

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
疾患・組織別実用化研究拠点（拠点A）事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療
（英語）Regenerative medicine for spinal cord injury and stroke
using human induced pluripotent stem cell-derived
neural precursor cells

研究開発実施期間：平成25年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）岡野栄之
（英語）Hideyuki Okano

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）慶應義塾大学医学部生理学教室・教授
（英語）Keio University School of Medicine Physiology Department ・ Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

我々は神経幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞を含む幹細胞研究（分離技術・分化誘導法の開発）や中枢神経系における再生医学に関する in vivo 研究成果やノウハウを蓄積すると同時に、免疫不全マウスや霊長類を用いた幹細胞移植の前臨床研究といった再生医療研究としての in vivo 実験医学の研究システムを確立してきた。加えて、GMP レベルのセルプロセッシングセンター(CPC)の設立と運営を行うことで、幹細胞治療開発の研究領域において世界をリードしてきた。本研究の目的は、我々が第 I・II 期再生医療の実現化プロジェクト、更には前臨床研究加速プログラムにおける研究等を通じて培ってきた幹細胞研究に関する基本技術（分離、培養、in vivo 実験）、インフラ（GMP 対応 CPC、フローサイトメトリーコアファシリティ、動物用 MRI、マーマセット飼育・前臨床研究施設等）を最大限に活用し、iPS 細胞由来神経前駆細胞を用い、亜急性のみならず慢性期を含めた脊髄損傷、更には脳梗塞に対する再生医療を実現化することである。

○ **【本格実施期間 I (2013 年度～2016 年度)】**では、臨床グレードの「再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストック」の構築を行い、安全性・有効性に関する検証と臨床プロトコルの作成と「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に基づく臨床研究申請準備を進め、再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックを用いた「亜急性期脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた再生医療」の臨床研究(First in Human)を 2017 年 3 月 17 日に慶應義塾特定認定再生医療等委員会に審議申請し、目標を達成した（1-1, 1-2）。また、並行して、同細胞ストックを用いた慢性期脊髄損傷を対象とした臨床研究を目指し、前臨床研究を推進した（2-1）。

1-1. 再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの構築

iPS 細胞研究中核拠点より提供を受けた iPS 細胞より神経前駆細胞を分化誘導し、品質試験、安全性試験、薬効評価試験を実施した。最終製品の規格値を確定した。本課題は in vitro 試験を主に大阪医療センターが、in vivo 試験を慶應義塾が検討した。住友ファーマ（旧、大日本住友製薬）で臨床用 iPS 細胞の GMP 準拠マスターセルバンクを製造した。

1-2. iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた亜急性期脊髄損傷に対する前臨床研究と臨床研究の開始

iPS 細胞研究中核拠点より提供を受けた臨床グレードの iPS 細胞より神経前駆細胞を分化誘導し、マウス亜急性期脊髄損傷モデル、ラット亜急性期脊髄損傷モデルを用いて有効性と安全性を評価した。特に、安全性においては Gamma-secretase inhibitor (GSI) 処理による移植細胞の腫瘍様増殖の抑制効果、PET 及び MRI による iPS 細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍性の評価法を確認した。大阪医療センターおよび慶應義塾で作成した細胞製造および品質管理に関する文書類、有効性・安全性に関する試験結果を「再生医療等提供計画」にまとめ、2017 年 3 月 17 日に慶應義塾特定認定再生医療等委員会へ審議申請を行った。

2-1. 慢性期不完全脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた移植治療の前臨床研究

慢性期不完全脊髄損傷での評価に先行して、マーマセット亜急性期脊髄損傷モデルにおける treadmill 歩行訓練方法の効果を検証した。非リハビリ群では後肢運動野を刺激しても後肢筋群の筋収縮は認められなかったが、リハビリ群においては近位筋群の筋収縮が認められ、皮質-脊髄間が機能的に接続されていることが示唆された。

○ **【本格実施期間 II (2017 年度～2019 年度)】**では【本格実施期間 I】で確立した「再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストック」を活用し、慢性期脊髄損傷（不完全麻痺）、慢性期脊髄損傷（完全麻痺）および亜急性期脳梗塞に対する安全性・有効性に関する検証と臨床プロトコルの作成を進めた（2-1, 3-1, 4-1）。なお、慢性期脊髄損傷（不完全麻痺および完全麻痺）においては再生医療実現拠点ネットワークプログラム（技術開発個別課題）「iPS 細胞由来神経前駆細胞を『高品質化』する手法の開発」（研究開発代表者：慶應義塾大学医

学部生理学教室 神山淳) で確立された iPS 細胞由来神経前駆細胞 (Gliogenic NPC) の臨床使用の可能性も検討した。亜急性期脊髄損傷患者および亜急性期脳梗塞患者に対する臨床研究で使用する iPS 細胞が決定したことを受けて住友ファーマにおいて同株の GMP 準拠でマスターセルバンクを製造した (2-2、3-2)。

2-1. 慢性期不完全脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた移植治療の前臨床研究

マウスおよびラット慢性期不完全脊髄損傷モデルに iPS 細胞由来神経前駆細胞を移植し、有効性およびリハビリテーションとの併用効果の検討を実施した。また、慢性期不完全脊髄損傷に対する臨床研究に向けたプロトコル案の作成に着手した。

2-2. HLA 多様性に対応した再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの拡充

iPS 細胞研究中核拠点より臨床用 iPS 細胞ストックの分与を受け、GMP 準拠でマスターセルバンクを製造し、セルバンクの品質管理として必要な規格試験および感染症試験を実施し、臨床用セルバンクとしての規格を満たすことを確認した。また、本セルバンクから神経前駆細胞の分化誘導を行い、目標収量を達成する増殖を示すことを確認した。

3-1. iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた脳梗塞に対する細胞移植療法の前臨床研究

げっ歯類脳梗塞モデルでの iPS 細胞由来神経前駆細胞の神経機能改善効果および長期安全性の検証として、亜急性期及び急性期のラットモデルに細胞移植を行った。脊髄損傷治療で使用する細胞と同一規格のヒト細胞由来神経前駆細胞の定位的脳内移植を行い、亜急性期モデルにおいて、由来神経突起が移植部周囲から対側半球に放射されることが確認された。さらに、移植ヒト細胞におけるプレシナプス分子の発現と、移植細胞とホストラット細胞間でのシナプス形成が確認され、亜急性期移植の長期有用性の POC 取得と、安全性の検証を達成した。

AMED における中間評価の審議の結果、以降、脳梗塞においては達成目標 5 「慢性期脳梗塞に対する臨床研究を開始」を優先することとした。

3-2. HLA 多様性に対応した再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの拡充

本格実施期間 II (2-2) と同様。

4-1. 慢性期完全脊髄損傷に対する iPS 細胞由来神経前駆細胞に対する前臨床研究

慢性期完全脊髄損傷においては、損傷部位を中心に空洞化、その周囲にグリア・線維性瘢痕が形成され、脊髄が分断されたギャップが生じるため、ホストの神経再生だけでなく、移植細胞の生存、神経再生における軸索の伸展等も非常に困難な環境である。そこでギャップに肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) 含有コラーゲンゼラチンスキャフォールドを先に設置し損傷周辺での脊髄微小環境の改善をはかり、二期的に細胞移植を行うことを検討するため、ラット慢性期完全脊髄損傷モデルを用いた検討を開始した。

○ **【本格実施期間 III (2020 年度～2022 年度)】**では慢性期脊髄損傷 (不完全麻痺) および慢性期脳梗塞の臨床研究申請準備を進めた。前者では Gliogenic NPC とリハビリテーションの集学的な併用療法に関する医師主導治験開始 (First in Human) への道筋をつけた (2-3)。後者は【本格実施期間 I】で確立した「再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストック」を用いた臨床試験の開始 (First in Human) への道筋をつけた (4-1、4-2)。また、慢性期脊髄損傷 (完全麻痺) では【本格実施期間 I】で確立した「再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストック」および/または Gliogenic NPC 応用の実現可能性を明らかにし、将来的な治験実施・承認への道筋をつけた (5-1、5-2)。

2-3. iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いた慢性期不完全脊髄損傷に対する臨床研究の開始

2020 年度までにマウスモデルにおいて、GSI 前処理した iPS 細胞由来神経前駆細胞移植の POC を確認したが、2021 年～2022 年度はリハビリテーションとの併用の有効性を確認し、更に作用機序の解明を検討した。脊髄損傷モデルにおける機能回復のメカニズムの解明については、特定の神経細胞におけるシグナリングを操作する DREADD を用いた研究を行い、移植細胞の機能を低下させるとマウスの運動機能も低下し、逆に細胞に刺激を加えると運動機能も上昇する事を確認した。それらの変化は運動機能のみならず、現在臨床で行われている電気生理

学的検査においても有意な差を示した。これらにより、移植した神経前駆細胞は分化してホストの脊髓回路に組み込まれ、長期的に活動している事が明らかとなった。現在は、医師主導治験に向けて準備中である。

4-1. 慢性期完全脊髓損傷に対する iPS 細胞由来神経前駆細胞に対する前臨床研究

慢性期完全脊髓損傷ラットモデルに対して肝細胞増殖因子 (HGF) 含有徐放型コラーゲンスキャフォールド設置後、ヒト iPS 由来神経前駆細胞移植の検討を行った。HGF 含有スキャフォールド設置による損傷脊髓内の微小環境の改善により、移植細胞の生着率の増加、ホストや移植細胞由来軸索突起の増加、血管新生の促進、グリア瘢痕や線維性瘢痕の減少、新たな神経回路の形成を認めた。また、下肢運動機能や排尿機能評価において機能改善を認め、その有効性を確認した。

4-2. HLA 多様性に対応した再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの拡充

再生医療実現拠点ネットワークプログラム (技術開発個別課題) 「iPS 細胞由来神経前駆細胞を『高品質化』する手法の開発」で確立された iPS 細胞由来神経前駆細胞 (Gliogenic NPC) の慢性期不完全脊髓損傷への適用可能性が高まったことから、本細胞に関して GCTP に準拠した製造工程の最適化をすすめ、ロットデータを蓄積した。製造した凍結ストックは解凍後に脊髓への投与可能かつ生着も問題ないことを確認した。

5-1. 再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックを用いた慢性期脳梗塞患者に対する臨床研究の開始

げっ歯類 (ラット) 慢性期脳梗塞モデルに対する脊髓損傷治療用ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の治療効果評価を実施した結果、GSI 未処理細胞の移植で亜急性期移植を上回る治療効果が得られることを明らかにした。病理組織学的解析により移植細胞のラット脳・脊髓組織内での生着と神経分化、神経軸索伸長が確認され、慢性期移植での神経機能回復メカニズム (細胞置換作用) を明らかにし、げっ歯類モデルでの非臨床 PoC 取得を達成した。また、霊長類 (カニクイザル) 慢性期脳梗塞モデルに対するヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞移植の有効性と安全性評価を実施した結果、げっ歯類試験同様に、移植細胞のカニクイザル脳・脊髓組織内での生着と神経分化、神経軸索伸長が確認され、移植後神経機能回復を示唆する所見が得られ、霊長類モデルでの安全性と有効性が確認された。慢性期移植のための臨床プロトコール作成に着手し、臨床研究ドラフトプロトコールを完成させた。

5-2. HLA 多様性に対応した再生医療用 iPS 細胞由来神経前駆細胞ストックの拡充

本格実施期間 III (4-2) と同様。

以上の成果から、これまで有効な治療法がなかった脊髓損傷や脳梗塞に対する再生医療を我が国発の iPS 細胞技術により実現できれば、これらの病に苦しむ多くの患者さんたちに一条の希望の光を投げかけられるものと信ずる。

We have accumulated study results and know-how about stem cell research, such as the development of separation technologies and differentiation methods, including neural stem cells, ES cells, and iPS cells, and about regenerative medicine in central nerve systems, established research systems of *in vivo* experimental medicines of regenerative medicine studies such as the stem cell transplantation systems using immunodeficient mice or the primates and the preclinical study, and performed establishment and operation of a cell processing center (CPC) of the GMP level, and have been leading the world in the field of studies of stem cell therapy development.

The purpose of this study is to realize regenerative medicines for spinal cord injury, including not only subacute but also chronic stages and cerebral infarction, by maximizing the basic technologies such as isolation, culture, and *in vivo* experiments, and infrastructure as GMP-compliant CPC, flow cytometry core facility, animal MRI, marmoset breeding and preclinical research facilities, etc. for stem cell researches that we have developed through our projects of Stage I and II of The Project for Realization of Regenerative Medicine and The Preclinical Research Acceleration Program.

In Implementation Period I (FY2013-FY2016), we constructed a clinical grade “stock of iPSC-derived Neural Progenitor Cells,” verified the safeties and efficacies, and prepared the clinical protocol and an application for clinical research based on the “Act on Securing Safety of Regenerative Medicine.” And the clinical research as the First in Human, “Clinical trial of transplantation of iPSC-derived NS/PCs in subacute complete spinal cord injury” using the “stock of iPSC-derived Neural Progenitor Cells,” was applied to Keio University Certified Committee for Regenerative Medicine on March 17, 2017. Therefore, the target was achieved. In parallel, we also promoted preclinical research with the aim of conducting a clinical study for spinal cord injury or chronic stages.

In Implementation Period II (FY2017-FY2019), we verified the safeties and efficacies of the “stock of iPSC-derived Neural Progenitor Cells” for regenerative medicine established in "Implementation Period I" for spinal cord injury or chronic stages of incomplete or complete paralysis and subacute cerebral infarction, and developed the clinical protocols. For spinal cord injury of chronic stages of incomplete or complete paralysis, we also examined the possibility of clinical use of iPSC-derived Gliogenic NPC(GNPC), which was established under Projects for Technological Development of the Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine “Study of the mechanism regulating the quality of iPS-derived NPCs” (principal researcher; Jun Kohyama, Keio University School of Medicine Physiology Department). After the iPSC was determined to be used in clinical studies for patients with subacute spinal cord injury or for patients with subacute cerebral infarction, a GMP-compliant master cell bank of the same strain was manufactured at Sumitomo Pharma Co., Ltd.

In Implementation Period III (FY2020-FY2022), we prepared clinical research applications for chronic spinal cord injury of incomplete paralysis and chronic cerebral infarction. The former paved the way for the start of a physician-led clinical trial as the First in Humans on a multidisciplinary combination therapy of GNPC and rehabilitation. The latter paved the way for the start of a clinical trial as First in Human using the “stock of iPSC-derived Neural Progenitor Cells” for regenerative medicine established in Implementation Period I. In addition, for chronic spinal cord injury of complete paralysis, the feasibility of the “stock of iPSC-derived Neural Progenitor Cells” for regenerative medicine and/or GNPC paves the way for the future implementation and approval of clinical trials.

From the above results, we will realize regenerative medicine, by the iPSC technologies from Japan, for patients of spinal cord injury or for patients of cerebral infarction which have had no effective treatment, so we believe throwing a ray of hope over many patients suffering from these diseases.