

＜シンポジウム (1)-4-2＞ iPS 細胞研究の現状と展望

iPS 細胞をもちいた脊髄再生医療の展望—基礎から臨床へ—

中村 雅也¹⁾ 戸山 芳昭¹⁾ 岡野 栄之²⁾

要旨：細胞移植による脊髄の再生医療を確立するために、われわれはラットおよびサル脊髄損傷に対する神経幹細胞移植の有効性と安全性を報告してきた。しかし、胎児由来組織を使用することにもなう倫理的問題のために、いまだ臨床応用にはいたっていない。本稿では、われわれがおこなってきた脊髄損傷に対するマウス、さらにヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）をもちいた細胞移植に関する基礎研究を紹介し、今後の臨床応用にむけた課題とその取り組みについて概説する。

（臨床神経 2013;53:1013-1015）

Key words：神経前駆細胞，細胞移植，脊髄損傷

はじめに

集学的医療の進歩により、脊髄損傷患者の平均余命は健康人と変わらなくなってきた。しかし医療の発達した現代でも、損傷された脊髄を治療する有効な手段はいまだ確立されていない。その一方で、近年の神経科学、とくに幹細胞学の目覚ましい進歩により、脊髄損傷に対する細胞移植をはじめとする様々な治療法に関する基礎研究が多数報告されるようになった。これらの成果により、損傷脊髄でも微小環境が整えば再生することが示され「中枢神経系は一度損傷を受けると再生しない」という通説はもはや過去のものとなりつつある。

本稿では、われわれがこれまでおこなってきた細胞移植研究、とくに人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell; iPS 細胞）に関する基礎研究の現状に触れながら、脊髄再生医療における細胞移植療法の現状と今後の展望について概説する。

脊髄損傷に対する細胞移植療法

われわれは胎児由来神経幹/前駆細胞（neural stem/progenitor cells; NS/PCs）に着目し、ラット NS/PCs をラット損傷脊髄に、さらにヒト NS/PCs をサル損傷脊髄に移植し、運動機能の良好な回復がえられることを報告した¹⁾²⁾。しかし NS/PCs をえるためには中絶胎児からの細胞採取が必須であり、倫理的観点から我が国における臨床応用は困難といわざるをえない。また胎児由来 NS/PCs を移植治療にもちいる際、他家移植であるため免疫拒絶がおこる可能性があり、細胞移植治療における大きな問題の一つとなっている。

一方、McDonald らはマウス ES 細胞から誘導した NS/PCs

をラット損傷脊髄へ移植し、良好な機能回復がえられることを報告した³⁾。われわれも ES 細胞から NS/PCs を誘導するシステムを構築し⁴⁾、マウス ES 細胞由来 NS/PCs をマウス損傷脊髄に移植し、軸索の再生と再髄鞘化および血管新生をみとめ、良好な下肢運動機能の改善をみとめた⁵⁾。しかしヒトへの臨床応用を考えれば、ES 細胞の樹立には不妊治療における余剰胚をもちいるため、胎児由来 NS/PCs と同様に倫理的問題は避けられない。

iPS 細胞をもちいた脊髄損傷治療

前述した諸問題に解決の糸口を与えたのが、山中伸弥教授らにより樹立された iPS 細胞である⁶⁾⁷⁾。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り、先に述べた倫理的問題や免疫拒絶の問題を解決できる技術として期待されている。

マウス iPS 細胞由来 NS/PCs をもちいた脊髄損傷治療

まず、前述したマウス ES 細胞の NS/PC への分化誘導法をマウス iPS 細胞に応用し、マウス iPS 細胞由来 NS/PC (iPS-NS/PC) を作製した。さらにその安全性を確認するために、免疫不全マウス的大脑線条体に移植した。その結果、分化誘導後の iPS-NS/PC 内に残存する分化抵抗性の未分化細胞の比率が 0.01% より高いと腫瘍形成がおこりやすいことが判明した⁸⁾。この結果を踏まえて、マウス iPS 細胞のうち、腫瘍形成をみとめなかった“安全な”335D1 と腫瘍形成がみとめられた“危険な”256H18 の 2 つの iPS 細胞株をそれぞれ神経分化誘導し、マウス損傷脊髄内に移植をおこなった。その結果、“危険な”256H18 由来 iPS-NS/PCs 移植群は脊髄内で巨大な奇形腫を形成し、下肢運動機能の低下がみとめら

¹⁾ 慶應義塾大学医学部整形外科（〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35）

²⁾ 慶應義塾大学医学部生理学

（受付日：2013 年 5 月 29 日）

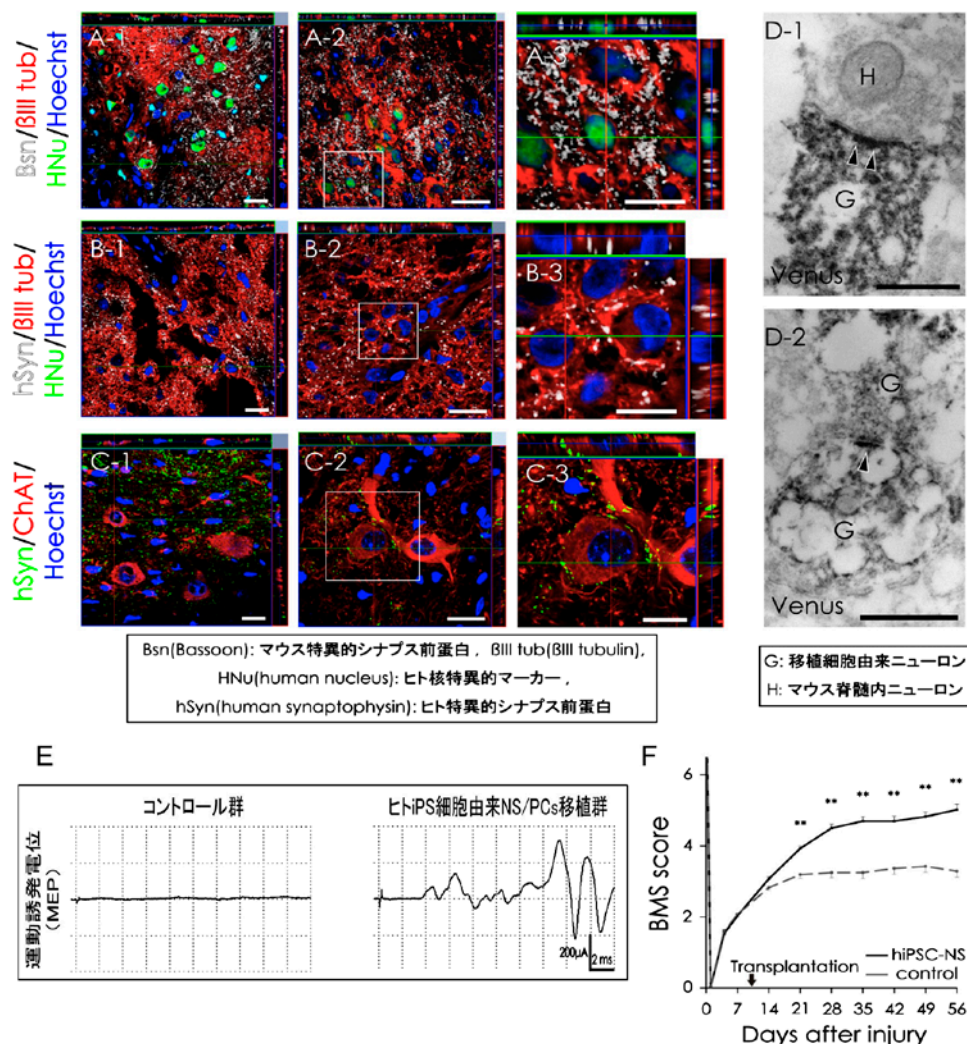


Fig. 1 免疫不全マウス脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来 NS/PCs 移植.

免疫組織学的および電子顕微鏡による解析より、ヒト iPS 細胞由来ニューロンはマウスニューロンとシナプスを形成していた (A~D)。運動誘発電位を計測したところ、移植群でのみ波形が検出された (E)。マウス脊髄損傷後の下肢運動機能評価法 (Basso mouse scale score; BMS score) において移植群はコントロール群にくらべて有意な改善をみとめた (F)。(文献 10 より改変)

れた。一方で“安全な”335D1 由来 iPS-NS/PCs 移植群では腫瘍形成をみとめず、対照群と比較して下肢運動機能の有意な回復がみられた。このことより、マウス iPS-NS/PC は、移植前に厳密にその安全性 (未分化細胞の混入) を検討すれば、脊髄損傷治療への有用な治療法となることが示唆された⁹⁾。

ヒト iPS 細胞由来 NS/PCs をもちいた脊髄損傷治療

次に臨床応用へ向けて、ヒト iPS 細胞をもちいた脊髄損傷治療への有効性と安全性の検討をおこなった。成人皮膚由来線維芽細胞にレトロウイルスをもちいて *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* を導入して作製し、安全性を確認した 201B7 細胞株から分化誘導した NS/PCs (ヒト iPS-NS/PC) を、免疫不全マウスの損傷脊髄内に移植した。移植細胞はマウス脊髄内で生着し、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロ

サイトへ分化した。移植細胞の約 50% が β III tubulin 陽性のニューロンへと分化しており、そのうちの約 70% が GAD67 陽性の GABA 作動性ニューロンへと分化していた。さらに、免疫組織学的解析および免疫電顕による解析からヒト iPS-NS/PC 由来ニューロンとマウスニューロンがシナプスを形成していることが明らかになった (Fig. 1A~D)。運動誘発電位を計測したところ、ヒト iPS-NS/PC 移植群では波形が検出されたのに対し、コントロール群では波形は検出されなかった (Fig. 1E)。このことより、移植されたヒト iPS-NS/PC がマウス脊髄内で介在ニューロンとして機能して神経回路の再構築に寄与している可能性が示唆された。また、移植細胞由来アストロサイトによる神経栄養因子の自己分泌、傍分泌作用により血管新生、神経再生、組織保護作用もみとめられた。これらの結果として Basso mouse scale による下肢運動

機能評価において良好な回復がみとめられた (Fig. 1F). さらに, 長期にわたるヒト iPS-NS/PC 移植の安全性を確認するために脊髄損傷後 112 日まで経過観察したところ, 移植群では良好な下肢運動機能の回復が継続し, 腫瘍形成もみとめられなかった¹⁰⁾.

おわりに

これまでわれわれが報告してきた移植研究では, iPS 細胞樹立時における初期化遺伝子の導入にレトロウイルスをもちいてきた. レトロ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. この問題を解決するため, ゲノム挿入の起こらないプラスミドベクターをもちいた方法, 染色体外に挿入しいずれ消失するエピソomalベクターの導入などが相次いで報告されている. 今後, これらの方法で作製されたヒト integration free iPS細胞をもちいて, 1) 移植前の安全な iPS 細胞クローンの選別法, 2) 最終産物である iPS-NSC の安全性基準の確立, 3) GMP 準拠した臨床に使用できる iPS-NSC の製造をおこなっていく予定である.

※本論文に関連し, 開示すべき COI 状態にある企業, 組織, 団体はいずれもありません.

文 献

- 1) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neuro-

genesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 2002;69:925-933.

- 2) Iwanami A, Kaneko S, Nakamura M, et al. Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates. *J Neurosci Res* 2005;80:182-190.
- 3) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999;5:1410-1412.
- 4) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, et al. Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 2008;26:3086-3098.
- 5) 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* 2009;4:e7706.
- 6) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
- 7) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.
- 8) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009;27:743-745.
- 9) 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;107:12704-12709.
- 10) Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16825-16830.

Abstract

Current status and perspective on regenerative medicine for spinal cord injury using iPS cell

Masaya Nakamura, M.D., Ph.D.¹⁾, Yoshiaki Toyama, M.D., Ph.D.¹⁾ and Hideyuki Okano, M.D., Ph.D.²⁾

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

²⁾Physiology, Keio University School of Medicine

Stimulated by the 2012 Nobel Prize in Physiology or Medicine awarded for Shinya Yamanaka and Sir John Gurdon, there is an increasing interest in the iPS cells and reprogramming technologies in medical science. While iPS cells are expected to open new era providing enormous opportunities in the biomedical sciences in terms of cell therapies for regenerative medicine, safety-related concerns for iPS cell-based cell therapy should be resolved prior to the clinical application of iPS cells. In this symposium, the pre-clinical investigations of cell therapy for SCI using neural stem/progenitor cells derived from iPS cells, and their safety issues *in vivo* are outlined.

(Clin Neurol 2013;53:1013-1015)

Key words: neural progenitor cells, cell transplantation, spinal cord injury