

論 文 要 旨

**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**

【 ヒト iPS 細胞由来神経上皮様幹細胞移植による脊髄損傷治療 】

藤元 祐介

【序論および目的】

我が国では年間約5千人の新規脊髄損傷患者が生まれており、その総数は10万人以上と言われる。現在、損傷された脊髄を直接治療する方法はないが、最近の研究の進歩により、損傷脊髄を修復する方法が動物実験レベルでは多数報告されており、そのなかでも神経幹細胞移植の有効性は多数報告されている。移植神経幹細胞の由来は、免疫拒絶反応や倫理的観点から、最近作製法が確立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が最適でありその利用が期待されている。今回我々は、新規誘導法によって、長期に安定した増殖能とニューロンへの分化能を保持したヒト iPS 細胞由来神経上皮様幹 (hiPS-It-NES) 細胞を脊髄損傷モデルマウスに移植し有効性を検討した。

【材料および方法】

近年、英国ケンブリッジ大学オースティン・スミス研究室とドイツのボン大学オリバー・ブリストル研究室は、ヒト iPS 細胞を神経幹細胞の一種である神経上皮様幹細胞へと誘導し、その際に、浮遊培養ではなく細胞を培養皿に接着させたうえ、神経系と思われる細胞のみを選別することで、均一かつ長期間神経幹細胞としての性質を維持させることができる培養法を開発した。この誘導された神経上皮様幹細胞は、*in vitro* でさらに分化を誘導すると安定した高い割合でニューロンになる。また、異なる因子を使用して作成された別の iPS 細胞を用い、神経上皮様幹細胞へ誘導した場合にも、ほぼ同様の性質を示した。このことはこの誘導法が実験者や場所に関係なく、iPS 細胞から神経上皮様幹細胞を誘導し、安定して供給出来る方法であることを示している。さらに、従来のニューロスフェアを用いる場合とは異なり、均一な神経上皮様幹細胞であるため、腫瘍の発生の原因となる未分化な iPS 細胞の混入も少ないと思われる。

そこで、我々はこれらの特徴を生かし、この新規誘導法によって得たヒト iPS 由来神経上皮様幹細胞を脊髄損傷モデルマウスへ移植し、その効果を検討する研究を行った。免疫不全マウスである NOD-SCID マウスの第9胸髄に一定の圧挫損傷を加え、損傷後1週

目に 1×10^6 個の神経上皮様幹細胞を移植する群、ならびに移植しないコントロール群を作成した。*in vivo* イメージングシステムを用い、移植細胞の生着を確認した。BMS スコアによる下肢運動機能評価、電気生理学的解析を行った。脊髓切片を免疫染色し、移植細胞の生着、分化傾向、内在性ニューロンへの影響、シナプス形成などを検討した。性質の異なる 2 種類のトレーサーによる皮質脊髓路の観察と、移植細胞の特異的除去によるその直接的な機能回復への関与を検討した。

【結果】

hiPS-lt-NES 細胞移植群はコントロール群と比較し有意な下肢機能改善を示した。移植細胞の 20%以上が損傷脊髓に正着し、そのうち 70%以上がニューロンへと分化していた。さらに移植細胞による内在性ニューロンの生存促進効果もみられた。移植細胞由来ニューロンと内在性ニューロン間のシナプス形成、ならびに移植細胞由来ニューロンのリレーを介した損傷神経回路の再建を示唆する結果が得られた。移植細胞の特異的除去により下肢機能は再度悪化したことから、移植細胞の機能回復への直接的な関与が示唆された。移植後 12 週で腫瘍形成は認めず、本研究に用いた移植細胞は接着培養で誘導維持しているため、その手技が確実であり、また未分化細胞残存の可能性が低いことが考えられた。ES 細胞や iPS 細胞を移植治療に用いる際、その未分化性が維持され腫瘍を形成してしまうという危険性がある。実際にそのような報告もあるが、われわれの実験では移植後 3 カ月まで観察したが腫瘍形成は認められなかった。このことから接着培養により神経系と思われる細胞のみを選別し、安定した手法で長期に継代培養できる神経上皮様幹細胞は、移植治療に対して有効なソースとなりうる可能性があると思われる。

【結論及び考察】

ヒト iPS 細胞を用いた再生医療への応用はその誘導法や腫瘍形成の有無など課題や改善点が残っている。本研究においても損傷脊髓機能が完全に回復したとは言い難く、今後は他の治療方法との併用なども検討する必要があると思われる。

(Stem Cells. Vol.30, No.6, June 2012 年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 221 号		学位申請者	藤元 祐介
審査委員	主査	高嶋 博	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中河 志朗	副査	亀山 正樹
	副査	有田 和徳	副査	宮田 篤郎

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

(ヒト iPS 細胞由来神経上皮様幹細胞移植による脊髄損傷治療)

現在、損傷された脊髄を直接治療する方法はないが、動物実験レベルでは神経幹細胞移植の有効性は多数報告されている。移植神経幹細胞の由来は、免疫拒絶反応や倫理的観点から、最近作製法が確立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が最適でありその利用が期待されている。そこで学位申請者らは、新規誘導法によって、長期に安定した増殖能とニューロンへの分化能を保持したヒト iPS 細胞由来神経上皮様幹細胞 (hiPS-lt-NES cells) を脊髄損傷モデルマウスに移植し有効性を検討した。

共同研究者であるケンブリッジ大学オースティン・スミス研究室で樹立されたヒト神経上皮様幹細胞を脊髄損傷モデルマウスへ移植し、その効果を検討する研究を行った。免疫不全マウスの第 9 胸髄に一定の圧挫損傷を加え、損傷後 1 週目に 1×10^6 個の細胞移植群、コントロール群を作成した。in vivo イメージングシステムを用い、移植細胞の生着を確認した。BMS スコアによる下肢運動機能評価、電気生理学的解析を行った。脊髄切片を免疫染色し、移植細胞の生着、分化傾向、内在性ニューロンへの影響、シナプス形成などを検討した。性質の異なる 2 種類のトレーサーによる皮質脊髄路の観察と、移植細胞の特異的除去によるその直接的な機能回復への関与を検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

hiPS-lt-NES 細胞移植群はコントロール群と比較し有意な下肢機能改善を示した。移植細胞の 20%以上が損傷脊髄に正着し、そのうち 70%以上がニューロンへと分化していた。さらに移植細胞による内在性ニューロンの生存促進効果もみられた。移植細胞由来ニューロンと内在性ニューロン間のシナプス形成、ならびに移植細胞由来ニューロンのリレーを介した損傷神経回路の再建を示唆する結果が得られた。移植細胞の特異的除去により下肢機能は再度悪化したことから、移植細胞の機能回復への直接的な関与が示唆された。移植後 12 週で腫瘍形成は認めず、本研究に用いた移植細胞は接着培養で誘導維持しているため、その手技が確実であり、また未分化細胞残存の可能性が低いことが考えられた。

ヒト iPS 細胞を用いた再生医療への応用はその誘導法や腫瘍形成の有無など課題や改善点が残っているが、本研究で行われた神経上皮様幹細胞移植は、移植治療に対して有効なソースとなりうる可能性があり、またその機能回復のメカニズムに対しても詳細な検討、考察がなされている。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 221 号		学位申請者	藤元 祐介
審査委員	主査	高嶋 博	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中河 志朗	副査	亀山 正樹
	副査	有田 和徳	副査	宮田 篤郎

主査および副査の5名は、平成24年11月1日、学位申請者 藤元 祐介 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 完全に断裂した神経回路がそれぞれ目的とする対応した回路にうまくつながっているのか？間違っつながり、痛みなどないのか？

(回答) アロディニア (異痛症) などの報告もありその可能性は否定できない。運動機能回復だけではなくヒートショックなどの実験を用いた知覚についての検討、また逆行性神経回路のトレーシングなどを行う必要がある。

質問2) 本実験に用いた iPS 細胞樹立時に c-Myc 遺伝子を使わなかったのには理由があるのか？

(回答) 特別な理由はない。c-Myc なしでも iPS 細胞は樹立できる。c-Myc は腫瘍化に関する遺伝子ではあるが、iPS 細胞樹立時にその有無でその後の腫瘍化には関係ないという報告もある。

質問3) 可視化するために用いたレンチウイルスの感染効率は？また移植実験においてウイルス感染の有無で差はあったのか？

(回答) 感染効率は論文図 1-C の FACS 図の通りで、GFP の強いものだけをソートし実験に用いた。今回の移植実験ではウイルス感染なしの細胞は用いていない。

質問4) 機能回復のメカニズムとしてグリア細胞による正の働き (神経栄養因子の産生、再髄鞘化など) が考察で述べられたが、移植細胞のグリアの比率を高める工夫はしなかったのか？

(回答) 本実験の移植細胞は特別な操作をしなくても、自然分化においてニューロンの比率が高い。グリアの比率を高める工夫はしていない。これは今回の損傷はかなり重症で (意図的に作成した) あり、ニューロン回路が破たんしていると考えたためニューロンを補充したほうがよいと思われたからである。また移植細胞がグリア瘢痕損傷の一部を担い、グリオシスが増大する可能性もある。程度やタイプにより神経幹細胞を適切な lineage へ分化させることが必要であると思われる。

質問5) 本実験で作成した胸髄圧挫傷モデルマウスでは動脈損傷の有無はあったのか？動脈損傷があると膀胱直腸障害は必発であり、ないように作成すべきではないか。

あった場合移植による血流改善により細胞死がまぬがれて機能が回復したのではないか。

(回答) 本実験マウスでは膀胱直腸障害は必発であった。膀胱マッサージなどの排尿処置を行った。動脈損傷に関しては検討しておらず、また血流改善の検討もしていない。

最終試験の結果の要旨

質問 6) BMS スコアリングのほかに、坂道を滑り落ちるような角度計測はしなかったのか？

(回答) 今回はスコアリングと、客観的評価として MEP を行った。

質問 7) 損傷後の機能回復を妨げるものとしてグリア瘢痕の形成によるものが大きい。本実験ではこのグリオシスを減少させるような工夫をしたのか、また移植によってグリオシスの形成に差があったのか。

(回答) グリア瘢痕を減少させる工夫はしていない。また移植によるグリオシスの大きさの差については検討していない。

質問 8) 損傷から移植までの期間は？

(回答) 本実験では受傷後 1 週で細胞移植を施行した。その理由は損傷後急性期では炎症性サイトカインなどの影響で細胞死してしまい、2 週後以降ではグリア瘢痕の形成により軸索の伸長が阻害されるという報告があるからである。またヒトに置き換えると損傷後約 4 週が細胞移植には適した時期と思われる。

質問 9) 移植の際の部位は？また生着をよくするために複数回投与する方法はどうか？

(回答) 正常部を損傷する可能性があるために損傷部中心に行った。実際は空虚になっているのではなく炎症性細胞が密に存在している部位である。マウスへの手術侵襲を考えると複数回の投与はリスクが高いと思われる。また細胞数を増やして条件検討してみたが今回の 1×10^6 個以上でも生着率に変化はなかった。

質問 10) さらに機能をよくするための併用治療は行わなかったのか？

(回答) 現在、細胞移植と薬剤の併用実験を行っているところである。

質問 11) ニューロンによるリレーによって回復しているのであれば、損傷部に近い（体幹や股関節）筋・関節から回復しているのか？今後、大型の動物や霊長類を使うのであれば軸索が届くのか？

(回答) 特に体幹や損傷部に近い関節から回復している印象はなかった。実験動物が大きくなると損傷部の大きさが大きくなるので検討が必要と思われる。

質問 12) 本実験で使用した in vivo イメージングではどのぐらいの深さまでシグナルを拾えるのか？

(回答) 蛍光ではなくルシフェリンを投与した発光を用いるシステムで 2 次元で高感度 CCD カメラを用い暗室にいた状態で撮影している。深さは 1-2cm で背側からの撮影で脊髄は十分透過していると思われる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。