

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462237

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来皮質運動神経シートの作成と移植応用

研究課題名(英文) Cortical motor neuronal cell sheet derived from human iPS cells for stroke patients

研究代表者

鈴木 登 (Suzuki, Noboru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：40235982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳血管障害は片麻痺など運動機能障害の主要な原因である。脳血管障害に対する神経細胞移植療法が脚光を浴びている。

新しく開発した皮質運動神経細胞シートは、大脳運動領域の皮質梗塞周囲巣の皮質にそのシートの層を置くことで最大限の接触面積を図り、移植細胞の生存率の著しい増加をもたらした。実際、この運動神経細胞シート移植後の、片麻痺モデルマウスの運動機能は著明に改善し、移植後の組織学的修復も十分に改善していた。

研究成果の概要(英文)：Transplantation of stem cells which differentiate into more mature neural cells brings about functional improvement in pre-clinical studies of stroke. In order to obtain suitable cell types for grafting patients with stroke, we have modified a protocol for differentiating human iPS cells to cells phenotypically related to cortical motor neurons. Moreover, we considered to use cell sheet technology for neural cell transplantation to avoid needle insertion which could damage host brain architecture.

The neural cell sheets we made were transplanted to damaged motor cortex in a way of a novel neuronal cell sheet that maintained cell-cell interactions, without needle insertion to patient's brain and improved motor functions of the hemiplegic model mice. The sheet transplantation brought about structural restoration partly and improvement of motor functions in hemiplegic mice. The motoneuron cell sheets are possibly applicable for stroke patients by using patient specific iPS cells.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 神経細胞移植 片麻痺 細胞シート

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害の患者数は現在約150万人と言われ毎年25万人以上が新たに発症する。「寝たきりになる原因」の3割近くが脳血管疾患で成人の運動機能障害の主要な原因となっている。脳組織の回復能の低さは脳梗塞を回避できたその周辺の組織（梗塞周囲巣）での神経回路の麻痺状態と、この梗塞周囲巣の神経再生能の欠落による。神経細胞移植は、脳血管障害治療として期待されている。ES細胞やiPS細胞を神経前駆細胞に分化させ移植することは、前臨床段階までは行動機能回復を導いている。これら動物モデルでは、移植細胞は神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化し組織と機能の修復に関わる。脳血管障害後における前駆細胞移植効果の正確なメカニズムはわかっていないが、細胞の直接接触や、内在性の修復機構を刺激する成長因子の分泌、さらには前駆細胞の神経細胞への分化と、梗塞周囲巣でのシナプス性の接触の存在が関与する。すなわち神経前駆細胞は脳血管障害の回復に効果がある。一方で、現状では多くの研究で、神経細胞移植後の生存移植細胞は移植細胞数の激減する事と移植細胞の分化が人為的にはコントロールできず、腫瘍形成も否定できないことにある。

2. 研究の目的

この研究計画においてはヒトiPS細胞からFoxP2, CTIP2, Crim1, FetzF2陽性の皮質運動神経細胞を分化誘導して実験に使用する。具体的な方法はレチノイン酸に加えてcyclopamine (hedgehogの阻害剤)とNoggin-Fcを順番に加えて10日間培養することで、

90%以上NCAM陽性の神経細胞を誘導でき、およそその半数がFoxP2, CTIP2, Crim1, FetzF2陽性の皮質運動神経細胞であることを確認した (Suzuki N et al. submitted for publication)。この細胞は既に増殖能を示さず、脳内に移植した後でも腫瘍形成の可能性は著しく低いと考えられる。実際、この細胞を脳内に移植した後、免疫抑制薬投与を受けた100匹以上のマウスでも腫瘍形成を認めていない。

3. 研究の方法

新しく開発した皮質運動神経細胞シートの移植を、移植細胞の細胞間相互作用を保存するため試みる。我々は既にこの皮質運動神経細胞を温度感応性ゲラチンポリマーの上で培養継続することでsynaptophysin陽性の神経細胞ネットワークを構築した神経細胞シートを作成できる。この細胞供給方法は、皮質梗塞周囲巣の皮質にそのシートの層を置くことで、最大限の接触面積を図り、移植細胞の生存率の著しい増加をもたらす事は既に確認した。ここでは、もっとも一般的なヒトの梗塞部位である大脳皮質で、もっとも障害性の高いレシピエントの脳局所に絞り込んだ唯一の細胞である皮質運動神経細胞を作り、さらにはその局所のために特別に考案された生物工学的な供給方法を作り出すことによって、新規治療法を樹立するものである。

4. 研究成果

脳血管障害は片麻痺など運動機能障害の主要な原因である。脳血管障害に対する神経細胞移植療法が脚光を浴びている。これまでは、神経幹細胞を

分化誘導し様々な脳局所に移植している。神経幹細胞に比べ、脳血管障害で実際に傷害される神経である前脳および皮質運動野神経への分化誘導方法はこれまでに存在しない。我々はヒト iPS 細胞を用いて脳血管障害の移植部位に、一番ふさわしい皮質運動神経細胞に分化させる培養方法を3種類の成長因子の組み合わせることで確立した。

通常の神経細胞移植では、移植細胞がまさに移植される瞬間にバラバラにされた後に細胞浮遊液にされ、通常の細胞相互作用を取り除かれた状態で、非常に高いストレス状態におかれているために、移植後に細胞の多くが死滅する。

皮質梗塞局所の解剖学的な特徴を考慮し、細胞間相互作用を保持したままの移植を可能とするために、この皮質運動神経細胞を温度感応性ゲラチンポリマーの上で培養継続することで synaptophysin 陽性の神経細胞ネットワークを構築した神経細胞シートを構築することが可能になった。新しく開発したこの皮質運動神経細胞シートを片麻痺モデルマウスへの移植に応用してその有用性を評価した。皮質運動神経細胞シートは、皮質梗塞周囲巣の皮質にそのシートの層を置くことで最大限の接触面積を図り、移植細胞の生存率の著しい増加をもたらした。実際、この運動神経細胞シート移植後の、片麻痺モデルマウスの運動機能は著明に改善し、移植後の組織学的修復も十分であった(現在論文修正中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 29 件)

1. Shimizu J, Oka H, Yamano Y, Yudoh K, Suzuki N. Cutaneous Manifestations of Patients with Relapsing Polychondritis: an association with extracutaneous complications. *Clinical Rheumatology* 2016;35:781-783. 査読あり.
2. Shimizu J, Takai K, Takada E, Fujiwara N, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Possible association of proinflammatory cytokines including IL1 β and TNF α with enhanced Th17 cell differentiation in patients with Behcet's disease. *Clinical Rheumatology* 2016 印刷中 査読あり.
3. Shimizu J, Hiroshi Oka, Yoshihisa Yamano, Kazuo Yudoh, Suzuki N. Cardiac involvement in relapsing polychondritis in Japan. *Rheumatology* 2016;55:583-584. 査読あり.
4. Kobayashi M, Chiba A, Izawa H, Yanagida E, Okamoto M, Shimodaira S, Yonemitsu Y, Shibamoto Y, Suzuki N, Nagaya M, The DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). The feasibility and clinical effects of dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for recurrent ovarian cancer. *Journal of ovarian research*. 2016 in press. 査読あり.
5. 清水 潤、久保田孝雄、鈴木 登. ヒトアレルギー・免疫疾患における

- Th17細胞異常と腸内細菌叢
Dysbiosis. アレルギーの臨床 2016
年2月号 印刷中. 査読なし.
6. 鈴木 登. 関節症から全身性疾患を
診る 再発性多発軟骨炎. リウマチ
科2016;55: 203-208. 査読なし.
7. Iinuma M, Umehara T, Arimitsu N,
Shimizu J, Misawa H, Takai K,
Fujiwara N, Fujii A, Ueda Y,
Wakisaka S, Suzuki T, Hirotsu C,
Beppu M, Suzuki N. Induction of
neural cells with spinal motoneuron
phenotype from human iPS cells and
the transplantation to totally
transected spinal cords in mice.
Inflammation and Regeneration
2015;35:154-163. 査読あり.
8. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K,
Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S,
Suzuki T, Suzuki N. Cellular and
molecular mechanisms of the
restoration of human APP transgenic
mouse cognitive dysfunction after
transplant of human iPS
cell-derived neural cells.
Experimental Neurology 2015;271:
423-431. 査読あり.
9. Suzuki N, Shimizu J, Hirotsu C,
Takada E, Arimitsu N, Ueda Y,
Fujiwara N, Suzuki T, Takai K.
Generation of Retinal Progenitor
Cell Sheets which Differentiate
into Rhodopsin Positive
Photoreceptors from Mouse iPS Cell
Derived Retinal Progenitor Cell
Clones. International Journal of
Ophthalmology and Clinical Research
2015;2:1-5. 査読あり.
10. 鈴木 登. 新たな難病対策に向け
て-診断基準、重症度分類、再発性多
発軟骨炎. リウマチ科 2015;54:
60-66. 査読なし.
11. 鈴木 登. 再発性多発軟骨炎の最
新の知見. 皮膚病診療
2015;37:828-834. 査読なし.
12. 鈴木登. 新たな難病対策に向けて
-診断基準, 重傷度分類 再発性多発
軟骨炎. リウマチ科 2015;54:60-66.
査読なし.
13. 鈴木登. 再発性多発軟骨炎の最
新の知見. 皮膚病診療
2015;37:828-834. 査読なし.
14. 鈴木 登. 再発性多発軟骨炎.
2015年 別冊 新領域別症候群シリ
ーズ 免疫症候群 (第2版) I-その
他の免疫疾患を含めて-
2015;631-636. 査読なし.
15. Sato T, Yamano Y, Tomaru U,
Shimizu Y, Ando H, Okazaki T,
Nagafuchi H, Shimizu J, Ozaki S,
Miyazawa T, Yudoh K, Oka H, Suzuki
N. Serum level of soluble triggering
receptor expressed on myeloid
cells-1 as a biomarker of disease
activity in relapsing
polychondritis. Modern
Rheumatology 2014;24:129-136. 査
読あり.
16. Ueno H, Hattori T, Kumagai Y,
Suzuki N, Ueno S, Takagi H.
Alterations in the Corneal Nerve
and Stem/Progenitor Cells in
Diabetes: Preventive Effects of
Insulin-Like Growth Factor-1
Treatment. International Journal
of Endocrinology 2014;2014:312401.
査読あり.
17. Oka H, Yamano Y, Shimizu J,
Yudoh K, Suzuki N. A large-scale
survey of patients with relapsing

- polychondritis in Japan. Inflammation and Regeneration 2014;34:149-156. 査読あり.
18. Baba T, Kashiwagi Y, Arimitsu N, Kogure T, Edo A, Maruyama T, Nakao K, Nakanishi H, Kinoshita M, Frohman MA, Yamamoto A, Tani K. Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics. J Biol Chem 2014;289:11497-11511. 査読あり.
19. 鈴木 登, 鈴木 知子. 免疫介在性脳炎 再発性多発軟骨炎. 日本臨床 2014 別冊神経症候群II. 2014; 717-722. 査読なし.
20. Suzuki N, Shimizu J, Oka H, Yamano Y, Yudoh K. Neurological Involvement of Relapsing polychondritis in Japan: An Epidemiological Study. Inflammation and Regeneration 2014;34:206-208. 査読あり.
21. Misawa H, Saito A, Shimizu J, Iinuma M, Shiratsuchi T, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Pax7 Gene Induction Rapidly Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. St. Marianna Medical Journal 2014;5:59-67. 査読あり.
22. Yoshioka T, Kurokawa MS, Sato T, Nagai K, Iizuka N, Arito M, Takakuwa Y, Nakano H, Ooka S, Suematsu N, Okamoto K, Yudoh K, Nakamura H, Suzuki N, Ozaki S, Kato T. Protein profiles of peripheral blood mononuclear cells as a candidate biomarker for Behçet's disease. Clin Exp Rheumatol. 2014;32:S9-19. 査読あり.
23. Maruyama T, Shimizu J, Suzuki N. T cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) regulates phosphorylation of Txk, a tyrosine kinase of the Tec family. Inflammation and Regeneration 2014;34:240-246. 査読あり.
24. Kono T, Arimitsu N, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Umehara T, Saito A, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Hashimoto T, Tanaka Y, Suzuki N. Human iPS Cell Derived Neurons with Cortical Motor Neuron Phenotype are Relevant for Functional Recovery of Hemiplegic Mice with Injured Motor Cortex. St. Marianna Medical Journal 2013;4:31-40. 査読あり.
25. Umehara T, Arimitsu N, Iinuma M, Shimizu J, Takai K, Fujiwara N, Saito A, Kono T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. Transplantation of Motor Neurons Derived from Human iPS Cells into Total Transection Model of Spinal Cord Injury in Mice. St. Marianna Medical Journal 2013;4:21-30. 査読あり.
26. Saito A, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Arimitsu N, Umehara T, Kono T, Misawa H, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Beppu M, Suzuki N. IGFII/Akt Signaling Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells. St. Marianna Medical Journal 2013;4:41-48. 査読あり.
27. Fujiwara N, Shimizu J, Takai K, Arimitsu N, Saito A, Kono T, Umehara

T, Ueda Y, Wakisaka S, Suzuki T, Suzuki N. Restoration of spatial memory dysfunction of human APP transgenic mice by transplantation of neurons derived from human iPS cells. Neuroscience Letters. 2013; 557:129-134. 査読あり.

28. Shimizu J, Kaneko F, Suzuki N. Skewed Helper T-Cell Responses to IL-12 Family Cytokines Produced by Antigen-Presenting Cells and the Genetic Background in Behcet's Disease. Genet Res Int 2013;2013:363859. 査読あり.

29. Kobayashi M, Sakabe T, Abe F, Tanii M, Takahashi H, Chiba A, Yanagida E, Shibamoto Y, Ogasawara M, Tsujitani S, Koido S, Nagai K, Shimodaira S, Okamoto M, Yonemitsu Y, Suzuki N, Nagaya M, The DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT). Dendritic cell-based immunotherapy targeting synthesized peptides for advanced biliary tract cancer. J Gastrointest Surg 2013;17:1609-1617. 査読あり.

[学会発表] (計 10 件)

1. Fujiwara N, Takai K, Takada E, Hirotsu C, Arimitsu N, Shimizu J, Suzuki N. Human iPS derived neural stem/precursor improved spatial memory learning of dementia model mice. International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting Stockholm, Sweden 2015. 6. 24-27.

他

[図書] (計 4 件)

1. Kurokawa MS, Suzuki N. Behcet's Disease. Current Research in Immunology, 2016 in press.
2. Suzuki N, Shimizu J. Chapter 2: The Immunopathology of Behcet's Disease. In: Ishigatsubo Y, eds. Behcet's Disease - From Genetics to Therapies. Tokyo, Japan: Shpringer Japan, 2016 in press.

他

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 鈴木 登
(Suzuki, Noboru)

聖マリアンナ医科大学・医学部・
教授

研究者番号：40235982

(2) 研究分担者 有光 なぎさ
(Arimitsu, Nagisa)

聖マリアンナ医科大学・医学部・
助教

研究者番号：40408688

(3) 連携研究者 鈴木 知子
(Suzuki, Tomoko)

聖マリアンナ医科大学・医学部・
講師

研究者番号：80596756