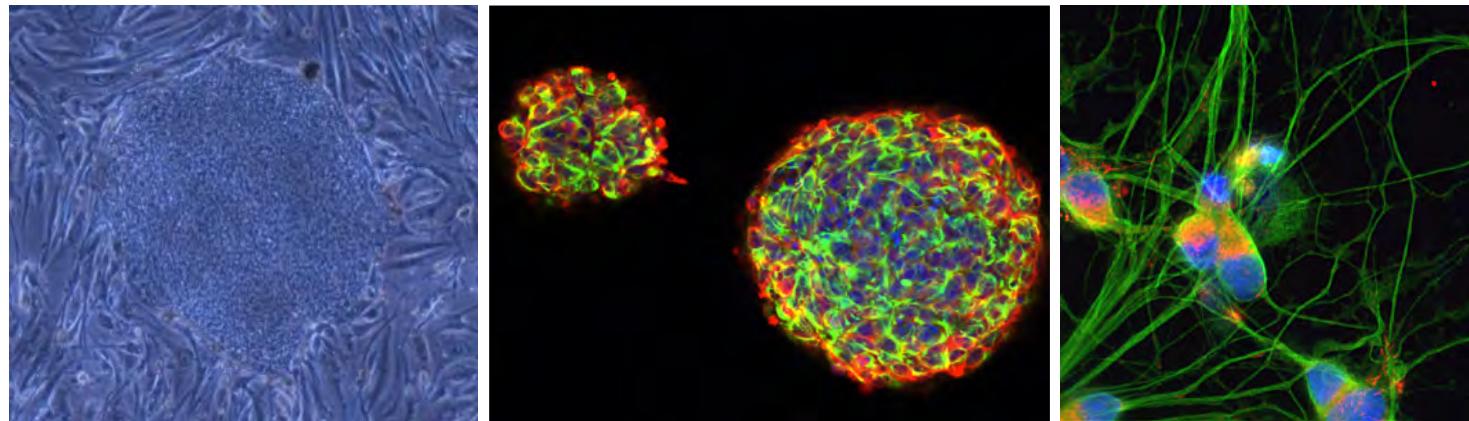


再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システム開発の成果報告  
中辻グループ「大スケール神経細胞分化誘導法の開発」



赤松和土<sup>1,2</sup>・岡野栄之<sup>2</sup>

- 1.順天堂大学大学院医学系研究科 ゲノム・再生医療センター
- 2.慶應義塾大学医学部・生理学



# 慶應義塾大学における脊髄損傷に対する細胞移植療法の研究の流れ

ラット胎児由来神経幹細胞のラット脊髄損傷モデルへの移植  
(Ogawa *et al.*, JNR 2002)

ヒト胎児由来神経幹細胞のマーモセット脊髄損傷モデルへの移植  
(Iwanami, *et al.*, JNR 2005)

iPS細胞の発見 (2006)



マウスiPS細胞の神経幹細胞への分化誘導  
(Miura, *et al.*, Nat Biotech 2009)

マウスiPS細胞由来神経幹細胞の  
マウス脊髄損傷モデルへの移植  
(Tsuzi, *et al.*, PNAS 2010)

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の  
マウス脊髄損傷モデルへの移植  
(Nori, *et al.*, PNAS 2011)

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の  
マーモセット脊髄損傷モデルへの移植  
(Kobayashii, *et al.*, PLoS ONE 2012)

臨床研究(2018年度以降)

京都大学のiPS細胞ストック  
から誘導した細胞を使用する



# 本研究の目的

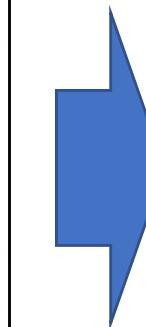
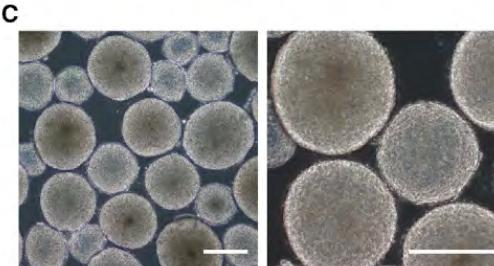


B

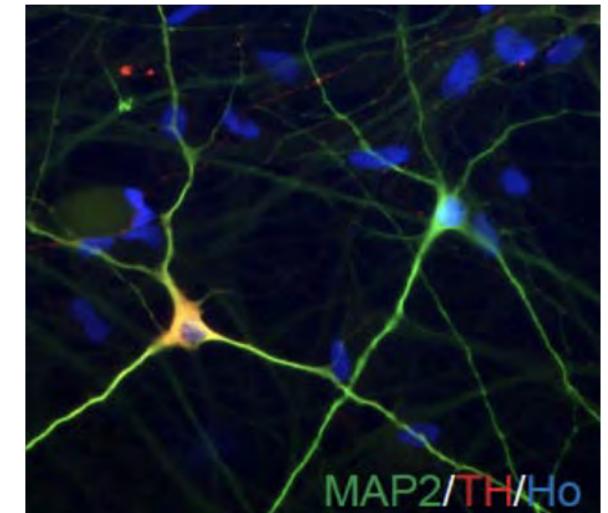
	200 ml culture bag	100 mm culture dish
Culture volume (ml)	200	10
Average cell number yield	$1.4 \times 10^8$ / bag	$8.3 \times 10^6$ / dish
Expected cell yield / 200 ml	$1.4 \times 10^8$ / bag	$1.7 \times 10^8$ / 20 dishes
Average cell number / ml	$7.2 \times 10^5$ *	$8.3 \times 10^5$ **

\* Medium change : d1 and d3

\*\* Medium change : daily



神経系の細胞を大量に作る



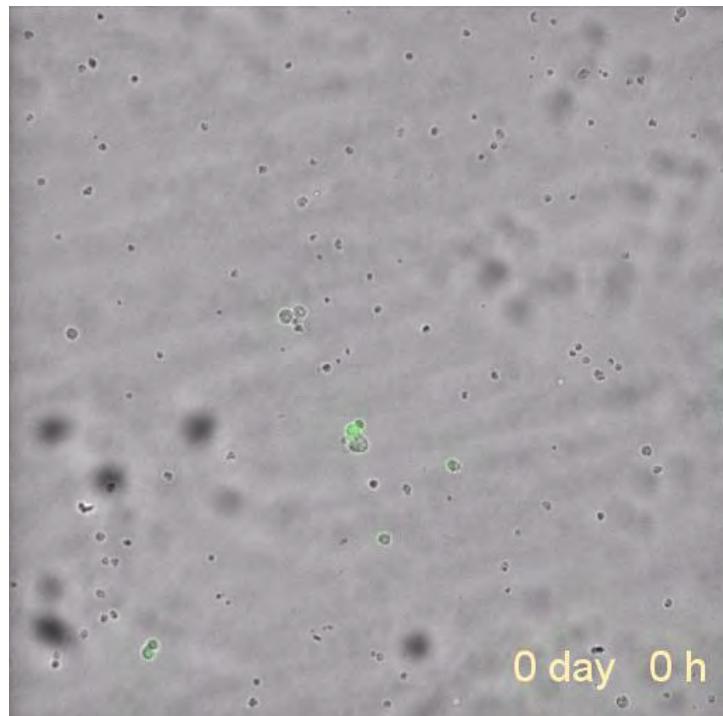
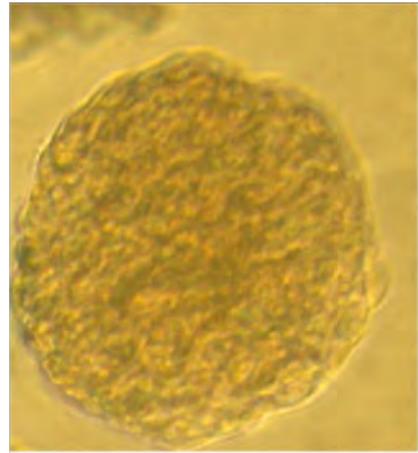
Otsuji et al. Stem Cell Reports 2014

中辻グループで3D大型スケールで培養されたES/iPS細胞

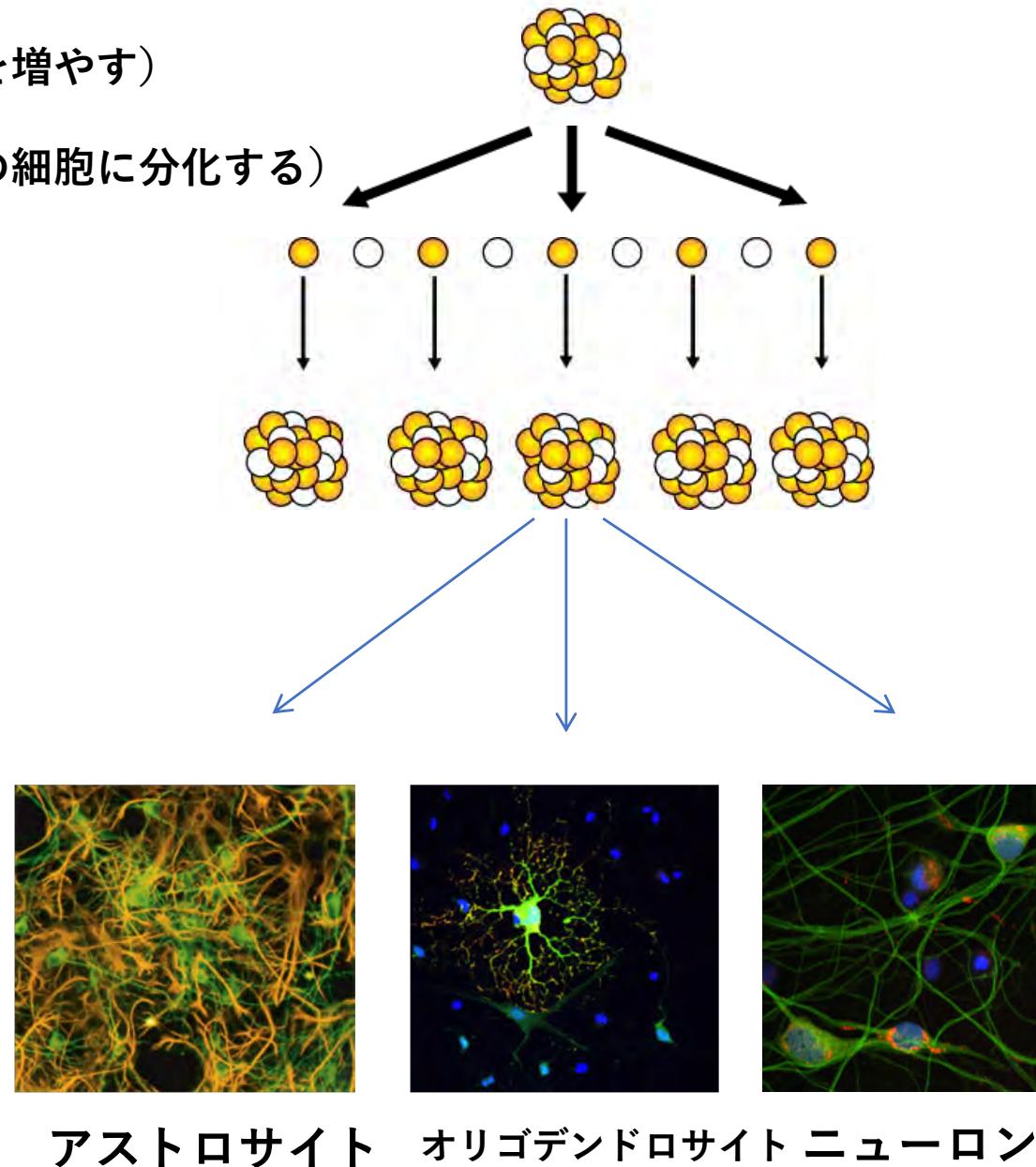
高品質なヒトiPS/ES細胞由来神経細胞を大量製造する方法を開発する

# 神経幹細胞とニューロスフェア法

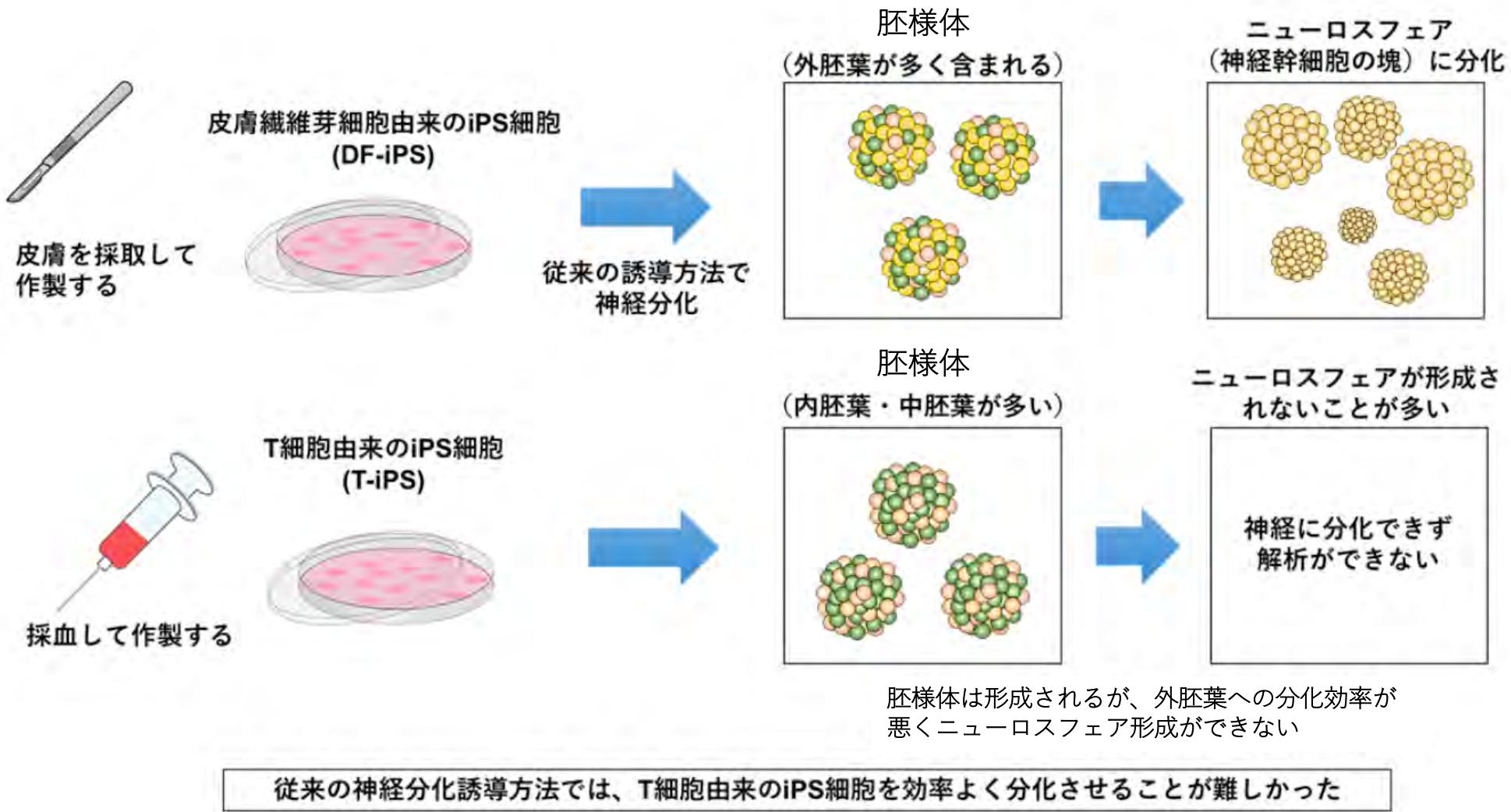
ニューロスフェアは継代して培養できる



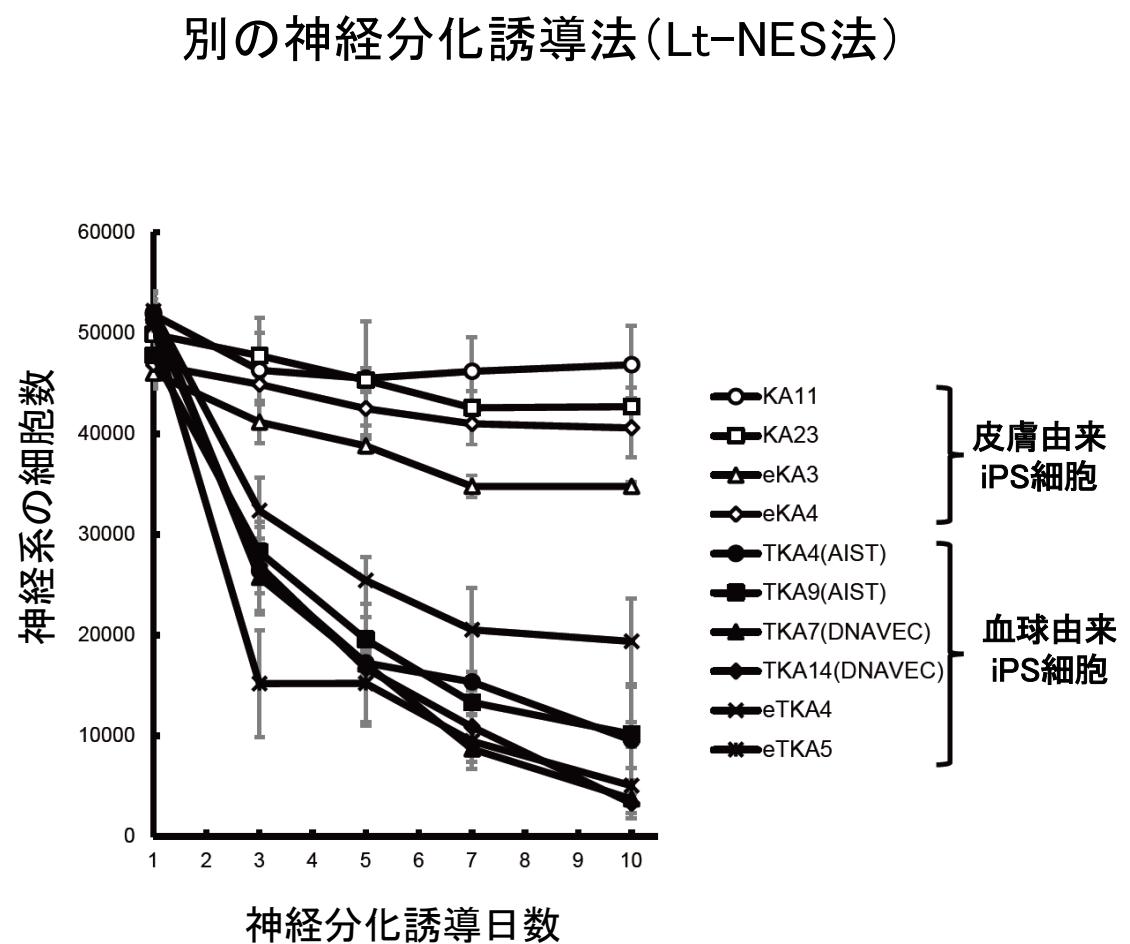
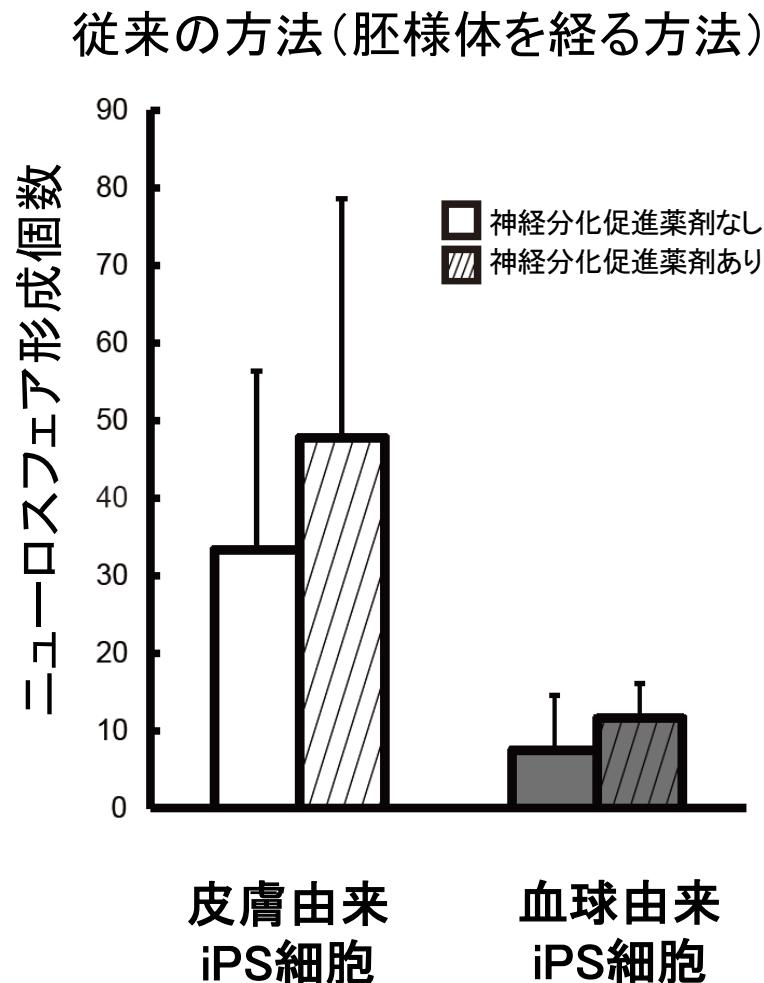
- 1.自己複製能  
(自分自身を増やす)
- 2.多分化能  
(複数種類の細胞に分化する)



# 末梢血から樹立したiPS細胞は従来の方法では神経分化しにくい



# ヒト末梢血から作製したiPS細胞を効率的に神経幹細胞に誘導する技術の開発

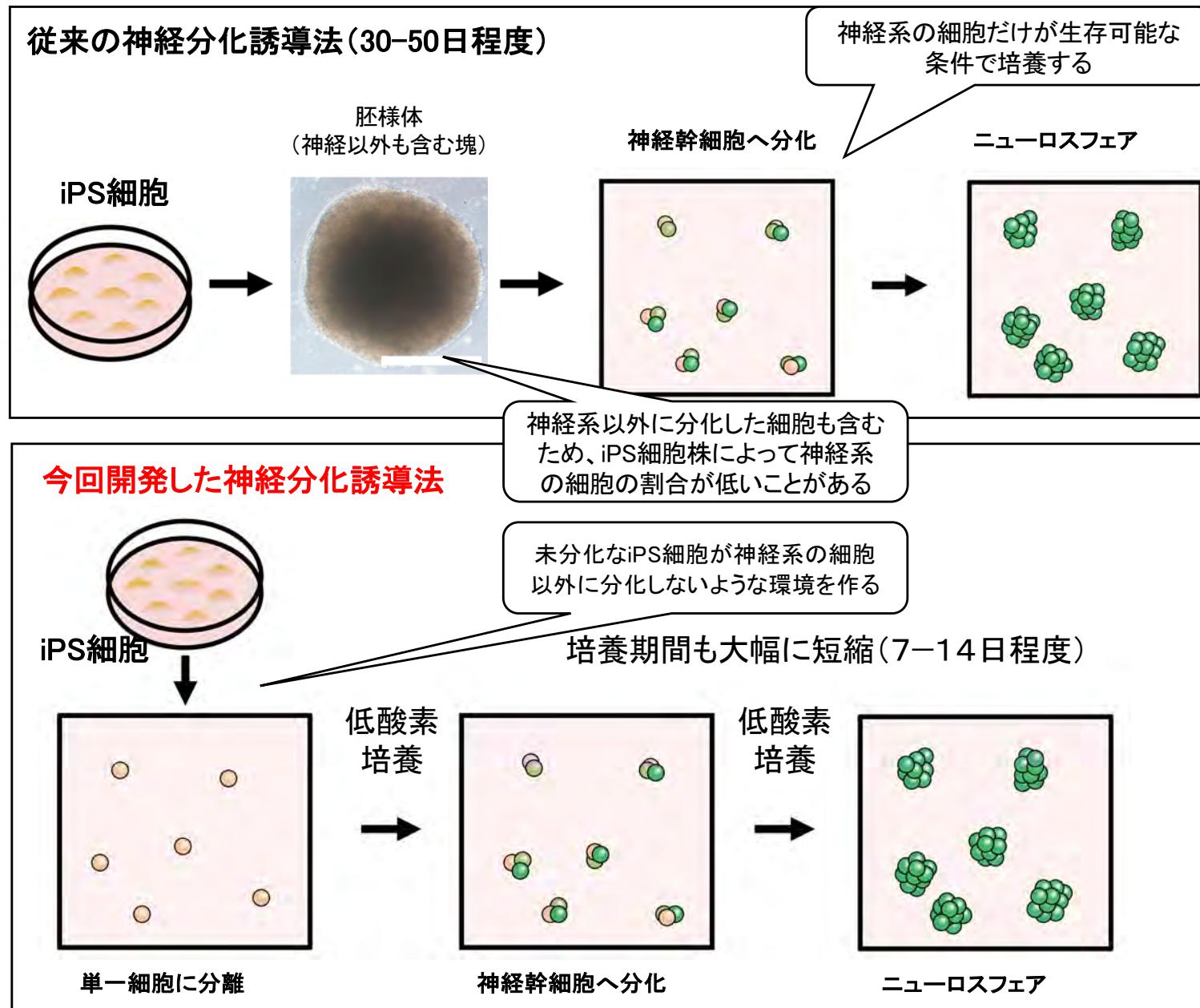


どの方法でも血球由来iPS細胞は皮膚由来iPS細胞より神経分化誘導効率が低かった

(Matsumoto et al. Stem Cell Reports 2016)

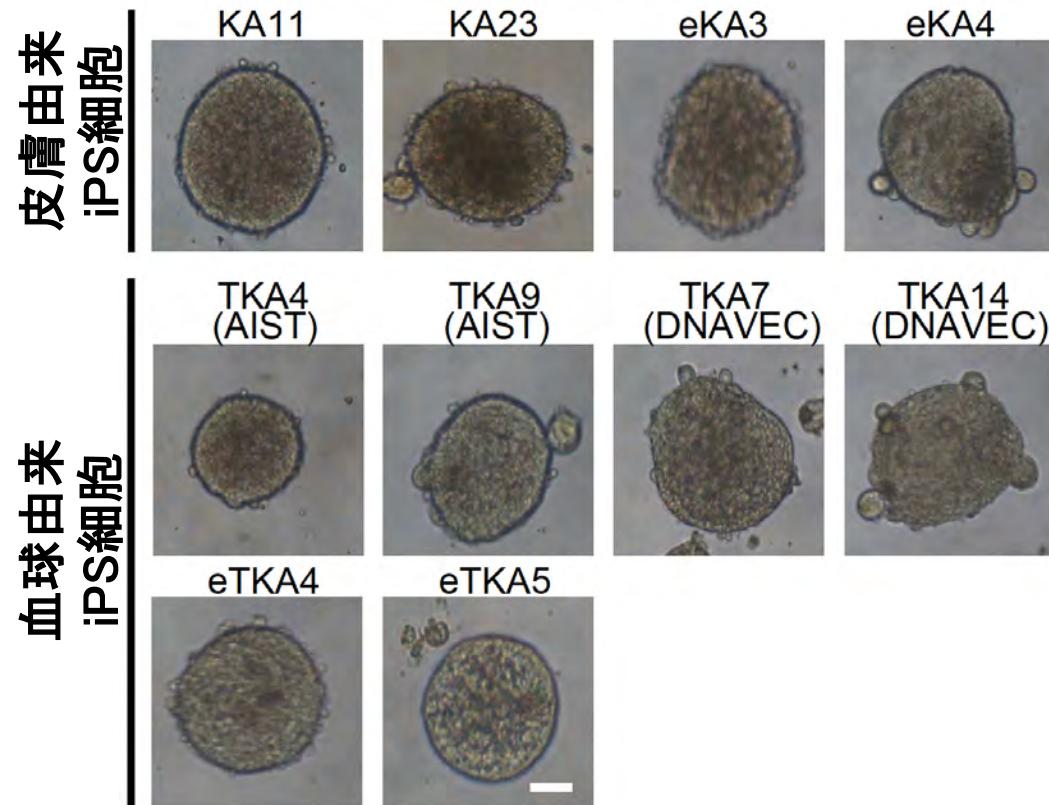
# 本研究の成果

## ヒト末梢血から作製したiPS細胞を効率的に神経幹細胞に誘導する技術の開発

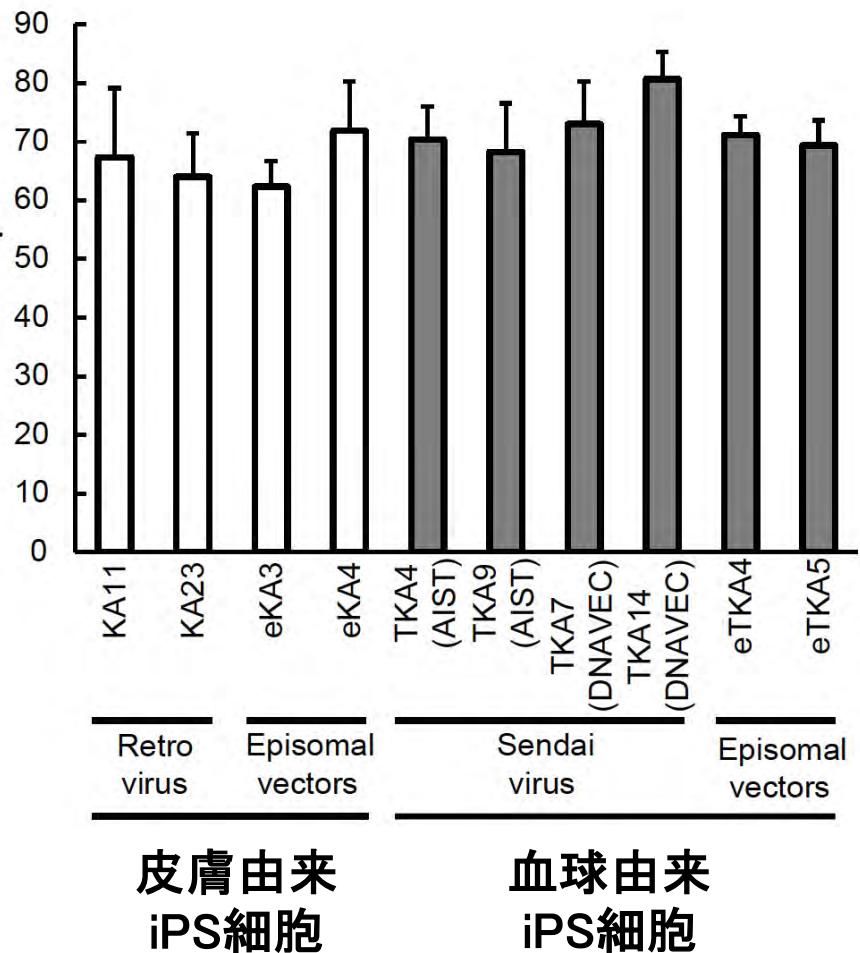


(Matsumoto et al. Stem Cell Reports 2016)

## ヒト末梢血から作製したiPS細胞を効率的に神経幹細胞に誘導する技術の開発



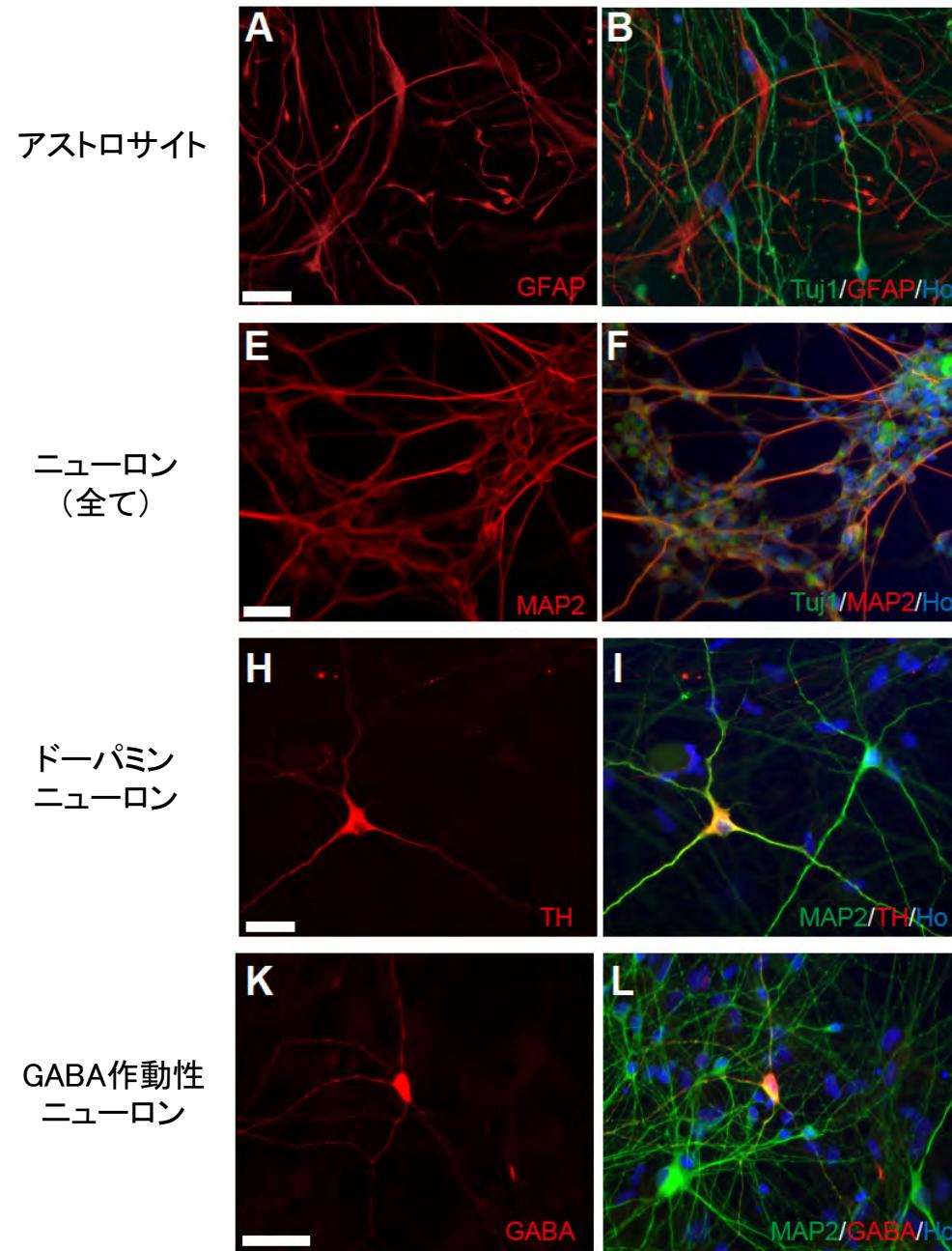
iPS細胞から誘導された  
ニューロスフェアの数



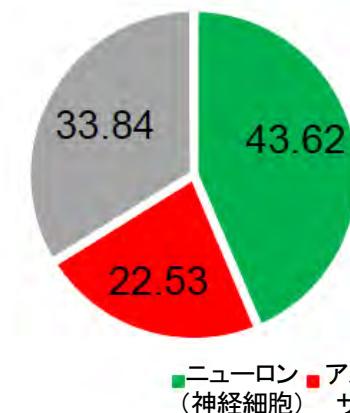
今回開発した方法を用いると、ほぼすべての細胞株で高い効率で神経分化が可能だった

(Matsumoto et al. Stem Cell Reports 2016)

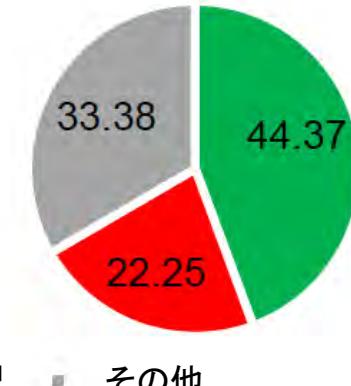
# ヒト末梢血から作製したiPS細胞を効率的に神経幹細胞に誘導する技術の開発



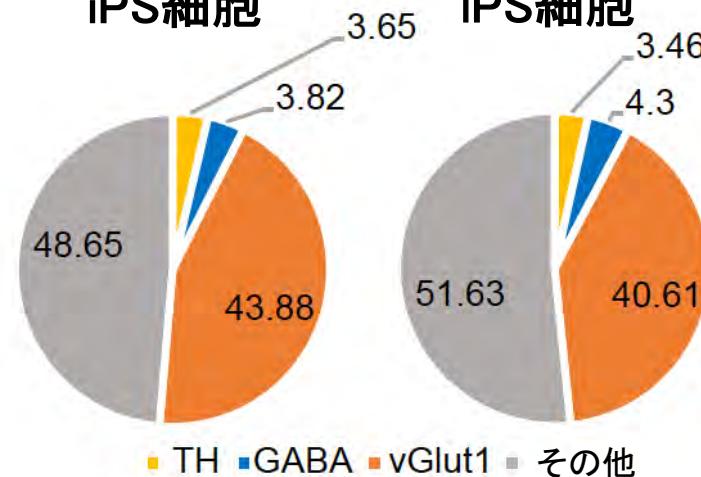
皮膚由来  
iPS細胞



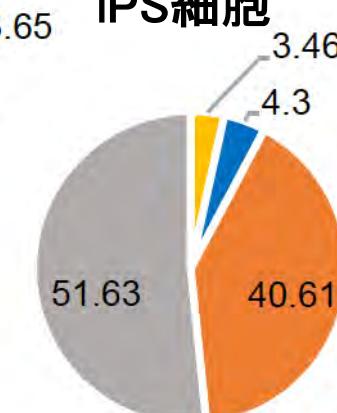
血球由来  
iPS細胞



皮膚由来  
iPS細胞



血球由来  
iPS細胞

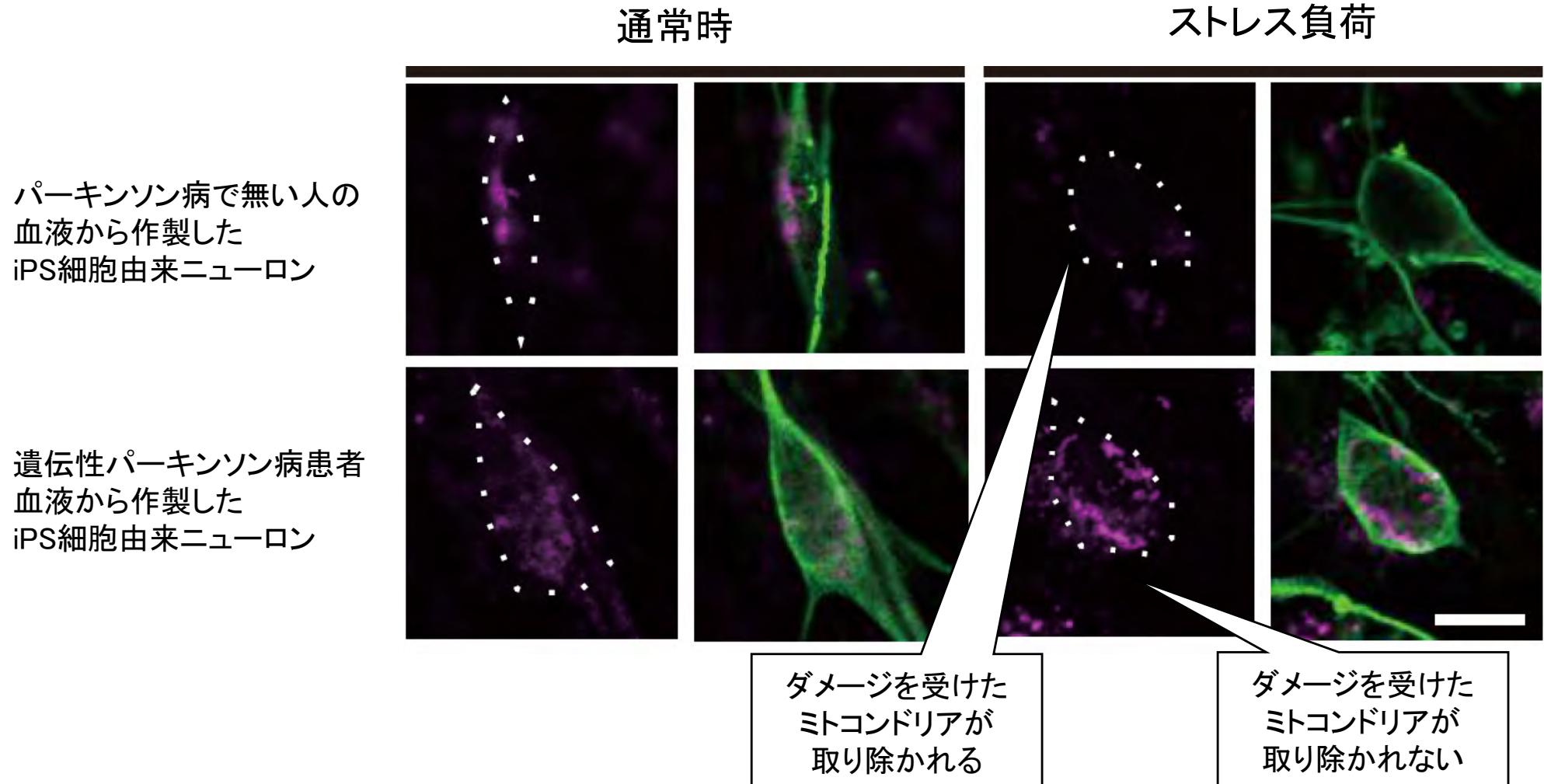


(Matsumoto et al. Stem Cell Reports 2016)

本法によって血液由来iPS細胞でも各種ニューロン・アストロサイトが分化可能

## 血球由来iPS細胞を用いた神経難病病態モデルの構築

2012年に報告した遺伝性パーキンソン病iPS細胞を作製した患者さん(順天堂医院に通院中)の血液から新たにiPS細胞を作製し、線維芽細胞由来iPS細胞で見られた変化が再現できるか検証を行った。



血液由来のiPS細胞でもミトコンドリアの品質管理機構の破綻が同様に再現できた。

(Matsumoto et al. Stem Cell Reports 2016)

## 結論1

- ・末梢血から作製したiPS細胞は神経分化誘導しにくかった
- ・新しい神経分化誘導法（dNS法）を開発してその問題が解決された
- ・神経幹細胞の誘導に胚様体を経由しないので**大スケール化しやすい**

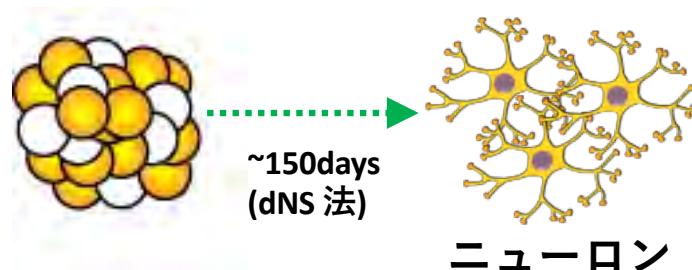
## 問題点

- ・誘導期間が短いために、従来の方法（胚様体経由）よりも腫瘍のもとになる未分化細胞が多い
- ・疾患モデルには使えるが再生医療には使えないのでは？

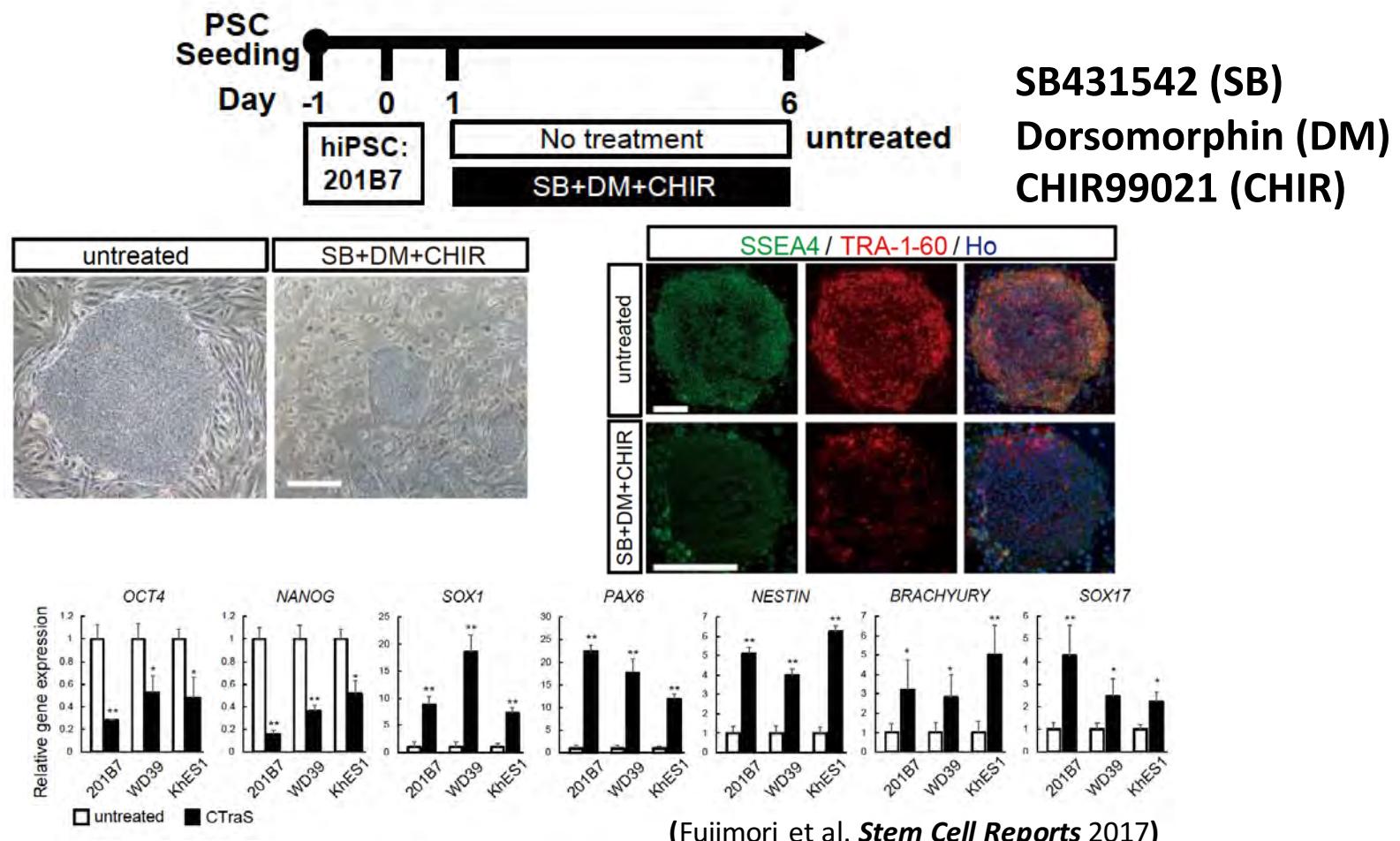
## 解決方法

- ・分化誘導した細胞の成熟度と品質を高める方法を開発する

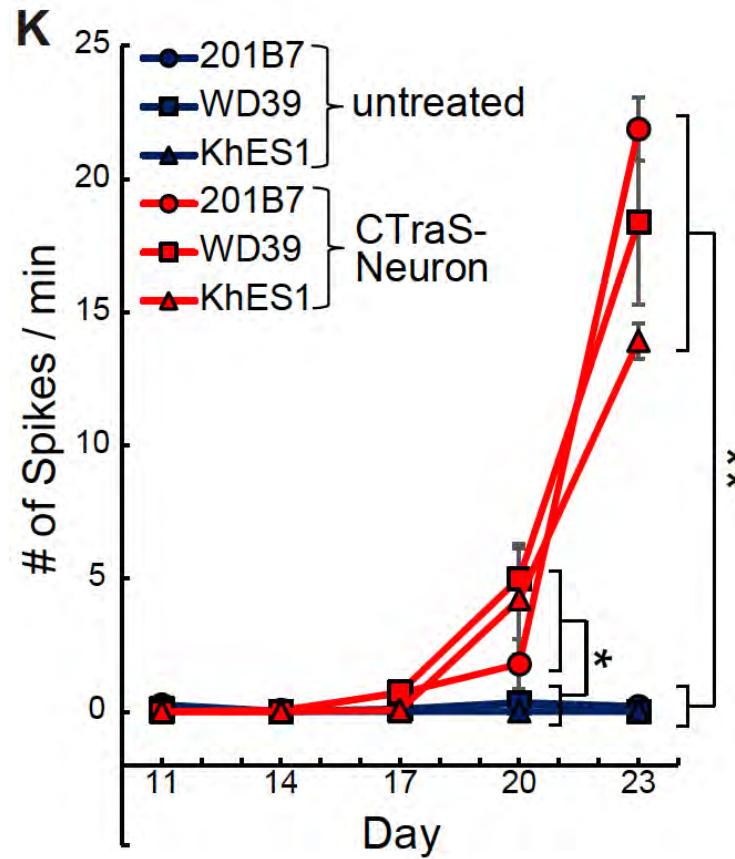
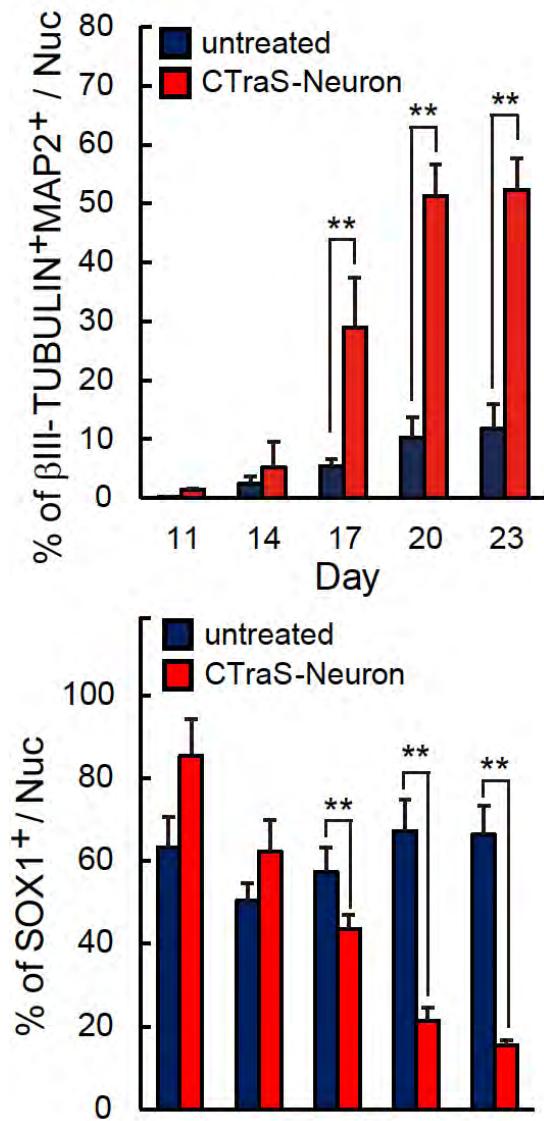
# ヒトES/iPS細胞から誘導した神経系細胞の分化を促進する方法 (CTraS法)



dNS法では神経分化効率は良くなつたが  
成熟速度が遅く未分化細胞の混入が多い  
という問題があつた。



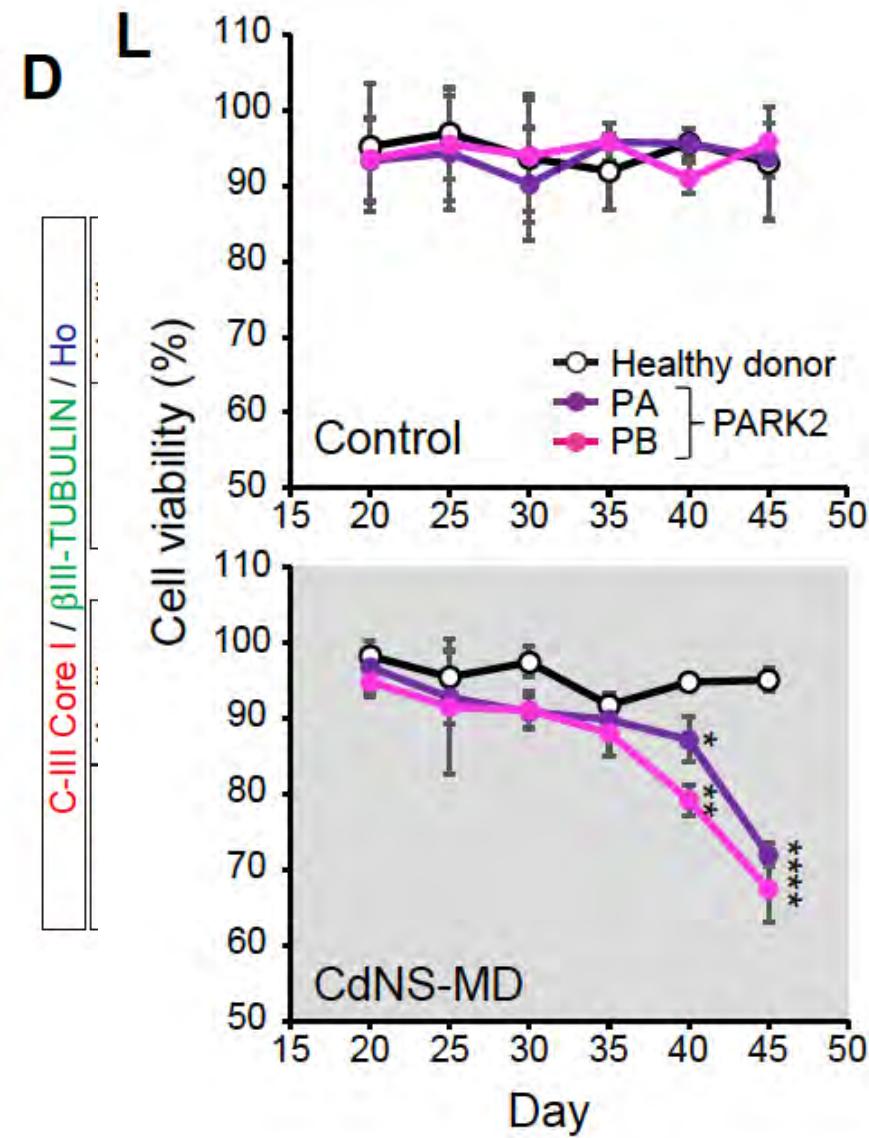
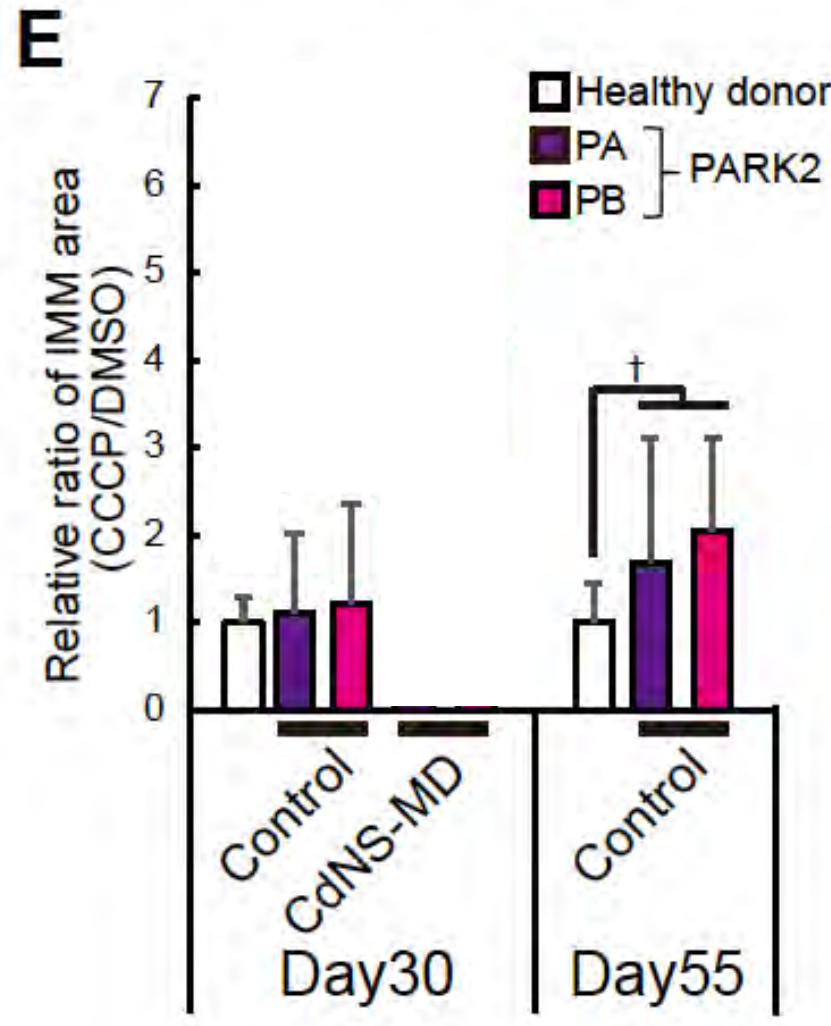
# CTraS法を用いると分化誘導したニューロンの成熟が加速する



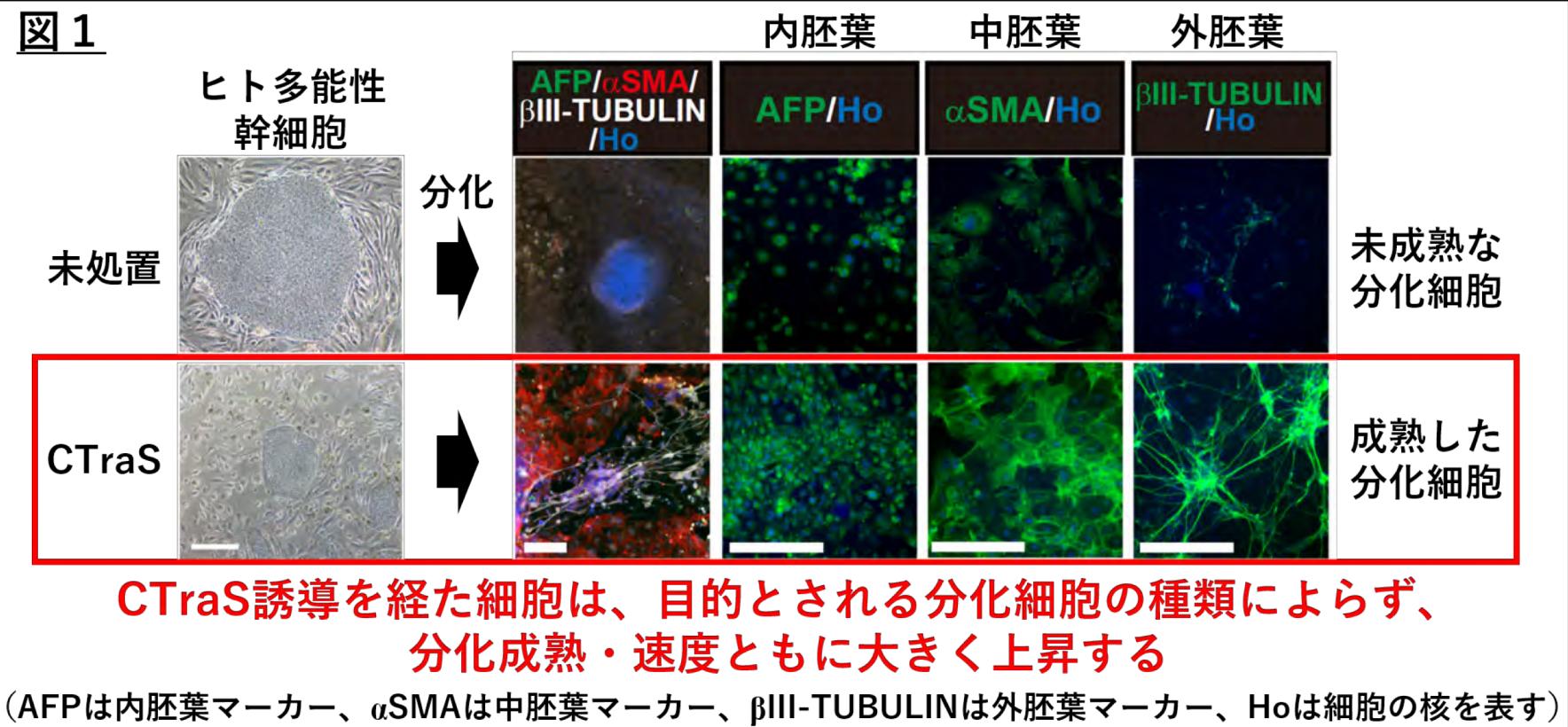
(Fujimori et al. *Stem Cell Reports* 2017)

CTraS法を用いると晩期発症の神経疾患モデルの再現も加速する？

# CTraS法によるパーキンソン病iPS細胞の疾患表現型の加速



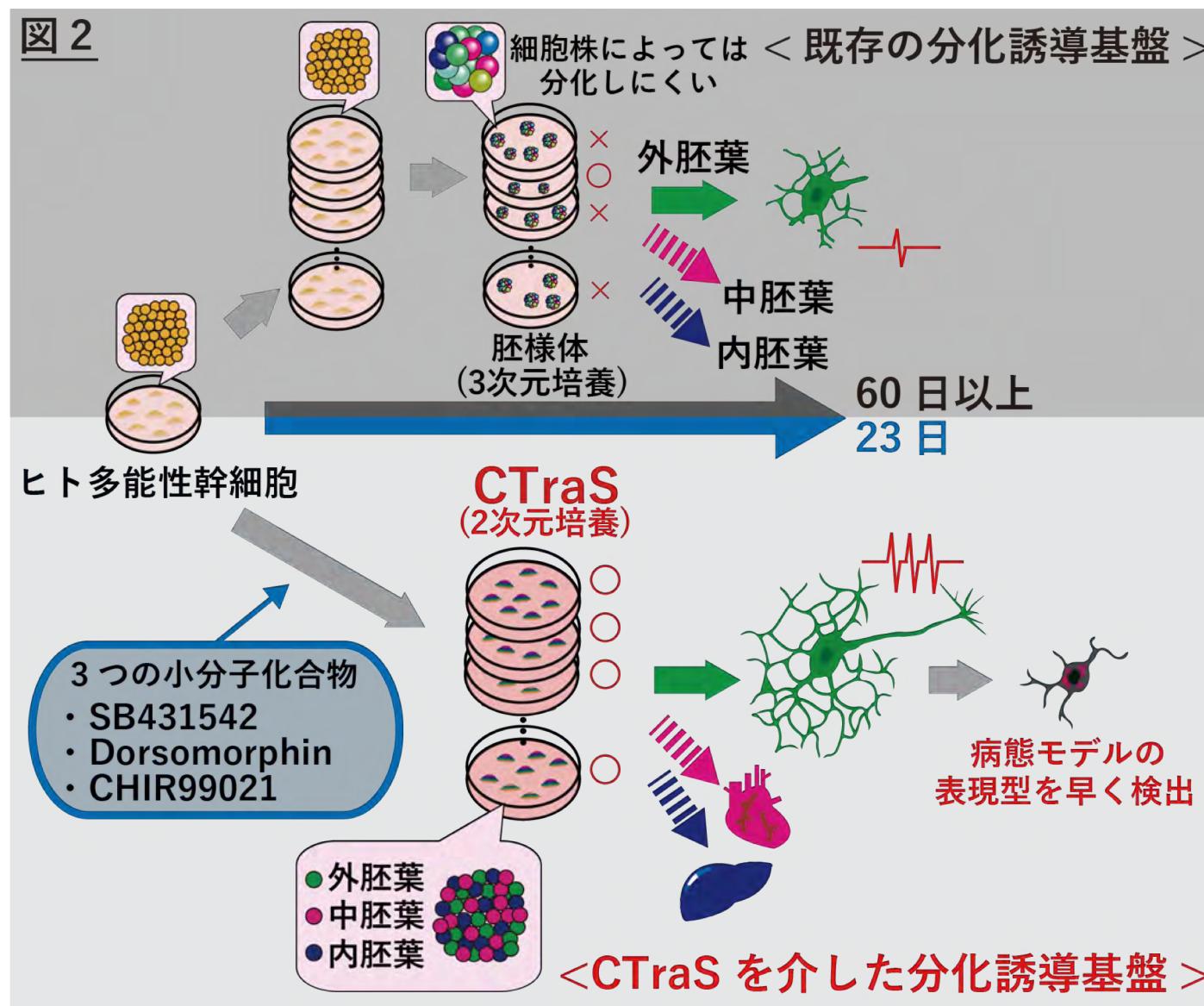
# CTraS法を用いるとニューロン以外の細胞も成熟が加速する



## 結論2

### CTraS法によるヒトES/iPS由来細胞の分化成熟の加速

図2



CTrasS法を用いた細胞の脊髄損傷モデルに対する有効性と安全性は？

(Fujimori et al. *Stem Cell Reports* 2017)

## 成果のまとめ

- ・神経幹細胞の誘導に胚様体を経由せず大スケール化しやすいdNS法を確立した。  
(Matsumoto et al. Stem Cell Reports 2016)
- ・未分化時のヒトES/iPS細胞に3種類の化合物を作用させて、誘導される細胞の分化成熟を促進するCTraS法を開発した。 (Fujimori et al. Stem Cell Reports 2017)
- ・CTraS法とdNS法を組み合わせると短期間で脊髄損傷の再生医療において安全性が高く有効な細胞を誘導可能と思われる。



創立175周年

開塾：1838年（天保9年）

新病棟完成後の本郷キャンパス予想図