

Figure 4. Global Human Gene-Expression Analysis

(A) Hierarchical clustering analysis of mouse gene-expression data from spinal cord tissues of the PBS-5d and -103d, 253G1-NS/TP-5d and -103d, and 201B7-NS/TP-5d and -103d groups.

(B) Hierarchical clustering analysis of human gene-expression data: 253G1-NSs TP and 201B7-NSs, as well as spinal cord tissues of the 253G1-NS/TP-5d and -103d, and 201B7-NS/TP-5d and -103d groups. In (A) and (B), the signal intensity of each gene is displayed as a heatmap colored according to the expression level.

(legend continued on next page)



Table 1. Gene Ontology Analysis of 335 Human Genes Upregulated in 201B7-NS-Grafted Spinal Cord

GO Accession	GO Term	Corrected p Value
GO:0045202	synapse	7.05E-08
GO:0007399	nervous system development	3.56E-06
GO:0007267	cell-cell signaling	7.69E-06
GO:0019226	transmission of nerve impulse	4.68E-04
GO:0043005	neuron projection	1.76E-03
GO:0030182	neuron differentiation	1.26E-02
GO:0007154	cell communication	1.26E-02
GO:0048699	generation of neurons	1.40E-02
GO:0022008	neurogenesis	1.91E-02
GO:0050806	positive regulation of synaptic transmission	3.52E-02
GO:0050804	regulation of synaptic transmission	4.19E-02
GO:0007417	central nervous system development	4.80E-02
GO:0051971	positive regulation of transmission of nerve impulse	4.80E-02

See also Table S2.

number of mesenchyme-associated terms, including “mesenchymal cell differentiation,” “mesenchymal cell development,” and “epithelial to mesenchymal transition” (Table 2). These terms were also identified in a comparison of 253G1 and 201B7 NS cells, suggesting that 253G1-NS cells were more prone to undergo EMT (Table S3). Furthermore, the mRNA-seq data revealed that EMT-related genes such as *LEF1*, *BMP2*, *HGF*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, and *TWIST2* (as suggested by GO analysis and previous reports

[Moody et al., 2005; Yang et al., 2004]) were significantly upregulated in the 253G1-NS/TP-103d group relative to the 201B7-NS/TP-103d group (Figures 4F–4L). We also evaluated the expression of *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, and *TWIST2* mRNAs in 201B7-NSs and 253G1-NSs prior to transplantation (Figures 4M–4P). Expression of *SNAI2*, *TWIST1*, and *TWIST2* was significantly higher in 253G1-NSs than in 201B7-NSs (Figures 4N–4P), whereas *SNAI1* expression was significantly lower in 253G1-NSs than in 201B7-NSs (Figure 4M). Furthermore, we evaluated the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), extracellular-signal-regulated kinase (ERK) and v-akt murine thymoma viral oncogene (AKT) pathways, which are involved in tumor maintenance. Specifically, we performed immunohistochemical analyses to monitor the levels of tyrosine 705-phosphorylated STAT3 (p-STAT3), tyrosine 202/204-phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), and serine 473-phosphorylated AKT (p-AKT). We observed p-STAT3⁺ cells (Figures 4Q–4S), but no p-ERK1/2⁺ or p-AKT⁺ cells, in the 253G1-NS/TP-103d group.

Ingenuity Pathway Analysis Revealed Pathways that Differed Significantly between 253G1-NS and 201B7-NS Transplantation

We used Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to identify pathways differentially expressed between the 253G1-NS/TP-103d and 201B7-NS/TP-103d groups. IPA detected a total of 56 significantly altered (p < 0.05) pathways. Figure 5 shows the ten most altered pathways, all of which were significantly upregulated in the 253G1-NS/TP-103d group relative to iPSC-NSs prior to transplantation.

DISCUSSION

Because we generated the human iPSC clone 253G1 without introducing *c-MYC*, we initially speculated that

(C) Principal-component analysis (PCA) of human gene-expression data. x axis, component 1 (41.03%); y axis, component 2 (24.21%); z axis, component 3 (13.88%).

(D) Two-dimensional PCA of human gene expression data. x axis, component 1 (41.03%); y axis, component 2 (24.21%).

(E) Venn diagram of human genes whose expression increased in the 253G1-NS/TP-103d and 201B7-NS/TP-103d groups relative to 253G1-NSs and 201B7-NSs. Color key: red, 692 genes highly expressed in the 253G1-NS/TP-103d group; blue, 335 genes highly expressed in the 201B7-NS/TP-103d group; purple, 1,023 genes highly expressed in both the 253G1- and 201B7-NS/TP-103d groups.

(F–L) EMT-related human gene expression in 253G1- and 201B7-NSs and the 253G1- and 201B7-NS/TP-103d groups. Values represent the means ± SEM (n = 1 each in the human iPSC-NS, n = 2 for 201B7-NS/TP-103d, and n = 3 for 253G1-NS/TP-103d; n indicates the number of independent experiments).

(M–P) The expression of *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, and *TWIST2* mRNA in 201B7-NSs and 253G1-NSs was analyzed by RT-PCR. Data are presented as expression levels relative to the control (the U87 human glioblastoma cell line). Values represent the means ± SEM (n = 3 independent experiments).

(Q) Representative H&E image of the mid-sagittal section 103 days after transplantation.

(R) p-STAT3-stained image of the adjacent section of (Q). Arrow, lesion epicenter; arrowhead, distribution of grafted 253G1-NSs.

(S) Boxed area in (R).

Scale bar, 1,000 μm in (Q) and (R), 100 μm in (S). *p < 0.05, **p < 0.01. See also the mRNA-seq read distribution in Table S1.



Table 2. Gene Ontology Analysis of 692 Human Genes Upregulated in 253G1-NS-Grafted Spinal Cord

GO Accession	GO Term	Corrected p Value
GO:0030198	extracellular matrix organization and biogenesis	2.29E-16
GO:0001501	skeletal development	1.29E-14
GO:0043062	extracellular structure organization and biogenesis	2.67E-13
GO:0001568	blood vessel development	1.88E-12
GO:0001944	vasculature development	3.51E-12
GO:0030199	collagen fibril organization	5.50E-08
GO:0014031	mesenchymal cell development	2.78E-07
GO:0048762	mesenchymal cell differentiation	4.84E-07
GO:0001525	Angiogenesis	2.81E-06
GO:0048514	blood vessel morphogenesis	3.02E-06
GO:0001503	ossification	1.74E-05
GO:0031214	biomineral formation	1.89E-05
GO:0014032	neural crest cell development	5.94E-04
GO:0014033	neural crest cell differentiation	7.55E-04
GO:0007517	muscle development	3.04E-03
GO:0042127	regulation of cell proliferation	4.84E-03
GO:0001837	epithelial to mesenchymal transition	2.02E-02

See also Table S3.

253G1-NSs would be less tumorigenic than 201B7-NSs. Therefore, we performed transplantation of 253G1-NSs to treat SCI in adult NOD-SCID mice. Like the 201B7-NSs, the grafted 253G1-NSs differentiated into three neural lineages, reconstructed local circuitry, and promoted angiogenesis as well as axonal regrowth (data not shown). Thus, 253G1-NS transplantation promoted motor function recovery after SCI in NOD-SCID mice.

When considering the clinical use of iPSC-NSs, it is important to address safety issues, especially with regard to tumorigenicity. To this end, we extended the observation period after transplantation. Previously, we reported that 201B7-NS-grafted mice maintained functional recovery until 103 days post-transplantation, and confirmed that 201B7-NSs were non-tumorigenic based on histological findings (Nori et al., 2011). Here, we found that 253G1-NS-grafted mice exhibited temporary motor func-

tion recovery for up to 47 days post-transplantation; however, this was followed by a gradual deterioration in motor function, along with grafted cell proliferation and tumor development. Bioluminescence imaging revealed that the photon count of the grafted cells increased more than 10-fold from the initial value by 103 days after transplantation. These tumors were negative for the pluripotency marker NANOG. Tumor size correlated with the proportion of Nestin⁺ cells in the graft at 103 days post-transplantation. Previously, we showed that after 201B7-NS transplantation, the proportion of grafted cells that were Nestin⁺ decreased from 10.7% ± 2.2% at 47 days to 7.5% ± 1.0% at 103 days post-transplantation, resulting in no evidence of tumorigenicity (Nori et al., 2011). By contrast, the proportion of Nestin⁺ cells increased from 19.6% ± 0.5% at 47 days to 33.1% ± 7.4% at 103 days after 253G1-NS transplantation, suggesting that differentiation-resistant Nestin⁺ cells proliferated over time and formed tumors. Consistent with this, the proportion of Ki-67⁺ cells significantly increased from 1.7% ± 0.17% at 47 days to 3.0% ± 0.2% at 103 days after 253G1-NS transplantation, which is significantly higher than what was observed after 201B7-NS transplantation. These findings suggest that the proportion of proliferating cells increased over time and induced tumor formation in 253G1-NS-grafted mice in the long term.

Tumor diameter exhibited no significant correlation with the proportion of OCT4⁺/HNU⁺ cells. Instead, the proportion of grafted cells that were OCT4⁺ was solely dependent on the post-transplantation observation period. In our previous study, we observed no evidence of OCT4⁺/HNU⁺ cells or tumor formation in 201B7-NS-grafted mice after long-term observation (Nori et al., 2011). It is likely that the chronologically increasing OCT4 expression in the grafted 253G1-NSs is related to tumor formation, consistent with the results of RT-PCR, which showed that the expression of OCT4-Tg at 103 days post-transplantation was significantly higher than that in untransplanted 253G1-NSs. OCT4 is a key regulator of self-renewal and plays a critical role in maintaining ESC pluripotency (Niwa, 2007). In addition, OCT4 is sometimes re-expressed in somatic cells during carcinogenesis (Monk and Holding, 2001). OCT4 is also highly expressed in human gliomas and glioma cell lines, and OCT4 overexpression in glioma cells induces Nestin expression by inhibiting glioma cell differentiation (Du et al., 2009; Ikushima et al., 2011). These findings are consistent with the results we describe here, even though the tumors observed in the present study were not pathologically identical to gliomas. We also observed that KLF4-Tg was activated in 253G1-NSs, and that its expression increased after transplantation. KLF4 is highly expressed in primary breast ductal carcinoma and oral squamous carcinoma (Foster et al., 2005; Pandya et al.,

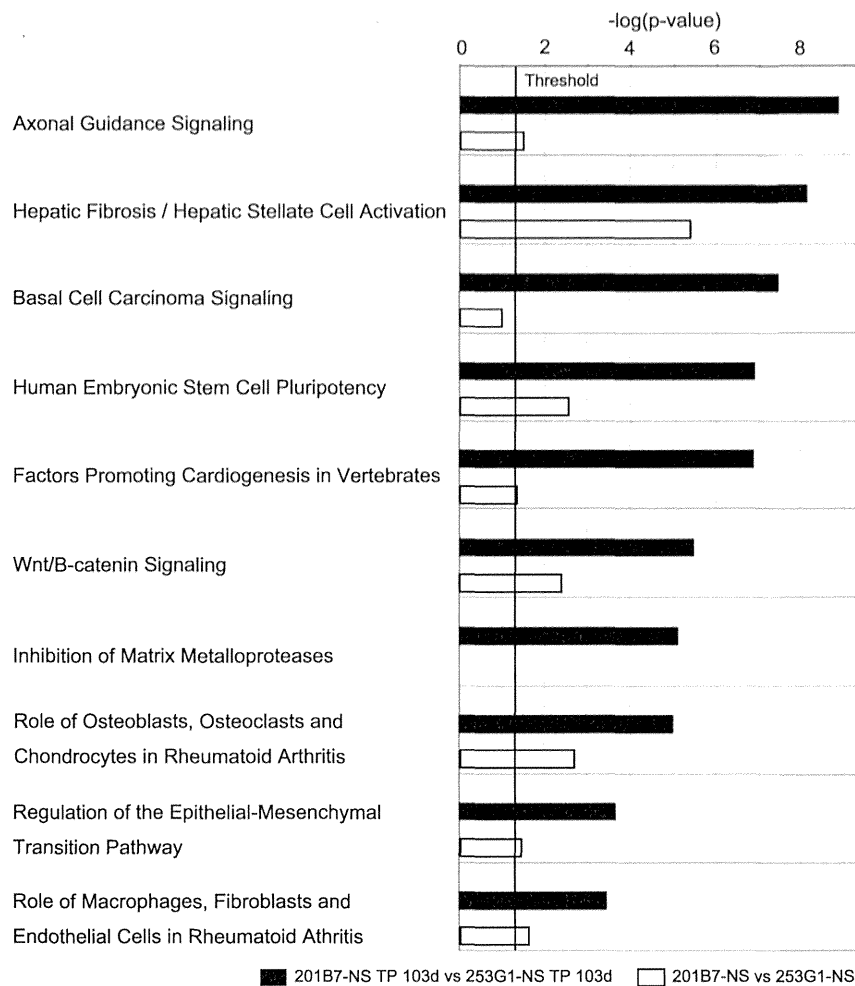


Figure 5. The Most Significantly Altered Common Pathways after Transplantation of 253G1- and 201B7-NSs, as Revealed by Ingenuity Pathway Analysis

Canonical pathway analysis identified the pathways from the Ingenuity Pathway Analysis library that were significantly enriched in the data set. Only genes that showed a fold change ≥ 3.0 were considered in this analysis. The black bars show the human gene set in the 253G1-NS/TP-103d group versus the 201B7-NS/TP-103d group. The white bars show the comparison of the human gene set in 253G1-NSs versus 201B7-NSs in the same pathway. Bars represent the logarithmic values (\log_{10}) of the significance level (p); the solid line corresponds to the threshold of $p = 0.05$.

2004). Previous reports also showed that KLF4 overexpression promotes self-renewal in ESCs (Li et al., 2005), and KLF4 is an essential reprogramming factor that functions by binding at *Oct4* loci to initiate *Oct4* transcription and complete the reprogramming process (Wei et al., 2013). These results suggest that KLF4 plays an important role in maintaining PSCs, and that the tumor formation we observed could be related to *KLF4*-Tg activation.

In a previous study, the molecular properties of engrafted NS/PCs changed dramatically depending on the spinal cord microenvironment (Kumamaru et al., 2012). Here, we analyzed the changes in the microenvironment of mouse spinal cord tissues affected by iPSC-NS transplantation. We observed no significant differences in the mouse gene-expression profiles of spinal cord tissues among the 253G1-NS/TP, 201B7-NS/TP, and control groups, suggesting that mouse gene expression did not widely affect tumorigenesis in grafted iPSC-NSs. However, human gene-expression profiles from the 253G1- and 201B7-NS/TP groups differed in a time-dependent manner, which

may have been related to tumor formation in the 253G1-NS/TP group. GO analysis revealed increased progression of EMT in the 253G1-NS and 253G1-NS/TP groups relative to the 201B7-NS and 201B7-NS/TP groups.

During EMT, epithelial cells lose their epithelial characteristics and acquire the properties of migratory mesenchymal cells. This process is associated with the early stages of carcinogenesis, cancer invasion, and recurrence (Hay, 1995; Thiery, 2002). Brain tumors, including some human gliomas, also contain stem-like cells with both neural and mesenchymal potential that are implicated in both tumor progression and invasiveness (Ricci-Vitiani et al., 2008). STAT3 is frequently overexpressed in cancers, including gliomas (Abou-Ghazal et al., 2008), and STAT3 phosphorylation leads to the transcriptional activation of genes involved in processes such as cell proliferation, apoptosis suppression, and angiogenesis (Bowman et al., 2001). Moreover, STAT3 regulates the EMT gene TWIST (Cheng et al., 2008), consistent with the more active EMT progression and



elevated TWIST expression in the 253G1-NS/TP group observed in this study. Mesenchyme-like changes in 253G1-NSs following transplantation may contribute to the biological characteristics of tumor cells derived from parental 253G1-NSs.

IPA revealed upregulation of human ESC pluripotency pathways in post-transplantation 253G1-NSs. This phenomenon might be related to the population of differentiation-resistant Nestin⁺ cells that proliferated over time and formed tumors. Furthermore, the Wnt/ β -catenin signaling pathway was significantly upregulated in the 253G1-NS/TP group. Previous studies showed that Wnt/ β -catenin signaling is critical for regulating the self-renewal, proliferation, and differentiation of NS/PCs in the brain (Gong and Huang, 2012), and that this pathway leads to enhanced *TERT* expression in human cancers, resulting in the stabilization of telomeres, a hallmark of tumorigenesis (Hoffmeyer et al., 2012). In part, the tumorigenicity of 253G1-NSs could be related to upregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Moreover, consistent with GO analysis, regulation of the EMT pathway was significantly upregulated in the 253G1-NS/TP group relative to the 207B7-NS/TP group.

Recently, several clinical trials of stem-cell-based therapy for SCI using either human NS/PCs (Cummings et al., 2005; Salazar et al., 2010) or human ESC-derived OPCs (Strauss, 2010) have been initiated. Compared with these stem cells, iPSCs raise fewer ethical concerns in certain countries (Nori et al., 2011; Tsuji et al., 2010). On the other hand, the use of iPSC-derived cells risks tumorigenesis (Miura et al., 2009; Tsuji et al., 2010). The present study demonstrates that even unsafe iPSC-NSs can confer therapeutic benefits against SCI, at least in the short term. However, long-term observation is required to assess the safety of iPSC-NSs, because slow-growing tumors could cause motor function to deteriorate over longer periods of time. In the present study, we used retrovirally generated iPSCs (Nakagawa et al., 2008; Takahashi et al., 2007) and showed that activation of *OCT4*- and *KLF4*-Tg might be related to tumor formation. Thus, from a clinical-applications perspective, NS/PCs derived from integration-free iPSCs (Okita et al., 2008, 2011) should be chosen to avoid Tg-induced tumorigenesis. Recently, a pilot clinical study of integration-free iPSC-based therapy for age-related macular degeneration was approved following review by the Japanese government (Garber, 2013; Kamao et al., 2014). As a step toward clinical applications in the SCI field, we have already initiated integration-free iPSC-NS transplantation in the NOD-SCID mouse SCI model. At the same time, transplantation into immune-deficient animals, accompanied by subsequent long-term observation, should be used to determine the safety and effectiveness of these cells (Okano et al., 2013).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Additional details regarding several of the protocols used in this work are provided in Supplemental Experimental Procedures.

Cell Culture, Neural Differentiation, and Lentiviral Transduction

Cell culture, neural differentiation of human iPSCs (253G1), and lentiviral transduction of neurospheres were performed as described previously (Nori et al., 2011; Okada et al., 2008). Briefly, 253G1-derived primary neurospheres were dissociated and infected with lentivirus expressing Venus or fLuc under the control of the EF promoter. Primary neurospheres were passaged into secondary and tertiary neurospheres. The fLuc vector enabled detection of grafted cells as strong bioluminescent fLuc signals in live SCI mice, and as fluorescent Venus signals in fixed spinal cord sections.

Animal Model and Cell Transplantation

Adult female NOD-SCID mice (20–22 g) were anesthetized via intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After laminectomy, contusive SCI was induced at the Th10 level using an IH impactor (60 kdyn; Precision Systems and Instrumentation) as described previously (Scheff et al., 2003). Nine days after SCI, 253G1-NSs (5×10^5 cells) were transplanted into the lesion epicenter of each mouse ($n = 37$) using a glass micropipette and stereotaxic injector (KDS310; Muromachi Kikai). The 253G1-NSs were transplanted at approximately the same time as the PBS injection and 201B7-NS transplantation described in our previous report (Nori et al., 2011).

Bioluminescence Imaging

A Xenogen-IVIS spectrum-cooled, charge-coupled device optical macroscopic imaging system (Summit Pharmaceuticals International) was used for bioluminescence imaging to confirm the survival of the grafted cells as previously described (Itakura et al., 2014; Okada et al., 2005; Takahashi et al., 2011). Monitoring was performed for 103 days post-transplantation.

Motor Function and Histological Analyses

Motor function was evaluated using the BMS, Rotarod apparatus (Muromachi Kikai), and DigiGait system (Mouse Specifics). For histological analyses, the animals were anesthetized and transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (pH 7.4). Spinal cords were removed and sectioned in the sagittal/axial plane on a cryostat. All motor function and histological analyses were conducted by observers blinded to the treatment conditions. All animal experiments (approval number 09169) were performed under the control of the Keio University Institutional Animal Care and Use Committee in accordance with the Institutional Guidelines on Animal Experimentation at Keio University, the Japanese Government Law Concerning the Protection and Control of Animals, and the Japanese Government Notification of Feeding and Safekeeping of Animals, and approved by the ethics committee of Keio University (IRB approval number 09091-8).



RT-PCR

RNA isolation and RT-PCR were performed as previously described (Nori et al., 2011; Okada et al., 2008).

Transcriptome Analysis

Total RNA from each sample was purified as previously described (Okada et al., 2008). mRNA libraries were prepared according to the TruSeq RNA sample prep kit protocol and sequenced using a Genome Analyzer IIx (Illumina). Mouse and human mRNA sequences were separated using Xenome software (Conway et al., 2012), and separated mRNA-seq data were mapped to the corresponding genomic DNA sequences (human [hg19] and mouse [mm9]) using TopHat software (Trapnell et al., 2009). The mapped sequences were normalized by trimmed mean of M values (TMM) and analyzed using Avadis NGS software (Agilent Technologies). All software used default parameters. For principal component analysis (PCA) and clustering analysis, the normalized data were narrowed down to 13,693 genes using a cutoff value for expression levels (reads per kilobase of exon per million mapped reads [RPKM] > 100). A Venn diagram was constructed to visualize the 1,715 genes that were upregulated in the 253G1-NS/TP-103d group and the 1,358 genes that were upregulated in the 201B7-NS/TP-103d group (RPKM > 100, fold change > 5.0 versus each NS group). GO analysis was performed using gene lists from the overlapping area, as well as from each separate area, in the Venn diagram. For GO analysis, p values were calculated using Fisher's exact test. Subsequently corrected p values were applied for multiple testing corrections using the Benjamini-Yekutieli method with a cutoff at $p = 0.05$. Pathway analysis was performed via IPA (Ingenuity Systems) using genes that were up- or downregulated in the 253G1-NS/TP-103d group versus the 201B7-NS/TP-103d group, as well as in 253G1-NS versus 201B7-NS (RPKM > 100, fold-change > 3.0). The genes were overlaid on the Ingenuity Knowledge Database and networks were algorithmically generated based on their connectivity. The p values were determined using Fisher's exact test and $p = 0.05$ was interpreted as indicating statistical significance.

Statistical Analyses

An unpaired, two-tailed Student's t test was used to assess the 253G1-NS differentiation efficacy. One-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test for multiple comparisons was used for the Ki-67, Rotarod, and DigiGait analyses. Repeated-measures, two-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer test was used for the BMS analysis. The Kruskal-Wallis non-parametric test and Scheffe's test were used to analyze tumor diameter and the percentage of HNu⁺ grafted cells that were Nestin⁺, Ki-67⁺, or OCT4⁺. Statistical significance was determined as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, two figures, and three tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.006>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Iwanami, S. Kaneko, K. Fujiyoshi, O. Tsuji, A. Yasuda, Y. Takahashi, S. Kawabata, Y. Nishiyama, T. Iida, S. Shibata, T. Harada, S. Miyao, and H.J. Okano for technical assistance and scientific discussions, and H. Saya, M. Ko, M. Jakt, and K. Horiuchi for critical readings of the manuscript. We also thank S. Yamanaka and M. Nakagawa for the human iPSC clones (253G1 and 201B7). The p-STAT3, p-ERK1/2, and p-AKT antibodies were kindly provided by N. Onishi. This work was supported by grants from the JST-CIRM collaborative program; Grants-in-Aid for Scientific Research from JSPS and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (MEXT); Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine from by the Japan Science and Technology Agency (JST); the Kanrinmaru Project (Keio University); Research Fellowships for Young Scientists from the Japan Society for the Promotion of Science; Keio Gijuku Academic Development Funds; and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (Comprehensive Brain Science Network) from the MEXT.

Received: February 21, 2014

Revised: January 9, 2015

Accepted: January 12, 2015

Published: February 12, 2015

REFERENCES

- Abou-Ghazal, M., Yang, D.S., Qiao, W., Reina-Ortiz, C., Wei, J., Kong, L.Y., Fuller, G.N., Hiraoka, N., Priebe, W., Sawaya, R., and Heimberger, A.B. (2008). The incidence, correlation with tumor-infiltrating inflammation, and prognosis of phosphorylated STAT3 expression in human gliomas. *Clin. Cancer Res.* *14*, 8228–8235.
- Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A., and Jove, R. (2001). Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 7319–7324.
- Bradford, J.R., Farren, M., Powell, S.J., Runswick, S., Weston, S.L., Brown, H., Delpuech, O., Wappett, M., Smith, N.R., Carr, T.H., et al. (2013). RNA-seq differentiates tumour and host mRNA expression changes induced by treatment of human tumour xenografts with the VEGFR tyrosine kinase inhibitor Cediranib. *PLoS ONE* *8*, e66003.
- Cheng, G.Z., Zhang, W.Z., Sun, M., Wang, Q., Coppola, D., Mansour, M., Xu, L.M., Costanzo, C., Cheng, J.Q., and Wang, L.H. (2008). Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *J. Biol. Chem.* *283*, 14665–14673.
- Conway, T., Wazny, J., Bromage, A., Tymms, M., Sooraj, D., Williams, E.D., and Beresford-Smith, B. (2012). Xenome—a tool for classifying reads from xenograft samples. *Bioinformatics* *28*, i172–i178.
- Cummings, B.J., Uchida, N., Tamaki, S.J., Salazar, D.L., Hooshmand, M., Summers, R., Gage, F.H., and Anderson, A.J. (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor



- recovery in spinal cord-injured mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 14069–14074.
- Du, Z., Jia, D., Liu, S., Wang, F., Li, G., Zhang, Y., Cao, X., Ling, E.A., and Hao, A. (2009). Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* *57*, 724–733.
- Erceg, S., Ronaghi, M., Oriá, M., Roselló, M.G., Aragó, M.A., Lopez, M.G., Radojevic, I., Moreno-Manzano, V., Rodríguez-Jiménez, F.J., Bhattacharya, S.S., et al. (2010). Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells* *28*, 1541–1549.
- Falk, A., Koch, P., Kesavan, J., Takashima, Y., Ladewig, J., Alexander, M., Wiskow, O., Taylor, J., Trotter, M., Pollard, S., et al. (2012). Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLoS ONE* *7*, e29597.
- Foster, K.W., Liu, Z., Nail, C.D., Li, X., Fitzgerald, T.J., Bailey, S.K., Frost, A.R., Louro, I.D., Townes, T.M., Paterson, A.J., et al. (2005). Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia. *Oncogene* *24*, 1491–1500.
- Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiya, S., Smith, A., and Nakashima, K. (2012a). Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells* *30*, 1163–1173.
- Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiya, S., Smith, A., and Nakashima, K. (2012b). Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human iPSC cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells* *30*, 1163–1173.
- Garber, K. (2013). Inducing translation. *Nat. Biotechnol.* *31*, 483–486.
- Gong, A., and Huang, S. (2012). FoxM1 and Wnt/ β -catenin signaling in glioma stem cells. *Cancer Res.* *72*, 5658–5662.
- Hara-Miyauchi, C., Tsuji, O., Hanyu, A., Okada, S., Yasuda, A., Fukano, T., Akazawa, C., Nakamura, M., Imamura, T., Matsuzaki, Y., et al. (2012). Bioluminescent system for dynamic imaging of cell and animal behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *419*, 188–193.
- Hay, E.D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)* *154*, 8–20.
- Hoffmeyer, K., Raggioli, A., Rudloff, S., Anton, R., Hierholzer, A., Del Valle, I., Hein, K., Vogt, R., and Kemler, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science* *336*, 1549–1554.
- Hofstetter, C.P., Holmström, N.A., Lilja, J.A., Schweinhardt, P., Hao, J., Spenger, C., Wiesenfeld-Hallin, Z., Kurpad, S.N., Frisén, J., and Olson, L. (2005). Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat. Neurosci.* *8*, 346–353.
- Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Saito, N., Miyazawa, K., and Miyazono, K. (2011). Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 41434–41441.
- Itakura, G., Kobayashi, Y., Nishimura, S., Iwai, H., Takano, M., Iwanami, A., Toyama, Y., Okano, H., and Nakamura, M. (2014). Control of the survival and growth of human glioblastoma grafted into the spinal cord of mice by taking advantage of immunorejection. *Cell Transplant.* Published online May 9, 2014. <http://dx.doi.org/10.3727/096368914X681711>.
- Iwanami, A., Kaneko, S., Nakamura, M., Kanemura, Y., Mori, H., Kobayashi, S., Yamasaki, M., Momoshima, S., Ishii, H., Ando, K., et al. (2005). Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J. Neurosci. Res.* *80*, 182–190.
- Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., Kiryu, J., and Takahashi, M. (2014). Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* *2*, 205–218.
- Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J. Neurosci.* *25*, 4694–4705.
- Kobayashi, Y., Okada, Y., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Yasuda, A., Nori, S., Hikishima, K., Konomi, T., Fujiyoshi, K., et al. (2012). Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS ONE* *7*, e52787.
- Kumagai, G., Okada, Y., Yamane, J., Nagoshi, N., Kitamura, K., Mukaino, M., Tsuji, O., Fujiyoshi, K., Katoh, H., Okada, S., et al. (2009). Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS ONE* *4*, e7706.
- Kumamaru, H., Ohkawa, Y., Saiwai, H., Yamada, H., Kubota, K., Kobayakawa, K., Akashi, K., Okano, H., Iwamoto, Y., and Okada, S. (2012). Direct isolation and RNA-seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. *Nat. Commun.* *3*, 1140.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., and Chan, R.J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* *105*, 635–637.
- Lukovic, D., Valdés-Sánchez, L., Sánchez-Vera, I., Moreno-Manzano, V., Stojkovic, M., Bhattacharya, S.S., and Erceg, S. (2014). Brief report: astrogliosis promotes functional recovery of completely transected spinal cord following transplantation of hESC-derived oligodendrocyte and motoneuron progenitors. *Stem Cells* *32*, 594–599.
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., et al. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* *27*, 743–745.
- Monk, M., and Holding, C. (2001). Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* *20*, 8085–8091.
- Moody, S.E., Perez, D., Pan, T.C., Sarkisian, C.J., Portocarrero, C.P., Sterner, C.J., Notorfrancesco, K.L., Cardiff, R.D., and Chodosh, L.A.



- (2005). The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 8, 197–209.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87–90.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106.
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635–646.
- Nori, S., Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Fujiyoshi, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Ikeda, E., et al. (2011). Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 16825–16830.
- Ogawa, Y., Sawamoto, K., Miyata, T., Miyao, S., Watanabe, M., Nakamura, M., Bregman, B.S., Koike, M., Uchiyama, Y., Toyama, Y., and Okano, H. (2002). 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.
- Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G., and Okano, H. (2004). Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 275, 124–142.
- Okada, S., Ishii, K., Yamane, J., Iwanami, A., Ikegami, T., Katoh, H., Iwamoto, Y., Nakamura, M., Miyoshi, H., Okano, H.J., et al. (2005). 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.
- Okada, Y., Matsumoto, A., Shimazaki, T., Enoki, R., Koizumi, A., Ishii, S., Itoyama, Y., Sobue, G., and Okano, H. (2008). Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26, 3086–3098.
- Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., Ikeda, E., Yamanaka, S., and Miura, K. (2013). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.* 112, 523–533.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPSCs. *Nat. Methods* 8, 409–412.
- Pandya, A.Y., Talley, L.I., Frost, A.R., Fitzgerald, T.J., Trivedi, V., Chakravarthy, M., Chhieng, D.C., Grizzle, W.E., Engler, J.A., Krontiras, H., et al. (2004). Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 2709–2719.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Larocca, L.M., Lombardi, D.G., Signore, M., Pierconti, F., Petrucci, G., Montano, N., Maira, G., and De Maria, R. (2008). Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 15, 1491–1498.
- Salazar, D.L., Uchida, N., Hamers, F.P., Cummings, B.J., and Anderson, A.J. (2010). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in an early chronic spinal cord injury NOD-scid mouse model. *PLoS ONE* 5, e12272.
- Scheff, S.W., Rabchevsky, A.G., Fugaccia, I., Main, J.A., and Lumpp, J.E., Jr. (2003). Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J. Neurotrauma* 20, 179–193.
- Strauss, S. (2010). Geron trial resumes, but standards for stem cell trials remain elusive. *Nat. Biotechnol.* 28, 989–990.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Takahashi, Y., Tsuji, O., Kumagai, G., Hara, C.M., Okano, H.J., Miyawaki, A., Toyama, Y., Okano, H., and Nakamura, M. (2011). Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. *Cell Transplant.* 20, 727–739.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.
- Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105–1111.
- Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N., Kitamura, K., Kumagai, G., Nishino, M., Tomisato, S., et al. (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 12704–12709.
- Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochedlinger, K., Windrem, M., and Goldman, S.A. (2013). Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* 12, 252–264.
- Wei, Z., Gao, F., Kim, S., Yang, H., Lyu, J., An, W., Wang, K., and Lu, W. (2013). Klf4 organizes long-range chromosomal interactions with the oct4 locus in reprogramming and pluripotency. *Cell Stem Cell* 13, 36–47.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.
- Yasuda, A., Tsuji, O., Shibata, S., Nori, S., Takano, M., Kobayashi, Y., Takahashi, Y., Fujiyoshi, K., Hara, C.M., Miyawaki, A., et al. (2011). Significance of remyelination by neural stem/progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. *Stem Cells* 29, 1983–1994.

iPS細胞創薬への期待と課題

岡田 洋平

Yohei Okada

愛知医科大学医学部内科学講座(神経内科)准教授

小野寺 一成

Kazunari Onodera

愛知医科大学医学部内科学講座(神経内科)/
名古屋大学大学院医学系研究科神経内科

はじめに

患者から採取した体細胞から作製する多能性幹細胞(pluripotent stem cells), すなわち疾患特異的 iPS 細胞(induced pluripotent stem cells) は, その疾患で障害を受けるとされる細胞(疾患感受性細胞)へと分化誘導することで, 患者由来細胞を用いた新たな疾患モデルとなり得るため, 新たな疾患解析のパラダイムを生み出す技術として期待されてきた。本稿では, 疾患特異的 iPS 細胞を創薬へと発展させるための課題と今後の期待について考察したい。

従来 of 疾患解析の問題点

従来 of 疾患解析では, 患者剖検サンプルを用いた解析や, 原因遺伝子の導入やノックアウト/ノックダウンにより作製された培養細胞や疾患モデル動物を用いた解析が広く行われてきた。しかし, 剖検サンプルは限られているうえに, 病態が進行した結果についての情報しか得られず, 疾患の発症や進行に関して解析するのは難しい。また, 原因遺伝子が明らかになっている遺伝性疾患はごく一部であり, 多くの疾患が孤発性であることを考慮すると, 先に述べた方法で作成できる疾患モデル細胞・動物は限られている。さらに, 原因遺伝子が明らかな疾患であっても, モデル動物と患者との間での原因遺伝子の発現量の違いや, ヒトとマウスなどのモデル動物における生物学的, 遺伝学的な違いのために, 患者の病態を正確に再現できないことも多い。特に, 種間での保存性が低い非翻訳領域の変異が病態と関連している場合や, 薬剤に対する感受性(効果や毒性)が種間で異なる場合に

は, 種の相違が大きな問題となる¹⁾。そのため, 近年では, 少しでもヒトに近いモデルとして, 霊長類モデルの開発が進められているが²⁾, いまだ霊長類の疾患モデルの作製と使用には, 技術的, 時間的, 経済的な問題が残されている。また霊長類モデルといえど, ヒトとは異なるために, 厳密な意味でヒト疾患を反映するモデルを作製するのは困難である。

ヒト iPS 細胞を用いた疾患解析の利点

2007年に山中伸弥先生(京都大学 iPS 細胞研究所所長)らにより開発されたヒト iPS 細胞の技術を用いることで, 患者の体細胞から多能性幹細胞を作製できるようになった³⁾。この技術を用いて作製された疾患特異的 iPS 細胞は, 患者自身の疾患感受性細胞へと分化誘導することができるため, 病態を忠実に再現する疾患モデルとなり得る。したがって, 遺伝的な多様性が表現型とどのように結びついているのか, すなわちゲノム情報と疾患表現型との関連を明らかにできるうえに, 遺伝的背景が明らかでない場合でも疾患モデルを作製することができる。また, 健常者由来細胞との比較により, 疾患のある時点を輪切りで解析する横断的解析のみならず, その分化誘導過程を解析することで疾患の発症や進行過程を縦断的に解析することが可能である。特に *in vivo* では表現型の表出に時間がかかる場合でも, iPS 細胞を用いた *in vitro* モデルでは, 神経変性などの表現型を比較的短時間で得られる場合もある。さらに表現型の解析のみならず, 生化学的解析, 分子生物学的解析が行いやすく, また近年次々に開発されているゲノム編集技術(ZFN nuclease, Talen, Crisper Cas 9など)¹⁾を用いることで, 比較的容

易に遺伝子改変を行うことができるため、疾患の背後にある分子遺伝学的な要因の探索、遺伝子治療に向けた詳細な解析や分子病態を標的とした治療法の開発においてきわめて有用なツールとなり得る。

iPS細胞の応用における問題点と その解決に向けた取り組み

培養細胞株である iPS 細胞は、一見、動物モデルに比べて実験が容易で短時間、低コストで解析できるように見える。しかしながら、実際に実験を進めてみると、多くの問題点に直面する。

まず、ヒトの細胞であるだけに培養や分化誘導に比較的時間がかかるうえに（ヒトの発生には受精から出生まで10ヵ月かかることを考慮する必要がある）、培養細胞であるがゆえに日々の培養には手間がかかり、また未分化 iPS 細胞をよい状態で維持するためには、十分な技術が必要とする。高価な培地や組換え蛋白、サイトカインなどを用いる場合も多く、コストの問題も無視できない。このような問題を解決するために、分化誘導期間を短くするための工夫や、組換え蛋白ではなく低分子化合物を用いるプロトコルが開発されてきている。例えば、神経分化誘導では、Dual Smad inhibition (BMP 阻害剤である Noggin, dorsomorphin や LDN-193189 などと、TGF- β 阻害剤である SB431542 を併用する方法) が報告されており¹⁾、また筆者らのグループでも、この方法に GSK3 β -inhibitor (BIO, CHIR99021) をあわせて用いることで、短期間で高効率に神経系前駆細胞を誘導する方法を報告している⁵⁾。

また、ヒト多能性幹細胞から特定の細胞への分化誘導効率は一般的にはそれほど高くなく、誘導された分化細胞は不均一な集団であることが多い。同じ種類の細胞へと分化誘導していても、誘導されたすべての細胞の分化の度合いを同期させることはほとんど不可能であり、細胞の成熟度と発症が関与する多くの疾患において解析上の問題点となっている。さらに、クローン間、培養バッチ間での分化傾向の違いやばらつきも大きい^{6) 7)}、コンスタントに同じ品質の分化細胞を作製するのがなかなか難し

い。ヒト多能性幹細胞が、マウス多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) のような分化全能性をもつ naive type の多能性幹細胞ではなく、もう少し分化が進んだ epiblast stem cell に近い細胞 (primed type) であることも、このような問題の一因となっていると考えられる^{8) 9)}。このような問題点を解決するために、より分化誘導効率を改善するための工夫や、表面抗原、細胞種特異的レポーター遺伝子を用いた細胞の純化、iPS 細胞の樹立方法や品質の均一化、naive type の iPS 細胞の作製方法の開発などが重要となってくる。

また、多能性幹細胞の分化誘導は、個体発生を *in vitro* で再現するのが基本である。そのため、胚発生の早い時期の細胞に相当する iPS 細胞から分化誘導した細胞は、まだ十分に成熟した細胞とはいえない。すなわち、発達期の疾患のモデルとしては大いに期待できるが、成人発症の疾患、特に遅発性疾患では、発症に足る十分な老化を経していないため、基本的な培養条件では十分に病態を再現できない、すなわち「発症しない」可能性がある。そのため、老化遺伝子である *Progerin* の導入などが試みられている¹⁰⁾。また筆者らは逆に、どのようなストレスが発症に必要なのかを解析することで、どのような老化関連シグナルが疾患の発症とかわかっているのかを明らかにすることができると考えている。

さらに、すべてのヒトは何らかの遺伝的多様性をもっているため、異なる患者・健常者から作製されたヒト iPS 細胞は、当然のことながら個人差を有していることになる。したがって、得られた解析結果が個人差の範囲を出ないものなのか、疾患に特徴的な所見といえるのかの判断を下すには、通常の臨床研究と同様に多数のサンプルを解析する必要がある。このような問題を解消するためには、先に述べたゲノム編集技術を用いて、正常細胞へ疾患関連遺伝子を導入する、あるいは患者細胞における遺伝子変異を修復する、などの方法により、同じ遺伝子情報をもつ疾患・対照 iPS 細胞 (isogenic iPS cells) を作製して比較することが求められている¹⁾。この方法により、クローン間のばらつきや解析のノイズの軽減が期待できる。いうまでもなく、多数のサンプルの収集、

同意の取得、細胞の維持・管理にはヒト・金・モノ・時間の経営資源が必要となる。

細胞自律的な病態と非細胞自律的な病態 (cell autonomous と non-cell autonomous)

In vivo の解析ができないことが iPS 細胞モデルの欠点でもある。従来の iPS 細胞を用いた解析では、単一の細胞種に着目した細胞自律的な解析が主体であった。しかし、多種類の細胞が組み合わさって一つの個体が生み出されることを考慮すると、それぞれの疾患も一種類の細胞のみの問題で発症しているとは限らない。例えば、運動ニューロン病と考えられてきた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、グリア細胞がその病態に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている¹¹⁾。このような非細胞自律的な病態解析では、個体として解析できる動物モデルのほうが、iPS 細胞による *in vitro* モデルに比べて一歩秀でているといえる。筆者らのグループでは患者、あるいは健常者由来の iPS 細胞からさまざまな細胞を誘導して共培養することで、複数の細胞種の相互作用に基づく非細胞自律的な病態に注目した解析を進めている。最近では多能性幹細胞から三次元的に分化誘導する脳オルガノイド培養法¹²⁾ や、眼球の三次元培養法¹³⁾ など、器官としての分化誘導法が構築されつつある。したがって、単一の細胞モデルから共培養系による組織としてのモデル、あるいは器官としての疾患モデルへと発展させることで、iPS 細胞の欠点である「*in vivo* の解析ができない」問題点を克服し、本当の意味での「疾患モデル」へと進化できる可能性がある。

どのような疾患が解析対象となるのか？

このような iPS 細胞の特性を理解したうえで、解析対象の疾患を選択していく必要がある。まず解析対象となるのは、やはり原因遺伝子がすでに同定されている、遺伝性疾患である。孤発性疾患は、同じ名称の疾患であっても、さまざまな原因が混在する「ヘテロな疾患群」で

あることが多く、多様な解析結果が得られ、解析に困難を伴うことが予想される。一方、単一の遺伝子異常に起因する遺伝性疾患であれば、そのレスキューやゲノム編集による遺伝子治療も可能であり、解釈しやすい結果が得られる可能性が高い。ただし先に述べたように、原因遺伝子の同定されている遺伝性疾患はごく一部であり、多くの場合が孤発性であることを考えると、遺伝性疾患で明らかにされた病態メカニズムが、どのくらい孤発性疾患にもあてはまるのか、原因遺伝子の同定されている疾患の解析結果を、どのように孤発性疾患にあてはめていくのかということが重要な課題となる。現在、神経系疾患のなかで解析対象として特に着目されているアルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、ALS などは、このような問題のよい例であるといえる。

一方、エピジェネティックスの異常や環境因子が影響する疾患については、解析に注意を要する。特に、発段階での生体内での「リプログラミング」過程の異常に起因する疾患では、*in vitro* でのリプログラミングにより作製された iPS 細胞では、そのままでは疾患を再現するのは難しい。また環境因子が影響する場合は、疾患感受性が高いという前提で、*in vitro* でいかにその環境を再現するかが重要となる。ミトコンドリア疾患などでみられるヘテロプラスミーにも注意しなくてはならない。これらを考慮すると、iPS 細胞を用いた解析に適した疾患、適さない疾患があり、創薬への応用を慎重に検討する必要があると同時に、疾患ごとに達成度は変わってくるだろうと予想される。

疾患特異的 iPS 細胞を用いた 薬剤スクリーニング

疾患特異的 iPS 細胞を用いた最大の魅力の一つが、ヒト細胞、患者由来細胞を用いた、薬効・毒性評価や薬剤スクリーニングへの応用である (図 1)。iPS 細胞の応用により、従来の動物実験の問題点や、臨床試験におけるコスト、時間を大幅に軽減できる可能性がある。また、iPS 細胞技術を用いた既存薬のスクリーニングを行うことがで

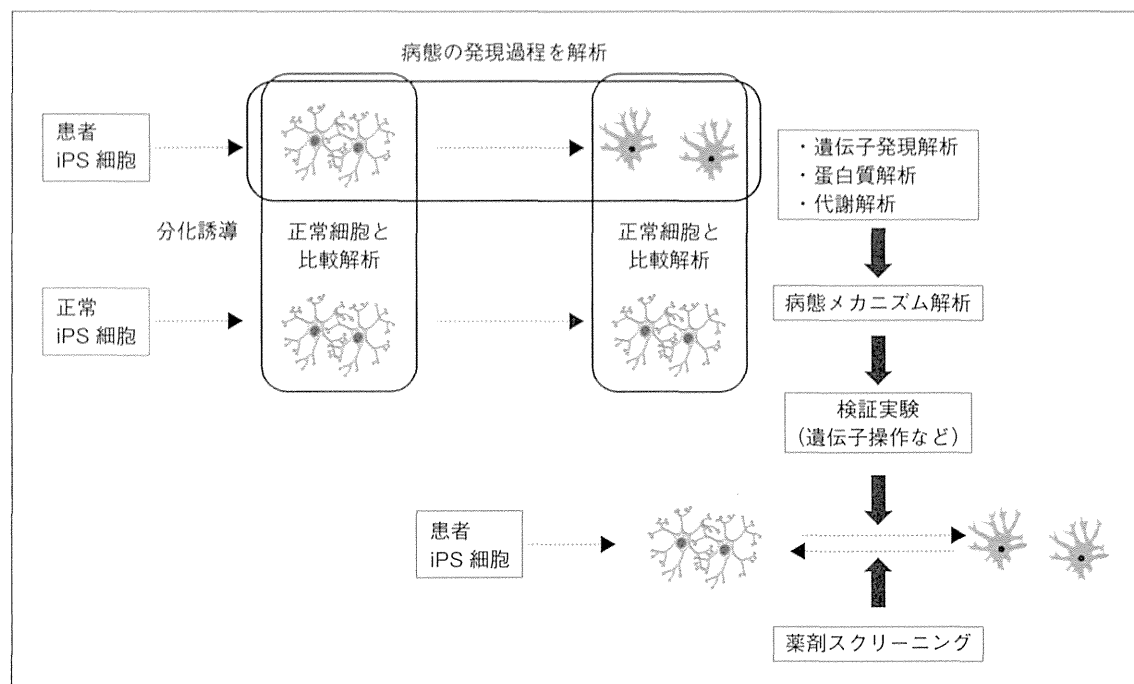


図1 疾患特異的iPS細胞を用いた病態解析と創薬

されれば、さらに迅速に臨床応用にいたる可能性がある（いわゆるドラッグリポジショニング）。このような疾患特異的iPS細胞を用いた応用例としては、ALS患者由来iPS細胞から誘導した運動ニューロンを用いて複数の薬剤の効果を検討し、表現型を改善する薬剤を見出した報告¹⁴⁾、家族性自律神経失調症のiPS細胞由来神経堤細胞を用いて、原因遺伝子である*IKBKAP*の正常型フォームの発現上昇を指標に6,912のコンパウンドをスクリーニングし、有効な薬剤を見出した報告などが特筆される¹⁵⁾。

しかし、このような薬剤スクリーニングを推進していくためには、いくつもの重要なハードルを乗り越える必要がある。まず、いかにして表現型を捉えるか。疾患特異的iPS細胞から誘導した細胞では、わずかな表現型の差しか観察されないことも多く、このわずかな差を確かな差として捉えるための高感度の検出システムと、十分な再現性（十分なサンプル数）を得ることが必要不可欠である。そのため、簡便なiPS細胞の樹立法、分化誘導法、評価法の構築や、自動化によるハイスループットス

クリーニングも重要である。また、iPS細胞創薬を加速度的に進行させるためには、iPS細胞リソースの効率的な活用が重要である。そのためには、疾患特異的iPS細胞バンクの充実が必要不可欠であり、わが国でも、京都大学iPS細胞研究所（CiRA）を中心に事業が推進されている。今後、さらにiPS細胞から分化した細胞（神経幹細胞などの分化の途中段階の細胞）の細胞バンクを構築することができれば、iPS細胞創薬にさらに拍車がかかると考えられる。最終的なiPS細胞創薬の実現には、企業の参画をスムーズに進めていくことが課題である。海外では、アカデミアと企業が共同してiPS細胞創薬に向けたシステムを構築しつつあり、特にアカデミアでは遂行しにくい実用化研究をベンチャー企業などがうまく取りもつこと、また製薬企業がもつ莫大なシーズ、ライブラリーを活用できる環境を構築することが肝要である。そのためには、成果・知的財産の取り扱いについても十分に議論する必要がある¹⁶⁾。

おわりに

以上を総合して、「iPS細胞創薬は10年以内に実現するか?」という問いに答えるとしたら、「iPS細胞創薬」は技術的には実現すると思われるが、その時期や実用化は「疾患によって異なる」と答えたいと思う。

REFERENCES

- 1) Merkle FT, Eggan K : Modeling human disease with pluripotent stem cells : from genome association to function. *Cell Stem Cell* 12 : 656-668, 2013
- 2) Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, et al : Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 459 : 523-527, 2009
- 3) 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
- 4) Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al : Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27 : 275-280, 2009
- 5) Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, et al : Involvement of ER Stress in Demyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports* 2 : 648-661, 2014
- 6) Osafune K, Caron L, Borowiak M, et al : Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26 : 313-315, 2008
- 7) Hu BY, Weick JP, Yu J, et al : Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 4335-4340, 2010
- 8) Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, et al : Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448 : 191-195, 2007
- 9) Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, et al : New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448 : 196-199, 2007
- 10) Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, et al : Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 13 : 691-705, 2013
- 11) Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, et al : Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11 : 251-253, 2008
- 12) Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al : Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501 : 373-379, 2013
- 13) Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, et al : Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 : 20284-20289, 2013
- 14) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, et al : Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med* 4 : 145ra104, 2012
- 15) Lee G, Ramirez CN, Kim H, et al : Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat Biotechnol* 30 : 1244-1248, 2012
- 16) 中辻憲夫, 浅田 孝, 仙石慎太郎 : ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS細胞) の医療・創薬応用を目指す技術と政策—グローバルレビューと海外動向—. *再生医療* 12 : 316-341, 2013

2. 小児神経疾患克服へ向けた 疾患 iPS 細胞研究の進歩と課題

沼澤佑子, 岡田洋平, 岡野栄之

2007年にヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell : hiPS細胞) の樹立が報告され, 患者自身の細胞を用いた病態解析や新規薬剤の探索が理論上可能となった. また遺伝子治療や再生医療の実現に向けても大きな期待が寄せられている. これまでに多くの疾患 iPS 細胞研究報告がなされてきた. 本稿では小児神経疾患を対象とする疾患 iPS 細胞研究の主な報告と今後の展望について概説する.

はじめに

2007年に hiPS 細胞樹立の報告¹⁾ がなされ患者自身の細胞を用いた病態解析が可能となった. また創薬へ

向けた薬剤スクリーニング, 遺伝性疾患における遺伝子治療, 再生医療の実現に向けて大きな期待が寄せられている. 特に神経疾患の場合, 「病変組織を直接採取し解析することが困難」, 「中枢神経は再生能力に乏し

【キーワード&略語】

小児神経疾患, 疾患特異的 iPS 細胞, 神経発生, 病態解析, 臨床応用

ABCD1 : ATP-binding cassette, sub-family D, member

ALD : adrenoleukodystrophy
(副腎白質ジストロフィー)

ASD : autism spectrum disorder
(自閉症スペクトラム障害)

CCALD : childhood cerebral ALD

CDK5RAP2 : CDK5 regulatory subunit associated protein 2

DYRK1A : dual-specificity tyrosine- (Y) -phosphorylation regulated kinase 1A

IGF1 : insulin-like growth factor 1

IKBKAP : inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein

MECP2 : methyl CpG binding protein 2

PLP1 : proteolipid protein 1

PMD : Pelizaeus-Merzbacher disease

SCN1A : sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit

SMA : spinal muscular atrophy
(脊髄性筋萎縮症)

SMN : survival motor neuron

VLCFA : very long chain fatty acid

XIST : X inactive specific transcript

Progresses and problems of disease specific iPSCs to overcome pediatric neurological disorders

Yuko Numasawa^{1) 3)} /Yohei Okada^{2) 3)} /Hideyuki Okano³⁾ : Department of Pediatrics, School of Medicine, Keio University¹⁾ /Department of Neurology, School of Medicine, Aichi Medical University²⁾ /Department of Physiology, School of Medicine, Keio University³⁾ (慶應義塾大学医学部小児科学教室¹⁾ /愛知医科大学内科学講座 (神経内科)²⁾ /慶應義塾大学医学部生理学教室³⁾)

表 疾患 iPS 細胞研究のテーマ別分類

		脊髄性筋萎縮症		Dravet 症候群			Rett 症候群	ALD	PMD	小頭症	21 トリソミー	FD
病態解析	細胞生物学的解析	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	成熟ニューロン機能解析			○	○	○	○			○	○	
	グリア細胞解析							○	○			
	三次元脳オルガノイド									○		
遺伝子治療											○	
薬剤スクリーニング												○
再生医療への可能性			○									
文献		2)	3)	5)	6)	7)	8)	12)	13)	16)	17)	18)

小児神経疾患を対象とした代表的な疾患 iPS 細胞研究のテーマ別分類概要を示す。詳細は本文・文献を参照。ALD：副腎白質ジストロフィー (adenoleukodystrophy), PMD：Pelizaeus-Merzbacher 病, FD：家族性自律神経失調症 (familial dysautonomia)。

く一度失われた組織をもとに戻すことは不可能である」という難題をかかえており、hiPS 細胞はこれらの難題を解決しうる画期的なツールとして脚光を浴びている。本稿では小児神経疾患に関連する疾患 iPS 細胞研究についてテーマ別 (表) に紹介するとともに今後の展望について概説する。

■ 小児神経疾患のテーマ別病態解析

1) 細胞生物学的解析—脊髄性筋萎縮症 (SMA) を例に

疾患 iPS 細胞を用いた病態解析では、疾患感受性細胞へ分化させ、分化効率や細胞形態などの細胞生物学的な解析を行うことで、*in vitro* での病態再現が行われている。

疾患 iPS 細胞の最初の報告となった脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy : SMA) は脊髄前角細胞の変性を特徴とする下位運動ニューロン病であり、原因遺伝子として SMN1 遺伝子が同定されている。Ebert らは患者由来の iPS 細胞における運動ニューロンへの分化効率減少と患者由来のニューロン、アストロサイトにおける核内構造物の減少や SMN タンパク質の減少を示した。またこれらがバルプロ酸や tobramycin の投与で一部回復したと報告した²⁾。

ヒトには SMN1 遺伝子の相同性遺伝子である SMN2 遺伝子が存在し、両者はスプライシングパターンが異なり SMN1 からは完全長、SMN2 からは不完全長の SMN タンパク質が産生される。Corti らは一本鎖オリゴヌクレオチドを用いて患者 iPS 細胞の SMN2 遺伝子エクソン

7 に 1 塩基修復を行い、スプライシングパターンを SMN1 遺伝子様に戻した。すると患者由来の運動ニューロンにみられた分化能低下、細胞体縮小、軸索短縮、神経筋接合部位の縮小・減少が改善した。さらに遺伝子修復を施した iPS 細胞から分化させた運動ニューロンをモデルマウスに移植したところ生存期間の延長が認められ、再生医療への応用の可能性を示した³⁾。

2) 成熟ニューロンにおける機能的解析

ニューロンは興奮性ニューロンと抑制性ニューロンに分類される。両者の数と機能のバランスは大脳皮質を正常に機能させるうえで重要でありこのバランスが崩れることで難治性てんかんや精神発達遅滞をきたすと考えられている⁴⁾。

i) Dravet 症候群

Dravet 症候群は SCN1A 遺伝子変異により生じる難治性てんかんであり、モデルマウスを用いた解析より抑制性ニューロン障害による抑制回路機能不全が主な病態であると考えられているがいまだ不透明な部分も存在する。iPS 細胞技術は動物間・細胞間での表現型の違いを克服する解析法として期待されている。福岡大学の広瀬らとわれわれの研究グループは、患者由来の iPS 細胞から誘導した抑制性ニューロンに強い脱分極パルスを加えた際、発火頻度の低下が認められたと報告した⁵⁾。また Liu らは患者由来の興奮性・抑制性ニューロンにおいて Na⁺ 電流密度の増加・活動電位の閾値の低下・発火頻度の上昇を、抑制性ニューロンにおいて静止膜電位の脱分極傾向を示し過剰興奮状態であると報告した⁶⁾。さらに Jiao らは Dravet 症候群に加

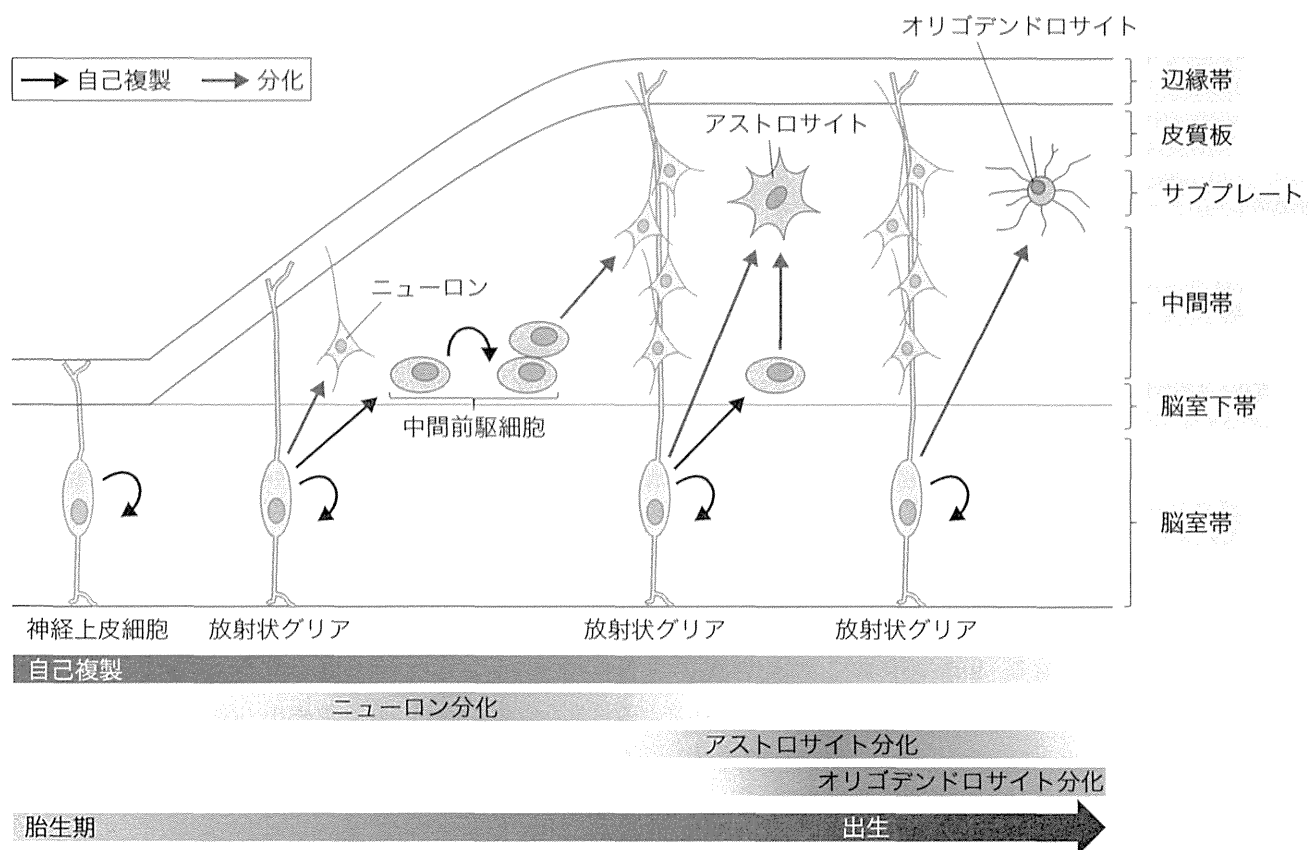


図1 大脳皮質における神経発生の継時的変化

大脳皮質における神経発生の継時的変化を示す。胎生初期に神経幹細胞（神経上皮細胞）は自己複製を繰り返し神経前駆細胞（放射状グリア）を生み出す。放射状グリアは自己複製または発生時期に応じた分化を行い、初期にはニューロンへ分化し、その後アストロサイト、オリゴデンドロサイトへ分化するようになる。

え、SCN1A 遺伝子変異が原因で生じる良性的全般てんかん熱性けいれんプラスの患者より興奮性ニューロンを分化させ、両者で Na^+ 電流の増強・ Na^+ チャネル不活性化遅延・発火頻度の上昇・自発性てんかん性放電を示した。これらは重症度の高い Dravet 症候群の細胞でより顕著であり、抗てんかん薬の添加により改善したと報告している⁷⁾。

ii) 自閉症スペクトラム障害 (ASD)

脳皮質での神経シナプス機能障害が自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder: ASD) の原因であると推測されている。しかしヒトでは ASD 関連遺伝子のホモ変異が稀であるのに対しマウスモデルはホモ変異でなければ表現型を示さず、適切な疾患モデルが存在していない。これを解決する手段として iPS 細胞技術は注目を浴びている。

ASD を呈する疾患のなかに、MECP2 遺伝子の変異が主な原因遺伝子として知られる Rett 症候群がある。

Marchetto らは患者由来の iPS 細胞から誘導した興奮性ニューロンにおいてシナプス密度の減少・樹状突起の減少・細胞体の縮小・カルシウムシグナルの変化・電気生理学的活動の欠如を示したと同時にシナプス密度の減少が IGF1 の投与で回復したと報告した⁸⁾。その他、脆弱 X 症候群、Angelman/Prader-Willi 症候群、Timothy 症候群などの疾患 iPS 細胞に関する報告もみられている⁹⁾。

3) グリア細胞における病態解析

大脳の神経発生は時期特異的な発生制御メカニズムにより厳密にコントロールされている^{10) 11)}。まず神経幹細胞（神経上皮細胞）の自己複製を繰り返し、神経前駆細胞（放射状グリア）を生み出した後、順次ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化が進む（図1）。分化に長期間を有するオリゴデンドロサイトを用いた研究報告はまだ少ない。

i) 副腎白質ジストロフィー (ALD)

副腎白質ジストロフィー (adrenoleukodystrophy : ALD) は副腎不全と中枢神経系の脱髄を認める白質変性疾患である。ABCD1 遺伝子の異常により極長鎖脂肪酸 (VLCFA) が中枢神経系などに蓄積することで発症すると考えられており小児大脳型 ALD (CCALD) は重症型、AMN (adenomyeloneuropathy) は緩徐進行性の成人型とされる。これまでモデルマウスを用いた解析において、ヒトの病理学的異常を忠実に再現しないという問題をかかえていた。この問題を克服する解析法として iPS 細胞技術に期待が集まっている。Jang らは CCALD と AMN の患者より樹立した iPS 細胞由来のオリゴデンドロサイトにおいて VLCFA の増加を示し CCALD でより高度であったと報告した。また高コレステロール血症薬の添加でこれらの表現型を改善させている¹²⁾。

ii) Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD)

PMD は重度の痙性四肢麻痺や精神運動発達遅滞を呈する先天性髄鞘形成不全症であり、原因遺伝子として PLP1 遺伝子が同定されている。PLP1 はオリゴデンドロサイトに存在する膜貫通タンパクであり髄鞘形成・維持に必要なタンパク質である。変異型や変異部位により臨床上の重症度に多様性を認めるのが特徴であり、病態解析をするうえで各患者の変異を有した疾患モデルを用いる必要がある。従来技術ではすべての変異について疾患モデルを作製することは困難であったが、iPS 細胞技術を用いれば理論上すべての患者由来の細胞を用いた病態解析が可能となる。われわれは重症度が異なる 2 例のミスセンス変異を有する患者より iPS 細胞を樹立しオリゴデンドロサイトを分化させ病態解析を行った。患者由来のオリゴデンドロサイトにおいて、変異型 PLP1 の小胞体への局在変化、小胞体ストレス^{*1}に対する感受性の亢進、アポトーシス細胞の増加や未熟な髄鞘様構造が認められ、小胞体ストレスが病態に関与することが示唆された。またこれらの表現型の一部は患者の重症度と一致しており、患者間の重症度の違いを再現することに成功した¹³⁾。

4) 三次元脳培養—遺伝性小頭症モデルの再現

次に *in vitro* で三次元脳構造の誘導に成功した報告と、遺伝性小頭症の病態モデルの再現に成功した報告を紹介する。門嶋らは三次元浮遊培養法を用いて大脳

皮質の 6 層構造や皮質形成時の inside-out pattern^{*2}、そしてヒトの皮質発生¹⁴⁾ に特徴的な外側放射状グリア^{*3}を含む大脳皮質構造を創り出した¹⁵⁾ (図 2)。遺伝性小頭症は、脳の発生過程において脳全体のサイズが小さくなる疾患である。複数の原因遺伝子が同定されているものの、モデル動物を用いた病態の再現が困難であり、適切な病態モデルの構築が求められていた。Lancaster らは CDK5RAP2 遺伝子変異を有する遺伝性小頭症の患者由来の iPS 細胞より三次元脳構造を分化させ、放射状グリア (神経前駆細胞) の減少・分裂異常、ニューロンへの早期分化など未熟な神経分化を示唆する所見が認められたと報告している。これは iPS 細胞技術を用いることでこれまで病態再現が困難であった疾患モデルの作製に成功した一例である¹⁶⁾。

2 遺伝子治療—21 トリソミー

iPS 細胞技術とゲノム編集技術を組み合わせることで染色体異常症に対する遺伝子治療への道も開かれつつある (5 章-1 参照)。

21 トリソミーは最も有病率の高い染色体異常症である。Jiang らはジンクフィンガーヌクレアーゼによるゲノム編集技術を用いて、X 染色体の不活化を担う XIST 遺伝子を患者 iPS 細胞の 21 番染色体の DYRK1A 遺伝子座に挿入した。その後 21 番染色体の過剰発現に由来する細胞増殖能低下や神経前駆細胞への分化能低下の所見がコントロールと同程度に回復し、1 本の 21

※1 小胞体ストレス

正常な高次構造に折り畳まれなかった変性タンパク質が小胞体に蓄積し生じる細胞へのストレスのこと。体内には小胞体ストレスを回避し生体の恒常性を維持する仕組みが備わっているが、変性タンパク質が過剰に蓄積し小胞体ストレスの強さが回避能力を越えると、細胞のアポトーシスが誘導され神経変性疾患などの原因となると考えられている。

※2 inside-out pattern

大脳皮質形成時、後から生まれた神経細胞が先に生まれた神経細胞を追い越してより外側に配置される現象のこと。

※3 外側放射状グリア

外側脳室下帯に存在する神経前駆細胞。マウスでは認められずヒトの大脳皮質に特徴的な細胞であり、ヒト大脳皮質のサイズ拡大や構造の複雑化に寄与していると考えられている。

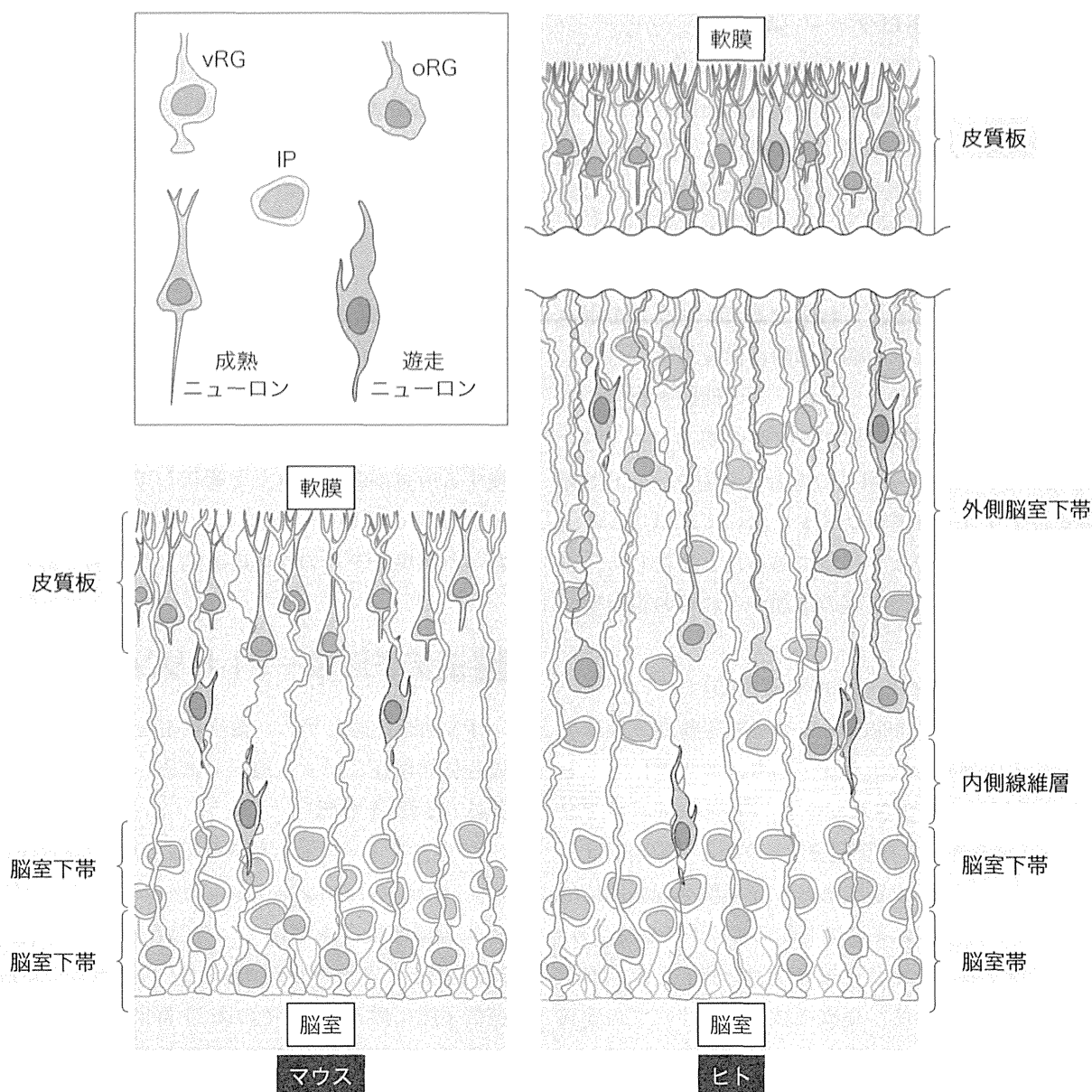


図2 ヒト大脳皮質発生の特徴

右にヒト、左にマウスの胎生期の大脳皮質発生を示す。大脳皮質内に分布する神経細胞は、神経幹細胞から神経前駆細胞（放射状グリア）を経て産生される。脳室周囲に上皮細胞として存在する脳室側放射状グリア（vRG）は中間前駆細胞を生み出した後、外側脳室下帯へ移動し外側放射状グリア（oRG）となり、増殖的対称分裂や増殖可能なニューロン前駆細胞を生み出す非対称分裂を行う。外側放射状グリアはマウスでは認められずヒトの大脳皮質に特徴的な細胞であり、ヒト大脳皮質のサイズ拡大や構造の複雑化に寄与していると考えられている。vRG：脳室側放射状グリア（ventricular-radial glia）、oRV：外側放射状グリア（outer-radial glia）、IP：中間前駆細胞（intermediate progenitor）。文献25より引用。

番染色体の遺伝子発現抑制に成功したと報告した¹⁷⁾。

③ 薬剤スクリーニング—家族性自律神経失調症（FD）を例に

既知の少数の化合物を用いて疾患表現型の改善を確

認する検討は多く行われているものの、創薬スクリーニングには①特定の細胞を大量培養し純化、②疾患に関連した表現型の再現、③ハイスループットスクリーニング解析系を必要とするため、報告が限られているのが現状である。ここでは家族性自律神経失調症のiPS細胞を用いて薬剤の一次スクリーニングを行っている

報告を紹介する。

LeeらはIKBKAP遺伝子変異を有する家族性自律神経失調症 (familial dysautonomia : FD) の患者由来のiPS細胞から誘導した神経堤前駆細胞で一次スクリーニングが可能であると報告した。IKBKAP遺伝子の正常スプライシング産物を増加させる化合物をスクリーニングし6,912種類の化合物のうち8個が有効であったと示した。この効果は他の細胞種では認められないことから疾患感受性細胞へ分化させスクリーニングする重要性が示された¹⁸⁾。

4 今後の課題・展望

iPS細胞には多くの可能性があるものの現状では疾患のモデル系として確立したという報告に留まることが多く、詳細な病態解析や治療への応用をめざすうえで解決すべき課題が残されている。

1) iPS細胞クローン間の差

iPS細胞クローン間には分化指向性や表現型の差が存在することが知られている¹⁹⁾。これはトランスジーン²⁰⁾の再活性化、初期化特有の遺伝子変化²¹⁾やエピジェネティックな変化²²⁾、女性由来細胞でのX染色体不活化状態の違い²³⁾、培養中の新規コピー数多型の出現²⁴⁾、エピゲノムの不安定性²⁵⁾などにより生じるとされている。これらの変化が細胞にどのような影響をおよぼすかは不明な点が多く今後さらなる解析が必要である。

2) 質の高い分化誘導法の開発

さまざまな分化誘導法の報告があるものの、分化効率が低い、分取が困難、培養手法が煩雑で分化に長期間を要するなどの問題が残る場合も少なくない。詳細な病態解析そして治療への応用に向けて、質のよい細胞を迅速に効率よく分化させる誘導法の開発に加え、分化細胞を的確に定量・分取する技術の開発が必要であろう。

3) 臨床応用へ向けて

創薬スクリーニングに向けたハイスループットな解析系の構築が必須である。細胞レベルで認められる薬剤効果は必ずしもヒトへの有用性を反映しないため、動物モデルなどを用いて投与経路、投与量、副作用の有無など検討を続ける必要がある。また再生医療の実現へ向けた腫瘍化しない安全な細胞の選定や誘導法の確

立、そしてよりヒトに近い動物モデルを用いて移植実験を行い安全性や有効性を慎重に検討する必要がある。

おわりに

課題は残るものの、iPS細胞を用いて病態の一部を再現することができ、薬剤スクリーニングや遺伝子治療へつながる報告も散見されるようになってきた。今後、さまざまな研究者がiPS細胞研究に携わることで多くの難治性疾患に対するアプローチが進展することを期待している。

文献

- 1) Takahashi K, et al : Cell, 131 : 861-872, 2007
- 2) Ebert AD, et al : Nature, 457 : 277-280, 2009
- 3) Corti S, et al : Sci Transl Med, 4 : 165ra162, 2012
- 4) McManus MF & Golden JA : J Child Neurol, 20 : 280-286, 2005
- 5) Higurashi N, et al : Mol Brain, 6 : 19, 2013
- 6) Liu Y, et al : Ann Neurol, 74 : 128-139, 2013
- 7) Jiao J, et al : Hum Mol Genet, 22 : 4241-4252, 2013
- 8) Marchetto MC, et al : Cell, 143 : 527-539, 2010
- 9) Kim DS, et al : Front Cell Neurosci, 8 : 109, 2014
- 10) Temple S : Nature, 414 : 112-117, 2001
- 11) Okano H & Temple S : Curr Opin Neurobiol, 19 : 112-119, 2009
- 12) Jang J, et al : Ann Neurol, 70 : 402-409, 2011
- 13) Numasawa-Kuroiwa Y, et al : Stem Cell Reports, 2 : 648-661, 2014
- 14) Florio M & Huttner WB : Development, 141 : 2182-2194, 2014
- 15) Kadoshima T, et al : Proc Natl Acad Sci U S A, 110 : 20284-20289, 2013
- 16) Lancaster MA, et al : Nature, 501 : 373-379, 2013
- 17) Jiang J, et al : Nature, 500 : 296-300, 2013
- 18) Lee G, et al : Nat Biotechnol, 30 : 1244-1248, 2012
- 19) Hu BY, et al : Proc Natl Acad Sci U S A, 107 : 4335-4340, 2010
- 20) Gore A, et al : Nature, 471 : 63-67, 2011
- 21) Lister R, et al : Nature, 471 : 68-73, 2011
- 22) Tomoda K, et al : Cell Stem Cell, 11 : 91-99, 2012
- 23) Hussein SM, et al : Nature, 471 : 58-62, 2011
- 24) Meissner A, et al : Nature, 454 : 766-770, 2008
- 25) Hansen DV, et al : Nature, 464 : 554-561, 2010

<筆頭著者プロフィール>

沼澤佑子：佐賀医科大学卒業後、慶應義塾大学医学部小児科学教室にて小児科診療に従事。慶應義塾大学大学院医学研究科博士課程に入学後、慶應義塾大学生理学教室にて大脳白質形成不全症の疾患iPS細胞研究に携わる。

ORIGINAL ARTICLE

Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients

KOJI ABE¹, YASUTO ITOYAMA², GEN SOBUE³, SHOJI TSUJI⁴, MASASHI AOKI², MANABU DOYU⁵, CHIKUMA HAMADA⁶, KAZUOKI KONDO⁷, TAKATOMO YONEOKA⁷, MAKOTO AKIMOTO⁷ & HIIDE YOSHINO⁸; ON BEHALF OF THE EDARAVONE ALS STUDY GROUP

¹Department of Neurology, Okayama University Hospital, Okayama, ²Department of Neurology, Tohoku University Hospital, Sendai (Yasuto Itoyama is currently affiliated with International University of Health and Welfare, Ohtawara, Japan), ³Department of Neurology, Nagoya University Hospital, Nagoya, ⁴Department of Neurology, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, ⁵Department of Neurology, Aichi Medical University Hospital, Nagakute, ⁶Faculty of Engineering, Tokyo University of Science, Tokyo, ⁷Development Division, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation, Tokyo, and ⁸Yoshino Neurology Clinic, Ichikawa, Japan

Abstract

Our objective was to confirm the efficacy and safety of edaravone in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. We conducted a 36-week confirmatory study, consisting of 12-week pre-observation period followed by 24-week treatment period. Patients received placebo or edaravone i.v. infusion over 60 min for the first 14 days in cycle 1, and for 10 of the first 14 days during cycles 2 to 6. The efficacy primary endpoint was changed in the revised ALS functional rating scale (ALSFRS-R) scores during the 24-week treatment. Patients were treated with placebo ($n = 104$) and edaravone ($n = 102$). Changes in ALSFRS-R during the 24-week treatment were -6.35 ± 0.84 in the placebo group ($n = 99$) and -5.70 ± 0.85 in the edaravone group ($n = 100$), with a difference of 0.65 ± 0.78 ($p = 0.411$). Adverse events amounted to 88.5% (92/104) in the placebo group and 89.2% (91/102) in the edaravone group. In conclusion, the reduction of ALSFRS-R was smaller in the edaravone group than in the placebo group, but efficacy of edaravone for treatment of ALS was not demonstrated. Levels and frequencies of reported adverse events were similar in the two groups.

Key words: *Amyotrophic lateral sclerosis, ALSFRS-R, edaravone, placebo, randomized trial*

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a refractory and progressive disease that causes selective degeneration of upper and lower motor neurons (1). Median survival from onset to death in ALS is reported to vary from 20 to 48 months (2).

Oxidative stress has been considered to be involved in the onset and progression of ALS (3). An established marker of oxidative stress is 3-nitrotyrosine (3NT), formed by reaction of the free radical peroxynitrite with tyrosine residues. A significant increase of 3NT was reported in spinal cord of transgenic mice expressing mutated

SOD1 (4) and in autopsied spinal cord of FALS patients with genetic mutation of SOD1 and sporadic ALS (SALS) patients (5). 3NT was found in motor neurons (6,7) and was elevated in cerebrospinal fluid of SALS patients (8). Moreover, oxidative stress induces nuclear translocation and activation of Nrf-2, a transcription factor that generates an anti-oxidative response (9). Nrf-2 translocation also occurs in mutant TDP-43 transfected cultured motor neuron cell lines (10–12). Consequently, drugs that eliminate free radicals might protect motor neurons from oxidative stress and free radical damage in ALS patients.

Correspondence: K. Abe, Department of Neurology, Okayama University Hospital, 2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama 700-8558, Japan. Fax: 086 235 7368. E-mail: abekabek@cc.okayama-u.ac.jp

This is an open-access article distributed under the terms of the CC-BY-NC-ND 3.0 License which permits users to download and share the article for non-commercial purposes, so long as the article is reproduced in the whole without changes, and provided the original source is credited.

(Received 12 December 2013; accepted 24 August 2014)

ISSN 2167-8421 print/ISSN 2167-9223 online © 2014 Informa Healthcare
DOI: 10.3109/21678421.2014.959024

RIGHTSLINK
Copyright Clearance Center