

戦略的創造研究推進事業
JST-CIRM 共同研究プログラム

研究課題「微小環境がヒト iPS 細胞及び胎児由来
神経幹細胞の分化・腫瘍化に及ぼす影響」

研究終了報告書

研究期間 平成22年10月～平成25年9月

研究代表者：中村雅也
(慶應義塾大学医学部
整形外科学教室・准教授)

§ 1 研究実施の概要

本研究は、損傷脊髄に対するヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植後の生存、分化、造腫瘍性を損傷脊髄内の炎症性微小環境(外的因子)と移植細胞の特性(内的因子)に着目して検討した。iPS 細胞由来神経幹細胞に関する造腫瘍性は、外的因子よりもむしろ内的因子が大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。一方、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞由来神経幹細胞の移植後の生存、移動、分化はむしろ外的因子(損傷脊髄内の微小環境)による影響が大きなことが明らかとなった。

① ヒト神経幹細胞の分化能、腫瘍形成能の評価

複数株のヒト iPS 細胞株(201B6, 201B7: c-Myc(+), 253G1, 253G4: c-Myc(-))から神経幹細胞(NSPC: Neural Stem/Progenitor Cells)を誘導し、神経分化誘導効率や分化誘導後の NSPC の *in vitro* における分化能について、ヒト ES 細胞由来 NSPC と比較解析を行った。さらに、NOD/SCID マウス脳および精巣に移植し、*in vivo* における造腫瘍性とその原因について検討した。その結果、一部の株(201B6)は NSPC へと分化誘導できないものの、他の iPS 細胞株は高効率に NSPC へと分化誘導可能で、機能的なニューロンへ分化した。しかし、253G1、253G4 由来 NSPC は、脳及び精巣の双方でグリオーマ様腫瘍を形成した。

そこで、各ヒト iPS 細胞や分化誘導した NSPC で網羅的遺伝子発現解析を行い、独自に同定した 929 個のヒト ES 細胞特異的遺伝子群や、ゲノム修復に関わる遺伝子群に着目した発現プロファイルを比較したところ、正常に分化して造腫瘍性を示さないヒト iPS 細胞株に比べ、分化異常やグリオーマ様腫瘍の形成を示すヒト iPS 細胞株は不完全にリプログラミングされていることを見出した。さらに、ゲノム安定性の維持に必要な遺伝子群の不完全なリプログラミングが、ヒト iPS 細胞株間の造腫瘍性の違いに寄与していることを明らかにした。そこで、各 iPS 細胞株の未分化状態、神経幹細胞へと分化誘導後において aCGH(Array comparative genomic hybridization)によるゲノムコピー数異常を解析したところ、造腫瘍性を示した iPS 細胞株は、未分化状態ではゲノム安定性が維持されるものの、神経幹細胞へと分化誘導することにより、ゲノム安定性が著しく低下することを見出した。

次に、iPS 細胞樹立時に用いたレトロウイルス由来トランスジーンの影響を考慮するため、*integration-free* iPS 細胞(エピゾーマルベクターで樹立)を用いて同様の解析を行った。その結果、*integration-free* iPS 細胞であっても、誘導した NSPC がグリオーマ様腫瘍を形成し得ること、不完全なリプログラミングによる、分化誘導に伴うゲノム不安定化がみられることを見出した。

これらの結果から、一見良質に見えるヒト iPS 細胞であっても、不完全にリプログラミングされたヒト iPS 細胞は、分化誘導に伴うゲノム不安定化により、造腫瘍性を示すと考えられた。また、各ヒト iPS 細胞クローンの厳密な造腫瘍性評価が必要であることが示唆された。

② 免疫不全マウス脊髄損傷モデルに対するヒト神経幹細胞移植(ES/iPS 細胞を含む)

京都大学でレトロウイルスを用いて樹立された 2 つのヒト iPS 細胞株(山中 4 因子で誘導した 201B7 および c-Myc を除く 3 因子で誘導した 253G1)を神経幹細胞(hiPSC-NS; 201B7-NS および 253G1-NS)に分化誘導し、免疫不全マウス損傷脊髄内に移植し、その有効性と安全性を検討した。hiPSC-NS を損傷部に移植したところ、2 種類の hiPSC-NS はマウス脊髄内で生着し、下肢運動機能の良好な改善が認められた。しかし、253G1-NS 移植群では、一度回復した運動機能は徐々に悪化し、Nestin 陽性の神経系腫瘍を形成し、RT-PCR で *OCT4* の再活性化を認めた。トランスクリプトーム解析の結果、253G1-NS は 201B7-NS に比して細胞外基質の形成、間葉系細胞分化や上皮間葉転換などが促進されていることが分かり、移植後にその傾向が強くなっていた。また、腫瘍形成がみられた 253G1-NS 移植後 103 日では Wnt/ β -catenin シグナルが活発に働いていた。本研究により、253G1-NS 移植群における *OCT4* の再活性化が腫瘍形成に関与していると考えられた。また、Wnt/ β -catenin シグナルによって促進される上皮間葉転換が移植細胞の浸潤や細胞外基質の蓄積を促進している可能性が示唆された。現在、これらの知見をもとに、臨床応用に向けて移植細胞の安全性をスクリーニングする手法を確立していくため、マーカー候補分子の探索を進めている

③ サル損傷脊髄内微小環境の検討

損傷脊髄内に移植された神経幹細胞 (NSC) はホストの微小環境により増殖や分化など大きな影響を受けるため、細胞移植治療を行ううえで考慮すべき重要な因子である。過去の研究の多くは齧歯類を用いたものであり、本研究では霊長類であるマーモセットの脊髄損傷モデルを用いてマイクロアレイ、次世代シーケンサー、組織学的評価を行い、損傷脊髄内の微小環境を網羅的に解析した。網羅的な遺伝子発現解析の結果、損傷後1週で上昇し、2週以降低下した遺伝子群には活性酸素の発生、サイトカインの分泌等に関わる遺伝子を認めた。逆に損傷後1週で発現が一度低下するものの、2週以降は上昇する遺伝子群には神経伝達物質やシナプスに関わる遺伝子を認めた。次に各遺伝子発現を個別に解析すると、マクロファージのマーカーである CD11b や CD68 等の発現は損傷後1週で著明に上昇し、それ以降は急激に低下した。組織学的評価でも損傷後1週に炎症細胞の著明な浸潤を認め、その後減少した。また各コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) の発現は損傷後2週以降に顕著な上昇がみられたが、組織学的解析では CSPG の集積やグリア瘢痕形成は損傷後2週ではほとんど認めず、6週で顕在化していた。損傷後急性期に起こる炎症反応は2週以降に沈静化する一方で、2週以降はシナプス再形成等の自然修復機構が働いている可能性が示唆された。また CSPG の集積やグリア瘢痕形成は2週ではほとんど認めず、6週では顕著であった。以上より霊長類では損傷後2-4週の時期が NSC 移植の至適時期である可能性が示唆された。

④ サル脊髄損傷モデルに対するサル神経幹細胞移植 (ES/iPS 細胞を含む)

脊髄損傷への神経幹細胞(NS/PC)移植に関する過去の報告の大半は齧歯類モデルだが、齧歯類と霊長類では神経解剖学的、免疫学的に大きく異なる。そこで本研究では、霊長類脊髄損傷に対する同種 ES 細胞由来 NS/PC(ESC-NS/PC)移植の有効性と安全性を検討した。前述の微小環境の検討から、コモンマーモセット脊髄圧挫損傷後14日に、マーモセットESC-NS/PCを移植した。また、対照群では損傷中心部にPBSを注入した。免疫抑制剤としてFK506(0.05mg/kg/day)を連日皮下投与した。移植群は対照群に比し、original open field rating scale で有意な運動機能の回復を認めた。移植細胞は良好に生着し、neuron、astrocyte、oligodendrocyte へ分化したが、腫瘍形成はみられなかった。移植群は対照群に比し、損傷部脊髄横断面積、残存髄鞘面積、神経線維陽性面積や新生血管面積の増大を認めた。また、q-space imaging による髄鞘面積で移植群は有意な増加を認めた。霊長類脊髄損傷に対する同種ESC-NS/PC移植の有効性と安全性が確認できたことは、ES細胞、さらにはiPS細胞を用いた脊髄再生医療の実現に向けての大きな一歩と考えられる。

⑤ 炎症性細胞がヒト神経幹細胞に及ぼす影響の検討

hESC 由来の4種類のhNSC細胞株(H1, H9, Shef4, Shef6)とhiPSC由来の2種類のhNSC細胞株(iPS6-9, iPS19-9)を作製し、これらの細胞が in vitro において炎症細胞から受ける影響を、その増殖能、細胞移動について評価した。胎児由来hNSCに関しては、好中球 condition 培地によって細胞移動能が促進されたが、マクロファージ condition 培地では促進されなかった。さらに、好中球 condition 培地では astrocyte への分化が促進したが、マクロファージ condition 培地では neuron への分化が促進されていた。しかし、好中球 condition 培地、マクロファージ condition 培地ともに olig2 陽性細胞数は減少していた。hESC 由来、hiPSC 由来 NSC のほとんど(H9, Shef4, iPS6-9, iPS19-9)は胎児由来 hNSC と同様に好中球 condition 培地にて細胞移動能が促進した。しかし、Shef6 hNSC の細胞移動は好中球 condition 培地、マクロファージ condition 培地の両方にて促進されており、この結果は Shef6 hNSC が異なる内在性の特性を有していることを示している。我々が解析した hES/hiPS-NSC のほとんどが GFAP 陽性 astrocyte には分化せず、全ての培地の条件においても astrocyte へ分化する細胞数はほとんど変化がなかった。さらに hES-/hiPS-NSC のほとんどが好中球 condition 培地において neuron の数が減少していたが、iPS19-9 由来の hNSC は astrocyte が好中球 condition 培地にて増加し、マクロファージ condition 培地にて neuron の数が増

加した。これは *in vitro* における胎児由来 hNSC の細胞特性に類似しているといえる。Shef4 hNSC を除き、O4 陽性 oligoprogenitor の数は H9 hNSC, iPS6-9 hNSC, iPS19-9 hNSC を含むほとんどの細胞株においてマクロファージ condition 培地において増加しており、マクロファージが *in vitro* において oligoprogenitor への分化を可能にするということを初めて示した結果である。一方、好中球 condition 培地では O4 陽性 H9 hNSC, Shef4 hNSC の数は減少しており、これは好中球によって oligoprogenitor が負の選択を受けたことを示していると言える。

⑥ 損傷脊髄に対する異なる移植時期のヒト神経幹細胞移植の検討

3つの細胞株(Shef4 hNSC, Shef6 hNSC, iPS19-9 hNSC; ヒト神経幹細胞)が安全且つ興味深い結果を与えると考え、移植実験に使用した。脊損後0日(急性期)と30日後(慢性期)の生体内での炎症環境の違いを上記の3細胞株のヒト神経幹細胞を移植することによって移植グループ間での違いを調べた。細胞の生着、細胞の分化、そして細胞の脊髄内での移動は移植細胞株によって異なることから、細胞株それぞれに備わっている内因子が重要だということが示唆される。さらに、脊損後0日(急性期)と30日後(慢性期)の生体内での炎症環境の違いがそれぞれの細胞株の生着、細胞の分化、そして細胞の移動に影響していることもわかった。Shef6 ヒト神経幹細胞がもっとも細胞の生着率が高くほぼ100%の生着が脊損後0日(急性期)と30日後(慢性期)移植のいずれのグループでも得られ、次にiPS19-9ヒト神経幹細胞95%、Shef4ヒト神経幹細胞50%の生着率がいずれのグループでも得られた。いずれの細胞株を移植されたマウスにおいても明らかな異常やガン化様の細胞増殖は認められなかった。行動評価では、対照群と比較して、急性期移植群で顕著な回復が見られたが、慢性期移植群でも軽度の改善が得られた。

§ 2 研究実施体制

日本側

1) 脊髄損傷研究グループ (慶應義塾大学整形外科)

① 研究分担グループ長: 中村雅也 (慶應義塾大学整形外科・准教授)

② 研究項目: 異なるヒト iPS 細胞株から誘導した神経幹細胞を亜急性期の損傷脊髄に移植し、その有効性と安全性を検討する。

2) 神経幹細胞研究 (慶應義塾大学生理学)

① 研究分担グループ長: 岡田洋平 (慶應義塾大学生理学・特任講師)

② 研究項目: ヒト iPS 細胞から誘導した神経幹細胞の腫瘍形成能に影響を及ぼす因子を明らかにする。

カリフォルニア側

1) 幹細胞研究グループ (University of California, Irvine)

① 研究分担グループ長: Aileen J. Anderson (University of California, Irvine, Sue and Bill Gross Stem Cell Center, Associate Professor)

② 研究項目: ヒト iPS 細胞から誘導した神経幹細胞の腫瘍形成能に影響を及ぼす因子を明らかにする。

2) 脊髄損傷研究 (University of California, Irvine)

① 研究分担グループ長: Brian J Cummings (University of California, Irvine, Sue and Bill Gross Stem Cell Center, Associate Professor)

② 研究項目: 急性期と亜急性期に細胞移植を行い、外的な環境因子が移植細胞の分化に与える影響を検討する。