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

Title	脊髄損傷に対する人工多能性幹細胞由来神経幹細胞移植の確立
Sub Title	Transplantation of iPS cell derived neural stem cells for spinal cord injury
Author	中村, 雅也(Nakamura, Masaya) 戸山, 芳昭(Toyama, Yoshiaki) 石井, 賢(Ishii, Ken)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	マウス脊髄損傷に対するマウス及びヒトiPS細胞由来神経幹細胞(iPSC-NS/PC)移植を行い、移植前にin vitroで安全なクローンを選別すれば、移植後に腫瘍形成はみられず、運動機能回復を促進することが明らかになった。さらに前臨床研究の最終段階として、サル脊髄損傷に対するヒトiPSC-NS/PC移植を行い、その安全性および有効性を確認した。安全性の評価を事前に十分行えば、ヒトiPSC-NS/PCは脊髄損傷に対する細胞移植療法における細胞供給源として有用である。
Notes	研究種目：基盤研究(B) 研究期間：2009～2011 課題番号：21390426 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21390426seika

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

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2009～2011
課題番号：21390426
研究課題名（和文）　脊髄損傷に対する人工多能性幹細胞由来神経幹細胞移植の確立

研究課題名（英文）
Transplantation of iPS cell derived neural stem cells for spinal cord injury

研究代表者
中村　雅也　（NAKAMURA MASAYA）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30217898

研究成果の概要（和文）：
マウス脊髄損傷に対するマウス及びヒト iPS 細胞由来神経幹細胞(iPSC-NS/PC)移植を行い、移植前に *in vitro* で安全なクローンを選別すれば、移植後に腫瘍形成はみられず、運動機能回復を促進することが明らかになった。さらに前臨床研究の最終段階として、サル脊髄損傷に対するヒト iPSC-NS/PC 移植を行い、その安全性および有効性を確認した。安全性の評価を事前に十分行えば、ヒト iPSC-NS/PC は脊髄損傷に対する細胞移植療法における細胞供給源として有用である。

研究成果の概要（英文）：
In the present study, we demonstrated that transplantation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSC) derived neural stem / progenitor cells (NS/PCs) promoted functional recovery after spinal cord injury (SCI) in mice. Furthermore, transplantation of human iPSC-NS/PC also promoted functional recovery after SCI in NOD/scid mice as well as common marmosets without any tumor formation as long as pre-evaluated “safe” human iPSC-NS/PCs were used as a cell source. Pre-evaluated ‘safe’ human iPSC-NS/PCs s may be a promising cell source for transplantation therapy for patients with SCI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
２０１０年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
２０１１年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総　計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
キーワード：　脊髄損傷　人工多能性幹細胞　移植　再生医療

１．研究開始当初の背景

前臨床試験としてヒトと同じ霊長類であるサル損傷脊髄に対するヒト神経幹細胞移植を行い、その有効性と安全性を報告した.これらの結果は、ヒトと同じ霊長類であるサル脊髄損傷に対する神経幹細胞移植の有効性を示すものであり、臨床応用に向けた大きな一歩であった.しかし、われわれがこれまで使用してきた細胞は胎生期の脳室下層・海馬・脊髄に存在する神経幹細胞であるために倫理的な問題が大きな障壁となり、いまだ臨床応用に至ってはいない.厚生労働省が作成したヒト幹細胞を用いた臨床治験のガイドラインでも胎児由来組織に関しては継続審議となってしまった.このような状況を鑑み、移植細胞としてより倫理的問題の少ない組織を模索してきた.

２．研究の目的

そこで我々は、自家組織由来の細胞供給源として京都大学の山中らが確立した人工多能性幹細胞(induced pluripotential stem cell;以下 iPS 細胞)に着目した.iPS 細胞は、胚性幹(ES)細胞の未分化維持に重要な 4 つの初期化因子(Oct3/4,Sox2,c-Myc,Klf4)をマウス体細胞（線維芽細胞）に導入することにより樹立された細胞であり、高い増殖能と様々な細胞へと分化できる多能性を有する.iPS 細胞は樹立時に受精卵を用いていないことより倫理的問題を回避可能であり、また体細胞由来であることから将来の自家組織移植につながる可能性があり、移植に伴う免疫拒絶の問題も解決できる可能性を秘めている.

しかし、iPS 細胞は多能性幹細胞であるが故に、いかに目的とする細胞に分化誘導するか、さらに遺伝子導入に伴う腫瘍化の問題を克服しなければ臨床応用は困難である.そこで本研究の目的は、(１)マウス脊髄損傷に対するマウス iPS 細胞由来神経幹細胞移植の有効性と安全性の検討、(２)免疫不全マウスに対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植の有効性と安全性の検討、(３)サル脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植の有効性と安全性の検討を行い、将来の脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経幹細胞移植の臨床応用に向けた礎を築くことである.

３．研究の方法

(１)マウス脊髄損傷へのマウス iPS 細胞由来神経幹細胞移植

京都大学山中らによって樹立されたマウス iPS 細胞を用いて、低濃度のレチノイン酸と bFGF 存在下に胚葉体を介して神経幹細胞(miPS-NSC)へ分化誘導し、各種マーカーによる免疫染色で分化能を検討した.次に、バイオイメージング(IVIS)を用いて、同一個体で非侵襲的かつリアルタイムで移植細胞を観察するために、マウス iPS 細胞由来神経幹細胞に対してレンチウィルスを用いて GFP と Luciferase の遺伝子導入を行った.

C57BL/6 マウスに、IH-impactor を用いて胸髄高位に圧挫損傷モデルを作製した.損傷後 9 日に miPS-NSC を損傷部に三次元マイクロインジェクターを用いて移植した.一方、対照として PBS 投与群とマウス ES 細胞由来神経幹細胞(mES-NSC)移植群を作製した.損傷後 6 週まで IVIS による細胞の生着と open field score による下肢機能回復を定量的に評価した.その後マウスを灌流固定し、移植細胞の分化・生着等を免疫組織学的に評価した.さらに、神経線維と再生軸索の評価は、RT97、GAP43、5HT、CGRP による免疫組織学的に行った.

(２)免疫不全マウス脊髄損傷へのヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植

京都大学山中らによって樹立されたヒト iPS 細胞を用いて、低濃度のレチノイン酸と bFGF 存在下に胚葉体を介して神経幹細胞(hiPS-NSC)へと分化誘導し、各種マーカーによる免疫染色で分化能を検討した.マウス iPS 細胞と同様にレンチウィルスを用いて GFP と Luciferase の遺伝子導入を行った.

NOD-SCID マウスに IH-impactor を用いて胸髄高位に圧挫損傷モデルを作製した.損傷後 9 日に hiPS-NSC を損傷部に三次元マイクロインジェクターを用いて移植した.また、対照群として PBS 投与群を作製した.損傷後 6 週まで IVIS システムを用いて、移植細胞の生着を経時的に定量的に観察した.BMS score による下肢運動機能評価も同時に施行した.運動機能評価後、NOD-SCID マウスを灌流固定し、移植した細胞の分化・生着等について織学的に評価した.また、神経線維と再生軸索の評価は、RT97、GAP43、5HT、CGRP による免疫組織学的に行った.

(３)サル脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植

成体コモンマーモセットに、既に我々が確立した頚髄不全損傷モデルを作製した.損傷後９日に既に免疫不全マウスに対する移植実験で安全性と有効性が確認できた 201B7 ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞（hiPS-NSC）1x10^{6}個を glass micropipette 付きの Hamilton シリンジを使用して損傷脊髄内に移植した.対照群では培養液のみを損傷脊髄内に注入した.MRI による移植細胞と軸索再生の評価：脊髄損傷前、損傷後１週（移植前)、移植後１から１２週まで、全身麻酔下に MRI（Burker 社製、７T）を撮像した.通常の T1・T2 強調像における移植細胞による腫瘍形成の評価に

加え、我々が既に報告した拡散テンソル投射路撮影によりサル脊髄損傷内の軸索を評価した.運動機能評価：既に我々が確立した original scoring scale、赤外線自発運動量モニタリングにより、運動機能障害や異常行動の有無を評価した.病理組織学的評価：機能評価後に灌流固定を行い、組織学的に腫瘍形成の有無､移植細胞の分化､血管新生(PECAM1)、軸索再生(RT97、GAP43、5HT)など評価した.

４．研究成果

(１)マウス脊髄損傷へのマウス iPS 細胞由来神経幹細胞移植

移植した miPS-NS は移植後 1 週間で約 20%まで低下したが、その後約 10%で良好に生着した.移植細胞はマウス損傷脊髄において、頭尾側方向に bipolar な形態を呈した GFAP 陽性の immature astrocyte へと分化し、残存する RT-97 陽性神経線維に近接して存在し、残存軸索へのガイダンス的役割を果たしていた.また、損傷部より 4mm 尾側での 5-HT 陽性 serotonergic fiber の数は、対照群と比較して移植群で有意に増加していた.また、移植された miPS-NS は MBP 陽性の matured oligodendrocyte へと分化しており、MBP 陽性の移植細胞由来である髄鞘が、ホストの軸索を取り巻く像も観察された.BBB scoring scale による後肢運動機能評価では､損傷後 3 週(移植後 2 週）以降に、miPS-NS 移植群では対照群と比較して統計学的有意差な改善がみられた.

iPS 細胞は、胚性幹(ES)細胞の未分化維持に重要な 4 つの初期化因子(Oct3/4,Sox2, c-Myc,Klf4)をマウス体細胞（線維芽細胞）に導入することにより樹立された細胞であり、高い増殖能と様々な細胞へと分化できる多能性を有する.iPS 細胞は樹立時に受精卵を用いていないことより倫理的問題を回避可能であり、また体細胞由来であることから将来の自家組織移植につながる可能性があり、移植に伴う免疫拒絶の問題も解決できる可能性を秘めている.本研究により、iPS 細胞由来ニューロスフェア移植による脊髄損傷後からの機能回復の主なメカニズムとして、移植細胞由来の immature astrocyte による軸索ガイダンス作用と、移植細胞由来の oligodendrocyte による損傷軸索の再髄鞘化が強く示唆された.

(２)免疫不全マウス脊髄損傷へのヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植

In vitro で hiPS-NSC はほとんどの細胞が neuron に分化する能力を持っており、継代を繰り返しても glia への分化は少なかった.In vivo で hiPS-NSC は NOD-scid マウス脊髄内で良好な生着を認めた.免疫組織学的検討により移植細胞は neuron、astrocyte、oligodendrocyte の 3 系統に分化していた.そのうち neuron への分化が最も多く，GAD67 陽性の GABA 作動性 neuron,ChAT 陽性のコリン作動性や TH 陽性のドパミン作動性 neuron に分化していた.また、hiPS-NSC 由来 neuron とホスト neuron とのシナプス形成を免疫組織学的に確認した.その結果、下肢運動機能は hiPS-NSC 群で対照群より有意な改善を認めた.感覚機能評価では 2 群間に有意差がなく、細胞移植に起因する異常知覚の出現は認めなかった.

脊髄損傷に対する細胞移植療法の機能回復機序としては①移植細胞から分泌される神経栄養因子による組織保護作用、②neuron に分化した移植細胞によるホスト neuron とのシナプス形成、③oligodendrocyte に分化した移植細胞による再髄鞘化が考えられている.本研究では、移植細胞は主に neuron に分化しておりホスト neuron とのシナプス形成も確認されていることから②による機能回復機序が最も考えられる.一方で oligodendrocyte への分化は少なく、今後 oligodendrocyte への分化を増やす培養系が確立できればより良好な機能回復が得られるものと考えている.iPS 細胞は患者自身から作製可能な多能性幹細胞である.このため倫理的問題も免疫拒絶も回避することが可能であり、将来的に自家組織移植につながる可能性があり期待されている.

(３)サル脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植

ヒト iPS-NSC は長期間にわたり継代が可能であり、また複数回の継代後もニューロンへの神経分化能を維持することを確認した.LFB 及び Eriochrome Cyanine 染色では、移植群の髄鞘面積は対照群に比べ有意に増加していた.また、移植細胞は損傷中心部の空洞周囲に生着し、NeuN 陽性のニューロン、GFAP 陽性のアストロサイト、Olig1 陽性のオリゴデンドロサイトに分化していた.損傷後 12 週において MIKY score は移植群 22.0±1.54 点,対照群 13.3±2.57 点, climbing test は移植群 4.0±0.63 点,対照群 2.75±0.5 点, bar grip test(損傷前を 100 とする)は移植群 67.7±2.34%,対照群 44.0±1.51%であり、移植群においていずれも有意な改善を認めた.

ヒト iPS-NSC を用いた脊髄再生医療の実現に向けて、安全性を担保することが何よりも重要であることは論を待たない.現時点において最も安全性が高いと考えられるヒト iPS-NSC 細胞株(201B7)を用いて本実験を行い、その有効性と安全性を確認できたことは、今後の臨床応用に向けて大きな一歩と言える.現在さらに安全性が高いと考えられるヒト integration free−iPS 細胞が樹立されており、今後これらの細胞を用いた検討も並行し

て行う予定である.

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９件）

① Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, Momoshima S, Nakamura M, Okano H. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells. Neurotherapeutics 8: 668-676, 2011（査読有）

② Miura K, Tsuji O, Nakamura M, Okano H. Toward using iPS cells to treat spinal cord injury: their safety and therapeutic efficacy. Inflammation and Regeneration 31: 1-9, 2011（査読有）

③ Nori S, Okada Y, Yasudaa A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashia Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Grafted human-induced pluripotent stem cell–derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. Pro Nat Acad Sci USA 108: 16825-16830, 2011 （査読有）

④ Yasuda A, Tsuji O, Shibata S, Nori S, Takano M, Kobayashi Y, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Miyauchi Hara C, Miyawaki A, Okano JH, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Significance of re-myelination by neural stem/ progenitor cells transplanted into the injured spinal cord. Stem Cells 29: 1983-1994, 2011 （査読有）

⑤ Takahashi Y, Tsuji O, Kumagai G, Miyauchi Hara C, Okano JH, Miyawaki A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. Cell Transplant 20: 727-739, 2011 （査読有）

⑥ Nakamura M, Tsuji O, Bregman BS, Toyama Y, Okano H. Mimicking the neurotrophic factor profile of embryonic spinal cord controls the differentiation potential of spinal progenitors into neuronal cells. PLos ONE 6: e20717. doi:10. 1371/journal.pone.0020717, 2011 （査読有）

⑦ Yamane J, Nakamura M, Iwanami A, Sakaguchi M, Katoh H, Yamada M, Momoshima S, Miyao S, Ishii K, Tamaoki N, Nomura T, Okano HJ, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H. Transplantation of Galectin-1-Expressing Human Neural Stem Cells into the Injured Spinal Cord of Adult Common Marmosets. J Neurosci Res 88: 1394-1405, 2010 （査読有）

⑧ Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated ‘safe’ induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. Pro Nat Acad Sci USA 107: 12704-12709, 2010（査読有）

⑨ Nakamura M, Nagoshi N, Fujiyoshi K, Kaneko S, Toyama Y, Okano H. Regenerative medicine for spinal cord injury: Current status and open issues. Inflammation and Regeneration 29: 198-203, 2009（査読有）

〔学会発表〕（計 13 件）

① Tsuji O, Fujiyoshi K, Miura K, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Yamanaka S, Okano H, Nakamura M, Therapeutic potential of appropriately evaluated ‘safe’ induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011,12,7-10)

② Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H, Transplantation of human iPSC-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, poster (Arizona, USA, 2011,12,7-10)

③ Kobayashi Y, Okada Y, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Okano H, Nakamura M, Pre-evaluated safe human iPS clone derived neural stem cells promoted functional recovery after spinal cord injury without tumorigenicity in adult common marmosets. Cervical Spine Research Society 38th Annual Meeting, oral presentation (Arizona, USA, 2011,12,7-10)

④ Kobayashi Y, Okada Y, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neurospheres promote functional recovery after spinal cord injury without tumorigenecity in adult common marmosets 41st Annual meeting

Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11,12-16)

⑤ Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H Transplantation of human iPSC-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in NOD-scid mice41st Annual meeting Neuroscience 2011, poster (Washington DC, USA, 2011,11,12-16)

⑥ Kobayashi Y, Okada Y, Iwai H, Nishimura S, Nori S, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H Pre-evaluated safe human iPS clone derived neural stem cells promoted functional recovery after spinal cord injury without tumorigenecity in adult common marmosets. ISSCR 2011, poster (Toronto, Canada, 2011,6,15-18)

⑦ Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in nod-scid mice. ISSCR 2011 (Toronto, Canada, 2011,6,15-18)

⑧ Nori S, Okada Y, Tsuji O, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Yasuda A, Kobayashi Y, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice. 40th Annual meeting Neuroscience 2010, poster (San Diego, 2010,11,13-17)

⑨ Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Matsumoto M, Chiba K, Yamanaka S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H Therapeutic potential of appropriately evaluated 'safe' induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. 40th Annual meeting Neuroscience, poster (San Diego, 2010,11,13-17)

⑩ Nori S, Okada Y, Tsuji O, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Yasuda A, Kobayashi Y, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice. Neuro2010 poster (Kobe, 2010,9,2-4)

⑪ Nori S, Okada Y, Tsuji O, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Yasuda A, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H: Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres for the treatment of spinal cord injury in NOD-scid mice. GCOE **幹細胞医学のための教育拠点　成果報告シンポジウム** Global COE Program Symposium 2010 Education and Research Center for Stem Cell Medicine 2010 **年** 2 **月** 25～26 **日慶應義塾大学信濃町キャンパス**

⑫ Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, Chiba K, Yamanaka S, Okano H, MD, Toyama Y, Nakamura M, Therapeutic effect of pre-evaluated 'safe' iPS derived neurospheres for spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 37th Annual Meeting, oral presentation (East Lancaster, USA, 2009,12,3-5)

⑬ Nori S, Okada Y, Tsuji O, Takahashi Y, Fujiyoshi K, Yasuda A, Shimada H, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H: Transplantation of human iPS cell-derived neurospheres into injured spinal cord of NOD-scid mice. The 39th annual meeting of the Society for Neuroscience, poster (Chicago, USA, 2009,10,17-21)

〔産業財産権〕
○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
中村　雅也（NAKAMURA MASAYA）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30217898

(2)研究分担者
戸山　芳昭（TOYAMA YOSHIAKI）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40129549

(3)連携研究者
石井　賢（ISHII KEN）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：00276289