告してきた^{7,8)}。

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、胎児/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。2011年には米国において、stem cell 社の胎児由来 NS/PC を用いた損傷後6週以降の胸髄損傷に対する clinical trial (phase I / II) が FDA により認可され世界で大きな注目を集めている。しかし、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我が国において臨床応用の実現は不可能と言わざるを得ない。

3. ES 細胞

1981年にマウス胚盤胞期の受精卵から樹立された ES 細胞は多分化能と自己複製能を持ち世

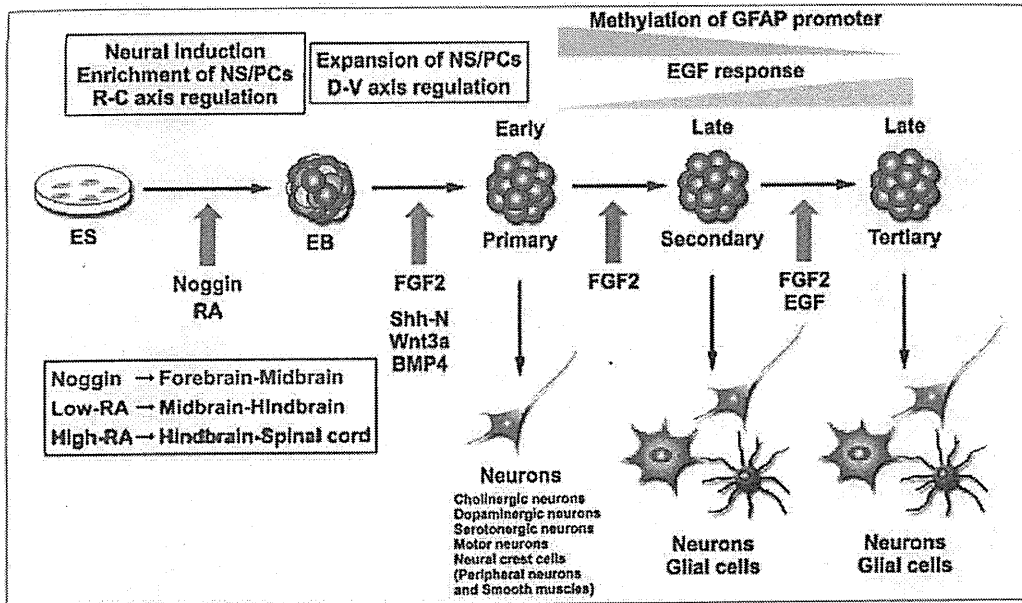


図2 マウス ES 細胞由来神経幹細胞 (neurosphere) による神経発生モデルシステム。ES 細胞から胚葉体 (embryoid body : EB) を形成したのち神経系に誘導をかけ neurosphere を形成する。

界に衝撃を与えた。1998年にES細胞がヒト胚から作られて以来、ES細胞は細胞移植の重要なソースとして認識されるようになった。

McDonaldらはマウスES細胞をレチノイン酸で神経幹細胞に分化誘導したのち、ラット損傷脊髄内に移植した。移植後2週に移植細胞はneuron, astrocyte, oligodendrocyteへ分化し、5週後には後肢運動機能が改善したと報告した⁹⁾。2005年にはKeirsteadらがヒトES細胞から高純度へ誘導したoligodendrocyte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¹⁰⁾。

当研究室の岡田らは、発生のより早い時期に存在する内部細胞塊 (inner cell mass : ICM) に由来するES細胞を用いて、高い可塑性を有する神経幹細胞を誘導するシステムを構築した¹¹⁾。まずES細胞から未分化状態を維持するために必要な白血病阻害因子 (Leukemia inhibitory factor : LIF) を取り除き、胚葉体 (embryoid body : EB) を形成し、その後神経系への誘導をかけ neurosphere を形成するシステムである (図2)。

この方法で形成された primary neurosphere は secondary, tertiary neurosphere (以下 PNS, SNS, TNS) に継代していくことが可能である。また、これらの neurosphere を分化誘導することで得られる細胞は PNS からはほとんどの細胞が neuron であるが、SNS, TNS からは neuron のみならず、astrocyte や oligodendrocyte といった glia 細胞が誘導される (図3)。

この知見をもとに、当研究室の熊谷らはマウスES細胞をPNSおよび一度継代したSNSを脊髄損傷モデルマウスに移植を行い運動機能の改善を確認している。組織学的評価でも、*in vitro* の実験結果と同様にPNS移植群ではneuron優位の分化傾向、SNS移植群ではastrocyteやoligodendrocyteといったglia優位の分化傾向を示し、さらにSNS移植群では軸索の成長、再髄鞘化、血管新生を認めた。運動機能評価でもSNS移植群はPNS移植群に比べ有意に改善していた¹⁰⁾。このことは脊髄損傷後の機能回復にgliogenicなNS/PCがより効果的であり、機能回復のメカニズムを解く重要な知見である (図4)。

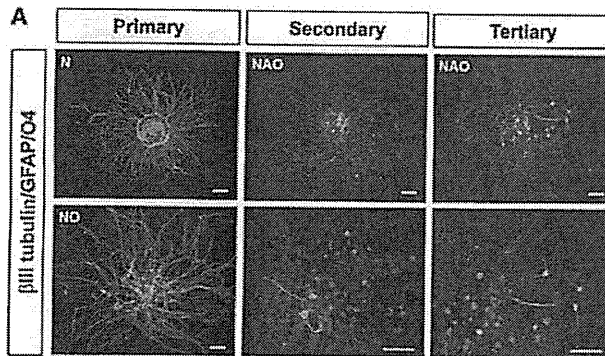


図3 ES細胞由来 primary neurosphere, secondary neurosphere, tertiary neurosphere の分化傾向の変化。分化した細胞の免疫染色像: β III tubulin は neuron, GFAP は astrocyte, O4 は oligodendrocyte。PNS では neuron 優位であるが, SNS, TNS に継代するにつれて astrocyte, oligodendrocyte への分化傾向が出現する⁶⁾。

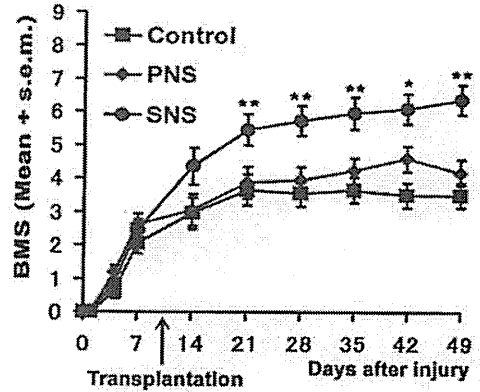


図4 脊髄損傷モデルマウスに対するマウス ES細胞由来 neurosphere 移植後の運動機能評価。PNS 移植群に比べ SNS 移植群は優位に運動機能の改善を認めた。

4. iPS 細胞

先述のように、胎児由来 NS/PC、ES 細胞由来 NS/PC は共に脊髄損傷の治療において有用な細胞となり得るが、中絶胎児組織や受精卵を破壊するため、臨床応用に際し、倫理的問題及び免疫学的拒絶反応の問題を避けられない。

このような問題点を解決するのが、2006 年、2007 年に京都大学の山中教授らにより、マウス及びヒト線維芽細胞より樹立された iPS 細胞である¹¹⁾¹²⁾。iPS 細胞は、マウス及びヒト線維芽細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4 および c-Myc の 3 または 4 因子を導入することで体細胞をリプログラミングし、ES 細胞に類似した増殖能・分化能をもつ多能性幹細胞であり、自家組織が細胞の供給源となり得るためこれらの問題が解決できる。

当研究室では、マウス ES 細胞の NS/PC への誘導培養法⁶⁾をマウス iPS 細胞¹¹⁾に応用し、neuron, astrocyte, oligodendrocyte 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 の治療効果を既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。

京都大学の山中研と当研究室の共同研究で、三浦らは胎仔マウス線維芽細胞 (MEF)、成体マウスの尾部由来線維芽細胞 (TTF)、肝細胞 (Hep)、胃上皮細胞 (Stm) に 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) または c-Myc (c-Myc の再活性化が腫瘍形成の一因として確認されている) を除く 3 因子を導入し、Nanog (未分化細胞のマーカー) 発現を指標とした細胞選択の有無の条件下 iPS 細胞を樹立した。それぞれの細胞から樹立された iPS 細胞由来の SNS を免疫不全マウスの脳に移植し腫瘍形成や腫瘍の大きさを指標に安全性を検証し、MEF や Stm は ES 細胞由来 SNS と同等の安全性を担保したが TTF 由来 iPS 細胞からの SNS では、分化抵抗性細胞の存在による奇形種の形成率が高いことを示した¹³⁾。これらの結果は、iPS 細胞を用いた細胞療法における細胞株選択の重要性を示し、その臨床的意義は大きいと考えている。

そこで当研究室の辻らは、マウス脊髄損傷モデルに対するマウス MEF 由来 iPS 細胞から分化誘導した NS/PC の移植実験を行った¹⁴⁾。雌の 8 週齢 C57Bl6/J マウスを用いて、第 10 胸椎

高位に I-H impactor を用いて圧挫損傷を作製し、損傷後9日目に 5×10^5 個の細胞を損傷中心部へ移植した。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経時的モニタリングするために、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 を移植細胞に導入した。損傷後6週間の機能評価を行い、その後組織学的に検討した。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、明らかな発光量の増大は認めず、組織学的検討でも腫瘍形成を認めなかった。移植細胞はHu陽性の neuron, GFAP陽性の astrocyte, GST- π 陽性の oligodendrocyte へと分化しており、分化効率はそれぞれ neuron が約30%, astrocyte が約50%, oligodendrocyte 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。

一方、培養液のみを注入した vehicle control 群では後肢で体幹を支持できなかった。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 oligodendrocyte 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5)。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 astrocyte へと損傷脊髄内で分化し、軸索再生のガイドランスとして働いた可能性が考えられた。事実、この幼若 astrocyte 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 4 mm 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神経線維への glial support が、iPS 由来

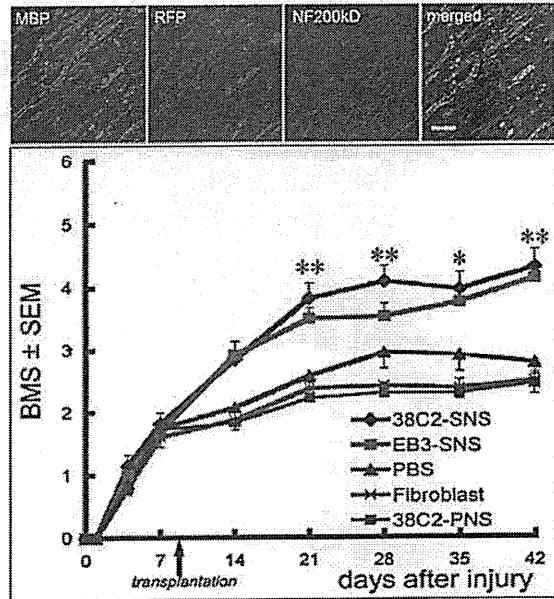


図5 脊髄損傷モデルマウスに対するマウス iPS 細胞由来 neurosphere 移植後の運動機能評価。移植された iPS 細胞由来 NS/PC が MBP 陽性の成熟 oligodendrocyte へと分化し、損傷により脱髄した神経線維を再髄鞘化し、有意な下肢運動機能回復が得られた。

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。

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た大きな一歩となった。しかし脊髄損傷に対する iPS 細胞を用いた細胞移植治療を実現するためには、前述の腫瘍化の問題など解決すべき課題は多い。iPS 細胞の樹立方法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¹⁶⁾、トランスポゾン的一种である Piggy Bac を用いた手法¹⁷⁾、染色体外挿入しついで消失するエピソームベクターの導入¹⁸⁾、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 vector²⁰⁾、薬剤による導入遺伝子の一部置き換えの成功²¹⁾ など報告が相次いでいる。また培養

法においても、動物種由来の血清やフィーダー細胞を用いずに iPS 細胞を樹立する方法も報告された²⁹⁾。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²⁹⁾。しかし、これらの方法で作製された iPS 細胞由来 NS/PC が、前述したレトロウイルスで作製された iPS 細胞由来 NS/PC と同等の多分化能と自己複製能を有しているか、移植細胞として安全性が高いのかなどについては、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 細胞を用いた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で、近い将来脊髄損傷の麻痺に苦しむ多くの患者に希望の光を投げかけられるものと確信している。

文献

- 1) McDonald J.W., X.Z. Liu, Y. Qu, *et al.* Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med.* 1999 ; 5(12) : 1410-2.
- 2) Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, *et al.* A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med.* 2006 ; 12(12) : 1380-9.
- 3) Barnabe-Heider F and J. Frisen. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell.* 2008 ; 3(1) : 16-24.
- 4) Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res.* 2002 ; 69(6) : 698-707.
- 5) Reynolds B.A. and S. Weiss. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992 ; 255(5052) : 1707-10.
- 6) 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(12) : 3086-98.
- 7) 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.* 2002 ; Res.69(6) : 925-33.
- 8) 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(2) : 182-90.
- 9) Keirstead H.S, *et al.* Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2005 ; 25(19) : 4694-705.
- 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.* 2009 ; 4(11) : e7706.
- 11) Yamanaka S. and Takahashi K. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 2006 ; 51(15) : 2346-51.
- 12) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 ; 131(5) : 861-72.
- 13) Okita K, *et al.* Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007 ; 448(7151) : 313-7.
- 14) Miura K, Okada Y, Aoi T, *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol.* 2009 ; 27(8) : 743-5.
- 15) Tsuji O, *et al.* Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 ; 107(28) : 12704-9.
- 16) Okita K, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008 ; 322(5903) : 949-53.
- 17) Woltjen K, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009 ; 458(7239) : 766-70.
- 18) Kaji K, *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature.* 2009 ; 458(7239) : 771-5.
- 19) Yu J, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 2009 ; 324(5928) : 797-801.
- 20) Jia F, *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods.* 2010 ; 7(3) : 197-9.
- 21) Maherali N, and Hochedlinger K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol.* 2009 ; 19(20) : 1718-23.
- 22) Zhou H, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009 ; 4(5) : 381-4.
- 23) 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.* 2010 ; 5(11) : e14099.
- 24) Vierbuchen T, *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010 ; 463(7284) : 1035-41.

iPS 細胞由来神経幹細胞移植による脊髄損傷治療

海 峯 聡^{*1)} 辻 収 彦^{*1)} 戸 山 芳 昭^{*1)}
岡 野 栄 之^{*2)} 中 村 雅 也^{*1)}

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「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」と述べて以来、このことが長い間定説として信じられてきたが、1992年に Weiss ら¹⁾により神経幹細胞が同定されると、その増殖能・分化能を生かして神経変性疾患や神経損傷において失われた神経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²⁾によりマウス胚性幹細胞(以下ES細胞)由来神経幹細胞移植の脊髄損傷への有効性も報告され、幹細胞移植による脊髄損傷治療の機運が高まった。

しかし、これらの研究で使用されている移植細胞の多くは胎児組織由来の幹細胞であり、倫理的な問題から臨床応用が困難であった。

そのような状況の中、2006年に京都大学の山中伸弥教授らによりiPS細胞が世界で初めて報告された³⁾。iPS細胞は体細胞に*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*の初期化遺伝子を導入することにより、体細胞をリプログラミングして作製された人工多能性幹細胞である。iPS細胞は成体組織から樹立が可能であるため、倫理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細胞の安全性およ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。

マウス iPS 細胞の安全性についての検討

われわれは、マウス iPS 細胞の神経幹細胞への誘導培養法を独自に開発した。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、胚様体(embryoid body; EB)を形成させ、その

後神経幹細胞を多く含むneurosphereを得る方法である。まず安全性を確認するために、36 cloneのマウスiPS細胞由来neurosphereを用いて、それぞれを免疫不全マウス(NOD-scid マウス)の線条体に移植した。その結果、樹立に用いる細胞が胎仔由来のものであるか、成体由来のものであるかによって腫瘍形成能は最も強く規定されており、成体組織由来iPS細胞はより腫瘍形成しやすいことが判明した。また、neurosphereまで分化誘導させた際に残存する未分化細胞の比率が高いと腫瘍形成が起こりやすいことも判明した⁴⁾。すなわち、将来の臨床応用を想定すると、成人体細胞からiPS細胞を樹立して移植療法を行う場合は、移植前に十分な安全性の検討が重要であることが示唆された。

成体組織由来の“安全な”iPS細胞と“危険な”iPS細胞を用いた損傷脊髄への移植実験

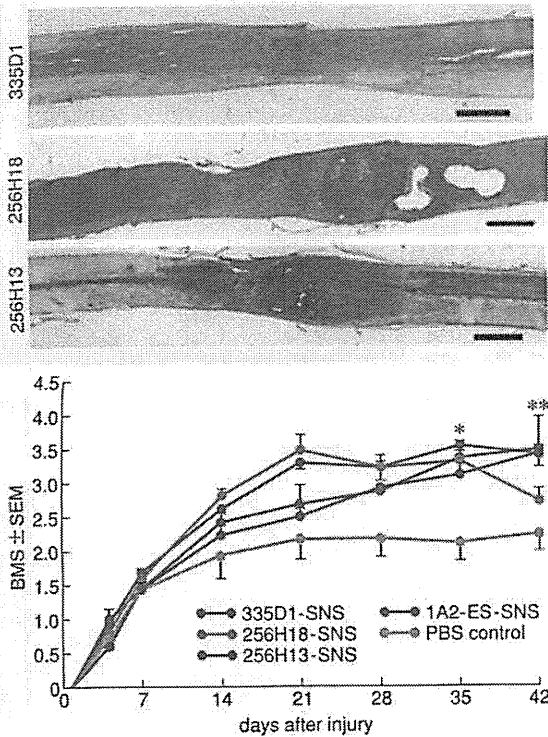
われわれは将来の臨床応用を考えて、成体組織(TTF; tail tip fibroblast)由来のiPS細胞を用いて移植実験を行った。TTF由来iPS細胞のうち、安全性が確認できた335D1と腫瘍形成が認められた“危険な”256H13と256H18の3つのcloneをそれぞれneurosphereへと誘導し⁴⁾、マウス脊髄損傷モデルに移植を行った。下肢運動機能評価をBasso Mouse Scaleで経時的に観察した。

その結果、全てのclone由来のneurosphere移植後に下肢運動機能の回復が得られたものの、“危険な”clone由来のneurosphere移植群においては、下肢運動機能が脊髄損傷後6週の時点で突然低下した。組織学的解析を行うと、脊髄内で巨大な奇形腫を形成していることが判明した。一方で“安全な”335D1由来neurosphereを移植した全てのマウスで腫瘍形成を認めず、ES細胞由来neurosphereと同等の下肢運動機能の回復が確認された(図1)。335D1由来神経幹細胞は移植後にHu陽性のneuron, GFAP陽性のastrocyte, GST- π 陽性のoligodendrocyteへと分化しており、

*¹⁾ Satoshi NORI et al, 慶應義塾大学医学部, 整形外科教室

*²⁾ Hideyuki OKANO, 同上, 生理学教室

図1 TTF-iPS 細胞由来 neurosphere 移植後の組織像と下肢運動機能評価〔文献5〕を改変

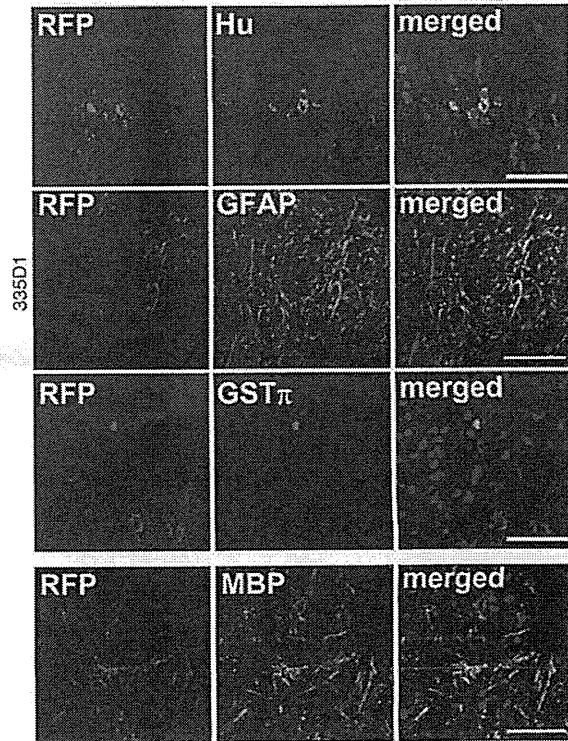


移植細胞がMBP陽性の成熟 oligodendrocyte へと分化し、損傷により脱髄した神経線維を再髄鞘化していた(図2)。このことより、臨床応用可能な成体組織由来のiPS細胞は胎仔組織由来のものと比較して危険性が高いものの、厳密にその安全性を検討すれば、脊髄損傷治療への有用な細胞源となることが示唆された⁵⁾。

おわりに

以上のように、iPS細胞は脊髄損傷に対する細胞移植療法の有効な細胞供給源となり得る大きな可能性を秘めている。最近、京都大学の山中教授らにより発表された「iPS細胞の作製効率のみならず安全性も飛躍的に向上させる Glis1 遺伝子の発見」は、iPS細胞の実用化を予感させる内容であり、世界中の幹細胞研究者を興奮させた⁶⁾。iPS細胞の研究は急速な勢いで進歩している。脊髄損傷に対する幹細胞移植療法の確立という悲願に向かって、今後も研究を続けて行きたい。

図2 移植後マウス脊髄内でのiPS細胞由来神経幹細胞の分化〔文献5〕を改変



文献

- 1) Reynolds BA et al: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255 : 1707-1170, 1992
- 2) McDonald JW et al: Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5 : 1410-1412, 1999
- 3) Takahashi K et al: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 4) Miura K et al: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27 : 743-745, 2009
- 5) 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
- 6) Maekawa M et al: Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 474 : 225-229, 2011