

# ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞による革新的線維芽制御方法の開発

慶應義塾大学眼科学教室

稲垣 絵海

With the advent of an aging society, the importance of prevention and treatment of various chronic diseases has been pointed out. Inflammation and fibrosis control are considered to be important as the underlying pathology common to chronic diseases. We focused on the wound healing mechanism during the embryonic period and investigated neural crest cells (NC) that have the ability to migrate during the embryonic period. In this study, we focused on neural crest cells derived from iPSCs to overcome disease phenotypes, and found that they secrete a secretome that acts in an inhibitory manner against inflammation and is useful in disease models. Since neural crest cells derived from living organisms have a relatively limited capacity, induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived neural crest cells may be advantageous for cell therapy and may enhance regenerative functions. However, there are some barriers to clinical application, such as standardization of production methods, product quality control and standardization, and in vivo viability, when considering extrapolation as a regenerative medicine product, but the potential as a new cell source with interesting possibilities is promising.

## 1. 緒言

世界的な高齢化社会を迎え、基礎研究分野でも加齢に伴う疾病の克服に向けた新たな時代が到来している。人間の老化や加齢に伴う疾病のメカニズムや治療法の解明という問題は、差し迫った高齢化社会を反映し、新たな局面を迎えている。老化の詳細なメカニズムは依然として不明な点があり、複数の調節機構の関与が報告されている<sup>1-3)</sup>。このなかで臓器線維化は慢性炎症に伴い生じ、主要臓器では致死を招く病態である。皮膚や角膜は強く損傷すると瘢痕を残して治癒し、決して元の状態には再生されない。しかし、胎生期のある時期までは、たとえどのような深い傷を追っても瘢痕を全く形成することなく完全に元の状態に再生され、この機構は胎仔創傷治癒機構 (scarless wound healing) といわれる<sup>4-7)</sup>。我々は、これまでの知見で生来における神経堤由来の細胞の局在について検討を実施、移植細胞源としての有用性を実証してきた<sup>8,9)</sup>。2006年と2007年に、高橋らはマウスとヒトの体性線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (iPSC) を作製する技術を報告した<sup>10,11)</sup>。以来iPS細胞を用いた組織分化のメカニズムやヒト疾患の病態生理を解明する病態解析の試験管モデルとしての有用性と共に細胞置換療法としての移植治療が着目され病態解明や新規治療法開発が実施されている<sup>12-14)</sup>。本研究ではiPS由来誘導神経堤細胞の移植細胞源としての特性を明らかにする目的で実施を行った。

## 2. 方法

我々は既報に準じた神経堤細胞の誘導法を改善し、現在では90%以上の誘導効率を担保する誘導系を確立した<sup>15,16)</sup>。誘導したiPS由来誘導細胞において神経堤細胞マーカーの遺伝子発現解析についてはDNAマイクロアレイを用いて検証した。分泌している液性因子に関してはサイトカインアレイを用いて上清成分の定量化および解析を実施した。

## 3. 結果

施行した遺伝子解析においては誘導の過程においてNGFR, SNAIL, SOX9, SOX10, TFAP2Aなどの神経堤マーカーの発現上昇を確認した。ウェスタンブロッティングにて検証した蛋白定量においてもNGFR, SOX9らの発現を確認した。またDNAマイクロアレイの解析において誘導細胞が神経堤マーカーの発現が高いことを確認した。また同細胞の培養液上清を用いて志向したサイトカインアレイの結果より複数の候補因子群を抽出した。さらに実際の生体における創傷治癒機構を解明するため、げっ歯類における眼疾患モデルを用いこれらの候補因子の有効性について検討を行った。結果として単一因子としては優位な瘢痕抑制を認めることはできなかったが、培養上清の添加によって効果を認めたことから培養上清中に分泌される複数の因子が作用していることが示唆された。

## 4. 考察

我々の解析により今回iPS細胞由来誘導神経堤細胞から分泌される液性因子による新しい瘢痕抑制効果を見出した。想定される奏功機序に寄与した液性因子が線維芽細胞に作用し細胞外基質や蛋白分解酵素の発現の修飾をする予備知見を得ており、神経堤の形質を有する本誘導細胞が炎症に関して収束的な役割に寄与することを推察している。



Development of an Innovative Method for Modulating Fibrosis by Human iPSC Cell-Derived Neural Crest Cells

Emi Inagaki

Keio University, School of Medicine, Department of Ophthalmology

## 5. 結論・まとめ

神経堤 (neural crest: NC) 細胞は胎生期から成体にかけて軟骨や骨、皮膚など結合織をはじめとして驚異的に様々な種類の細胞系譜への可能性を秘めかつ、成体になっても持続する自己複製能力を有する細胞である<sup>17-19)</sup>。近年同細胞を細胞治療用に探索する試みも報告されつつある<sup>20, 21)</sup>。同細胞を用いて治療の標的としては神経堤から分化するような組織における組織構築に関する貢献を期待する場合、もう一つは疾患特異的な修復を期待する場合である。今回標的とした角膜実質は神経堤由来の誘導組織と報告されているが、我々もヒト NC 由来の多能性前駆細胞をヒト成体から単離した場合に、年齢依存的な変化を呈しており自己複製能力と多能性に関しては制限されていることなどを報告している<sup>22)</sup>。よって移植細胞として用いる場合にはより幼若な iPS 細胞あるいは ES 細胞のような細胞源が適切とも考えられる。本研究では主に組織修復における有用性を検証したが、ヒルシュスプリング病など神経堤由来細胞の発生異常関連疾患においても寄与することが期待できる。再生医療においては長期的な安定性を厳密に管理することが重要であると考えられる。たとえば規格化などの点においては代表的な神経堤細胞表面抗原である p75 を使用することが推定されるが、複数の適切な表面抗原の選定が必要である。iPS 由来誘導細胞を用いた新しい細胞治療を構築するには、有効性評価の確立、細胞の安全性、毒性評価、投与方法の最適化を踏まえる必要がある<sup>23, 24)</sup>。もし同等の効果を有する場合に液性因子のみを投与するような試みも十分に考える。本領域においてはモデル動物での検討と iPS 由来誘導細胞において互いに補完して研究を進めていくことが有用であると考えられる。今後も当該領域において進歩がなされることを期待する。

### (文 献)

- 1) Harman, D., *The aging process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78** (11) : p. 7124-8.
- 2) Haigis, M.C. and B.A. Yankner, *The aging stress response*. Mol Cell, 2010. **40** (2) : p. 333-44.
- 3) López-Otín, C., et al., *The Hallmarks of Aging*. Cell, 2013. **153** (6) : p. 1194-1217.
- 4) Larson, B.J., M.T. Longaker, and H.P. Lorenz, *Scarless fetal wound healing: a basic science review*. Plast Reconstr Surg, 2010. **126** (4) : p. 1172-1180.
- 5) Schwartzfarb, E. and R.S. Kirsner, *Understanding scarring: scarless fetal wound healing as a model*. J Invest Dermatol, 2012. **132** (2) : p. 260.
- 6) Lo, D.D., et al., *Scarless fetal skin wound healing update*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2012. **96** (3) : p. 237-47.
- 7) Pratsinis, H., E. Mavrogonatu, and D. Kletsas, *Scarless wound healing: From development to senescence*. Adv Drug Deliv Rev, 2019. **146**: p. 325-343.
- 8) Yoshida, S., et al., *Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea*. Stem Cells, 2006. **24** (12) : p. 2714-22.
- 9) Inagaki, E., et al., *Skin-Derived Precursors as a Source of Progenitors for Corneal Endothelial Regeneration*. Stem Cells Transl Med, 2017. **6** (3) : p. 788-798.
- 10) Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126** (4) : p. 663-76.
- 11) Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131** (5) : p. 861-72.
- 12) Liu, G.H., Z. Ding, and J.C. Izpisua Belmonte, *iPSC technology to study human aging and aging-related disorders*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24** (6) : p. 765-74.
- 13) Okano, H. and S. Yamanaka, *iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease*. Mol Brain, 2014. **7**: p. 22.
- 14) Okano, H. and D. Sipp, *New trends in cellular therapy*. Development, 2020. **147** (18).
- 15) Lee, G., et al., *Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25** (12) : p. 1468-75.
- 16) Chambers, S.M., et al., *Dual-SMAD Inhibition/WNT Activation-Based Methods to Induce Neural Crest and Derivatives from Human Pluripotent Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2016. **1307**: p. 329-43.
- 17) d'Aquino, R., et al., *Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo*. Eur Cell Mater, 2011. **21**: p. 304-16.
- 18) Achilleos, A. and P.A. Trainor, *Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy*. Cell Res, 2012. **22** (2) : p. 288-304.
- 19) Griswold, S.L. and P.Y. Lwigale, *Analysis of neural crest migration and differentiation by cross-species transplantation*. J Vis Exp, 2012 (60).
- 20) Li, L.K., et al., *Intramuscular delivery of neural crest stem cell spheroids enhances neuromuscular regeneration after denervation injury*. Stem Cell Res Ther, 2022. **13** (1) : p. 205.

- 21) Brizi, V., et al., *Human iPSC-derived neural crest stem cells can produce EPO and induce erythropoiesis in anemic mice*. *Stem Cell Res*, 2021. **55**: p. 102476.
- 22) Hatou, S., et al., *Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/beta-catenin signaling*. *Stem Cells Dev*, 2013. **22** (5) : p. 828-39.
- 23) Blau, H.M. and G.Q. Daley, *Stem Cells in the Treatment of Disease*. *N Engl J Med*, 2019. **380** (18) : p. 1748-1760.
- 24) Madl, C.M., S.C. Heilshorn, and H.M. Blau, *Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics*. *Nature*, 2018. **557** (7705) : p. 335-342.