

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： ヒト iPS 由来神経前駆細胞の腫瘍形成能のメカニズムとその制御による安全性確保の検討

2. 研究開発代表者： 中村雅也（慶應義塾大学医学部整形外科学教室）

3. 研究開発の成果

中枢神経系において神経前駆細胞が存在することが報告されて以来、難治性の中枢神経系疾患に対する再生医療の実現が期待されてきた。しかし、再生医療に利用可能な神経前駆細胞は中絶胎児やヒト ES 細胞から樹立もしくは誘導する必要があり、いずれもヒト胚や中絶胎児に関わる倫理的な制約から臨床応用に至るまでには多くの障害があった。一方、山中博士らにより樹立方法が確立されたヒト iPS 細胞は皮膚を含む体細胞から作製可能な細胞であり、倫理的な障壁が少ないことから再生医療実現に向けて大きな期待がよせられている。我々の研究グループではヒト iPS 細胞より作製した神経前駆細胞を用いて、脊髄損傷モデル動物に対する細胞移植療法の有効性を報告しており、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)の脊髄損傷に対する有用性を提唱している。しかし、同時にヒト iPS 細胞を用いた再生医療実現に向けた、ヒト iPS 細胞由来細胞の造腫瘍性の克服は喫緊の課題である。移植後に hiPS-NPC から生じる可能性のある腫瘍は①未分化 iPS 細胞の残存(奇形腫)②hiPS-NSC 自体の腫瘍化(神経系腫瘍)のいずれかにより生じると考えられる。奇形腫は iPS 細胞の分化抵抗性に由来し、iPS 細胞選択的マーカーの利用により理論的には除去可能である。しかし、神経系腫瘍に関しては神経幹/前駆細胞と区別する表面マーカーが存在しないという問題があった。さらに、hiPS-NSC における腫瘍形成能が一部の細胞に限局するのか、全ての細胞が有するのかが明らかでないこと(hiPS-NSC の不均一性)も大きな問題であった。本研究では京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)より複数の iPS 細胞の供与を受け、研究を実施した。CiRA より提供された iPS 細胞は効率的に神経系への分化誘導が可能であり、我々が新規に開発した、臨床応用可能な培養手法を用いても iPS-NPC の効率的な分化誘導が可能であった。そこで、複数の iPS-NPC を利用し、遺伝子発現や DNA メチル化、融合遺伝子等の発現を解析し、造腫瘍性との関連しうる因子の特定を行った。その結果、移植後に持続的な増殖を示す iPS-NPC に特徴的な DNA メチル化変動領域を見出した。このような知見は iPS-NPC の品質管理項目設定に重要である。しかし、同時に iPS-NPC は移植後に多様な組織像を呈するため系統だった分類が必要であることも明らかとなった。そのため、本研究課題では移植後の iPS-NPC が産生する組織像に関して病理組織学的手法を用いて解析することにより造腫瘍性を定義しうる基準の作成を試みた。その結果、iPS-NPC は免疫不全動物への移植により一定の増殖能を示すが、長期間の経過観察から明らかな造腫瘍性を示さず、神経発生を模倣するような組織像を呈すること、移植後の短期間での解析では増殖像が存在しても長期間の観察により生体内での増殖は抑えられることが明らかとなった。興味深いことに神経系以外の細胞集団が一定の割合で混入する場合があります、この際には神経系以外の組織を産生することになることが明らかとなった。このようなある種の非神経系細胞は神経前駆細胞用の培養条件下でも増殖可能であり、我々は FACS による 1 細胞分離後に培養を行い、複数の 1 細胞由来の細胞株を作製した。この結果、この非神経系細胞を除去しうる表面マーカーを複数同定した。本研究の知見を生かすことでヒト iPS 細胞を利用した再生医療の早期実現に貢献可能だと考えている。