

戦略的創造研究推進事業

JST-CIRM 共同研究プログラム

平成 24 年度研究実施報告書

「微小環境が 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

### 1) ヒト神経幹細胞の分化能、腫瘍形成能の評価

レトロウイルスにより樹立したヒト iPS 細胞株(201B6, 201B7, 253G1, 253G4)を用いた解析では、独自に同定した 929 個のヒト ES 細胞特異的遺伝子群に着目した発現解析により、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 細胞株が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)によるゲノムの copy number 異常を解析したところ、造腫瘍性を示した 253G1 と 253G4 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。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、神経分化誘導に伴うゲノム不安定化により、グリオーマ様腫瘍を形成しうることを見出した。

### 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)

危険なヒト iPS 細胞 (253G1) 由来神経幹細胞移植により、脊髄損傷後のマウス下肢運動機能は一時的に改善するが、長期経過観察後に腫瘍を形成し徐々に運動機能を悪化させることが明らかになった。さらに Oct4 の発現上昇が腫瘍形成に関与していたことから、今後は integration-free iPS 細胞を用いることによりこの問題を回避できる可能性が示唆された。臨床応用の際には、安全性評価を個々の細胞株ごとに詳細に行い、安全性の確立された iPS 細胞株を用いる必要がある。

### 3) サル損傷脊髄内微小環境の検討

霊長類であるマーモセットの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、霊長類における神経幹細胞移植の至適時期を検討した。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が、その一方で 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 週の時期が神経幹細胞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、マーモセット脊髄損傷後 2 週にマーモセット ES 細胞から分化誘導した神経幹細胞を移植し、その有効性と安全性を検討した。移植細胞は良好に生着し neuron, astrocyte, oligodendrocyte へと分化して

いた。移植 3 ヶ月後の組織学的検討でも腫瘍化はみられず、運動機能の有意な改善がみられたことから、同種神経幹細胞の移植の有効性と安全性が確認できた。

#### 5) 炎症性細胞がヒト神経幹細胞に及ぼす影響の検討

神経幹細胞を *zeno-free*(XF)培養条件下で複数の iPS 細胞、および ES 細胞から誘導することに成功した。樹立した神経幹細胞を用い、炎症性細胞がヒト神経幹細胞に及ぼす影響を考察する為に好中球とマクロファージ上清(液体因子)を用いて *in vitro* において神経幹細胞の反応と影響を検索した。多能性幹細胞由来の神経幹細胞は炎症(マクロファージおよび好中球の液性因子)に反応して分化、移動、増殖への影響が観察された。樹立株により炎症因子に対する反応、影響に格差があることから、iPS 細胞由来の神経幹細胞の選択には炎症が及ぼす影響を解析して、適切な細胞株を動物実験で有効性と安全性を立証することが重要だと思われる。

#### 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

脊髄損傷による亜急性期から慢性期にかけての炎症が異なる微小環境が、神経幹細胞移植において移植細胞の生存、分化、腫瘍形成性にどのように影響するか考察するために、ヒト iPS 細胞、ES 細胞由来の神経幹細胞を、損傷後 9 日と 30 日に免疫不全マウス損傷脊髄に移植した。移植後 10 週まで各種運動機能評価と、疼痛などの異常感覚が生じていないか感覚機能評価を行い、現在解析中である。これらのマウスの脊髄の組織学的検討を行い、移植細胞の分化、増殖、移動を定量的に解析し、亜急性期群、慢性期群、対照群の 3 群間で比較検討を行う。

## §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。