

ヒトiPS細胞で脊髄損傷のマウスの運動機能回復

Treatment of a Mouse Model of Spinal Cord Injury
by Transplantation of Human iPS Cell-derived Long-term Self-renewing Neuroepithelial-like Stem Cells

Satoshi Nori, Yohei Okada, Akimasa Yasuda, Osahiko Tsuji, Yuichiro Takahashi, Yoshiomi Kobayash, Kanehiro Fujiyoshi, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Eiji Ikeda, Yoshiaki Toyama, Shinya Yamanaka, Masaya Nakamura, and Hideyuki Okano

Department of Physiology, Department of Orthopaedic Surgery, Kanrinmaru-Project, School of Medicine, Keio University, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan; Department of Cell Biology and Neuroscience, Juntendo University Graduate School of Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan; Department of Pathology, School of Medicine, Keio University, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan; Department of Pathology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan; and Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Edited by Fred H. Gage, The Salk Institute, San Diego, CA, and approved September 1, 2011 (received for review May 20, 2011)

【要約】

再生医療において、倫理的問題を伴わないヒト iPS 細胞 (hiPSCs) は、安全性が確認されさえすれば、他の細胞よりも好まれる細胞源となるでしょう。ここでは、脊髄損傷 (SCI) を治療するために、膵膵糖尿病 (NOD) で、重症複合免疫不全 (SCID) のマウスにヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) を移植する治療の有効性を調査しています。このために、4 つの転写因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) をヒト線維芽細胞へ転写することで形成されたヒト iPS 細胞クローン (201B7) を使用しました。移植されたヒト iPS 細胞は損傷した脊髄の中で生き残り、転位し、3 つの主要な神経系列 (ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト) へと分化しました。ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NS) から派生するニューロンと被移植体マウスのニューロン間のシナプス形成、神経栄養因子の発現、血管形成、軸索再生、損傷部位のミエリン鞘の増加などを含む、細胞自律的な効果と膵膵細胞自律的な効果の両方を示しました。媒介体により治療された動物と比較すると、これらの効果は、著しい運動機能回復をもたらしました。そして、その回復は、脊髄損傷後 112 日目の観察期間の終了時まで持続しました。ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NS) を移植されたマウスからは腫瘍は一つも形成されていませんでした。これらの結果はヒト iPS 細胞が脊髄損傷後の機能改善を支持する神経幹細胞 / 神経前駆細胞を誘発し、その治療の将来有望な細胞源であることを示唆しています。

- ヒト iPS 細胞 (hiPSCs) : 人工多能性幹細胞の略。体細胞に特定因子を導入することにより樹立される、ES 細胞に類似した多能性幹細胞。2006 年に山中教授の研究グループにより世界で初めてマウス体細胞を用いて樹立された。自分自身の細胞を使えば拒絶反応もない。
- ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) : 神経幹細胞を含む球状の神経系細胞の塊。ES 細胞や iPS 細胞から分化させて 1 次ニューロスフェアを作成し、それをさらに継代培養したものを 2 次ニューロスフェアという。神経幹細胞を浮遊培養で継代培養する方法として用いられる。
- ES 細胞 : 胚性幹細胞の略。ES 細胞は受精卵を壊して利用するため、倫理的問題が指摘されている。
- 転写因子 : 細胞の設計図である遺伝子を解読する役割がある。

- 線維芽細胞 : 結合組織を構成する細胞の 1 つ。皮膚の機能を保つ上で最も重要な細胞。皮膚組織と皮膚細胞の間を結合させる活発な働きをしている。
- 転写 : 遺伝子発現の第一段階で、DNA を RNA として写しとる反応。RNA は科学的にもろく、ちぎれやすい。また、「書き込まれた」情報も変わりやすい。一方、酵素を 1 つ抜いた DNA は、丈夫で情報も変わりにくく、遺伝情報をしっかり写し取る。
- 神経幹細胞 / 神経前駆細胞 : 中枢神経実質はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの 3 種類の細胞からなる。これらすべての細胞を産み出すことができ (多分化能)、同じ多分化能を持つ細胞を分裂によって複製することができる (自己複製能) 細胞が狭義の神経幹細胞である。神経のみに分化する未分化細胞は神経前駆細胞である。
- ニューロン : 神経細胞。神経系を構成する細胞。
- アストロサイト & オリゴデンドロサイト : グリア細胞の種類
- グリア細胞 : 神経系を構成する神経細胞ではない細胞の総称。神経線維の周囲を取り巻いている絶縁する「さや」を作る細胞。
- 神経栄養因子 : 神経細胞の生存、発生、機能に必要とされる因子。
- ミエリン鞘 : 髄鞘。神経繊維の軸索を包む鞘 (さや) 状の被膜。

神経幹細胞 / 神経前駆細胞 (NS/PCs) を移植するような幹細胞基盤のアプローチは、さまざまな中枢神経障害の治療においての将来有望です。これまでの研究では、げっ歯類や非人類霊長類の損傷した脊髄へ神経幹細胞 / 神経前駆細胞 (NS/PCs) を移植した後の機能回復は報告されています。さらに、近年の研究では胚性幹細胞 (ES 細胞) が神経幹細胞 / 神経前駆細胞 (NS/PCs) やオリゴデンドロサイト前駆細胞を含む神経細胞を発生させることを明らかにしました。それによって、脊髄損傷の ES 細胞基盤の治療が研究所から臨床治療へと移行しています。しかし、ヒト ES 細胞治療は国によっては倫理的問題により複雑になっています。前回の研究では、ES 細胞に関する問題を避けるために、マウスの線維芽細胞から iPS 細胞を作り、そして、動物モデルの脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) の治療的可能性が証明されました。

今回の研究では、脊髄損傷患者へのヒト iPS 細胞基盤治療に着眼し、膵膵糖尿病 (NOD) で、重症複合免疫不全 (SCID) のマウスに iPS 細胞ニューロスフェア (iPSC-NSs) を移植することで、ヒト iPS 細胞の治療的可能性について調べました。成人のヒトの皮膚線維芽細胞へ 4 つの転写因子をレトロウイルス導入することで作ったヒト iPS 細胞のクローンを用いました。この研究で使用されたクローンは 201B7 で、転写因子は Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc でした。これらの移植されたヒト iPS 細胞は損傷した脊髄の中で生き残り、転位し、3 つの主要な神経系列へと分化しました。それらは、血管形成、軸索再生、損傷部位のミエリン鞘を保護し、いくつかは被移植体のマウスのニューロンとシナプス形成をしました。これらは腫瘍を作ることなく、機能回復改善の効果をもたらし、またその効果は脊髄損傷後 112 日目まで持続しました。これらの結果はヒト iPS 細胞が脊髄損傷後の移植治療のための将来有望な細胞源であることを示しています。

- レトロウイルス : RNA (リボ核酸) から DNA (デオキシリボ核酸) を作る酵素 (逆転写酵素) をもつウイルス。遺伝子治療のベクターとして利用され、また逆転写酵素は、RNA から DNA を作るのに応用されている。

【結果】

- iPS 細胞は生き残り、転位し、3つの主要な神経系列へと分化しました。(略) 肥満糖尿病で重症複合免疫不全 (NOD-SCID) のマウスの Th10 レベルに脊髄損傷を負わせた。
- ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) と被移植体のマウスのニューロンとの間にシナプス形成が起こりました。(略)
- ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) の移植により血管形成と軸索の再生を促進されましたが、脊髄損傷後の痛みに関係する求心性カルシトニン遺伝子関連ペプチドへの異常な神経刺激伝達はおこりませんでした。(略)
- カルシトニン遺伝子関連ペプチド：中枢神経、心臓や血管など末梢の一次知覚神経の終末および遠位端に存在しているアミノ酸 37 個からなるペプチドである。
- ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) の移植により脊髄損傷後の運動機能と電気生理学的回復を促進されました。(略)
- 電気生理学：神経、脳、筋肉、心臓やその他の組織または細胞の電氣的性質と生理機能との関係を解明する生理学の一部門。
- ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) の移植後の長期的な観察により腫瘍形成が認められなかったことが明らかにされました。(略)

【考察】

今回の研究では、NOD-SCID の大人のマウスの脊髄損傷を治療するため、細胞源としてヒト iPS 細胞ニューロスフェア由来のクローン 201B7 を使用しました。これらの移植されたヒト iPS 細胞は損傷した脊髄の中で生き残り、転位し、3つの主要な神経系列へと分化し、運動機能回復を促進しました。仮説上では、ヒト iPS 細胞ニューロスフェアの移植は、血管形成、軸索再生、ローカル回路再建を含む広範囲に渡り効果的な結果をもたらすことができます。これらの結果は、これまでの ES 細胞や iPS 細胞を使ったげっ歯類の脊髄損傷の治療研究で報告されています。この全てのメカニズムは、脊髄損傷へのヒト iPS 細胞移植治療後の運動機能回復へ貢献するかもしれません。

脊髄損傷後の血管形成は内因性の修復を促進し、軸索再生をサポートします。この研究では、ヒト iPS 細胞ニューロスフェア移植が脊髄損傷後の血管形成とスベア組織を増強しました。アストロサイトは低酸素状態下においても、血管内皮増殖因子 (VEGF) のような血管新生促進因子を発現させました。ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトと被移植体のアストロサイトが VEGF を発現しました。これは、ヒト iPS 細胞ニューロスフェアの移植が移植体と被移植体の双方における VEGF の発現を促進したことを示しています。

- 血管内皮増殖因子：血管がないところに新たに血管がつくられること。既存の血管から分枝伸長して血管を形成することに関与する一群の糖タンパク。

また、運動機能回復はヒト iPS 細胞ニューロスフェア移植により促進された軸索再生によってサポートされています。免疫組織学的分析によると、ヒト iPS 細胞移植由来グリア線維酸性たんぱく質 (GFAP+) アストロサイトは 神経線維 (NF-H+) とヒドロキソトリプタミン線維 (5HT+) に密接に関係していることが明らかになりました。移植由来のアストロサイトは成長に寛容な基盤を与える事によって、NF-H+ 線維と 5HT+ 線維の再生を促進することが報告されています。さらに、NGF, BDNF, HGF のような神経栄養因子は軸索再生とニューロンの残存において欠かせない役割を果たしています。これらの報告のように、ヒト iPS 細胞由来ニューロスフェアの移植

は脊髄の遠位部の軸索再生を促進するという結果が観察されました。我々の治療が軸索再生を誘発したことを受けて、神経幹細胞 / 神経前駆細胞 (NS/PCs) により誘発されるアロディニアに密接に関係している脊髄後角第 3 層に入ってくる求心性の痛みについても調べました。分析によると、コントロールグループとヒト iPS 細胞由来のニューロスフェア移植のグループに顕著な差は見られませんでした。よって、アロディニア自体は評価はされていませんが、形態学的なデータによると、iPS 細胞由来のニューロスフェア移植は求心性の痛みによる異常な神経支配を誘発しませんでした。

- ヒドロキソトリプタミン：脳、血小板、消化管、松果体などに存在するホルモン。神経伝達物質 (神経が相互に情報を伝達するのに用いられる物質) や血管収縮物質 (血管を細くさせる物質) として作用する。

この研究で観察された運動機能回復は、ヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) 由来のニューロンと被移植体のマウスのニューロンとの間にシナプス形成が起こったためでもあります。現在のデータは、移植されたヒト iPS 細胞ニューロスフェア (hiPSC-NSs) 由来のニューロンと脊髄損傷を負った被移植体のニューロンとの間にシナプス形成が起こる可能性を支持しています。これまでの研究では、脊髄損傷後の機能回復は、神経前駆細胞のみに関連しているか、またはその他の細胞含む髄腔内の移植に関連していると説明されてきました。このような研究では、ヒト由来の移植ニューロンは、被移植体マウスのニューロンの突出を受け取ることができ、伸びた突起は被移植体のニューロンとシナプスを形成することができると報告しています。損傷のあるエリアのニューロン (残存した移植体のニューロンと移植由来のニューロンの混合) は、信号を中継して伝達できるようです。

ほとんどのヒト iPS 細胞由来ニューロスフェアの成熟した神経細胞は GABA 系であることが観察されました。GABA 系とは神経伝達物質のタイプです。この神経伝達物質は、脊髄内で運動ニューロンの出力や感覚入力のレベルのコントロール、一次求心性伝達物質放出の変調、シナプス後の運動ニューロン抑制調節することにおいて重要な役割を果たしています。さらに、脊髄 GABA 系抑制性神経伝達物質の機能不全は、脊髄損傷によって発生する異常な痛みに関係しています。よって、ドナー由来の GABA 系ニューロンによるシナプス形成は、脊髄ニューロンネットワーク内で運動調整と、脊髄損傷に誘発されるケイセイや痛みの抑制においても重要かもしれません。

- GABA: アミノ酸のひとつで、主に抑制性の神経伝達物質として機能している物質。

ヒト iPS 細胞基盤の治療の一番の欠点になる可能性があるのは腫瘍形成です。従って、治療した動物を長期に渡って観察しました。ヒト iPS 細胞由来ニューロスフェア移植のグループにおいては脊髄損傷を負った 112 日後に、機能回復を維持しただけでなく、腫瘍形成も全く起こりませんでした。ヒト iPS 細胞由来ニューロスフェアの表現型の定量分析によると、脊髄損傷後 56 日後と 112 日後を比較したところ、成熟した神経細胞のニューロン核とグリア線維酸性ペプチドのパーセンテージが上昇していることが明らかになっています。この結果は、長期に渡り移植されたヒト iPS 細胞由来のニューロスフェアのほとんどが成熟した神経細胞へと分化していくことに成功したことを証明しています。脊髄損傷後 56 日後に比べると、割合は低下してはいますが、脊髄損傷 112 日後にネスチン (Nestin+) /HNu+ 細胞や Ki-67+/HNu+ 細胞はいくらか存在していました。この結果は、移植した細胞はヒト iPS 細胞由来ニューロスフェアとして残っていることを示しています。しかし、過度な増殖や増殖細胞の塊、またはその他の腫瘍形成の兆候の証拠は移植したマウスのいずれにもありませんでした。まとめると、腫瘍がないこと、長期に渡るニューロン核の上昇があること、そして、ネスチン (Nestin) や Ki-67 の数少ないということが、このアプローチは人間に対しても安全である可能性を支持しています。

- ・ネスチン:神経外胚葉の前駆細胞(幹細胞)に特有の中間径フィラメント。
- ・Ki-67:細胞増殖に関係する、または必要かもしれない核たんぱく質。RNAの転写と関連している。

同様に、ヒトの胎児の神経幹細胞/神経前駆細胞は移植6ヶ月後のNOD-SCIDの線条体における細胞増殖マーカーあるKi-67や細胞核遺伝子に対してネガティブなNestin+/HNU+を発現しました。移植4ヶ月後のNOD-SCIDのマウスの脊髄内にはNestin+/HNU+は28-34%、Ki-67+/HNU+は2-4%存在しました。移植6ヶ月後のマウスにはNestin+/HNU+が11-14%、Ki-67+/HNU+が3-5%存在しました。長期的な観察の後、移植細胞のNestin+やKi-67+の存在にも関わらず、これらの研究には特に腫瘍形成は観察されませんでした。

最近では、ヒト神経幹細胞/神経前駆細胞、または、ヒト胚性幹細胞(ES細胞)由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞を使った、脊髄損傷へのES細胞を基盤とする治療の臨床試験が開始されています。オリゴデンドロサイト前駆細胞を介したミエリン鞘の返還と栄養作用が、このパラダイムの研究に利益をもたらした仕組みである可能性が高いです。ヒトES細胞を使うことの免疫拒絶反応と倫理的問題を克服することに加えて、ヒトiPS細胞由来のニューロスフェアは脊髄損傷に誘発されるケイセイや痛みを抑えるGABA系ニューロン生じたことも考慮すると、現在の研究は移植したヒトiPS細胞ニューロスフェアはヒトES細胞よりもより有益であるかもしれないことを指示しています。ヒトiPS細胞神経は細胞自律的な効果と腓細胞自律的へ有益な効果をもたらすアストロサイト、オリゴデンドロサイトへ分化しますが、それに関わらず、これらの研究結果は臨床試験への第一歩にすぎません。これからの研究では、例えばヒトではない霊長類の脊髄損傷モデルなどで、ヒトiPS細胞由来の神経幹細胞/神経前駆細胞の安全性と有効性に重点を置いて調査することになるでしょう。特に、統合遊離ウイルスシステム、ウイルスフリー、または移入遺伝子フリーシステム、あるいは、HALホモ接合型ドナー由来細胞などのような異なる方法を使用して再プログラミングを実現したヒトiPS細胞の評価がされえるべきでしょう。

HLA: Human Leucocyte Antigen(ヒト白血球抗原)の略。現在はヒトの主要組織の抗原性(反応性)を表している。HLAが合わないと拒絶反応を起こす。HLAの「ホモ型」の方を50名見つけてくると、日本人の場合は90%はこの50名に由来するiPS細胞バンクでカバーできる。