慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	iPS細胞移植による機能的神経回路網再建および悪性脳腫瘍治療法に関する基礎的研究
Sub Title	Cell therapy by human iPSC-transplantation for functional repair of stroke-damaged neural circuitry and malignant brain tumor
Author	峯, 裕(Mine, Yutaka) 戸田, 正博(Toda, Masahiro) 井上, 賢(Inoue, Satoshi) 吉田, 一成(Yoshida, Kazunari) 岡野, 栄之(Okano, Hideyuki)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	iPS細胞を用いた細胞療法に注目が集まっているが, 移植後の拒絶反応や腫瘍形成など問題点が多い。本研究では改良した方法を用いて, 安定した自殺遺伝子導入ヒトiPS細胞を樹立した。神経幹細胞に分化した同細胞をマウス脳内に移植したところ, 脳内に生着し生存した。また薬物投与にて細胞除去する事が出来た。同細胞を悪性脳腫瘍モデル動物に移植したところ, 腫瘍の縮小と生存延長を認めた。以上より, 開発した細胞の治療用幹細胞としての有用性が示された。 Cell therapy using iPS cells is attractive for regenerative medicine, cancer, etc., however, a lot of concerns such as rejection and tumor formation after transplantation remain at moment. To solve those issues, we have established the stable cell line of suicide gene-induced human iPSCs by modified method. When neural stem cells (NSCs) derived from suicide gene-induced human iPSCs were transplanted into mouse brain, those cells were alive and survived well, then wiped out by administration of drug. When those NSCs were transplanted into the brain of malignant brain tumor model animals, the tumor volume reduced and transplanted animals survived longer. Those findings suggested that our established human iPSC line might be useful as a therapeutic stem cells for both stroke and tumor.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2016 課題番号 : 26462171 研究分野 : 脳神経外科, 神経移植
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26462171seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　６　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４６２１７１

研究課題名（和文）iPS細胞移植による機能的神経回路網再建および悪性脳腫瘍治療法に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Cell therapy by human iPSC-transplantation for functional repair of stroke-damaged neural circuitry and malignant brain tumor

研究代表者

峯　裕（Mine, Yutaka）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：１０３０６７３０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞を用いた細胞療法に注目が集まっているが、移植後の拒絶反応や腫瘍形成など問題点が多い。本研究では改良した方法を用いて、安定した自殺遺伝子導入ヒトiPS細胞を樹立した。神経幹細胞に分化した同細胞をマウス脳内に移植したところ、脳内に生着し生存した。また薬物投与にて細胞除去する事が出来た。同細胞を悪性脳腫瘍モデル動物に移植したところ、腫瘍の縮小と生存延長を認めた。以上より、開発した細胞の治療用幹細胞としての有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：Cell therapy using iPS cells is attractive for regenerative medicine, cancer, etc., however, a lot of concerns such as rejection and tumor formation after transplantation remain at moment. To solve those issues, we have established the stable cell line of suicide gene-induced human iPSCs by modified method. When neural stem cells (NSCs) derived from suicide gene-induced human iPSCs were transplanted into mouse brain, those cells were alive and survived well, then wiped out by administration of drug. When those NSCs were transplanted into the brain of malignant brain tumor model animals, the tumor volume reduced and transplanted animals survived longer. Those findings suggested that our established human iPSC line might be useful as a therapeutic stem cells for both stroke and tumor.

研究分野：　脳神経外科、神経移植

キーワード：　iPS細胞　脳梗塞　悪性脳腫瘍　再生医療　神経移植

１．研究開始当初の背景

脳血管障害（脳梗塞、脳出血、くも膜下出血）は国民病とも言うべき疾患であり、かつては本邦死亡原因の第1 位であった。血流障害または物理的損傷により神経細胞、各種膠細胞など脳実質細胞を壊死させる。神経回路網を破壊・損傷し、重篤な神経症状を来し最悪の場合不幸の転帰をたどる。脳梗塞超急性期に対する組織プラスミノーゲンアクティベーター投与・危険因子管理・公衆衛生の改善により、脳血管障害の死亡者数は現在第３位に減少したが、依然として死亡率は高い。有病者は現在173 万人で増加傾向にあり、救命し生存しても四肢麻痺のみならず、精神活動や脳機能全般に高度障害を残すことが多い。しかし、現在の治療法は予防と悪化防止であり、リハビリテーションなどで多少の機能回復は得られるものの、中枢神経の特徴である神経回路網の損傷を修復し完全な機能回復を得るのは困難である。機能回復、殊に高次脳機能の回復を目指して完全な神経回路網修復をなし得る治療方法が求められる。損傷した神経回路網を再構築する担い手として、幹細胞は非常に有用と考えられている。その方法としては**①側脳室下帯や海馬顆粒下層に存在する内在性神経幹細胞の賦活化**および**②幹細胞移植**がある。ルンド大学Olle Lindvall 教授のグループは、脳梗塞後に自己脳内の内在性神経幹細胞から神経新生が起こることを2002年に報告し、数ヶ月に渡り脳梗塞部位へ移動することが知られている。しかし、その新生神経の生存率は極めて低く、これのみで神経回路網再構築は不可能である。この為、②が損傷神経回路網の再構築の手段として必要である。移植ドナーの多くは間葉系幹細胞を用いた血管内投与による神経保護作用が主であり、厳密な意味で回路網再構築を目指したものではない。私達は神経幹細胞移植にて、脳虚血後の内在性神経新生が発症後３ヶ月以上、長期に渡って促進されること、ヒト神経幹細胞が宿主とシナプス形成し得ること、機能回復を促すこと、更には炎症反応を改善することを見出し、上記①と②のコンビネーションが神経回路網再建ならびに機能回復を目的とした治療方法となりうることを示した。

脳実質に対する移植に関しては、その目的、至適な移植時期・細胞など定まってない事項や明らかでない点が多い。神経幹細胞にも色々な段階があるが、私達は以前より神経上皮型幹細胞が移植ドナー細胞として最適であると考え示してきた。臨床応用を考えた場合、倫理的・実用的問題を解決しうるヒトiPS 細胞由来細胞はドナー細胞として理想的である。実際、申請者が海外で従事した研究でも、移植ドナー細胞としてのヒトiPS 細胞由来神経上皮型幹細胞の有用性が示されている。

これらの研究の対象は急性期であるが、実際の医療現場で遭遇する機会が多い脳血管障害は亜急性期、慢性期である。しかし、亜急性期・慢性期に対しては、抗炎症作用を狙った間葉系幹細胞を用いた経動脈・静脈的投与による研究のみで、神経回路網再構築を目的とした研究は殆ど成されていない。今回我々は、将来的な臨床応用を目標として、亜急性期又は慢性期脳血管障害の神経回路網再構築を目的とする脳実質へのiPS 細胞由来神経上皮型幹細胞の移植実験を計画した。また、脳神経外科領域にて遭遇する機会が多く予後不良である悪性脳腫瘍、特に悪性神経膠腫・神経膠芽腫に幹細胞が遊走する事から、iPS 細胞を用いたこれら腫瘍に対する治療効果も検討する。

２．研究の目的

本研究の最終目標は、脳血管障害等の脳疾患に対するヒトiPS 細胞由来神経幹細胞移植治療の実現である。これを成し遂げるには安全性と有効性の両者を達成しなくてはならない。明らかにしたい項目は以下の通りである。

1) 移植ヒトiPS 細胞由来神経上皮型幹細胞

の長期生存、腫瘍形成など安全性の確認
2) 亜急性期・慢性期脳梗塞モデル動物に移植し、神経新生促進、抗炎症作用の有無の確認
3) ホスト脳内神経細胞との間に機能的シナプスを形成に関する電気生理学的検討
4) 神経上皮型幹細胞による移植後長期に渡る疾患モデル動物の機能回復の確認。

３．研究の方法

1) 既報(Oki et al.: Stem Cells 30: 1120-1133, 2012; Falk et al.: PLoS One 7:e29597)に準じ、ヒトiPS 細胞およびiPS 細胞由来神経上皮型幹細胞を培養・増殖し、神経移植に必要な細胞数を確保する。
2) 成体雄性ラット・マウスを麻酔し、定位脳手術装置に固定する。1) で確保した細胞をラット･マウス脳内に移植する。移植後1 または6 ヶ月後に4%パラフォルムアルデヒド(PFA)を経心臓的に灌流固定し断頭する。これは既報(Mine et al.: Neurosurgery 64: 741-753, 2009)の方法に準じたものである。
3) 脳切片を免疫組織化学的に検討し、移植iPS 細胞の生着・生存・分化・増加度や腫瘍化の有無を観察する。移植ヒト幹細胞による脳損傷及び内在性神経幹胞による神経新生への影響も評価する。
4) 1)-3)と平行して、既報(Oki et al.: Stem Cells 30: 1120-1133, 2012; Mine et al.: Neurobiol Dis 52: 191-203, 2013)の方法に準じ成体雄性ラット・マウスを用いて片側中大脳動脈閉塞モデルを2)と同様の麻酔下に作成する。グループによっては、脳梗塞後にBrdU を腹腔内投与する。また脳梗塞作成前後で神経学的・行動学的に評価する。
5) 脳梗塞後（2-8 週間）、動物を定位手術固定器に固定し、ハミルトンシリンジを用いてヒトiPS 細胞やiPS 細胞由来神経幹細胞を同側に脳内移植する。移植4 週間後に灌流固定・断頭しホスト脳を摘出する。
6) 脳切片を免疫組織化学的に検討し、移植iPS 細胞の生着・生存、新生神経細胞の有無やその増加度、神経新生への影響、そしてヒト幹細胞自身の生着・分化・成熟を評価し、機能回復機序、相互作用・影響の持続期間や最も効果の高い移植時期を探る。
7) また成体ラット・マウス脳内に2)や5)に準じた方法で悪性脳腫瘍細胞を移植する。その後、EGFP 等で標識したヒトiPS 細胞（および由来神経幹細胞）を腫瘍と同側或いは対側に移植する。幹細胞移植1 ヶ月後に灌流固定・断頭する。
9) 8)で摘出した脳標本から脳切片を作成し、免疫組織科学的に移植iPS 細胞の腫瘍への遊走・分化度などの挙動、腫瘍細胞の挙動等を評価する。

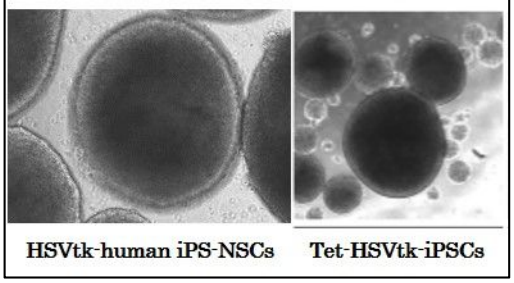
以上より、神経回路網再構築を効果的に達成し得る方法、神経機能回復機序を解明する。

４．研究成果

１）治療用幹細胞（therapeutic stem cells, TSCs）の樹立

38C2 mouse iPS cells（ Nanog-GFP-IRES-Puro ）に lentivirus を用いて humanized and CpG-free HSV1tk を導入し、治療用 mouse 幹細胞を作成し GCV に対する感受性を確認した。また human iPS cells (253G1 と integration-free 1210B2)を用いて、上記同様、humanized and CpG-free HSV1tk を iPSC の段階で導入し、GCV に対する感受性を確認した。しかし、EBs や neurosphere 作成効率が悪く、iPS-NSC 2nd neurosphere に同遺伝子を導入した TSC を確立した（図１）。また、Tet-on system および HSVtk 遺伝子を導入した human iPSCs を作成して NSCs に分化させた TSC も樹立した（図１）。

図１　HSVtk遺伝子導入細胞



２）脳血管障害に対する再生治療開発

片側中大脳動脈閉塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)**モデル作成および行動学的評価法**(stepping test、cylinder test、stair case test **等)が安定して可能となった。このモデルに対し、脳梗塞作成７日後に上記** TSC **を病側線条体に移植した。全例生存しており、現在行動学的評価を行っている。また今後、組織学的・免疫組織化学的に評価する。**

３）悪性脳腫瘍に対する遺伝子細胞療法開発

In vitro **にて** mouse iPS cell **由来** TSC-NSC **は** U87, U251 **を** GCV **連日投与** 7 **日でほぼ死滅させた。**human iPS-NSC **由来** TSC **に関しても上記同様の** bystander killing effect **を確認した。**In vivo **では、ヒト悪性脳腫瘍モデル動物として、ヌードマウスに** U87, U251**、またヒト脳腫瘍幹細胞である** HG008 **を** 1×10^5 **個移植しモデルとして確立した。**U87 **を用いた悪性脳腫瘍モデルマウスに** human iPS-NSC **由来** TSC **を移植し** GCV **投与したところ、平均生存期間は対照群** 19.3 **日**(n=6)**、治療群は** 33.8 **日（**n=6**）と統計学的に有意に延長し（図２）、カプランマイヤー生存曲線でも有意に延長を認めた。**

また、IVIS (in vivo imaging system)**による頭蓋内脳腫瘍細胞の観察でも、対照群では腫瘍増大（細胞増殖）を認めるのに対し、治療群では腫瘍体積の著明な減少を認めた（図３）。以上より、開発したヒト** iPS **細胞由来治療用幹細胞の有用性が証明された。**

図２　生存曲線

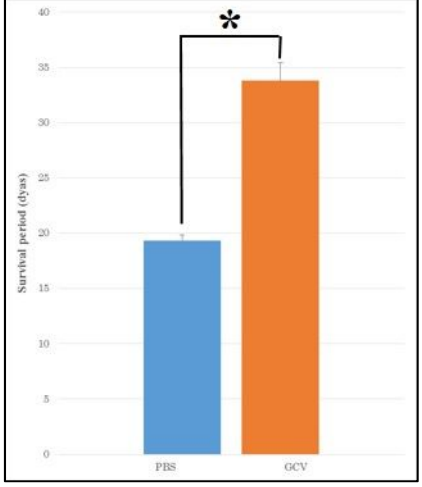
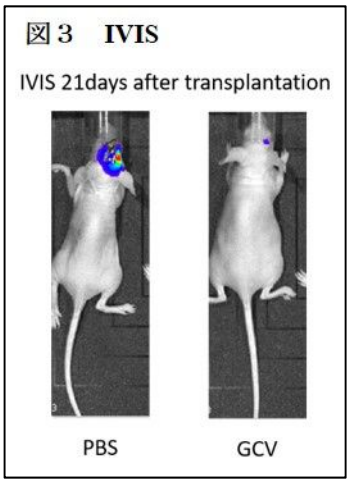


図３　IVIS



５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　1　件）

① Arai N, Inaba M, Ichijo K, Kagami H, **Mine Y.** Thyrotropin-producing pituitary adenoma simultaneously existing with Graves' disease: a case report. J Med Case Rep 11:9, 2017. doi: 10.1186/s13256-016-1172-4.**査読有。**

〔学会発表〕（計　23　件）

① **峯　裕、佐藤瑞仁、各務宏、稲葉真、**Intra-arterial infusion of fusdil hydrochloride improves neurological deterioration by severe aneurysmal SAH、STROKE 2017、2017-03-17、**大阪国際会議場（大阪府大阪市）**

② 峯　裕、佐藤瑞仁、各務宏、稲葉真、Direct clipping for intracranial aneurysm by 3D Exoscope、第 23 回日本神経内視鏡学会、2016-11-17、東京ドームホテル（東京都文京区）

③ 峯　裕、佐藤瑞仁、各務宏、稲葉真、Usefulness of virtual 3D neuroendoscopy combined with neuronavigation in evacuation of intracranial hematoma、第 23 回日本神経内視鏡学会、2016-11-17、東京ドームホテル（東京都文京区）

④ 峯　裕、佐藤瑞仁、各務宏、稲葉真、Intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride improves neurological deterioration by severe aneurysmal SAH、第 75 回日本脳神経外科学会学術集会、2016-09-29、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

⑤ **Mine Y**, Yoshida K, Murakami H, Ishihara M, Kagami H, Inaba M. 3D simulation and neuronavigation for the surgery of paraclinoid aneurysm might contribute to the safe direct surgery and the preservation of visual function. 7th World Congress of the World Federation of Skull Base Surgery. 2016-06-16、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

⑥ 峯　裕、吉田啓佑、各務宏、稲葉真、Intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride improves deteriorations by severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage、STROKE2016、2016-04-16、ロイトン札幌（北海道札幌市）

⑦ 峯　裕、吉田啓佑、各務宏、稲葉真、3D simulation and neuronavigation for the surgery of paraclinoid aneurysms. STROKE2016、2016-04-16、ロイトン札幌（北海道札幌市）

⑧ 峯　裕、石森久嗣、吉田啓佑、各務　宏、村上秀樹、石原雅行、稲葉　真、Usefulness of virtual 3D neuroendoscopy combined with neuronavigation in evacuation of intracranial hematoma. 第 22 回日本神経内視鏡学会、2015-11-06、ホテル大観荘（宮城県松島町）

⑨ 峯　裕、吉田啓佑、西本真幸、市村真也、菊地亮吾、原　晃一、各務　宏、稲葉　真、Combination therapy of cilostazol and intra-arterial infusion of fasudil hydrochloride might improve the neurological deteriorations by severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage. 第 74 回日本脳神経外科学会学術集会、2015-10-15、ロイトン札幌（北海道札幌市）

⑩ 峯　裕、吉田啓佑、村上秀樹、石原雅行、各務　宏、稲葉　真、3D simulation and neuronavigation for the surgery of paraclinoid aneurysms. 第 27 回日本頭蓋底外科学会、2015-07-10、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

⑪ Inoue S, **Mine Y,** Hara K, Iwai H, Komaki Y, Tsukada H, Nakamura M, Okano HJ, Yoshida K, Okano H. Development of less invasive transient middle cerebral artery occulusion model on common marmoset and transplantation of NS/PCs. The 13th annual meeting of ISSCR. 2015-06-26. Stockholm, Sweden.

⑫ **Mine Y**, Kanai R, Miyoshi H, Okano H, Toda M. Establishment of therapeutic stem cells derived from induced pluripotent stem cells for malignant glioma. The 13th annual meeting of ISSCR 2015-06-26. Stockholm, Sweden.

⑬ **Mine Y,** Tatarishvili J, Oki K, Mooni E, Kokaia Z, Lindvall O. Grafted human neural stem cells enhance several steps of endogenous neurogenesis and improve behavioural recovery after middle cerebral

after occlusion in rats. 第 12 回日本再生医療学会総会、2015-03-19、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

⑭ **Mine Y**. Ishimori H., Murakami H., Nishimoto M., Kagami H., Inaba M., Ishihara M. Preservation of visual function the operation of paraclinoid aneurysms. The 25th annual meeting of North American Skull Base Society. 2015-02-21. Tampa, FL, U.S.A.

⑮ 峯　裕、石森久嗣、西本真章、各務宏、村上秀樹、石原雅行、稲葉真、Experiences of virtual 3D neuroendoscopy.第 21 回日本神経内視鏡学会、2014-11-28、浅草ビューホテル（東京都台東区）

⑯ 峯　裕、石森久嗣、西本真章、堀越知、村上秀樹、各務宏、石原雅行、稲葉真、Treatment for cerebral venous sinus thrombosis with hemorrhagic infarction. Poster presentation、第 73 回日本脳神経外科学会学術集会、2014-10-09、グランドプリンス新高輪（東京都品川区）

⑰ 峯　裕、西本真章、各務宏、稲葉真、Unruptured ACA aneurysm in patient with amyotrophic lateral sclerosis –case report-、第 21 回京浜脳神経外科フォーラム、2014-10-03、JALCITY 川崎（神奈川県川崎市）

⑱ 峯　裕、石森久嗣、村上秀樹、石原雅行、Prevention of visual function in the operation of paraclinoid aneurysms、第 26 回日本頭蓋底外科学会、2014-06-20、幕張メッセ（千葉県千葉市）

⑲ 峯　裕、西本真章、各務宏、稲葉真、Management and diagnosis of cerebral venous (sinus) thrombosis (CVT) –case report-. Oral presentation. 第 21 回鶴見区脳神経カンファレンス、2014-05-13、済生会横浜市東部病院（神奈川県横浜市）

⑳ 峯　裕、石森久嗣、村上秀樹、石原雅行、Experiences of virtual 3D neuroendoscope、第 123 回日本脳神経外科学会関東支部学術集会、2014-04-12、昭和大学（東京都品川区）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
なし

○出願状況（計　0　件）

○取得状況（計　0　件）

〔その他〕
ホームページ等　なし

６．研究組織

(1)研究代表者
峯　裕　　（MINE, Yutaka）
慶應義塾大学・医学部・訪問研究員
研究者番号：１０３０６７３０

(2)研究分担者
戸田　正博　（TODA, Masahiro）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：２０２１７５０８

井上　賢　　（INOUE, Satoshi）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：７０４４５３７８

(3)連携研究者
吉田　一成　（YOSHIDA, Kazunari）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：　７０１６６９４０

岡野　栄之　（OKANO, Hideyuki）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：　６０１６０６９４

(4)研究協力者
なし