

第144回日本医学会シンポジウム

臨床応用をめざしたiPS細胞研究

期日 平成25年6月6日(木)

会場 日本医師会館

日本医学会

第144回日本医学会シンポジウム

臨床応用をめざしたiPS細胞研究

日 時：平成25年6月6日(木) 13:00~17:00

場 所：日本医師会館 大講堂

〒113-8621 東京都文京区本駒込2-28-16

TEL 03-3946-2121 FAX 03-3942-6517

- 13:00 開会の挨拶 高久史磨 (日本医学会長)
- 13:05 序論 岡野栄之 (慶應義塾大学・生理学教室)
- I. (座長) 小室一成 (東京大学大学院・循環器内科学)
- 13:15 1. 真に応用可能なiPS細胞技術の開発
中川誠人
(京都大学iPS細胞研究所・初期化機構研究部門)
- 13:35 2. iPS細胞由来輸血製剤の開発
江藤浩之
(京都大学iPS細胞研究所・臨床応用研究部門)
- II. (座長) 中内啓光
(東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター)
- 13:55 1. 細胞から臓器へ；iPS細胞から臓器を創る
中内啓光
(東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター)
- 14:15 2. 細胞シートによる心筋再生治療
澤芳樹
(大阪大学大学院・心臓血管外科学)
- 14:35 3. 角膜再生～体性幹細胞からiPS細胞へ～
西田幸二
(大阪大学大学院・脳神経感覚器外科学 (眼科学))

- Ⅲ. (座長) 岡野 栄之 (慶應義塾大学・生理学教室)
- 14:55 1. iPS細胞を用いた脊髄再生医療の実現に向けて
中村 雅也 (慶應義塾大学・整形外科学教室)
- 15:15 2. iPS細胞を用いたパーキンソン病治療
高橋 淳
(京都大学iPS細胞研究所・臨床応用研究部門)
- 15:35 3. 神経の疾患とiPS細胞研究
岡野 栄之 (慶應義塾大学・生理学教室)
- 15:55 休憩
- 16:10 総合討論 (司会) 小室 一成 (東京大学大学院・循環器内科学)
中内 啓光 (東京大学医科学研究所
・幹細胞治療研究センター)
岡野 栄之 (慶應義塾大学・生理学教室)
- 16:55 閉会の挨拶 門田 守人 (日本医学会副会長)
- 17:00 終了

第144回日本医学会シンポジウム組織委員

小室 一成 中内 啓光 岡野 栄之

I.

1. 真に応用可能なiPS細胞技術の開発

中川 誠人

京都大学iPS細胞研究所 初期化機構研究部門

再生医療に用いられる材料として多能性幹細胞は有用なものと考えられてきた。実際に最近ではそういった幹細胞を用いた再生医療のニュースを耳にする機会が増えてきている。

胚性幹細胞（ES細胞）は我々の体のほぼすべての細胞に分化できる能力とほぼ無限に増殖できる能力を有しているが、医療に用いる際には倫理面の問題や移植後の拒絶反応の問題などがある。これらの問題を解決するために体細胞から人工多能性幹細胞（iPS細胞）が樹立された。iPS細胞にはES細胞のような倫理面や拒絶反応の問題はないと考えられ、再生医療への次世代の材料として期待されている。

ヒトおよびマウスのiPS細胞は線維芽細胞に4つの初期化因子を導入することで樹立された。これらのiPS細胞はES細胞とほぼ同じ性質を持っている。しかし、マウスiPS細胞の研究からiPS細胞由来のキメラマウスで高頻度に腫瘍が形成されることが分かった。この原因の一つとしてiPS細胞樹立時に用いたレトロウイルス由来のc-Mycの再活性化が寄与していることが判

明した。我々は元細胞のゲノムに挿入がないエピソードベクターを用い、c-Mycの代わりにL-Mycを用いることでより安全なiPS細胞を作製することに成功した。

ヒトiPS細胞は一般的にフィーダー細胞上で樹立・維持培養されている。従来からマウスのフィーダー細胞を用いることが多く、これらの細胞はウシ胎児血清（FBS）を含んだ培養液で培養されている。医療応用の段階では、血清や動物由来成分を出来る限り減らすか使わないことがガイドライン等にあることからフィーダー細胞を用いず、培養液に異種由来成分を含まない条件で作製したiPS細胞を用いることが望ましいと考えられる。そこで我々はこれらの条件を満たすような培養条件の開発を進めてきた。様々な検討から、組み換え蛋白質のラミニンフラグメントを基質とし、異種由来成分を含まない培地を開発して、それらを用いることでヒトiPS細胞の樹立・維持培養に成功した。このフィーダーフリーiPS細胞はこれまで解析されてきたフィーダー細胞上のiPS細胞と同様に様々な体細胞に分化誘導することが分かった。

2. iPS細胞由来輸血製剤の開発

江藤 浩之

京都大学iPS細胞研究所 (CiRA) 臨床応用研究部門

iPS細胞（人工多能性幹細胞）は、体のあらゆる組織に成長する多能性幹細胞で、再生医療への応用が期待されている。昨年の山中伸弥京都大学iPS細胞研究所長のノーベル賞受賞は、再生医療実現加速のターニングポイントとなったと思われる。私たちの研究室では将来の輸血製剤不足に対応することを目標に、iPS細胞からの血小板、赤血球製剤の開発を行っている。特に血小板に関しては、文部科学省の再生医療の実現化ハイウェイプログラムのご支援を頂き、今ではH27-28年度でのfirst in humanを目指せる研究ステージに進展している。

私たちが提案しているiPS細胞技術を応

用した血液製剤は、通常の細胞療法が目指す初回移植によって完結するシナリオには適しておらず、繰り返し何度も投与する必要がある。このような特殊性に対応する目的で、血小板前駆細胞である“巨核球”を凍結保存・バンク化できる細胞株として、特殊な血液型をもつiPS細胞ストックから作製し、何回でも品質が一定した血小板を供与することが可能な方法（治療モデル）を提案している。本会では、この治療モデルを紹介する。さらに、私たちの提案を実現化するための技術的な問題点、ならびに将来の医療ビジネスモデルを成立させる為の課題についても言及する。

II.

1. 細胞から臓器へ；iPS細胞から臓器を創る

中内 啓光

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター・幹細胞治療分野

JST・ERATO中内幹細胞制御プロジェクト

iPS細胞技術の開発により体細胞をES細胞と同等の能力を持つ多能性幹細胞に転換することが可能となり，“自身の多能性幹細胞”から分化誘導した細胞による再生医療への道が開けた。しかしながら現時点で考えられている幹細胞を利用した再生医療の多くは細胞を用いた細胞療法であって、心臓や肝臓といった実質臓器の再生は遠い将来の夢と考えられている。これは臓器の形成過程において必要とされる複雑な細胞間相互作用を試験管内で再現することは不可能と考えられているからである。しかし、臓器を再生してドナー不足を解消するということは再生医療の究極の目標の一つであることは言うまでもない。

そこで我々は遺伝的に特定の臓器が欠損したマウスの発生段階における“空き”を利用することで、外から注入した多能性幹細胞由来の臓器が作れないかと考えた。臓器の“空き”を持ったマウスとして腎臓欠損を示す*Sall1*ノックアウト (KO) マウスおよび膵臓欠損を示す*Pdx1*KOマウスを用いた。それらの胚に、蛍光遺伝子でマークしたiPS細胞を注入し、仮親子宮への移植

後、妊娠満期で取り出した新生児を解析した。その結果、iPS細胞の寄与が認められた*Sall1*KOマウス内には一様にEGFP蛍光を示す腎臓が、*Pdx1*KOマウス内には同様の膵臓がそれぞれ存在していた。

次に異種間でも同様な原理が働くかを調べるため、膵臓を欠損する*Pdx1*^{-/-}マウスの胚盤胞にラットiPS細胞を移入したところ、ラットiPS細胞由来の膵臓を持つマウスが誕生し、正常に成育することを見出した。さらに小型動物で示された原理がブタのような大型動物でも適応できるかを検証するため、遺伝子導入と体細胞核移植により膵臓欠損ブタを作成し、蛍光遺伝子トランスジェニックブタの胚細胞を移入して胚盤胞補完を行ったところ、胚細胞由来の膵臓を持ったブタが誕生し、正常に生育することを見出した。

これらの結果は臓器発生の機構を理解するための新たな方法論を提供するとともに、将来的に異種動物個体内でヒトiPS細胞由来の臓器を再生するといった、全く新しい再生医療技術の開発に貢献するものと期待される。

2. 細胞シートによる心筋再生治療

澤 芳 樹

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科学

近年、重症臓器不全治療の解決策として新しい再生型治療法の展開が不可欠と考えられている。特に最近、幹細胞学研究が画期的に進歩し、各臓器における遺伝子治療や細胞移植は各臓器機能を改善する事が報告され、その臨床応用が開始されている。

われわれは自己骨格筋芽細胞シートによる心筋再生に取り組んできた。広範囲の心筋再生治療法を開発するため、温度感応性培養皿を用いて自己骨格筋芽細胞シートを作成、心筋症ハムスターの不全心に移植したところ、均一構造をとって生着し、心機能の改善、生存率の向上がみられた。自己骨格筋芽細胞によるシートの有効性を、豚心筋梗塞モデルおよび拡張型心筋症モデルである高速ペーシングによる犬心不全モデルを用いた前臨床試験で良好な結果を得たので、倫理委員会の承認を経て、DCMに対する臨床試験を開始し、第一例目は補助人工心臓の離脱するほどに心機能が回復し

た。さらに、補助人工心臓装着前のDCMおよびICMを対象とした、自己骨格筋芽細胞シートによる心筋再生治療を、ヒト幹細胞臨床研究の指針に従って、20人の患者に治療し、安全性を含めて良好な結果を得ている。

さらに、現在はより高い心機能回復を目指し、iPS細胞由来心筋細胞シートによる再生医療の開発にも取り組んでいる。普遍的な治療法として再生医療を発展させるためには、治療法の安全性・有効性の確認が肝要であり、当大学のトランスレーショナルリサーチ (TR) 拠点では再生細胞の品質を管理する目的で無菌的細胞調整施設を整備するとともに、客観性の高い臨床試験の手順を作成し、いくつかの先進的医療の臨床応用を開始している。

細胞シートによる心筋再生治療は、Viabilityが残存した重症心不全に対して、有効な治療法となる可能が期待される。

3. 角膜再生～体性幹細胞からiPS細胞へ～

西田 幸二

大阪大学大学院医学系研究科 脳神経感覚器外科学（眼科学）

ヒトは外界の情報の80%を視覚から得ているとされており、難治性の眼疾患により生活の質QOLが損なわれている数多くの患者が存在する。例えば、網膜色素変性症、重症の緑内障や黄斑変性、Stevens-Johnson症候群などの瘢痕性の角膜疾患などである。これらの病気のために、多くの患者が失明状態にある。その克服のために、再生医療や人工視覚、バイオ医薬品の開発など、先端的な治療法の開発が世界中で展開されている。眼は外界に接している器官で、種々の介入が行いやすいということや、その結果を直接観察して評価しやすいなどの利点があり、先端医療の導入が進んでいる領域である。

近年産学官が連携して、再生医療の実用化に向けたプロジェクトが展開されており、眼疾患、骨疾患、心不全、肝不全、糖尿病、パーキンソン病、脊髄損傷など、種々の難治性疾患の治療も夢物語ではなくなってきた。この背景にあるのが幹細胞やバイオマテリアルの基盤的な研究の発展である。殊に網膜や角膜等の眼組織には大きな期待が寄せられている。角膜においてはすでに一部の疾患に対して、我が国で世界に先んじて再生治療法の臨床試験が開始され

ている。また、網膜疾患についても胚性幹細胞を用いた初めての治験が米国で進められているところであり、我が国においても、人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いた網膜の再生医療の臨床治験の計画が進められている。

さて、現在角膜移植術が必要な患者は全世界で100万人以上と見積もられている。しかし、実際に角膜移植を受けている患者数は年間6万人足らずであり、多くの国で提供眼球不足が大きな問題となっている。また、術後に生じる拒絶反応が大きな問題点となっている。このような現在の移植医療が抱える問題点を抜本的に解決するため、患者自身の細胞を用いた再生医療の開発が待望されてきた。我々は患者自身の口腔粘膜から角膜上皮の代用となりうる組織を作製し、それを患者の治療に世界で初めて応用し、現在まで良好な成績を得ている。また、iPS細胞を用いた角膜再生医療の開発も進めている。

本講演では角膜の再生医療の現状について紹介し、臨床への実現化という視点から、眼疾患の再生医療の開発がどのステージにあるかをお話したい。

Ⅲ.

1. iPS細胞を用いた脊髄再生医療の実現に向けて

中村 雅也

慶應義塾大学 整形外科学教室

細胞移植による脊髄の再生医療を確立するために、我々はラットおよびサル脊髄損傷に対する神経幹細胞移植の有効性を報告してきた。しかし、胎児由来組織を使用することに伴う倫理的問題のために、いまだ臨床応用には至っていない。本シンポジウムでは、これまで我々が行ってきた脊髄損傷に対する人工多能性幹細胞 (iPS細胞) を用いた細胞移植に関する基礎研究を紹介したい。

まず、マウス iPS細胞から分化誘導した神経幹細胞 (iPS-NSC) をマウス脳に移植し、腫瘍形成を認めなかった安全なクローン由来 iPS-NSC をマウス損傷脊髄に移植した。その結果、軸索の再生・再髄鞘化、血管新生、さらに運動機能の回復が促進し、移植細胞由来の腫瘍形成を認めなかった。

次にヒト iPS-NSC を免疫不全マウス脳に移植し、腫瘍形成を認めない安全なクローン由来ヒト iPS-NSC を選別し、免疫不全マ

ウス損傷脊髄に移植した。その結果、移植細胞由来 neuron とホスト neuron 間のシナプス形成を確認し、損傷部尾側における軸索の再生、血管新生、運動機能回復が促進することを明らかにした。さらに、長期経過観察後も腫瘍形成はみられなかった。しかし造腫瘍性に関しては、ヒト iPS-NSC クローン間にばらつきがあることも明らかになってきた。

今後の課題は、1) 移植前の安全な iPS細胞クローンの選別法、2) 最終産物である iPS-NSC の安全性基準の確立、3) GMP 準拠した臨床に使用できる iPS-NSC の製造である。1), 2) に関しては既に基礎研究からその方向性は定まりつつある。3) に関しては産業化を見据えて企業を巻き込んだ研究体制の構築が求められている。これまでの研究成果を結集して、平成 30 年の脊髄損傷に対する iPS-NSC を用いた臨床研究の開始を目指したい。

2. iPS細胞を用いたパーキンソン病治療

高 橋 淳

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門

神経難病に対する再生医療の方法として幹細胞を用いた細胞移植が注目されており、その対象疾患のひとつとしてパーキンソン病がある。欧米では1980年代後半から胎児中脳黒質細胞移植が行われ一定の効果が示されているが、胎児細胞の利用には量的・質的問題がありその解決策としてES細胞やiPS細胞の利用に期待が寄せられている。その治療戦略は、多能性幹細胞からの神経誘導、さらにはドパミン神経の誘導を行い、これらを脳内に移植するということになる。すでにヒトES、iPS細胞からのドパミン神経誘導は効率的に行われるようになっており、世界中で臨床応用を目指した研究が精力的に進められている。

多能性幹細胞からはBMPおよびActivin/Nodal/TGFシグナルを阻害することによりほとんどすべての細胞を神経系に誘導することができる。さらにShhやFGF8などを添加することにより、中脳ドパミン神経を誘導することが可能となった。現在は、このドパミン神経誘導を動物由来のフィーダー細胞やマトリクスを用いずに行うこと、さらには腫瘍形成や合併症の原因となる未分化細胞や非神経系細胞の

混入を取り除く方法の技術開発が焦点となっている。我々はFloor plate markerを用いてセルソーティングをすることによってドパミン神経前駆細胞を濃縮できることを明らかにした。選別された細胞は増殖率が低く、移植後のgraftサイズもソーティングをしない場合と比べて小さくなることが明らかとなった。

また、こうして作製した細胞の有効性と安全性を評価することも重要である。我々は齧歯類以外に霊長類パーキンソン病モデルも用いて移植細胞の解析を行っている。これまでの研究では、ヒトES細胞から誘導した神経前駆細胞を両側の線条体に移植したところ、12か月の経過観察で腫瘍形成はみられず、行動改善が明らかとなった。PET検査では移植部位での¹⁸F-DOPA取り込み上昇が観察され、12か月後の脳切片の組織学的解析では多数のドパミン神経細胞が生着していた。さらにヒトiPS細胞を用いた実験でも、霊長類モデル脳でiPS細胞由来ドパミン神経細胞が移植後6か月にわたって生着していることが確認された。

本講演ではこれらの結果を紹介し、臨床応用に向けた課題や展望について述べる。

3. 神経の疾患とiPS細胞研究

岡野 栄之

慶應義塾大学 生理学教室

2012年にノーベル医学・生理学賞を受賞された京都大学の山中 伸弥教授らの研究成果により、皮膚の線維芽細胞などの体細胞に少数の転写因子の遺伝子を導入するだけで、体を構成するあらゆる細胞になる能力(=多能性)をもつ人工多能性幹細胞(=iPS細胞)を作成することが可能となり、細胞移植治療や疾患研究において大きな期待を集めている。ところが、実際の臨床応用には、腫瘍形成の問題等の安全性の問題をクリアする必要がある(Miura et al. Nature Biotech, 2009)。私達は、慶應義塾大学医学部整形外科学教室との共同研究で、マウスおよびヒトiPS細胞由来の神経前駆細胞をマウスおよびサルの脊髄損傷モデルへ移植することにより機能回復を誘導することに成功した(Tsuji et al., PNAS, 2010; Nori et al., PNAS, 2011; Kobayashi et

al., PLoS ONE, 2012; Okano et al., Circulation Res, 2013)。今後これらの成果をどのように臨床の現場へ応用する道筋をお話する。

一方iPS細胞技術のもう一つの応用例として疾患モデル研究があげられるが、私達が取り組んでいるRett症候群, Perizaeus-Merzbacher病, Prader-Willi症候群などの小児神経疾患, アルツハイマー病(Yagi et al., Hum Mol Genet, 2011), パーキンソン病(Imaizumi et al., Molecular Brain, 2012), ALS, 球脊髄性筋萎縮症(Niheii et al., J. Biol. Chem, 2013), 統合失調症疾患などの精神・神経疾患を対象とした疾患のモデル細胞作出による病態解明や創薬の研究(Ito et al., Annals of Neurol., 2012)について、最近の研究成果や世界的動向について判りやすく紹介したい。

総 合 討 論

(司会) 小 室 一 成

東京大学大学院 循環器内科学

中 内 啓 光

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター・幹細胞治療分野

JST・ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト

岡 野 栄 之

慶應義塾大学 生理学教室