

Title	脊髄損傷に対する細胞移植治療の向上を目的とした改良型ヒトiPS細胞の開発
Sub Title	Development of advanced human iPS-cells to improve the quality of cell transplantation therapy for spinal cord injury
Author	飯田, 剛(Iida, Tsuyoshi)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	ヒトiPS細胞由来神経幹/前駆細胞（以下iPSC-NS/PCs）移植治療の脊髄損傷モデル動物に対する有効性が報告されているが、慢性期脊髄損傷などの治療困難例への有効性確保が命題となっている。本研究により、DPPA3とUSP28というゲノム安定化に関わる遺伝子の発現が治療成績が良好なiPSC-NS/PCsで高いことがわかった。USP28とDPPA3の発現量をshRNAを用いたレンチウイルスで抑えることで治療効果が下がることもわかった。今後の研究で、USP28及びDPPA3の発現を多くした場合に治療効果がさらに増進するか否かということの評価すべきであり、今後もさらなる研究継続が必要である。 The efficacy of transplantation therapy of human iPSC-derived neural stem/progenitor cells (iPSC-NS/PCs) in animal models of spinal cord injury has been reported, but ensuring efficacy in difficult cases such as chronic spinal cord injury is challenging. In this study, we found that the expression of DPPA3 and USP28, genes involved in genome stabilization, was higher in iPSC-NS/PCs with good therapeutic outcome. We also found that the suppression of USP28 and DPPA3 with shRNA-based lentivirus reduced therapeutic efficacy of iPSC-NS/PCs for spinal cord injury. Further studies should be conducted to evaluate whether the therapeutic effect is further enhanced when the expression of USP28 and DPPA3.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2018～2021 課題番号：18K16674 研究分野：再生医療
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_18K16674seika

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.

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16674

研究課題名（和文）脊髄損傷に対する細胞移植治療の向上を目的とした改良型ヒトiPS細胞の開発

研究課題名（英文）Development of advanced human iPS-cells to Improve the quality of cell transplantation therapy for spinal cord injury

研究代表者

飯田 剛 (Iida, Tsuyoshi)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00594540

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞由来神経幹/前駆細胞（以下iPSC-NS/PCs）移植治療の脊髄損傷モデル動物に対する有効性が報告されているが、慢性期脊髄損傷などの治療困難例への有効性確保が命題となっている。本研究により、DPPA3とUSP28というゲノム安定化に関わる遺伝子の発現が治療成績が良好なiPS-NS/PCsで高いことがわかった。USP28とDPPA3の発現量をshRNAを用いたレンチウイルスで抑えることで治療効果が下がることもわかった。今後の研究で、USP28及びDPPA3の発現を多くした場合に治療効果がさらに増進するか否かということの評価すべきであり、今後もさらなる研究継続が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞由来神経幹/前駆細胞移植治療が脊髄損傷モデルに有効であることが報告されている。しかし、慢性期脊髄損傷などの治療困難例を細胞移植により改善させるためには、より良好な脊髄損傷治療に特化したiPS細胞を作成することが期待される。本研究により、ゲノム安定因子（USP28, DPPA3）をiPS細胞で高発現することで、良好な治療成績を有する細胞が作成できることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The efficacy of transplantation therapy of human iPSC-derived neural stem/progenitor cells (iPSC-NS/PCs) in animal models of spinal cord injury has been reported, but ensuring efficacy in difficult cases such as chronic spinal cord injury is challenging. In this study, we found that the expression of DPPA3 and USP28, genes involved in genome stabilization, was higher in iPSC-NS/PCs with good therapeutic outcome. We also found that the suppression of USP28 and DPPA3 with shRNA-based lentivirus reduced therapeutic efficacy of iPSC-NS/PCs for spinal cord injury. Further studies should be conducted to evaluate whether the therapeutic effect is further enhanced when the expression of USP28 and DPPA3.

研究分野：再生医療

キーワード：iPS細胞 脊髄損傷 神経幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷とは、外傷などによる脊髄実質の損傷を契機に、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が、損傷した脊髄そのものを修復する治療法は未だ確立されていない。世界中で脊髄再生の研究が進められ、中枢神経損傷に対する胎性神経組織移植やES細胞由来神経幹/前駆細胞移植の有効性が報告され始めたが、本邦では倫理的観点からこれらを利用した臨床応用は困難であった。しかし京都大学の山中らが、体細胞へ初期化因子を導入し、自己複製・多分化能を持つiPS細胞(以下iPSCs)を樹立することに成功し(Takahashi et al. 2006, 2007)、上述の倫理的問題を回避する有力な細胞ツールになり得ると考えられている。実際我々は、これまでにヒトiPS細胞由来神経幹/前駆細胞(以下iPSC-NS/PCs)移植治療の脊髄損傷モデル動物での有効性を報告している(Nori et al. 2011, Kobayashi et al. 2012)。一方で、移植後に細胞が腫瘍化する問題も看過できないが(Nori et al. 2015, Iida et al. 2017, Okubo et al. 2017)、iPS細胞作成のための初期化因子が宿主DNAに組み込まれない新しいiPS細胞

(integration-free iPS細胞)(Okita et al. 2011)と新たな神経誘導プロトコルの確立(Sugai et al. 2016)から、より安全な細胞移植治療が行えるようになってきた。移植する細胞の安全性が高まっている一方で、脊髄再生治療のツールとしiPSC-NS/PCs移植治療が広く普及するためには、今後も乗り越えていくべき以下の問題がある。

(1)；安全な細胞株の中でも、一部の細胞株では移植後の治療成績が悪く、原因解明および改善が必要

(2)；慢性期脊髄損傷では、細胞移植治療の治療効果が既存の方法では得られない

(3)；良好な治療効果を有するiPSC-NS/PCs株においても、ES細胞由来NS/PCsや胎児組織由来NS/PCsと同等もしくはそれ以下の機能回復しか得られない

後述する申請者の過去の研究結果から、iPSC-NS/PCs株の治療効果の優劣を決める運命

は、iPS細胞の時点で決まっているということがわかっている。本研究テーマは、上述した(1)から(3)の問題を解決する方法として、「脊髄損傷治療に特化した新しいiPS細胞を開発し、治療効果の向上を得られないか」という学術的問いから生まれた研究である。

2. 研究の目的

iPS細胞が2006年に登場して以来、世界中でiPS細胞の研究が盛んに行われており、臓器再生医療分野においても注目されている。京都大学が報告したオリジナルのiPS細胞(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Mycの4つの初期化因子を用いてレトロウイルスで作成したiPS細胞)のみならず、他の初期化因子やベクター・ウイルスを用いた方法が数多く報告されてきており(Yu et al. 2007, Lowry et al. 2008, Carey et al. 2008, Liao et al. 2008, Kunitomi et al. 2016など)、今後もより品質の高いiPS細胞が登場していくことが期待される。しかしながら、いずれの報告も細胞のstemness(多能性幹細胞らしさ)の程度やテラトーマ形成効率、iPS細胞樹立成功率など、いかにES細胞と同様の多能性幹細胞を効率よく作れるかということを重要視しており、個々の臓器再生を見据えたiPS細胞の評価および作成は、申請者が涉猟する限りでは報告がない。iPS細胞というシーズが登場して以来、脊髄損傷に対する治療効果についてはプラトーに達してしまっている現状から、iPSC-NS/PCs以外の薬剤による相乗効果やリハビリによるアプローチなども試みられてきている(Tashiro et al. 2016, Okubo et al. 2017)。治療効果向上のために、iPS細胞そのものを再度検討し、改変を試みることで、飛躍的な治療効果を得ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ヒトiPS細胞4株と、それぞれから誘導したiPSC-NS/PCsについてin-vitro, in-vivo実験で評価し、脊髄損傷に対する有効性の高いiPS細胞の特徴を抽出する。抽出した遺伝子について、レンチウイルスを用いた遺伝子導入技術を用いてiPS細胞で高発現させ、改良型iPS細胞を作製する。有効性の向上が認められるか、in-vitro, in-vivo実験で評価する。

(1). 遺伝子発現評価および、重要な遺伝子の抽出

それぞれのサンプルからRNAを抽出し、Infinium HumanHT12を用いて遺伝子発現解析を行う。

(2). 改良型ヒトiPS細胞の作製およびin-vitro, in-vivo評価

方法(4).で抽出した因子について、レンチウイルスを用いてiPS細胞（方法c.の実験で最も有効性の高かった細胞株を使用）で高発現させる。作製した改良型iPS細胞からNS/PCsを作製し、下記in-vitro, in-vivo試験を行い、既存の細胞との比較をする。

使用する細胞

- ・コントロール：ES細胞（KhES1）
- ・iPS細胞：414C2-, 201B7-, 836B3-, 253G1-iPSCs
- ・iPSC-NS/PCs: 414C2-, 201B7-, 836B3-, 253G1-iPSC-NS/PCs

iPSC-NS/PCsのin-vitro評価

神経幹細胞培地（Okada et al. 2008）からFGFとLIFを抜いて10日間培養して終末分化させ、Nestin, β III-tublin, GFAP, CNPaseについて免疫染色し細胞株間の分化能の違いを評価する。さらに、神経突起の長さを比較するため、IN Cell Analyzer 6000を用いて神経細胞の形状を定量化して比較する。

in-vivo実験

- ①脊髄損傷モデル：免疫不全（NOD/SCID）マウス8週齢メスの第10胸髄レベルにIH impactor 60kdynで圧挫損傷を作成
- ②細胞移植：脊髄損傷後9日目に、損傷中心部に 5×10^5 細胞/マウス移植し、移植後2ヶ月の経過観察（各細胞株n=25 コントロール群（PBS）n=10）
- ③運動機能評価：Basso mouse scale(BMS) score, DigGaitによる歩行解析
移植後組織の評価：Bio-imagingによる細胞生着評価、
- ④H-E染色および免疫染色による評価

4. 研究成果

(1) 良好な治療成績を有する 414C2 と 201B7 という細胞株と、良好な治療成績を有さない 836B3 と 253G1 という細胞株、及び ES 細胞を用い、遺伝子発現解析をマイクロアレイ及び PCR にて確認したところ、良好な治療成績を有する細胞株と ES 細胞では、USP28, DPPA3 などのゲノム安定因子が高発現していることがわかった(図1)。また、SNV や DNA メチル化の解析結果から、良好な iPS 細胞株はゲノム・エピゲノム共にとても安定していることもわかった。

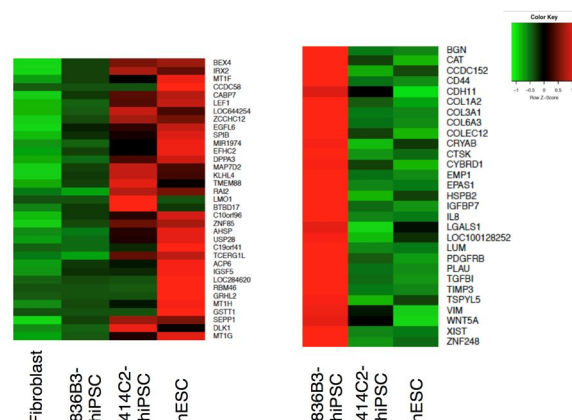


図1 マイクロアレイによる遺伝子発現結果

(2) PCR の結果から、良好な治療成績を有する細胞株では、DPPA3 と USP28 というゲノム安定に関わる2つの遺伝子の高発現が、iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導させた後にも維持されることがわかった(図2)。また、シングルセル RNA シークエンスの結果から、それらの高発現がごく一部の細胞で認められる訳ではなく、ほぼ全ての細胞で認められることもわかった。DPPA3 と USP28 が治療効果に寄与するものと考え、良好な治療成績を有する細胞株 414C2-iPS 細胞にレンチウイルスで DPPA3 と USP28 を高発現させた iPS 細胞を作成することを試みた。

DPPA3 を組み込んだレンチウイルス、USP 28 を組み込んだレンチウイルスと、shRNA-DPPA3 を組み込んだレンチウイルス(=DPPA3 の発現を抑えるレンチウイルス)、shRNA-USP28 を組み込んだレンチウイルス(= USP28 の発現を抑えるレンチウイルス)を作成した。しかし、それぞれのウイルスを iPS 細胞へ導入しようとするも、導入効率が悪く、安定しなかった。

(3) 414C2iPS 細胞への導入についてウイルス濃度の変更や導入時期などを検討するもうまくいかず、836B3 などの他の細胞株に変更してもうまく導入できなかった。そこで、ひとまず iPS 細胞へのウイルス導入は諦め、神経幹細胞へ分化させた状態でのウイルス導入を試みたところある程度安定して導入することができた。In-vitro 実験の結果から、414C2-iPSC-NS/PCs で DPPA3 と USP 28 の発現を落とすと、Neuron, Astro, Oligo への分化効率が悪くなることがわかった。

(4) 414C2-iPSC-NS/PCs で shRNA-DPPA3 と shRNA-USP28 を組み込んだレンチウイルスをそれぞれ導入し、DPPA3 と USP28 の発現を落としたものを NOD-SCID マウスへ移植すると、ウイルスを導入していない 414C2-iPSC-NS/PCs を移植した場合に比べて明らかに BMS スコア(図3)、Digi-Gait

の結果が悪かった。DPPA3, USP28 を高発現させた神経幹細胞を移植することで運動機能の向上が得られることが予想されたが、この期間内では評価仕切れなかったため、今後の研究継続が必要と考える。

(5) 本研究により、治療効果が良好な細胞ではゲノム安定因子の発現が高いことが示唆され、脊髄損傷に対して良好な治療成績を有する iPS 細胞由来神経幹細胞にてゲノム安定因子の発現を減じることで、治療効果が不良になることまで明らかとなった。しかしながら、ゲノム安定因子を高発現した場合に、もともと良好な治療成績を有する iPS 細胞由来神経幹細胞による治療効果がさらに増進するか否かについては検証しきれなかった。また、レンチウイルスを iPS 細胞に導入するも、導入効率が悪く、別のベクターや方法を用いて iPS 細胞へ導入する必要があることがわかった。細胞治療を行う上で、神経幹細胞レベルで遺伝子発現を操作するのは移植前の最終産物の細胞数を確保する上で非常に効率が悪く、臨床応用を目指す上では、やはり当初の目的のよう iPS 細胞の時点で、安定して USP28 と DPPA の発現を増幅する方法が導き出す

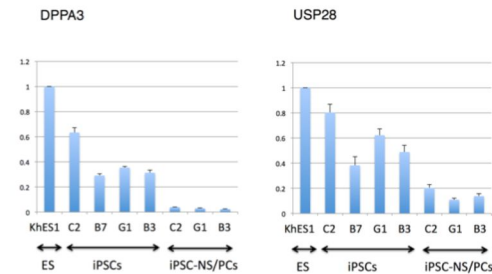


図2 iPS細胞、iPS細胞由来神経幹細胞におけるDPPA3とUSP28の遺伝子発現レベル

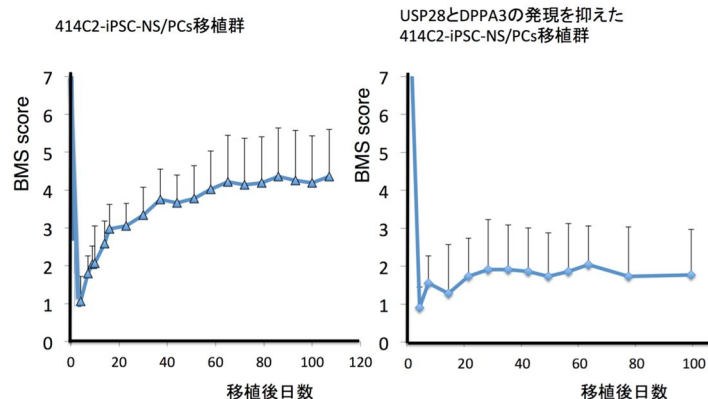


図3 414C2-iPSC-NS/PCsを脊損マウスに移植した後の運動機能

必要がある。そのため、脊髄損傷に対する細胞治療の治療効果増進のためには、本研究の継続が重要であることと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Iida
2. 発表標題 Single nucleotide variance(SNV) of critical gene induce tumorigenicity of iPS cell-derived neural stem cells8iPSC-NSCs) after transplantation for spinal cord injury
3. 学会等名 ISSCR2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Iida
2. 発表標題 Identifying the most effective types of integration-free human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells in the treatment of spinal cord injury
3. 学会等名 ISCoS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Iida
2. 発表標題 Identifying the most effective types of integration-free human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells in the treatment of spinal cord injury
3. 学会等名 Neuroscience 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------