

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 5×10^5 個ずつ損傷後9日目に移植した。移

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

京都大学山中研で樹立された iPS 細胞 4 株、これらの各細胞株を NS/PCs へ分化誘導したものの、iPS 細胞の feeder 細胞、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

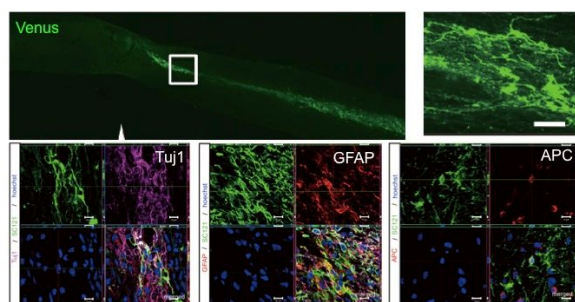


図1

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

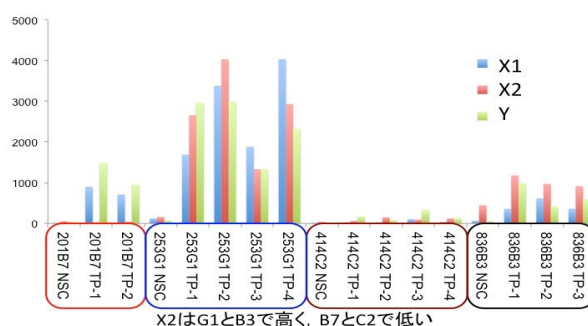


図2

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)

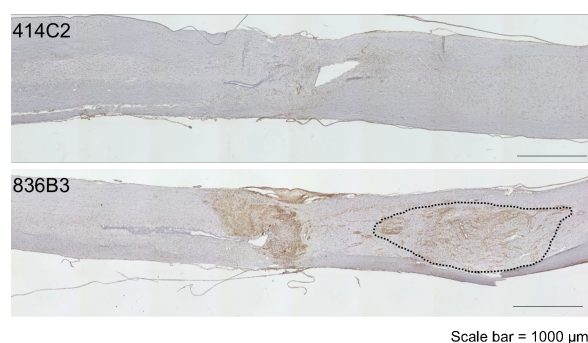


図 3

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

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細胞から神経前駆細胞への誘導法の検討

研究分担者 神山淳 慶應義塾大学医学部 生理学教室 特任講師

【研究要旨】

本研究は、ヒト iPS 細胞から神経前駆細胞への分化誘導法を検討し、至適化を行なった。従来汎用される iPS 細胞から神経前駆細胞への分化誘導法(ニューロスフェア法)とは異なる単層培養系を利用した神経誘導法を利用し、再生医療用 iPS 細胞ストックにおける神経誘導能の検討及び安定培養に向けた培養法の検討を行った。さらに、予備的検討として単層系 hiPS-NPC を用いて免疫不全動物に移植を行ない、造腫瘍性の検討を行った。

A . 研究目的

神経幹細胞の発見は従来不治の病であった中枢神経系における変性疾患や損傷に対する細胞治療への一つ可能性を提唱した。しかし、成体における神経幹細胞は採取が困難であり、研究レベルでは中絶胎児由来の神経幹細胞を用い、実験動物モデルにおける細胞治療の有用性が報告されてきた。しかしながら、治療用神経前駆細胞の供給源として想定された胎児由来神経前駆細胞やヒト ES 細胞由来神経前駆細胞は倫理的な問題が伴い、現実的ではない。京都大学の山中博士らにより開発された iPS 細胞樹立法は成体のヒト線維芽細胞や血球細胞からの樹立が可能であり、採取や樹立に伴う倫理的な問題がなく、有用な

ソースであることが期待されてきた。本研究では再生医療実現拠点ネットワーク事業再生医療実現拠点ネットワークプログラムにおける中核拠点『iPS 細胞研究中核拠点』より提供される再生医療用 iPS 細胞ストックを用い、神経前駆細胞へと分化誘導を行ない、再生医療用の iPS 細胞由来神経前駆細胞ストック構築に向けた分化誘導法の最適化及び妥当性を検討することを目的としている。中核拠点からの再生医療用 iPS 細胞ストックの提供時期は平成 26 年度後半が予定されているため、本年度は中核拠点より提供された再生医療用 iPS 細胞ストックと同様の手法で樹立された血球系由来 iPS 細胞株を利用し、分化誘導法の検討を行った。また、接着系培

養法の妥当性を検討するため、既報の論文により他研究室において樹立された単層培養系 hiPS-NPC を用いて造腫瘍性を検討した。

B . 研究方法

1) iPS 細胞からの神経誘導法の検討

平成 26 年度後半に提供が予定されている再生医療用 iPS 細胞ストックを利用した神経誘導を行なう為のパイロットスタディを行なった。再生医療用 iPS 細胞ストックと同様の手法で樹立された iPS 細胞を iPS 細胞樹立中核拠点より入手し、神経誘導を試みた。

2) iPS 細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍性の検討

既に他研究室により樹立された単層培養系 hiPS-NPC(lt-NES)を用いた解析を行った。hiPS-NPC にルシフェラーゼで標識後、免疫不全動物(NOD/SCID マウス)の脳へと移植した。IVIS システムにより移植細胞の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) iPS細胞からの神経誘導法の検討

ヒトiPS細胞から単層培養系への誘導法は既報が存在するものの (Falk et al., PloS One 2012) iPS細胞樹立中核拠点から提供されるiPS細胞と同等の細胞(血液細胞)から樹立されたiPS細胞では神経誘導能が検討されていなかった。そこで先ず、神経誘導を検討した。その結果誘導後2週間程度で神経ロゼット様構造を呈する細胞集団が見出された。さらに、PLZF, ZO1, DACHI等の神経ロゼット選択的マーカーの発現も観察された(図1)。

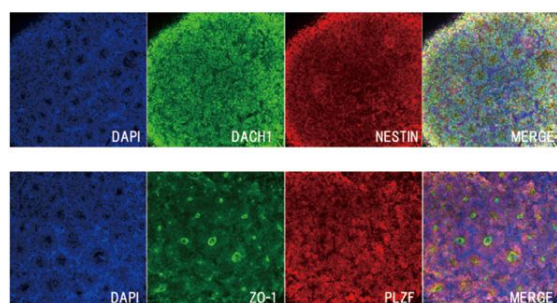


図1

次にロゼット構造を形成する細胞群を分離・回収し、接着性の基質状での培養系へと移行した。このような手法で誘導した単層培養系hiPS-NPCは神経前駆細胞マーカー (Sox1, Sox2, Nestin)を発現しており(図2)、分化誘導によりニューロンへの分化能が確認された。iPS細胞樹立中核拠点より提供された2つのiPS細胞株で同様の現象が確認されたため、本手法はiPS細胞から神経前駆細胞への分化系として有用であることが推察された。

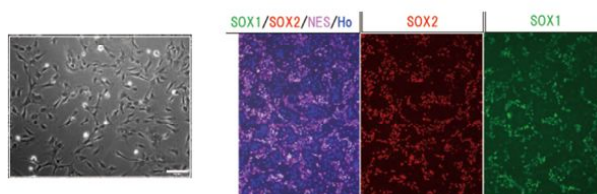


図2

2) hiPS-NPCの腫瘍原性の検討

他施設により樹立されたhiPS-NPC(Ih-NES)をルシフェラーゼを発現するようにさせる為にレンチウイルスによりhiPS-NPCを標識し、免疫不全動物の脳内に移植した。細胞の増殖度を生きた個体において経時的に解析した結果、hiPS-NPCは図に示すような増殖曲線を描いた(図3)。

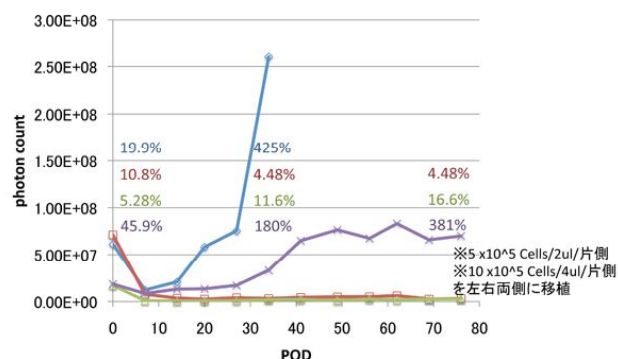


図3

既報では腫瘍形成能を示さないことが報告されていたため(Fujimoto et al., Stem Cells)、hiPS-NPCの腫瘍原性を検討するため組織学的な解析をし、移植細胞がニューロンへと分化していることが明らかとなったが(図4)移植部位以外へ細胞が播種しており、脳室内での細胞増殖が観察された。

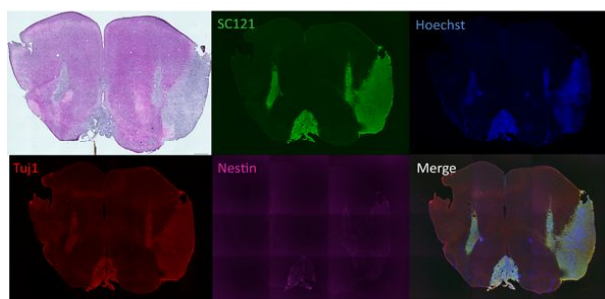


図4

D . 考察

血液細胞由来のiPS細胞においても線維芽細胞由来iPS細胞と同様に神経幹細胞へと分化誘導可能であることが明らかとなった。単層培養系であり、通常の細胞培養時に個々の細胞の形態学的変化を把握可能であるため細胞の急激な状態変化を把握可能な系であると考えられた。現有する2つのiPS細胞株において同様に神経前駆細胞の誘導が可能であり、安定して神経前駆細胞を樹立可能であったためiPS-NPC樹立という観点から標準プロトコールになる可能性を秘めていると考えられた。また、樹立したhiPS-NPCはほぼ均一に神経前駆細胞マーカーを発現していたため、細胞種としての不均一性の問題は考慮する必要がなく、造腫瘍性という観点からの不均一性のみに着目可能であると考えられた。また、単層培養系で他研究室において樹立されたhiPS-NPCはニューロンへの分化能が認められたものの、移植後に増殖が見られ、また移植部位以外にも生着及び播種していることが認められたため、腫瘍原性を

有している可能性が考えられた。この点に関しては現在神経病理学的な見地から検討中である。

E . 結論

iPS細胞-NSPC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. Zhou Z, Kohda K, Ibata K, **Kohyama J**, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H.: Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. **Mol Brain**. 7(1):24. 2014
2. 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.

Proc Natl Acad Sci U S A.

12;110(11):4339-4344 2013

3. Urayama S, Semi K, Sanosaka T, Hori Y, Namihira M, **Kohyama J**, Takizawa T, Nakashima K.: Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation.: Cell Struct Funct. 38(1):55-66, 2013

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし