

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20610006

研究課題名(和文)

腫瘍発生のリスクのない多能性幹細胞移植治療の開発の基礎的研究

研究課題名(英文)

Establishment of iPS cell transplantation that does not form teratomas

研究代表者

赤松 和土 (AKAMATSU WADO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60338184

研究成果の概要(和文):

マウス線維芽細胞に遺伝子導入を行い、直接に神経幹細胞を得る分化誘導系を確立した。マウス皮膚線維芽細胞から誘導された神経幹細胞はエピジェネティックな観点からも十分に成熟した神経幹細胞であることが証明された。培養法を最適化することによって樹立された iPS 細胞から安全なクローンを選択した場合と同程度の残存未分化細胞を持つ神経幹細胞を作り出すことができた。

研究成果の概要(英文):

We have succeeded in generating neural stem cells from mouse fibroblasts by using gene transfer. These neural stem cells are mature and contain few residual pluripotent cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：幹細胞学

科研費の分科・細目：幹細胞学・生物学

キーワード：iPS 細胞、神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

再生医学を用いた次世代の細胞移植療法として、培養によって増幅できる多能性の胚性幹細胞(ES 細胞)からの細胞分化誘導、細胞移植が近年検討されてきた。しかしながら ES 細胞から分化させた細胞は比較的可塑性に富み、ある程度分化誘導させた状態でも生体内に移植した場合に奇形腫を形成するリスクを有するのが大きな問題である。近年山中らによりマウス線維芽細胞から ES 細胞様の細胞(iPS 細胞)が作成できることが報告された(Takahashi et al. Cell 2006, Okita et al. Nature 2007)。この発見から、患者自身の細胞から比較的簡単に ES 様の万能性細胞を樹立できる可能性が示唆され、細胞移植治療に

大きな進歩が期待される。しかしながらこの細胞は 4 種類の未分化維持に重要な転写因子を高発現させねばならず、将来的な臨床応用を考えた場合、生体内への移植では奇形腫などの腫瘍を生じるリスクが無視できない。

## 2. 研究の目的

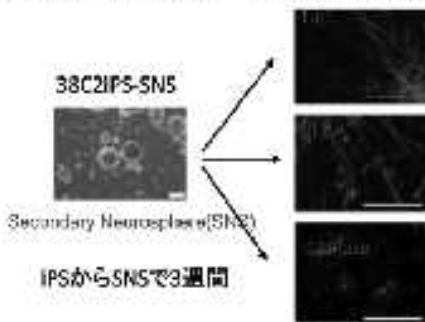
本研究では、哺乳類多能性幹細胞が特定の細胞系譜、特に神経系細胞へと分化する際にどのようにして多能性を失い、目的の細胞に分化していくのかというメカニズムを解明し、さらにその知見を応用して、万能細胞から誘導した細胞が再生医療における移植ソースとして実用可能な移植源であるかを検討していくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

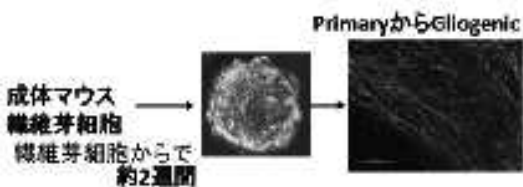
Oct4 の発現量をモニター、操作することによって腫瘍形成のリスクのないドナー細胞の樹立を確立すること、万能性の細胞から神経幹細胞を効率よく誘導する方法の確立を目指して研究を行った。

ヒト iPS 細胞の樹立システムを確立し、多くのヒト iPS 細胞を樹立し比較検討を行ったが、クローンごとの腫瘍形成能の差は大きく、それを規定する因子を同定するのは非常に困難であった。万能性細胞からではなく、体細胞への遺伝子導入を行い、iPS 細胞を経ないことによって、細胞の安全性がどう変わるかを検討した。申請者は iPS の樹立と神経分化誘導の培養手法 (Akamatsu et al J. Neurosci 2009) を組み合わせることにより、iPS 細胞をクローン化する手順をスキップし、マウス成体線維芽細胞から直接に神経幹細胞を誘導する細胞培養系を確立した。

従来の方法 (線維芽細胞→iPS 細胞→神経幹細胞)



申請者の開発した方法 (線維芽細胞→神経幹細胞)



これを iNSC (induced Neural Stem Cells) と名付けた。

申請者らはこの細胞を iNSC と名付け、詳細な解析を行った。誘導された神経幹細胞は、iPS 細胞から直接の分化誘導した神経幹細胞よりも成熟したグリア産生能力の高い神経幹細胞であった。さらに、一般的にリプログラミング効率が高く高純度の iPS 細胞が作成されるとされる胎児由来の細胞を用いて同様に iNSC を誘導すると、iNSC はニューロンしか産生しない幼若な神経幹細胞の性質を示した。これらのことから、成体由来 iNSC は、その培養過程でフルにリプログラミングされないために、成熟した神経幹細胞に迅速に到達すると考えられた。誘導過程で iNSC がフルにリプログラミングされないという

ことは、その過程で細胞が十分な多能性を獲得しないことが推測される。

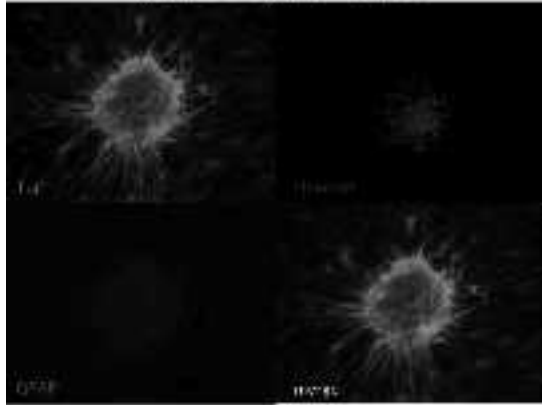
マウス iPS 細胞から神経幹細胞を誘導した場合、移植細胞に残存する多能性を有する細胞が奇形腫を形成すると考えられる。これまで申請者の研究室では、分化誘導した移植細胞に含まれる Nanog 陽性細胞が 0.01% 以下 (1 万個に 1 個以下) でないと、高率に移植個体に奇形腫を形成することを示した (Miura et al. nature Biotech 2009)。この含有率は iPS 細胞のクローンによって大きく異なり、樹立後に慎重にクローンを選択し、その安全性を検討する必要があった。さらに、成体皮膚から誘導した iPS 細胞では、このような性質を持つ安全な iPS 細胞を得ることはほぼ不可能であった。申請者らは iNSC において、同様に Nanog レポーターの発現を指標に腫瘍化能の評価と安全性の検討を行った。

### 4. 研究成果

我々は H20 年度に、マウス線維芽細胞に遺伝子導入を行い、直接に神経幹細胞を得る分化誘導系を確立した。マウス皮膚線維芽細胞から誘導された神経幹細胞はエピジェネティックな観点からも十分に成熟した神経幹細胞であることが証明された。我々が得た神経幹細胞は ES/iPS 細胞から同時に分化をさせた細胞よりも分化度が高く、iPS 細胞を経ないで神経幹細胞が生成されていることが示唆された。この結果として、従来 2ヶ月かかっていた線維芽細胞から神経幹細胞を得る工程を 3週間程度に短縮することができた。これらの細胞の腫瘍化能に関しては培養法を改良することによって、樹立された iPS 細胞と同程度の腫瘍形成能の神経幹細胞を作り出すことができた。さらに同様の方法をヒト細胞に応用し、従来半年以上かかっていた線維芽細胞から神経幹細胞の樹立をわずか 2週間で成し遂げることに成功した。我々が得たヒト神経幹細胞は iPS から得た神経幹細胞と同様に、ニューロン、アストロサイトへ分化することが明らかになった。これらの細胞の腫瘍化能に関しては、培養法を最適化することによって樹立された iPS 細胞から安全なクローンを選択した場合と同程度の残存未分化細胞を持つ神経幹細胞を作り出すことができた。この方法で得た神経幹細胞を免疫不全マウス脳へと移植を行い、奇形腫形成が殆ど見られないことを確認した。すなわち我々の方法では成熟した神経幹細胞を得るまでの培養期間が大きく短縮され、さらにクローン選択を行うことなしに安定して安全な細胞を得ることに成功した。この方法はたとえば亜急性期に細胞移植が有効である脊髄損傷など、再生医療の実現化において細胞移植の時期にタイムリミットを有す

る疾患に対する迅速な細胞誘導法として非常に有用であると考えられる。同時にヒト細胞でも検討を行い、安定してニューロンを生成する神経幹細胞の誘導を行うことに成功している。

ヒト嗅神経細胞から直接誘導した神経幹細胞



神経幹細胞の誘導と分化

#### 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2件)

##### 1. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells.

Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Kuwahara R, Ohya M, Amagai M, Matsuzaki Y, Yamanaka S, Okano H, Kawakami Y. PLoS One. 2011 Jan 13;6(1):e16182. (査読有)

##### 2. Suppression of Oct4 by germ cell nuclear factor restricts pluripotency and promotes neural stem cell development in the early neural lineage.

Akamatsu W, DeVeale B, Okano H, Cooney AJ, van der Kooy D. J Neurosci. 2009 Feb 18;29(7):2113-24 (査読有)

[学会発表](計7件)

##### 1) Shigeki Ohta, Wado Akamatsu, Yohei

Okada, Yumi Matsuzaki, Hideyuki Okano, Yutaka Kawakami Generation of human iPS-derived melanocytes in vitro, (2009年度日本分子生物学会年会)

2009.12.9-12 (11) 横浜

##### 2) 二瓶義廣, 孤発性筋萎縮性側索側策硬化症患者からの iPS 細胞樹立(第28回日本認知症学会学術総会)

2009.11.20-22 (22) 仙台

##### 3) S.-I. KANO, Molecular profiling of schizophrenia by use of patient-derived olfactory neurons and induced

pluripotent stem (iPS) cells (北米神経科学学会年会 2009) 2009.10.17-21 (18)

シカゴ

##### 4) Yoshikazu Sugimoto, RETROVIRUS/LENTIVIRUS INTEGRATION SITE ANALYSIS OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM (iPS)

CELLS (第15回日本遺伝子治療学会)

2009.7.7-9 (9) 大阪

##### 5) 赤松和土、岡野栄之再生医療の現状と将来の見通し(第35回BMSコンファレンス

基調講演) 2009.7.5-7 (7) 高知

##### 6) 八木拓也 孤発性パーキンソン病患者からの iPS 細胞の樹立 第50回日本神経学

会 2009.5.20-22 (22) 仙台

##### 7) 赤松和土 DeVeale B, 岡野栄之, Cooney AJ, van der Kooy D\*. GCNF/Oct4 シグナル

による初期神経幹細胞の分化誘導と万能性の抑制 第31回日本神経科学大会

2008.7.9-11(10) 東京

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 神経幹細胞製造方法

発明者: 赤松和土

権利者: 岡野栄之

種類: PCT

番号: PCT/JP2009/005856

出願年月日: 2009/11/04

国内外の別: 国内

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤松 和土 (AKAMATSU WADO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：60338184

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし