

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23618010

研究課題名(和文) 皮膚から直接誘導した神経幹細胞の移植治療効果と安全性の検討

研究課題名(英文) Safety and effectiveness of neural stem cells directly induced from skin fibroblasts

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムへの遺伝子挿入が無いエピゾーマルプラスミドもしくはセンダイウイルスを用いてヒト線維芽細胞に山中4因子(Oct4, Sox2, Klf4, cMyc)の導入を行い、これまでのレトロウイルスを用いた方法よりも効率よくdiNSCを含むニューロスフェアが形成されたが、それらのスフェアを分化誘導したところ、神経分化が極めて遅いという問題が明らかになった。一方でiPS細胞の樹立は線維芽細胞から末梢血由来細胞に変化してきており、ヒトdiNSCも末梢血由来細胞から誘導できるかを検証したが、良好な神経分化を得られる誘導方法の確立には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in making human directly induced neural stem cells by using Sendai virus vectors. Although we were able to obtain increased number of neurospheres compared to retroviral vectors, SeV-induced neurospheres did not differentiate into neural cells efficiently.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：再生医学・医療

キーワード：神経幹細胞 ダイレクトリプログラミング

## 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は神経損傷・神経変性に対する細胞移植治療の移植源として有効であることが報告されてきた。申請者の所属する慶應義塾大学医学部生理学では、整形外科教室との共同研究のもと、これまで主として脊髄損傷モデル動物を対象として、ラット神経幹細胞 (Ogawa et al JNR 2002)、マウス ES 細胞由来神経幹細胞 (Kumagai et al Plos One 2008)、マウス iPS 細胞由来神経幹細胞 (Tsuji et al PNAS 2010) が、損傷脊髄に対して治療効果を有することを報告してきた。近年報告された iPS 細胞の樹立技術は、損傷患者に対する自己移植の可能性を切り開き、安全で倫理的に問題のない移植医療が確立されることが期待される。しかしながら、脊髄損傷においては損傷部位が癒痕化する以前の時期 (マウスでは受傷後 7-14 日程度) に細胞移植を行わないとその効果がほとんど無いことが明らかになっている (Ogawa et al J. Neurosci Res. 2002)。これに対して iPS 細胞は樹立および神経分化誘導に必要な期間はマウス細胞で 2 ヶ月、ヒト細胞で 3-4 ヶ月以上を要するため、iPS 細胞の大きなメリットの一つである自家移植を目指すためには、より早く細胞を誘導する技術の開発が必要である。さらに現在の iPS 細胞の樹立技術では樹立されたクローンにおける腫瘍原性を詳細に評価した後でない限り、樹立された iPS 細胞が安全であるかどうかは担保できない。しかしながら現状では成体細胞から得たマウス iPS 細胞から神経幹細胞に分化誘導を行っても、極めて高い確率で未分化細胞が残存し、移植動物に奇形種を引き起こす (Miura et al Nature Biotech 2009)。近年では繊維芽細胞から iPS 細胞を経ずに目的の体細胞へとリプログラミングすることにより、そのような奇形種の発生リスクを回避することができるのではないかと期待されている (Ieda et al Cell 2010)。神経系でもニューロンへの直接誘導が報告されているが (Vierbuchen et al Nature 2010)、その安全性に関しては多くが不明である。申請者はこの問題を解決するため、成体の体細胞から安全に迅速に神経幹細胞を誘導する方法を確立したいと考えた。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに、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、マウス成体繊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。申請者らはこの細胞を diNSC と名付け、詳細な解析を行った。diNSC を移植細胞として用いることにより、培養期間の短縮だけでなく、樹立された iPS からの誘導で必須である安全なクローン選択の評価も不要になるため、申請者らは、この diNSC がヒト細胞でも誘導できれば、移植までの時間が限られる疾患に対して有効で

安全な移植源になるのではないかと考えた。マウスと同様の方法でヒト diNSC の誘導を試みたところ、皮膚繊維芽細胞への遺伝子導入から約 2 週間でニューロンを産生する Neurosphere が誘導された。従来、iPS 細胞の樹立に 2 ヶ月程度、分化誘導にも 2 ヶ月程度の期間を要していたことから考えると、飛躍的に所要時間を短縮することが出来た。さらに腫瘍化しないクローンの選択と評価の期間が不要になることを考慮すると、これまでほぼ不可能と考えられてきた急性神経損傷に対する移植治療が現実的になると期待される。本研究計画では、研究期間中にさらに培養法を改良し、マウスで成功したのと同様に、グリアを産生し奇形腫を作らない、成熟した神経幹細胞を短期間に誘導することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス diNSC 細胞の培養法の改良

ヒト diNSC の培養方法の改良を目的として、さらに安全性の高いマウス diNSC の樹立方法を確立し、応用することを試みた。培養方法の改良を使用する成長因子などを変更して検討し、ニューロスフェアでの Nanog-EGFP 含有率とマウス線条体移植時の腫瘍形成を指標に安全性の検討を行った。

### (2) ヒト iNSC 細胞の培養法の改良

これまで申請者らは慶應義塾大学病院で皮膚片から樹立された繊維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行い、その後の培養を神経幹細胞の選択培養法である Neurosphere 法に直接移行させることにより、2 週間でヒト diNSC を誘導することに成功した (ReV-hiNSC)。この diNSC が有効かつ安全な細胞であるとするれば、これまでの方法 (繊維芽細胞 iPS 細胞 神経幹細胞) に比べ、安全なクローンを評価・選択する期間も含めれば細胞調整に必要な時間を 10 分の 1 以下に短縮したと言える。しかしながら、現在のところ 2 週間の培養で得られるヒト diNSC は主として Neuron に分化する初期型の神経幹細胞であるため、脊髄損傷の治療に有効なグリア産生型の成熟した神経幹細胞へ分化させるために、継代などの更なる培養が必要になると考えられる。また、現在の培養条件では誘導効率が極めて低く、実用化に向けては誘導効率自体を増加させる培養条件の確立が急務であると言える。しかしながら、申請者らがマウス diNSC を初めて誘導した培養条件と、その後改良を重ねた現在の培養条件を比較すると、誘導効率では 100 倍の改良に成功しているため、同様に培養中の成長因子、薬剤、継代の方法を最適化することにより誘導効率および分化度の改良を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) マウス diNSC 細胞の培養法の改良

マウス線維芽細胞に iPS 化 4 因子 (Oct4, Sox2, cMyc, Klf4) を発現するレトロウイルスを用いて遺伝子導入を行い直接誘導した神経幹細胞 (diNSC) の培養方法を改良し、EGF を用いることにより Nanog-EGFP 含有率がほぼ 0% になるような誘導条件を確立した。この誘導条件で作成した神経幹細胞はマウス線状体への移植においても腫瘍を形成せず、培養条件を最適化することによって diNSC の安全性が実用レベルに達することを示すことが出来た。

## (2) ヒト iNSC 細胞の培養法の改良

さらに多くのヒト線維芽細胞を用いて、神経幹細胞の直接誘導を行った。市販細胞と生検細胞の計 4 種類の細胞でヒト diNSC の誘導が可能であることを示した。誘導効率は細胞株ごとに差が認められたが、ほぼ全ての線維芽細胞で同様の方法で神経幹細胞を誘導することが可能であることを示した。さらに、ヒト diNSC ではセンダイウイルスやエピゾーマルベクターなどを用いて将来の再生医療に用いることが出来るようなプロトコルの作成を目指した。ゲノムへの遺伝子挿入が無いエピゾーマルプラスミドもしくはセンダイウイルスを用いてヒト線維芽細胞に山中 4 因子 (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) の導入を行い、酸素濃度、化合物の添加、培地に添加する成長因子の各条件に分けて検討を行い、培養条件を最適化した場合、これまでのレトロウイルスを用いた方法よりも効率よく diNSC を含むニューロスフェアが形成されたが、それらのスフェアを分化誘導したところ、神経分化が極めて遅いという問題が明らかになった。H25 年度は分化誘導プロトコルの最適化を試みると同時になぜ神経分化が遅いかという問題の解決を試みた。マウス diNSC が分化誘導速度がきわめて速いのは iPS 細胞を樹立しないことにより、本来なら iPS クローンになれない細胞が線維芽細胞から diNSC に誘導されていると考えられた。ヒト diNSC の分化能の解析の結果から、現在のヒト diNSC の誘導方法は形成される Neurosphere の数がきわめて少なく、選択性の高い培養になっているために未分化維持しやすい細胞が選択されているのではと考えた。一方で iPS 細胞の樹立は線維芽細胞から末梢血由来細胞に変化してきており、ヒト diNSC も末梢血由来細胞から誘導できるかを検証したが、良好な神経分化を得られる誘導方法の確立には至らなかった。

以上の結果の一部を Stem Cells 誌に投稿し、受理された。同時期に体細胞からの神経幹細胞の誘導は海外の複数のグループから多数報告されたが、マウスの細胞の増殖性と安全性は他グループの結果に比較して明らかに高く、ヒト細胞における成体細胞からの誘導に成功したのは本グループのみであったため、国内外からの反応は大きかった。本

研究の結果に対する一般の関心も非常に高く、論文発表に際してプレス発表を行った。

## 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 16 件)

- 1) Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Oasaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes *Stem Cell Rep.* 2014 May 6;2:1-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.007> (査読あり)
- 2) Zhou Z, Kohda K, Iyata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. *Mol Brain.* 2014 Apr 3;7(1):24. doi: 10.1186/1756-6606-7-24. (査読あり)
- 3) DeBoer E, Azevedo R, Vega T, Brodtkin J, Akamatsu W, Okano H, Wagner G, Rasin MR. Prenatal deletion of the RNA binding protein HuD disrupts postnatal cortical circuit maturation and behavior. *J Neurosci* 34(10):3674-86, 2014 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3703-13. (査読あり)
- 4) Kim C, Kim W, Lee H, Ji E, Choe YJ, Martindale JL, Akamatsu W, Okano H, Kim HS, Nam SW, Gorospe M, Lee EK: The RNA binding protein, HuD regulates autophagosome formation in pancreatic cells by promoting autophagy-related gene 5 expression. *J Biol Chem.* 289(1):112-21, 2014 doi: 10.1074/jbc.M113.474700. (査読あり)
- 5) Bundo M, Toyoshima M, Ueda J, Nemoto-Miyake T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Okada Y, Akamatsu W, Kato M, Okano H, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K: Increased LI Retrotransposition in the neuronal genome in Schizophrenia. *Neuron* 81(2):306-13, 2014 doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.053. (査読あり)
- 6) Higurashi N, Uchida T, Christoph L, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori M, Katsurabayashi S, Shirasaka S, Okano H and Hirose S. A human Dravet syn

- drome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain* 2013 May 2;6(1):19. doi: 10.1186/1756-6606-6-19. (査読あり)
- 7) Ohta S, Imaizumi Y, Akamatsu W, Okano H, Kawakami Y. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol.* 2013;989:193-215. doi: 10.1007/978-1-62703-330-5\_16. (査読あり)
- 8) Nihei Y, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Yagi T, Yoshizaki T, Okano H, Suzuki N. Enhanced Aggregation of Androgen Receptor in Induced Pluripotent Stem Cell-derived Neurons from Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. *J Biol Chem.* 2013 Mar 22;288(12):8043-52. doi: 10.1074/jbc.M112.408211. (査読あり)
- 9) Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, Akamatsu W, Sasaki T, Yamanaka S, Amagai M, Okano H and Ohshima M: Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. *J Invest Dermatol.* doi: 10.1038/jid.2013. (査読あり)
- 10) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohshima M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shoji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain.* 2012 Oct 6;5(1):35. doi: 10.1186/1756-6606-5-35. (査読あり)
- 11) Matsui T, Akamatsu W, Nakamura M, Okano H. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: Basic concepts and potential application for cell replacement therapy. *Exp Neurol.* 2012 Oct 1. doi:p11: S0014-4886(12)00378-0. 10.1016/j.expneurol.2012.09.016. (査読あり)
- 12) Imamura M, Okuno H, Tomioka I, Kawamura Y, Lin ZY, Nakajima R, Akamatsu W, Okano HJ, Matsuzaki Y, Sasaki E, Okano H. Derivation of induced pluripotent stem cells by retroviral gene transduction in mammalian species. *Methods Mol Biol.* 925: 21-48. 2012. doi: 10.1007/978-1-62703-011-3\_2. (査読あり)
- 13) Yagi T, Kosakai A, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. *PLoS One.* 2012;7(7):e41572. doi: 10.1371/journal.pone.0041572. (査読あり)
- 14) Matsui T, Takano M, Yoshida K, Ono S, Fujisaki C, Matsuzaki Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H, Akamatsu W. Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. *Stem Cells.* 2012 Jun;30(6):1109-19. doi: 10.1002/stem.1091. (査読あり)
- 15) Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang X, Subaran SS, Carlson OD, Mercken EM, Kulkarni RN, Akamatsu W, Okano H, Perrone-Bizzozero NI, de Cabo R, Egan JM, Gorospe M. RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Mol Cell.* 2012 Mar 30;45(6):826-35. doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.016. (査読あり)
- 16) Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, Yamanaka S, Okano H, Suzuki N. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet.* 2011 Dec 1;20(23):4530-9. (査読あり)

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) 赤松 和土: 招待講演: 順天堂大学第 136 回お茶の水木曜会 「多能性幹細胞(ES細胞/iPS細胞)を用いた神経疾患の再生医療と病態研究」 2014 年 3 月 13 日 東京
- 2) 赤松 和土: シンポジウム(招待演者) 第 13 回日本再生医療学会総会 Direct Reprogramming の最近の進歩: 神経幹細胞の直接誘導とその応用: 2014 年 3 月 5 日 京都
- 3) 赤松 和土: シンポジウム(招待演者) 第 37 回日本血液事業学会総会「iPS細胞技術を用いた神経疾患研究と治療」 2013 年 10 月 21 日札幌
- 4) 赤松 和土: シンポジウム(招待演者)

- 第 11 回 遺伝子治療学会 「iPS technology-based regenerative medicine for damaged central nervous system」2013 年 7 月 6 日 岡山
- 5) **赤松 和土**：シンポジウム(招待演者) 炎症再生学会 疾患 iPS 細胞と創薬:「神経疾患患者由来細胞からの神経系細胞の誘導と病態解析」: 2013 年 7 月 2 日 京都
- 6) **赤松 和土**：招待講演：第 20 回東京血管疾患研究所セミナー:「iPS 細胞を使った神経疾患の治療法の開発」: 2013 年 6 月 8 日 東京
- 7) **赤松 和土**：招待講演：第 2 回小児泌尿器科研究会「iPS 細胞技術を用いた神経系の再生医療と疾患解析」 2013 年 6 月 1 日 東京
- 8) **赤松 和土**：招待講演：第 11 回横浜小児先端医療セミナー 「多能性幹細胞を用いた神経疾患の再生医療と病態研究」 2013 年 5 月 24 日 横浜
- 9) **赤松 和土**：特別講演：iPS 細胞技術の神経疾患研究・治療への応用 第 116 回日本小児科学会学術集会 2013 年 4 月 19 日 広島
- 10) **赤松 和土**, 岡野 栄之：シンポジウム(招待演者)45 iPS 細胞技術を用いた中枢神経系の再生と創薬研究：iPS technology-based cell therapy for damaged CNS and investigation of neural disorders. : 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 29 日東京
- 11) **赤松 和土**：シンポジウム(招待演者) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明および治療法確立研究：神経疾患患者由来細胞からの神経系細胞の誘導と病態解析：日本再生医療学会総会 2013 年 3 月 22 日 横浜
- 12) **赤松 和土**：招待講演：多能性幹細胞・神経幹細胞を用いた再生医療と病態解析：愛知医科大学 細胞治療研究会 2013 年 3 月 5 日 愛知
- 13) **赤松 和土**：シンポジウム(招待演者) ALS に対する再生医療の開発：幹細胞生物学を応用した神経疾患病態研究：第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 23 日 東京
- 14) **赤松 和土**：招待講演：多能性幹細胞から神経幹細胞を生み出す分子機構とその応用：第 12 回日本分子生物学会春季シンポジウム 2012 年 4 月 26 日 山梨
- 15) **赤松 和土**：シンポジウム(招待演者)13 基礎研究セミナー：多能性幹細胞由来神経幹細胞を用いた神経系の再生医療の展望：第116回日本眼科学会2012年4月6日 東京
- 16) **赤松 和土**：シンポジウム(招待演者) “ヒト”をキーワードにした多能性幹細胞研究の展開：体細胞からの安全な神経幹細胞の直接誘導：第89回日本生理学会大会 2012年3月31日 (シンポジストおよび座長)長野
- 17) **赤松 和土**, 岡野 栄之：特別講演 多能性幹細胞を用いた神経系の再生医療の展望 長野県医学会例会 2011 年 7 月 25 日 長野
- 〔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：岡野栄之、赤松和土  
権利者：岡野栄之、赤松和土  
種類：PCT 出願  
番号：PCT/JP2009/005856  
出願年月日：2009.11.4  
国内外の別：日本、米国、欧州、中国
- 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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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