

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16927

研究課題名（和文）領域特異的なiPS細胞由来神経幹細胞を用いた脊髄損傷に対する新しい再生医療の開発

研究課題名（英文）Cell therapy for spinal cord injury by using human iPSC-derived region-specific neural progenitor cells

研究代表者

今泉 研人（IMAIZUMI, Kent）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：10835846

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年の培養技術の発展により、iPS細胞から様々な脳領域の特性を持つ領域特異的な神経幹細胞を作り分ける技術が発展している。しかしながら、脊髄損傷に対するiPS細胞由来神経幹細胞を用いた細胞移植治療においては、この神経幹細胞の領域特異性についてはほとんど検討されていない。本研究では、iPS細胞から領域特異的な神経幹細胞を作出し、どの脳領域の神経幹細胞が高い治療効果を発揮するかを検討した。研究の結果、脊髄の領域特性を持つ神経幹細胞が特に高い運動機能改善効果を発揮することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷治療における神経幹細胞の領域特異性に着目し、脊髄型神経幹細胞が最も高い治療効果を発揮することを明らかにした。この結果から、iPS細胞を用いた脊髄損傷再生医療において、従来の手法よりも治療効果の優れた神経幹細胞を作成できる可能性を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：The transplantation of neural progenitor cells (NPCs) derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) has beneficial effects on spinal cord injury; however, it remains unknown what subtypes of NPCs are most effective. In this study, we generated region-specific NPC subtypes from human iPSCs and grafted them onto the injured spinal cord in mice. We demonstrated that NPCs with spinal cord identity but not those with forebrain identity resulted in functional improvement in SCI mice.

研究分野：神経科学

キーワード：領域特異性 iPS細胞 神経幹細胞 脊髄損傷

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は、外傷などにより脊髄における神経機能が破綻することで、運動・感覚機能の喪失をもたらし、患者のQOLを著しく障害する疾患である。現時点で未だ治療法が確立されておらず、数多くの研究者がこの疾患に対する根本的治療法の開発に取り組んでいる。その中で、細胞移植療法は、動物モデルでの有用性が報告されており、有望な治療法の1つとして高く注目されている。特に、ヒト iPS 細胞の発明によってヒト由来の神経幹細胞が比較的容易に作成できるようになったことで、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞を用いた脊髄損傷に対する移植療法が発展してきた。

一方で、神経幹細胞は各脳領域ごとにそれぞれ固有の特性を持っていることが知られている。近年の培養技術の発展から、ヒト iPS 細胞から様々な脳領域固有の神経幹細胞を作り分けられる技術が発達してきた。しかしながら、iPS 細胞を用いた脊髄損傷の再生医療においては、神経幹細胞の領域特異性はほとんど検討されておらず、どの脳領域の神経幹細胞が脊髄損傷治療に最も有効であるかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞から各脳領域に特異的な神経幹細胞を作出し、脊髄損傷に対する機能改善効果の差異を明らかにする。さらに、領域情報による治療効果の差異を通して、神経幹細胞移植による脊髄損傷の治療メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞からの領域特異的神経幹細胞の作出: Wnt およびレチノイン酸シグナルの濃度勾配によって前脳-脊髄の運命決定が行われることが知られている。これを利用して、iPS 細胞から神経幹細胞を誘導する過程において Wnt 阻害薬処理を行うことで、前脳型神経幹細胞を選択的に誘導した。一方で、Wnt 活性化剤とレチノイン酸を処理することで、脊髄型神経幹細胞を誘導した。

(2) 領域特異的神経幹細胞の損傷脊髄への移植: 脊髄損傷モデルマウスとして、Th10 レベルで圧挫損傷を加えた NOD-SCID マウスを使用した。上記の前脳型および脊髄型 iPS 細胞由来神経幹細胞を、それぞれ損傷 9 日後に損傷中心部に移植した。

(3) 脊髄損傷マウスの運動機能評価: iPS 細胞由来神経幹細胞を移植したマウスの運動機能を下肢運動評価スケールである Basso Motor Scale (BMS) を用いて、損傷後 9 週まで評価した。

(4) 損傷脊髄の組織学的評価: 損傷後 9 週の損傷脊髄を免疫組織化学染色にて評価した。

(5) BDA によるホスト神経回路トレーシング: ホスト神経回路と移植細胞との相互関係を明らかにするために、Biotinylated Dextran Amine (BDA; 分子量 10 kDa) を細胞移植マウスの sensorimotor cortex に注入した。

4. 研究成果

(1) iPS 細胞から神経幹細胞を誘導する過程において Wnt 阻害薬である IWR1e を処理することで、前脳に特異的なマーカーである FOXG1 および EMX1 を発現する前脳型神経幹細胞を作出することに成功した。さらに、Wnt 活性化剤である CHIR99021 とレチノイン酸を処理することで、脊髄に特異的なマーカーである HOXB4, HOXC4 を発現する脊髄型神経幹細胞を誘導した。

(2) 前脳型および脊髄型神経幹細胞は、増殖性、細胞生存率、分化傾向に大きな差異を認めなかった。

(3) 上記の iPS 細胞由来の領域特異的神経幹細胞を、脊髄損傷マウスに移植したところ、損傷 9 週後(移植後 8 週)においても細胞の生着を認め、ニューロンおよびグリア細胞への分化を確認した。

(4) 生着後の移植細胞を詳細に調べると、領域特異的マーカーである FOXG1, HOXB4 の発現がそ

れぞれ維持されていることから、前脳型および脊髄型神経幹細胞は移植後も、それぞれの固有の脳領域特性を保持していることが明らかとなった。

(5) BMS を用いて下肢運動機能を評価すると、脊髄型神経幹細胞を移植した群は、非移植群と比較して統計的に有意な運動機能改善を示した。一方で、前脳型神経幹細胞を移植した群では、有意な運動機能改善は認めなかった。このことから、脊髄型の領域特性を持つ神経幹細胞が特に高い運動機能改善効果を有することが明らかとなった。

(6) 脊髄型と前脳型細胞の移植において、ホスト神経回路との接続の有無を検証するために、BDA を用いてホストの皮質脊髄路をラベルした。その結果、脊髄型細胞は皮質脊髄路との接続を示しているのに対して、前脳型細胞ではそのような接続は見られなかった。この結果から、脊髄型と前脳型細胞の治療効果の差異には、ホスト神経回路との接続の有無が関与していることが示唆された。

(7) 一方で、脊髄型細胞を移植された群においても高い治療効果を得られた個体とそうでない個体が存在した。この治療効果の差異を明らかにするために、損傷後 9 週の移植細胞体積および損傷体積を、各個体ごとに算出した。その結果、BMS が高い(運動機能改善が著しい)個体は、移植細胞体積が大きく、かつ損傷体積が小さい傾向があることが明らかとなった。この結果から、mild-to-moderate 損傷の個体に多くの脊髄型移植細胞が生着した場合に、特に高い治療効果を発揮することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Lam Matti, Sanosaka Tsukasa, Lundin Anders, Imaizumi Kent, Etal Damla, Karlsson Fredrik H., Clausen Maryam, Cairns Jonathan, Hicks Ryan, Kohyama Jun, Kele Malin, Okano Hideyuki, Falk Anna	4. 巻 24
2. 論文標題 Single cell study of neural stem cells derived from human iPSCs reveals distinct progenitor populations with neurogenic and gliogenic potential	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 836 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sho Misato, Ichyanagi Naoki, Imaizumi Kent, Ishikawa Mitsuru, Morimoto Satoru, Watanabe Hirotaka, Okano Hideyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 A combinational treatment of carotenoids decreases A secretion in human neurons via secretase inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kajikawa Keita, Imaizumi Kent, Shinozaki Munehisa, Shibata Shinsuke, Shindo Tomoko, Kitagawa Takahiro, Shibata Reo, Kamata Yasuhiro, Kojima Kota, Nagoshi Narihito, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Okano Hideyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell therapy for spinal cord injury by using human iPSC-derived region-specific neural progenitor cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00662-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Leventoux Nicolas, Morimoto Satoru, Imaizumi Kent, Sato Yuta, Takahashi Shinichi, Mashima Kyoko, Ishikawa Mitsuru, Sonn Iki, Kondo Takahiro, Watanabe Hirotaka, Okano Hideyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Human Astrocytes Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2680 ~ 2680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9122680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imaizumi Kent、Okano Hideyuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Modeling neurodevelopment in a dish with pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 18 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12699	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Tsukika、Imaizumi Kent、Watanabe Hirotaka、Ishikawa Mitsuru、Okano Hideyuki	4. 巻 746
2. 論文標題 Generation of region-specific and high-purity neurons from human feeder-free iPSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135676 ~ 135676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.135676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Hirotaka、Imaizumi Kent、Cai Tetsuo、Zhou Zhi、Tomita Taisuke、Okano Hideyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Flexible and Accurate Substrate Processing with Distinct Presenilin/ -Secretases in Human Cortical Neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0500-20.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimatsu Sho、Nakajima Mayutaka、Iguchi Aozora、Sanosaka Tsukasa、Sato Tsukika、Nakamura Mari、Nakajima Ryusuke、Arai Eri、Ishikawa Mitsuru、Imaizumi Kent、Watanabe Hirotaka、Okahara Junko、Noce Toshiaki、Takeda Yuta、Sasaki Erika、Behr R?diger、Edamura Kazuya、Shiozawa Seiji、Okano Hideyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Non-viral Induction of Transgene-free iPSCs from Somatic Fibroblasts of Multiple Mammalian Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 754 ~ 770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Imaizumi Kent, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Rostrocaudal areal patterning of human ESC/iPSC-derived cortical neurons by FGF8 signaling
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imaizumi Kent, Hideyuki Okano
2. 発表標題 The cerebral cortex patterning in hPSC-derived organoids
3. 学会等名 20th TMIMS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imaizumi Kent, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Recapitulation of the areal patterning in the cerebral cortex by human ESC/iPSC-derived cortical neurons
3. 学会等名 49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶川慶太、名越慈人、今泉研人、篠崎宗久、神山淳、松本守雄、岡野栄之、中村雅也
2. 発表標題 脊髄損傷治療におけるiPS細胞由来神経細胞の領域特異性の重要性
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Imaizumi Kent, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Neural spheroid model for the study of neural patterning
3. 学会等名 The 2nd Stanford-Keio Webinar (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関