

201335003A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
(再生医療関係研究分野)

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

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 雅也

平成 26 年 (2014 年) 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

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

----- 1

中村 雅也

### II. 分担研究報告

1. ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価系の確立とそのメカニズム  
の解析

----- 11

岩波 明生

2. ヒトiPS細胞から神経前駆細胞への誘導法の検討

----- 17

神山 淳

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 23

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 29

# I. 総括研究報告書



厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

総括研究報告書

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

研究代表者 中村 雅也 慶應義塾大学医学部 整形外科学教室 准教授

**【研究要旨】**

本研究は、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)を用いた再生医療実現化の為の最大の障壁となる造腫瘍性を制御する為の基本戦略を作成することを目的としている。hiPS-NPCの腫瘍原性を規定する細胞集団としては残存する未分化iPS細胞、腫瘍化したhiPS-NPC自体のいずれかにより生じると考えられる。テラトーマはiPS細胞の分化抵抗性に由来し、iPS細胞選択的マーカーにより理論的には除去可能であるがグリオーマに関しては神経幹細胞とグリオーマ幹細胞を区別する表面マーカーが存在しないため不可能である。本研究ではhiPS-NPC中に含まれると考えられる腫瘍原性を有する細胞(unsafe hiPS-NPC)の同定、実体を解明する為に一細胞分離(single cell sorting)により得られたhiPS-NPC由来クローン(siPS-NPC)の樹立を試みた。

**A. 研究目的**

ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)の腫瘍原性の実体解明はhiPS-NPCを用いた再生医療の実現化において最も重要な課題である。hiPS-NPCは造腫瘍性という観点から不均一な集団であることが推定される(heterogeneity)。すなわち、一見均一に見受けられるhiPS-NPCにおいて全ての細胞が造腫瘍性を有する訳ではなく、一部の細胞が造腫瘍性を有していることが予想される。そこで、hiPS-NPCをFACSを利用

し、一細胞を調整し、維持・増殖させることで単一細胞由来iPS-NPC(siPS-NPC)を樹立する。また、樹立されたsiPS-NPCを免疫不全動物へと移植し、造腫瘍性を検討することにより造腫瘍性を有する細胞群の同定が期待される。siPS-NPCにおいて造腫瘍性の有無により細胞群を分類し、遺伝子発現やエピジェネティック修飾状態を解析することにより腫瘍マーカーを見出すことが究極的な目標であり、平成25年度はその為の基礎的な基盤形成を目的とする。

## B. 研究方法

### (1) FACSによる細胞分取

再生医療用iPS細胞ストックの提供時期が平成26年度後半以降であるという状況から平成25年度は本研究グループにより既に造腫瘍性を有することが明らかとなっている。hiPS-NPCを用いて解析を行った。本hiPS-NPCはニューロスフェア法により樹立、維持しているものである。そこで、このhiPS-NPCをTryple Selectにより分散し、細胞浮遊液を調整したのち、FACSにより一細胞ずつ分取し、96wellプレートに播種した。

### (2) siPS-NPCの樹立と維持

FACSにより調整し、96wellプレート上に播種した細胞を神経前駆細胞用培地で維持し、2日ごとに培地交換及び液性因子を添加した。

### (3) 単層培養系hiPS-NPCを用いたsingle cell sortingの条件検討

本研究課題で利用する単層培養系神経前駆細胞におけるsingle cell sortingの条件検討を行うため、研究分担者(神山淳)より単層培養系hiPS-NPCの提供を受け、single cell sortingの条件の最適化を行った。

### (4) 免疫不全動物への細胞移植

hiPS-NPCにルシフェラーゼ発現用のレンチウイルスを感染させたのち、免疫不全

動物(NOGマウス)の脊髄へと移植し、IVISシステムにより移植細胞の生存と増殖の程度を経時的に解析した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学倫理委員会で人権擁護、不利益・危険性の排除、説明と同意に関して十分な審査を経た承認のもとに行われる。ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、下記の各種指針にもとづいて研究計画を立案・遂行するものとする。

- ・ ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
- ・ その他(文部科学省研究振興局長通知 19 文科振第 852 号)

実験動物を使用する研究を含む研究計画：「動物の愛護及び管理に関する法律」および関連した指針に則って研究を行う。慶應義塾大学医学部では、動物実験委員会を設置し、関連法案および指針を遵守した審査が行われている。本研究に関する動物実験の多くは既に同委員会の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、新たな課題の必要が出てきた場合は、同委員会に申請し、承認を得るものとする。

ヒト細胞を用いた基礎研究計画：ヒト神経堤由来幹細胞を用いた脊髄再生研究、ヒト ES 細胞の使用研究、ヒト iPS 細胞樹立等の基礎研究について、ヒト細胞入手法を含めて機関内倫理委員会（慶應義塾大学医学部の倫理委員会）の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、必要に応じて同委員会に申請を行い、承認を得るものとする。尚、同委員会では、法令違反を行った場合等に備えて、臨時委員会を緊急に開催するなどの処置により、当該研究を中止することが出来る。

### C. 研究結果

#### (1) 浮遊系hiPS-NPCからのsiPS-NPCの樹立

浮遊系hiPS-NPC(ニューロスフェア)を一細胞レベルまで分散し、FACSにより96wellプレート50枚分(4800ウェル)に播種した(図1)。浮遊系hiPS-NPCから最終的に $1 \times 10^5$ 以上の細胞数まで増殖するクローン数は4クローンであり、2クローンは最低限移植に必要な細胞数まで増殖することが明らかとなった。クローン間で増殖性に差があるものの、single cell sorting後、7~10回以上の継代は困難であり、拡大培養の中途段階で細胞の増殖が止まり、複数個体への移植を目的とした細胞調整が不可能であった。

図1: single cell sorting後により樹立されたhiPS-NPC

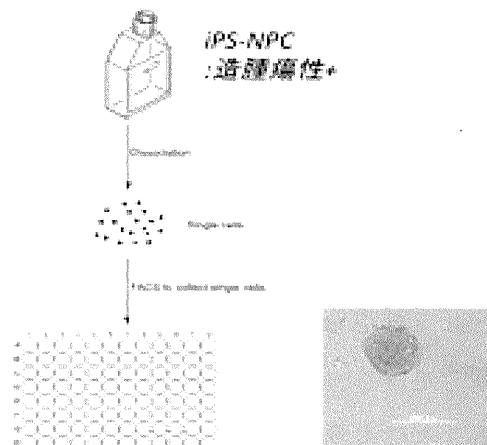


図1

(2) 浮遊系siPS-NPCの造腫瘍性の検討  
 拡大培養中のsiPS-NPCの一部をレンチウイルスにより標識し、免疫不全動物(NOGマウス)の脊髄へと移植し、IVISで非侵襲的に発光を解析したところ移植直後においては発光が観察され、移植自体は成功していることが明らかとなった。その後経時的に解析した(図2)。移植後40日の時点で免疫組織学的検討を行ったところ、個体内でヒト由来細胞の生着は認められなかった。

図2: Bioimagingによる移植後の生存細胞数の評価

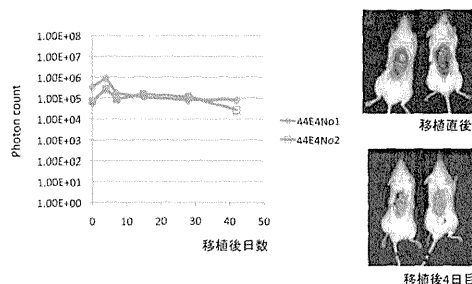


図2

### (3) 単層培養系hiPS-NPCを用いたsingle cell sortingの条件検討

単一細胞由来のクローン作成の観点から浮遊系は非常に困難であると予想されたことから単層培養系hiPS-NPCを利用し、single cell sortingの条件の最適化を行った。結果として細胞分散を行なう前に、ROCK阻害剤で処理し、細胞の基質をマトリゲルとすることによりsiPS-NPCの効率が上昇し、96wellに撒いた細胞のうち8割程度のウェルにおいて細胞の増殖が見出され、siPS-NPCの樹立が可能であることが推察された。

### D. 考察

hiPS-NPCにおける造腫瘍性という観点から造腫瘍性における細胞の不均一性(heterogeneity)の解明は重要な課題であり、一細胞由来hiPS-NPCの樹立は非常に有用な手法であると考えられる。しかしながら本年度の研究では少なくともニューロスフェア法を介し、一細胞由来クローンを効率的に作成・維持するのは困難であり、また移植細胞用へと拡大培養する過程で増殖性が著しく減弱することが明らかとなった。免疫不全への動物移植においてsiPS-NPCの造腫瘍性は生着率の問題から解析が困難であった。しかし、本研究計画で次年度以降に解析で使用する単層培養系hiPS-NPCは比較的容易に短時間に

siPS-NPCの樹立が可能であることが予想された。

### E. 結論

hiPS-NPCにおける造腫瘍性の実体解明には単一細胞由来のNPCの樹立が必須であり、本研究では再生医療用iPS細胞ストックを利用し作製されたhiPS-NPCの造腫瘍性の実体解明に向けた基礎的な基盤が確立されたものと考えており、これらをもとに腫瘍原性を事前に検出可能な腫瘍マーカーの同定が期待される。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### (1) 論文発表

1. Nishimura S, Yasuda A, Iwai H, Takano M, Kobayashi Y, Nori S, Tsuji O, Fujiyoshi K, Ebise H, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Time-dependent changes in the microenvironment of injured spinal cord affects the therapeutic potential of neural stem cell transplantation for spinal cord injury. *Mol Brain* 6: 3, 2013
2. Takano M, Komaki Y, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama

- Y, Okano H, Nakamura M. In vivo tracing of neural tracts in tip-toewalking Yoshimura mice by diffusion tensor tractography. *Spine* 38: E66-72, 2013
3. Shinozaki M, Yasuda A, Nori S, Saito N, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Novel method for analyzing locomotor ability after spinal cord injury in Rats: Technical Note. *Neurologia medico-chirurgica* 53: 907-913, 2013
  4. Shinozaki M, Nakamura M, Konomi T, Kobayashi Y, Takano M, Saito N, Toyama Y, Okano H. Distinct roles of endogenous vascular endothelial factor receptor 1 and 2 in neural protection after spinal cord injury. *Neurosci Res* 78: 55-64, 2014
  5. Takano M, Kawabata S, Komaki Y, Shibata S, Hikishima K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Inflammatory cascades mediate synapse elimination in spinal cord compression. *J Neuroinflammation* 11: 40, 2014
  6. Zhang L, Kaneko S, Kikuchi K, Sano A, Maeda M, Kishino A, Shibata S, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, Kimura T, Okano H, Nakamura M. Rewiring of regenerated axons by combining treadmill training with semaphorin3A inhibition. *Mol Brain* 7(1):14, 2014
  7. Iwai H, Nori S, Nishimura S, Yasuda A, Takano O, Fujiyoshi K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Transplantation of neural stem/progenitor cells at different locations in mice with spinal cord injury. *Cell Transplant* (in press)
  8. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation Research* 112: 523-533, 2013
  9. Nakamura M, Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells. *Cell Research* 23: 70-80, 2013
  10. Matsui T, Akamatsu W, Nakamura M, Okano H. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: basic concepts and potential application for cell replacement therapy. *Exp Neurol* (in press)
  11. 辻収彦, 海苔聡, 中村雅也 : iPS細胞を用いた脊髄損傷治療の開発. *BIO Clinica* 28:1208-1212, 2013
  12. 中村雅也, 岡野栄之, 戸山芳昭 : iPS細胞を用いた脊髄再生医療の展望 -基礎から臨床へ-. *日本内科学会誌* 102:2247-2253, 2013



13. 西村空也, 小林喜臣, 海苔聡, 辻収彦, 岡野栄之, 中村雅也: iPS細胞を用いた脊髄再生治療開発. *Pharma Medica* 31:33-36, 2013
14. 西村空也, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: 多能性幹細胞を用いた脊髄再生治療法の開発. *整形災害外科* 56:611-618, 2013
15. 中村雅也, 岡野栄之, 戸山芳昭: iPS細胞を使うー神経の研究へ. *整形外科* 64:1311-1315, 2013
3. Nishimura S, Yoshida K, Iwai H, Kobayashi Y, Shibata S, Ebise H, Koya I, Sasaki T, Shimizu A, Kudoh J, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Optimal time-window of neural stem cell transplantation therapy is at the sub-acute phase of SCI in non human primates. 52nd annual scientific meeting of ISCoS 2013 (Istanbul, Turkey, 2013, 10)
4. Tashiro S, Shinozaki M, Mukaino M, Renault-Mihara F, Okano H, Toyama Y, Liu M, Nakamura M. BDNF Induced by Treadmill Training Contributes to the Long-term Suppression of Allodynia and Spasticity through the Up-regulation of Functional KCC2 after Thoracic Cord Injury. 52nd annual scientific meeting of ISCoS 2013 (Istanbul, Turkey, 2013, 10)

(2) 学会発表

1. Itakura G, Kobayashi Y, Takahashi Y, Nori S, Nishimura S, Takano M, Konomi T, Iwai H, Iwanami A, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Selective ablation of the tumor after NSCs transplantation by controlling the immune suppression. 11st annual meeting of ISSCR 2013 (Boston, USA, 2013, 6)
2. Tashiro S, Shinozaki M, Mukaino M, Zhang L, Renault-Mihara F, Okano H, Toyama Y, Nakamura M, Liu M. BDNF expression secondary to treadmill training contributes to the long-term suppression of allodynia and spasticity through functional KCC2 increase in lumbar enlargement after thoracic spinal cord injury. 7th ISPRM World Congress (Beijing, China, 2013, 6)
5. Iwai H, Shimada H, Nishimura S, Kobayashi K, Konomi T, Hikishima K, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. The allogeneic transplantation of embryonic stem cells-derived neural stem/progenitor cells into injured spinal cord in adult common marmosets. 52nd annual scientific meeting of ISCoS 2013 (Istanbul, Turkey, 2013, 10)
6. Itakura G, Kobayashi Y, Takahashi Y, Nori S, Nishimura S, Takano M, Konomi T, Iwai H, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Selective ablation of the

- tumor after NSCs transplantation by controlling the immune suppression. 52nd annual scientific meeting of ISCoS 2013 (Istanbul, Turkey, 2013, 10)
7. Tashiro S, Shinozaki M, Mukaino M, Renault-Mihara F, Toyama Y, Liu M, Nakamura M, Okano H. BDNF Induced by Rehabilitation Training Contributes to the Suppression of Spasticity and Allodynia after Spinal Cord Injury through the Up-regulation of KCC2. Society for Neuroscience Annual Meeting (San Diego, USA, 2013, 11)
  8. Hori K, Nishimura S, Negishi M, Onoe H, Kobayashi Y, Itakura G, Iwai H, Takeuchi S, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Neural stem/progenitor cells-laden microfibers promote cellular survival in mouse transected spinal cord injury model. Society for Neuroscience Annual Meeting (San Diego, USA, 2013, 11)
  9. Nishiyama Y, Kobayashi Y, Itakura G, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Investigation of the effect of cryopreservation on the character of human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells in vitro. Society for Neuroscience Annual meeting (San Diego, USA, 2013 11)
  10. Nishimura S, Yoshida K, Iwai H, Kobayashi Y, Shibata S, Ebise H, Koya I, Sasaki T, Shimizu A, Kudoh J, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Optimal time-window of cell transplantation therapy is at the sub-acute phase of SCI in non-human primate. Society for Neuroscience Annual Meeting (San Diego, USA, 2013, 11)
  11. Iwai H, Shimada H, Nishimura S, Kobayashi K, Hori K, Itakura G, Hikishima K, Tsuji O, Fujiyoshi K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. The primate allogeneic transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells promoted functional recovery in common marmosets with spinal cord injury. (Nanosymposium) Society for Neuroscience Annual Meeting (San Diego, USA 2013, 11)
  12. Itakura G, Kobayashi Y, Takahashi Y, Nori S, Nishimura S, Takano M, Konomi T, Iwai H, Iwanami A, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Selective ablation of the tumor after NSCs transplantation by controlling the immune suppression. Society for Neuroscience Annual Meeting (San Diego, USA 2013, 11)
  13. Kawabata S, Takano M, Numasawa Y, Itakura G, Kobayashi Y, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Human iPS cell-derived oligodendrocyte precursor cells promote functional recovery after spinal cord injury in adult mice. Society for Neuroscience Annual Meeting (San

- Diego, USA 2013, 11)
14. Iwai H, Ishii H, Nishimura S, Kobayashi Y, Itakura G, Hikishima K, Tsuji O, Fujiyoshi K, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Allogeneic transplantation of embryonic stem cells derived neural stem/progenitor cells promotes functional recovery after spinal cord injury in common marmosets. 41th annual meeting of Cervial Spine Research Society (Los Angeles, USA, 2013, 12)
  15. Takano M, Kawabata S, Komaki Y, Shibata S, Hikishima K, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Inflammatory cascades mediate synapse elimination in cervical spinal cord compression. 41th annual meeting of Cervial Spine Research Society (Los Angeles, USA, 2013, 12)
  16. Kobayashi Y, Itakura G, Nishimura S, Yamaguchi R, Toyama Y, Yamanaka S, Okano H, Nakamura M. Transplantation of integration-free human iPSC-derived neurospheres into injured spinal cord promotes functional recovery in immunodeficient mice. 41th annual meeting of Cervial Spine Research Society (Los Angeles, USA, 2013, 12)
  17. 中村雅也 : 脊髄再生医療の実現に向けて-現状と展望-. 第26回日本整形外科勤務医会神奈川支部研修会 (2013, 4, 神奈川)
  18. 中村雅也 : iPSC細胞を用いた脊髄再生医療の展望 -基礎から臨床へ-. 第33回日本脳神経外科コンgres総会 (2013, 5, 大阪)
  19. 中村雅也 : 脊髄再生医療の実現に向けて-基礎から臨床へ-. 第2回 京都大学 Orthopaedic Seminar (2013, 5, 京都)
  20. 中村雅也 : iPSC細胞を用いた脊髄再生医療への挑戦. MSD整形外科フォーラム (2013, 5, 東京)
  21. 中村雅也 : 脊髄損傷に対する再生医療の実現に向けて. 第86回日本整形外科学会学術総会 (2013, 5, 広島)
  22. 中村雅也 : iPSC細胞を用いた脊髄再生医療の展望-基礎から臨床へ-. 第54回日本神経学会学術大会 (2013, 5, 東京)
  23. 中村雅也 : 脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-. 国立精神・神経医療研究センターセミナー(2013, 6, 東京)
  24. 中村雅也 : 脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-. 東京医科歯科大学講義 (2013, 6, 東京)
  25. 中村雅也 : 脊髄損傷患者さんを治したい～iPS細胞を用いた再生医療に向けて～. 第1回新宿区民医療公開講座 (2013, 6, 東京)
  26. 中村雅也 : 脊髄再生医療の実現に向け

- て -現状と展望-. リリカWebシンポジウム (2013, 6, 東京)
27. 中村雅也: 脊髄損傷に対する再生医療の確立に向けて. 中野区整形外科医会学術講演会 (2013, 7, 東京)
28. 中村雅也: 脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-. ひむか運動器セミナー (2013, 7, 宮崎)
29. 中村雅也: 脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-. 日本ペインクリニック学会 第47回大会ランチョンセミナー2 (2013, 7, 埼玉)
30. 中村雅也: 脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-. 第3回東京下町疼痛懇話会 (2013, 7, 東京)
31. 中村雅也: 脊髄再生医療の実現に向けて-現状と展望-. 第386回横浜市立大学整形外科同門会談話会 (2013, 8, 神奈川)
32. 中村雅也: Regenerative Medicine for Spinal Cord Injury. 東京医科歯科大学 第5回国際サマープログラム (2013, 8, 東京)
33. 中村雅也: 脊髄再生研究の現状と展望 -脊髄再生を中心に-. 第34回日本リハビリテーション医学会北陸地方会 (2013, 9, 石川)
34. 中村雅也: 脊髄再生への挑戦. 第16回城南慶應整形外科の会 (2013, 9, 東京)
35. 中村雅也: 脊髄損傷に対する再生医療の実現に向けて. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会 (2013, 10, 千葉)
36. 中村雅也: iPS細胞を用いた脊髄再生医療の実現に向けて□課題と展望□. 先導的創造科学技術開発費「多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究」第7回運営会議セミナー (2013, 10, 兵庫)
37. 中村雅也: 脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-. 順天堂大学整形外科学教室 同門会総会 (2013, 11, 東京)
38. 中村雅也: 脊髄再生医療の実現に向けて. 第48回日本脊髄障害医学会 (2013, 11, 福岡)
39. 中村雅也: 脊髄損傷に対する再生医療の実現に向けて. 第31回日本神経治療学会総会 (2013, 11, 東京)
40. 中村雅也: 脊髄損傷患者さんを治したい -iPS細胞を用いた再生医療に向けて-. 平成25年度関東地区整形外科勤務医会 第57回関東地区整形外科勤務医会 (2013, 12, 東京)
41. 中村雅也: 免疫不全マウス損傷脊髄に対するヒトiPS細胞由来神経幹細胞移植. 「iPS細胞」研究支援3制度合同シンポジウム2014 ～iPS細胞研究の今～ (2014, 1, 東京)

42. 中村雅也：脊髄再生医療の実現に向けて。第4回国際放射線神経生物学会大会（2014, 1, 東京）
43. 中村雅也：脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-。愛知医科大学先端医学研究センター 第14回セミナー（2014, 2, 愛知）
44. 中村雅也：脊髄疾患再生治療の最前線。第5回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会（2014, 2, 東京）
45. 中村雅也：iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷の再生医療。第13回日本再生医療学会総会 学会賞受賞者特別講演（2014, 3, 京都）
46. 中村雅也：脊髄再生医療の現状と展望。第13回日本再生医療学会総会 ランチオンセミナー（2014, 3, 京都）
47. 中村雅也：脊髄の再生医療。Sweden Embassy Medical Forum Sponsored Seminar（2014, 3, 東京）
48. 中村雅也：脊髄再生医療の実現に向けて -現状と展望-。第10回長崎腰痛セミナー（2014, 3, 長崎）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当する記載なし

## II. 分担研究報告書



## 厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

### 分担研究報告書

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価系の確立とそのメカニズムの解析

研究分担者 岩波明生 慶應義塾大学医学部整形外科 助教

#### 【研究要旨】

本研究は、脊髄損傷に対するヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞移植を臨床応用するために必要な、品質管理項目の確立を目的としている。腫瘍化を来さない安全な移植用細胞株を選別するためのマーカー検索と腫瘍化につながる細胞の遺伝子変異を同定するゲノムの網羅的解析を行った。

#### A. 研究目的

我々はこれまでに脊髄損傷に対するマウス及びヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞(以下、iPS-NS/PCs) 移植の有効性を報告してきた (Tsuji *et al*, PNAS 2010; Nori *et al*, PNAS 2011)。しかし、iPS-NS/PC を損傷脊髄へ移植することにより下肢運動機能が改善する一方で、iPS 細胞株によっては、移植後一定期間が経過した時点で glioma 様の腫瘍を形成することも明らかとなった。iPS 細胞を用いた脊髄損傷に対する細胞療法をヒトに応用する場合、腫瘍化をきたさない“安全な” iPS-NS/PC の選別が極めて重要である。そこで本研究の目的は、移植後に腫瘍を形成した細胞株と形成しなかった細胞株を詳細に比較検討し、腫瘍を形成する細胞に特異

的に発現するマーカーやゲノム変異を明らかにすることで、移植神経幹/前駆細胞の品質管理項目の1つを確立すると共に、腫瘍化のメカニズムを解析することである。

#### B. 研究方法

1) 腫瘍形成能を持つヒト iPS 細胞由来神経幹細胞特異的なマーカーの検索  
京都大学で樹立された integration free iPS 細胞4株 (414C2、409B2、836B1、836B3) を当研究室で開発した EB 法を用いて胚葉体を形成した後、NS/PCs へと分化誘導した。その後、NOD-SCID マウスの胸髄圧挫損傷モデルを作製し、損傷中心部に iPS-NS/PCs を各  $5 \times 10^5$  個ずつ損傷後9日目に移植した。移

植後3ヶ月間、bioimagingによる細胞の生着・増殖の評価及び各種運動機能評価を行った。移植後3ヶ月の時点で損傷部脊髄を採取し、組織学的解析を行うと共に、移植前の細胞と移植後3ヶ月の損傷中心部脊髄からそれぞれ mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

2) iPS 細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価系の確立

①京都大学山中研で樹立された iPS 細胞4株、②これらの各細胞株を NS/PCs へ分化誘導したもの、③ iPS 細胞の feeder 細胞、④ Glioblastoma 細胞株 (U87 細胞) をそれぞれ培養し、これらのサンプルから DNA を抽出して、シーケノム社の MassARRAY システムを用いて、がん遺伝子の一塩基変異 (SNP) について網羅的に解析を行った。それぞれのサンプルから2マイクログラムずつ DNA を準備した。これらを、既存の癌遺伝子の代表的な SNP で、1 サンプルあたりの変異混入率を網羅的に解析可能なシーケノム社の OncoCarta panel v1.0、v2.0、v3.0、OncoFOCUS に apply し解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学倫理委員会でも人権擁護、不利益・危険性の排除、説明と同意に関して十分な審査を経た承認のもとに行われる。ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、下記の各種指針にもとづいて

研究計画を立案・遂行するものとする。

- ・ ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
- ・ その他(文部科学省研究振興局長通知 19 文科振第 852 号)

実験動物を使用する研究を含む研究計画：「動物の愛護及び管理に関する法律」

および関連した指針に則って研究を行う。慶應義塾大学医学部では、動物実験委員会を設置し、関連法案および指針を遵守した審査が行われている。本研究に関する動物実験の多くは既に同委員会の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、新たな課題の必要が出てきた場合は、同委員会に申請し、承認を得るものとする。

ヒト細胞を用いた基礎研究計画：ヒト神経

堤由来幹細胞を用いた脊髄再生研究、ヒト ES 細胞の使用研究、ヒト iPS 細胞樹立等の基礎研究について、ヒト細胞入手法を含めて機関内倫理委員会(慶應義塾大学医学部の倫理委員会)の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、必要に応じて同委員会に申請を行い、承認を得るものとする。尚、同委員会では、法令違反を行った場合等に備えて、臨時委員会を緊急に開催するなどの処置により、当該研究を中止することが出来る。

### C. 研究結果

#### 1) 腫瘍形成能を持つヒト iPS 細胞由来神経幹細胞特異的なマーカーの検索

in vitro において各 integration free iPS 細胞は NS/PCs へ分化誘導が可能であった。いずれの細胞株由来 NS/PCs も beta-III tubulin 陽性のニューロン優位に分化し、GFAP 陽性のアストロサイトへの分化はごく少数であった。また CNPase 陽性のオリゴデンドロサイトへの分化は認めなかった。一方、移植後3ヶ月の時点では、損傷脊髄内において各 iPS 細胞由来 NS/PCs は生着し (図1) beta-III tubulin 陽性のニューロン、GFAP 陽性のアストロサイトだけでなく、APC 陽性のオリゴデンドロサイトへも少数ながら分化した。また全ての iPS 細胞由来 NS/PCs 移植群は対照群に比べ、有意な後肢運動機能の回復を認めた。

図1 移植後のヒトiPS由来NS/PCの生着とNeuron, Astrocyte, Oligodendrocyteへの分化

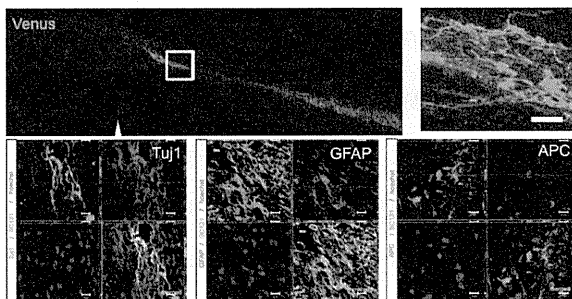


図1

しかし 836B3 由来 NS/PCs 移植群では bioimaging の結果、移植後に生着細胞数の経時的な増加を認めた。組織学的解析の結果で

も、836B3 由来 NS/PCs 移植群では HE 染色にて損傷脊髄内で移植細胞の異常増殖を認めた。836B3 由来 NS/PCs 移植群における移植細胞の異常増殖部を、iPS 細胞樹立の際に用いる初期化遺伝子 Oct4 に対する蛍光免疫染色で評価した結果、Oct4 陽性の細胞は認めなかった。次に、明らかな異常増殖を認めた 836B3 由来 NS/PCs を腫瘍化群とし、異常増殖を認めなかった 414C2 由来 NS/PCs を非腫瘍化群として、これら2群の細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、腫瘍化群で遺伝子 X や Y 等の発現が非腫瘍化群と比べ、顕著に高かった(図2)。

図2 各移植細胞株におけるX1, X2, Yの発現

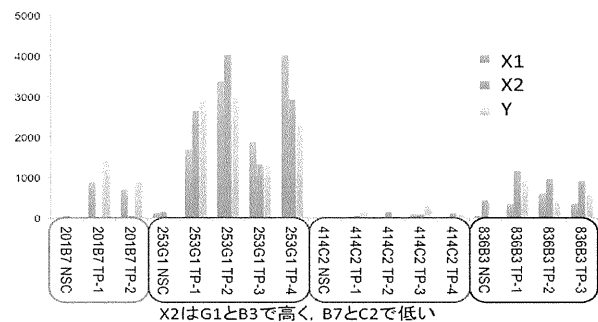


図2

特に遺伝子 X のサブタイプの一つである X2 の発現は移植後に異常増殖した NS/PCs と移植前の NS/PCs のいずれにおいても腫瘍化群で顕著に発現が上昇していた。さらに X の免疫組織染色を行った結果、836B3 由来 NS/PCs 移植群では移植細胞の異常増殖部に X 陽性の細胞が多数存在することを確認した(図3)。一方で、414C2 由来 NS/PCs 移植

群では同様の染色性は認めなかった。

図3細胞移植内のXの免疫染色 (414C2, 836B3)

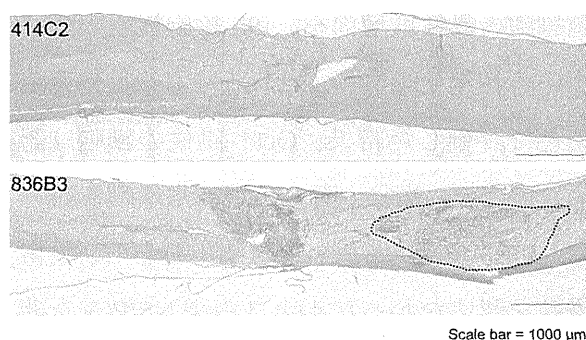


図 3

## 2) iPS-NS/PC 造腫瘍性評価系の確立

まずiPS細胞のfeeder細胞と、253G1iPS細胞、253G1由来神経幹細胞（9継代目）、U87細胞についてPanel v1.0を用いて解析したところ、明らかな変異は検出されなかった。続いて、iPSのfeeder細胞、253G1iPS細胞、253G1由来神経幹細胞（3継代目と12継代目）、201B7iPS細胞、201B7由来神経幹細胞（3継代目と6継代目）、836B3iPS細胞についてPanel v3.0で解析したところ、253G1iPS細胞において、Xのある特異的領域の変異が13.2%混入していることがわかった。

さらに現在OncoFOCUSを用いて、feeder細胞、253G1 iPS細胞、253G1由来神経幹細胞（12継代目）、201B7iPS細胞、201B7由来神経幹細胞（6継代目）、836B3iPS細胞、836B3由来神経幹細胞（3継代目）、414C2iPS細胞、U87（GBM）のゲノム変異を解析中である。最終的には、全てのサンプルで、OncoCarta

Panel v1.0, v2.0, v3.0, OncoFOCUSについて解析を行い、腫瘍化しやすい細胞集団の持つゲノム変異を見出す

現時点では、レトロウイルスで誘導されたiPS細胞株の2株で、Xの変異SNPが同定されている。本研究により、iPS細胞由来神経幹細胞に造腫瘍性をもたらす特徴的ながん遺伝子のSNPを特定することが出来るものと考えられる。

## D. 考察

iPS-NS/PC を損傷脊髄に移植後、頻度は低いものの細胞株によっては腫瘍を形成することが明らかになった。Oct4 に対する免疫組織学的染色陽性の細胞がなかったことから、この腫瘍形成は未分化な iPS 細胞の混在によるものとは考えにくい。今回同定した X などのマーカーは移植前の安全性スクリーニングとして有用と考えられた。

また、これまでのトランスクリプトーム解析は、遺伝子発現量の違いのみが検出可能であり、造腫瘍性判定を目的とした遺伝子発現量のカットオフ値の設定が困難であるため、造腫瘍性の評価系としては不十分であった。今後本研究で明らかとなった、造腫瘍性を規定する SNP を組み合わせることにより、より精度の高い iPS-NS/PC の品質管理項目の作成が可能となると期待される。

## E. 結論

iPS-NS/PC を損傷脊髄に移植後、頻度は低いものの細胞株によっては腫瘍を形成することが明らかになった。今回同定したマーカーを用いた移植前の安全性スクリーニング法の確立が、脊髄再生医療の実現に向けて急務である。

今後はさらにこれらの解析を進めることで、信頼度の高い造腫瘍性に関わるマーカーの検索を行うと共に、造腫瘍性に特徴的な遺伝子変異を同定し、腫瘍メカニズムの解明につなげたいと考えている。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### (1) 論文発表

1. Qin Y, Fu M, Takahashi M, Iwanami A, Kuga D, Rao RG, Sudhakar D, Huang T, Kiyohara M, Torres K, Dillard C, Inagaki A, Kasahara N, Goodglick L, Braun J, Mischel PS, Gordon LK, Wadehra M. Epithelial membrane protein-2 (emp2) activates src and is a novel therapeutic target for gbm. *The Journal of biological chemistry*. 2014
2. Read RD, Fenton TR, Gomez GG, Wykosky J, Vandenberg SR, Babic I, Iwanami A, Yang H, Cavenee WK, Mischel PS, Furnari FB, Thomas JB. A kinome-wide rnai screen in drosophila glia reveals that the rio kinases mediate cell proliferation and survival through torc2-akt signaling in glioblastoma. *PLoS genetics*. 2013;9:e1003253
3. Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, Iwanami A, Liu F, Villa GR, Gu Y, Campos C, Zhu S, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Mellinghoff IK, Cavenee WK, Shaw RJ, Mischel PS. Mtor complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through foxo acetylation and upregulation of c-myc. *Cell metabolism*. 2013;18:726-739
4. Iwanami A, Gini B, Zanca C, Matsutani T, Assuncao A, Nael A, Dang J, Yang H, Zhu S, Kohyama J, Kitabayashi I, Cavenee WK, Cloughesy TF, Furnari FB, Nakamura M, Toyama Y, Okano H, Mischel PS. Pml mediates glioblastoma resistance to mammalian target of rapamycin (mTOR)-targeted therapies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:4339-4344
5. Iwanami A, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Arsenic reverses glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. *Cell Cycle*.

(2) 学会発表

1. Itakura G, Kobayashi Y, Takahashi Y, Nori S, Nishimura S, Takano M, Konomi T, Iwai H, Iwanami A, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Selective ablation of the tumor after NSCs transplantation by controlling the immune suppression. 11st annual meeting of ISSCR 2013 (Boston, USA, 2013, 6)
2. Itakura G, Kobayashi Y, Takahashi Y, Nori S, Nishimura S, Takano M, Konomi T, Iwai H, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Selective ablation of the tumor after NSCs transplantation by controlling the immune suppression. 52nd annual scientific meeting of ISCoS 2013 (Istanbul, Turkey, 2013, 10)
3. Itakura G, Kobayashi Y, Takahashi Y, Nori S, Nishimura S, Takano M, Konomi T, Iwai H, Iwanami A, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Selective ablation of the tumor after NSCs transplantation by controlling the immune suppression. Society for Neuroscience Annual Meeting (San Diego, USA 2013, 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし