

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2008 ~ 2009

課題番号： 20791052

研究課題名 (和文) 体細胞由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた脊髄損傷治療

研究課題名 (英文) Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells.

研究代表者

辻 収彦 (TSUJI OSAHIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 70424166

研究成果の概要 (和文): 免疫不全マウス (NOD/SCID mouse) 大脳への移植実験を経て腫瘍形成を 6 ヶ月にわたって認めなかった、安全性の確認された iPS 細胞クローン (38C2 ; MEF 由来, 335D1 ; TTF 由来) を用い、当研究室にて独自に開発されたプロトコル (Okada Y, Stem Cells 2008) により神経幹 / 前駆細胞 (以下 NSP/C) へと誘導し、損傷脊髄へ移植を行った。その結果、Basso Mouse Scale を用いた後肢機能評価では、iPS-NS/PC 移植群では ES-NS/PC 移植群と同等に、かつコントロール群と比較して優位に回復しており、この機能回復は主に i) 移植細胞由来 oligodendrocyte による再髄鞘化、ii) 移植細胞由来 astrocyte による軸索ガイダンス作用によりもたらされたと判明した。

研究成果の概要 (英文): Here we demonstrated the directed neural differentiation of murine iPS cells and examined their therapeutic potential in a mouse spinal cord injury (SCI) model. 'Safe' iPS-derived neurospheres, which had been pre-evaluated as non-tumorigenic by their transplantation into NOD/SCID mouse brain, produced neurons, astrocytes, and oligodendrocytes in vitro. Furthermore, when the 'safe' iPS-derived neurospheres were transplanted into the spinal cord 9 days after contusive injury, they differentiated into all three neural lineages without forming teratomas or other tumors. They also participated in re-myelination and induced the axonal re-growth of host 5HT⁺ serotonergic fibers, promoting locomotor function recovery. These results suggest that pre-evaluated 'safe' iPS clone-derived neural stem/progenitor cells may be a promising cell source for transplantation therapy for SCI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎損傷、iPS 細胞、神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は胚性幹細胞 (ES 細胞) と同様に高い増殖能と様々な細胞へと分化できる分化多能性を有する幹細胞である。iPS 細胞が自家組織由来の移植細胞源になりうるという点からも、免疫学的・倫理学的問題は ES 細胞や胎児由来神経幹細胞に比べて少なく、臨床応用に極めて近い細胞供給源と考えられ、我々はこの iPS 細胞より神経幹/前駆細胞を誘導し、脊髄損傷への治療を目指し研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス体細胞由来人工多能性幹細胞(以下 iPS 細胞)より神経幹/前駆細胞を誘導し損傷脊髄に移植してその有効性を確認し、脊髄損傷への再生治療を実現させることである。

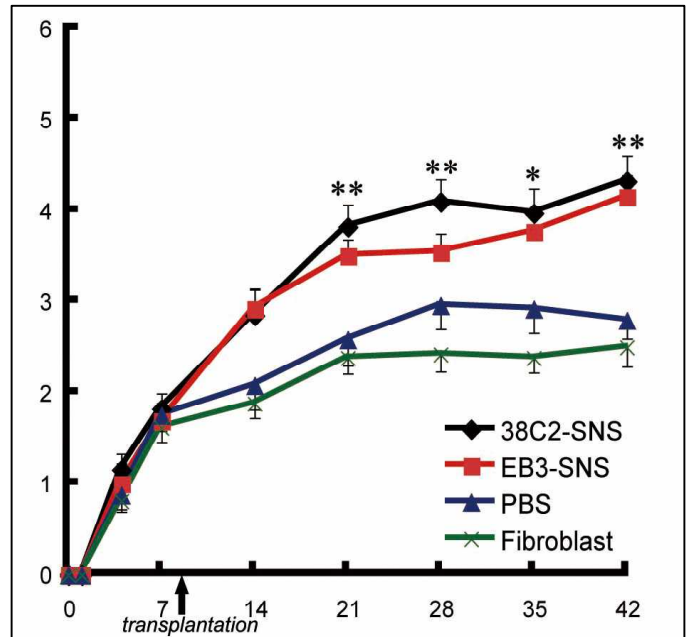
3. 研究の方法

京都大学 iPS 細胞研究所にて樹立された、マウス MEF 由来のクローン及び TTF 由来クローンのうち、NOD/scid mouse 大脳への移植実験を経て安全性の確認されたクローンを用いて実験を行った。In vitro 及び in vivo において各 iPS 細胞由来 NSP/C の神経系 3 系統 (Neuron, Astrocyte, Oligodendrocyte) への分化効率を定量的に評価し、更に第 10 胸髄圧挫損傷モデルマウスへ損傷後 9 日目の亜急性期に移植を行い、細胞の生着を Luciferase 発光によるバイオイメージングにて評価し、後肢機能を BMS(Basso Mouse Scale)を用いて経時的に評価した。損傷後 6 週経過した時点で移植された動物を Sacrifice し、各種組織学的検討を行い、機能回復メカニズムの解明を目指し解析を行った。

4. 研究成果

in vivo での生着を定量的に評価し、移植 5 週間経過後約 20%の細胞が生着していることが分かった。これらの生着した細胞は腫瘍化を呈せず、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの神経系三系統へ正常に分化していた。このラベルされた neurosphere を損傷脊髄に損傷後 9 日目に移植すると、ビー

クル群と比べて有意に良好な後肢機能回復が得られており、また機能回復の度合いはマウス ES 細胞由来神経幹細胞移植群とほぼ同等であった。また、iPS 細胞のもとになる線維芽細胞も対照群として比較し、線維芽細胞移植群では機能回復は得られず、Basso Mouse Scale での評価ではビークル群とほぼ同等の程度であった(下図)。これらの結果より、安全性の担保された iPS 細胞クローン由来の NSP/C は脊髄損傷への移植療法として有用なツールとなり得ると考えられた。



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0件)

[学会発表](計8件)

<口頭発表>

Osahiko Tsuji Kyoko Miura, Kanehiro Fujiyoshi, Kazuhiro Chiba, Shinya Yamanaka, Hideyuki Okano, Yoshiaki Toyama, Masaya Nakamura. Therapeutic effect of pre-evaluated 'safe' iPS derived neurospheres for spinal cord injury.

Cervical Spine Research Society 37th annual meeting (Salt Lake City, UT USA, 2009.12.2~4)

辻収彦、三浦恭子、藤吉兼浩、向野雅彦、名越慈人、熊谷玄太郎、山中伸弥、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：「c-Mycを除いたマウス3因子iPS細胞由来神経幹細胞を用いた脊髄損傷治療」第24回日本整形外科基礎学術集会(2009.11.5~6 横浜)

辻収彦、三浦恭子、藤吉兼浩、名越慈人、北村和也、向野雅彦、熊谷玄太郎、山中伸弥、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：「脊髄損傷に対するiPS細胞由来神経幹細胞移植—機能回復メカニズムの解析—」第38回日本脊椎脊髄病学会(2009.4.23~25 神戸)

辻収彦、三浦恭子、藤吉兼浩、北村和也、名越慈人、向野雅彦、熊谷玄太郎、山中伸弥、岡野栄之、戸山芳昭、中村雅也：「脊髄損傷に対する人工多能性幹細胞由来神経幹細胞移植の検討」第23回日本整形外科学会基礎学術集会(京都、2008年10月23、24日)

Osahiko Tsuji, Kyoko Miura, Masaya Nakamura, Narihito Nagoshi, Kazuya Kitamura, Kanehiro Fujiyoshi, Gentaro Kumagai, Masahiko Mukaino, Hiroyuki Kato, Yohei Okada, Yoshiaki Toyama, Shinya Yamanaka, Hideyuki Okano; Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. 日本神経科学会(東京、2008年7月9~11日)

<ポスター発表>

辻収彦、三浦恭子、藤吉兼浩、北村和也、名越慈人、向野雅彦、熊谷玄太郎、戸山芳昭、松崎有未、中村雅也、山中伸弥、岡野栄之：「脊髄損傷に対するiPS細胞由来神経幹細胞移植の検討」第5回宮崎サイエンスキャンプ(宮崎、2009年2月20~22日)

Osahiko Tsuji, Kyoko Miura, Masaya Nakamura, Yohei Okada, Narihito Nagoshi, Kazuya Kitamura, Gentaro Kumagai, Masahiko Mukaino, Kanehiro Fujiyoshi, Shinya Yamanaka, Yoshiaki Toyama, Hideyuki Okano; Cell therapy for spinal

cord injury by neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. Neuroscience2008, Washington DC, 15-19 Nov, 2008.

Osahiko Tsuji, Kyoko Miura, Masaya Nakamura, Yohei Okada, Yoshiaki Toyama, Shinya Yamanaka, Hideyuki Okano; Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. 第23回内藤コンファレンス(湘南、2008年11月11~14日)

〔図書〕(計2件)

<和文原著>

辻収彦、岡野栄之：「脊髄損傷へのES/iPS細胞由来神経幹細胞移植」実験医学 増刊号(Vol.28 No.2)『再生医療の最前線2010』羊土社、p89-95(2010)

辻収彦、中村雅也、藤吉兼浩、岡田誠司、山田雅之、岡野 James 洋尚、岡野栄之、戸山芳昭：「神経の分子イメージング—脊髄損傷を中心に—」遺伝子医学MOOK9,ますます広がる分子イメージング技術、メディカルドゥ社、p197-203(2008)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 収彦 (TSUJI OSAHIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70424166

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし