

平成23年度研究実施報告書

1. 研究実施の概要

1) ヒト神経幹細胞の分化能と腫瘍形成能の評価

複数株のヒト iPS 細胞株から誘導した神経幹細胞 (NSPC : Neural Stem/Precursor Cells) を 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。移植した NSPC のうち、253G1、253G4 由来 NSPC は、in vivo において脳及び精巣の双方でグリオーマ様腫瘍を形成した。また、NSPC を移植した精巣を詳細に解析した結果、腫瘍化した組織の一部では、ヒト iPS 細胞の樹立時に用いたレトロウイルス由来トランスジーンの高発現がみられ、腫瘍の発生に寄与していると考えられた。しかしながら、トランスジーンの高発現が見られない細胞も多く含まれており、造腫瘍性には他の要因も考えられた。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ったところ、全プローブを用いた解析では各株間で大きな違いは見られなかった。さらに、ヒト ES 細胞特異的な 929 個の遺伝子に着目して解析すると、神経分化不全や造腫瘍性が見られたヒト iPS 細胞株では、不完全なリプログラミングが見られ、造腫瘍性と関与すると考えられた。

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)

免疫不全マウス脊髄損傷に対して安全性の確立していないヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植を行い、組織学的解析と RT-PCR を行った。253G1-NSPC 移植後 56 日までは下肢運動機能の良好な改善を認めたが、その後徐々に悪化し、Nestin 陽性の未分化な神経系腫瘍の形成を認めた。組織学的解析から、移植後の時間経過あるいは腫瘍の長径の増大に伴い、Nestin 陽性細胞率および Ki-67 陽性細胞率が上昇した。RT-PCR および組織学的解析により、移植後時間依存的に Oct4 の発現は増加していた。損傷脊髄内での造腫瘍性には Oct4 の再活性の関与が示唆された。

3) サル損傷脊髄内微小環境の検討

サル脊髄損傷モデルを用いて損傷脊髄内の微小環境を網羅的に解析した。トランスクリプトーム解析の結果、T 細胞の活性や活性酸素の発生、炎症性サイトカインの分泌等に関わる遺伝子群の発現が 1 週で上昇し、2 週以降は沈静化していた。逆に神経伝達物質やシナプスに関わる遺伝子は 1 週で発現が一度低下するものの、2 週以降は上昇する傾向を認めた。各遺伝子発現を個別に検討すると、炎症性サイトカインの発現の中で 2 週以降も上昇が続くのは $TGF\beta 1$ のみであった。また各種 CSPG の発現は 2 週以降に顕著な上昇がみられた。さらにマクロファージ関連遺伝子は 1 週で著明に上昇し、それ以降は急激に低下した。本研究により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、各軸索進展阻害因子の発現は 2 週から顕著に上昇し始めることが明らかに

なった。以上より霊長類では損傷後2週前後の時期がNSC移植の至適時期である可能性が示唆された。

4) 炎症性細胞がヒト神経幹細胞に及ぼす影響の検討

異なる細胞株から誘導されたNSPCの微小環境からの外的シグナル、特に炎症性細胞に対する反応性を検討した。H9-NSCと胎児由来NSCはSox-2、nestin、CD133陽性でOct-4は陰性であった。H9-NSCを通常のDM/B27で分化誘導するとβ-tubulin III、olig4陽性細胞が多数みられたがGFAP陽性細胞はほとんどみられず、hNSCとは異なっていた。さらにPMN-CMで分化誘導すると、胎児由来NSCは60～80%がGFAP陽性astrocyteへ分化したが、ヒトES細胞由来NSC(H9-NSC)は41%がβ-tubulin III neuronへと分化し、GFAP陽性astrocyteの増加はみられなかった。一方、Shef4由来NSCはDM/B27で分化誘導してもGFAP陽性astrocyteへ分化し、胎児由来NSCと同様の分化能を有していた。ヒトES細胞由来NSPCでも細胞株の違いにより、炎症性細胞に対する反応性は全く異なっていた。

5) 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

免疫不全マウス脊髄損傷モデルを用いて、脊髄損傷の亜急性期と慢性期にNSPC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した。移植NSCの生着率及び神経系3系統への分化率は亜急性期群と慢性期群間において有意差を認めなかった。しかし亜急性期群では移植細胞が損傷中心部から頭尾側に広く分布しているのに対して、慢性期群では損傷中心部の近傍に偏在しており、その周囲はグリア瘢痕形成が著明であった。各種運動機能評価及び電気生理学的評価において亜急性期群は対照群に比べ有意な回復を認めたが、慢性期群では回復はみられなかった。亜急性期と慢性期の損傷脊髄内における微小環境の最も顕著な違いはグリア瘢痕形成であり、細胞の生着や分化に影響を及ぼす因子には有意差はなかった。

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・講師）
- 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・咸臨丸プロジェクト・特別研究講師）
- 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。