

201335005A

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)

iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川真田 伸

平成 25 (2014) 年 3 月

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)

iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門

研究代表者 川真田 伸

目 次

I. はじめに	2
II. 研究組織	5
III. 平成25年度 総括研究報告書	
iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築 に関する研究.....	9
川真田 伸	
IV. 平成25年度 分担研究報告書	
細胞label systemの開発.....	15
尾上 浩隆, 田原 強	
iPS 細胞由来神経前駆細胞の長期造腫瘍安全性試験の実施.....	17
金村 星余, 西下 直希, 郷 正博, 永井 洋士	
V. 会 議 記 録.....	27

はじめに

本報告書は、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の再生医療関係研究分野の一つである「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」研究班における平成25年度の研究成果をまとめたものである。

本研究では、幹細胞治療では被験者保護の観点から、無限の分裂能をもつ多能性幹細胞由来細胞移植の安全性試験とりわけ腫瘍形成能の評価を主軸としたiPS細胞等多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験実施する。iPS細胞の細胞規格が未確定で、未分化状態で多能性幹細胞の規格を満たしていても、iPS細胞の樹立法の違いによっては、分化誘導の際に最終分化に至らない細胞の増殖がみられたこと。また多能性幹細胞を未分化培養状態で長期間培養すると、染色体構造異常が高頻度(約12%、Nature Rev Gen 2012:13 732-44)で出現するため、移植前の網羅的染色体検査方法の確立が必須であること。さらに、少数の移植細胞の転移を長期間観察するための適切な生体imaging systemがないこと等、これらの課題に答える新たな研究を実施する。最終的な安全性パッケージ構築の形としては、iPS細胞の遺伝子情報を造腫瘍性試験結果と関連づけ、ヒト癌臨床data baseと照合させることで、臨床に用いられるiPS細胞の分化抵抗性に関する評価を目指す。

上記のテーマ別研究課題について、平成 25 年度時点 中間報告書（1 年目）として作成したものであるが、関係者のご参考になれば幸いである。

研 究 組 織

平成25年度厚生科学研究

「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」 研究班

研究組織

	役 割	氏 名	所 属
研究代表者	研究総括	川真田 伸	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門
分担研究者	試験物責任者	郷 正博	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 細胞製造グループ
分担研究者	体内動態試験責任者	尾上 浩隆	(独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能動的イメージング部門 イメージング機能研究グループ 薬理学、神経科学 (ライフサイエンス技術基盤研究センター)
分担研究者	イメージング実験の責任者	田原 強	(独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能動的イメージング部門 イメージング機能研究グループ 薬理学、神経科学 (ライフサイエンス技術基盤研究センター)
分担研究者	統計処理支援	永井 洋士	公財) 先端医療振興財団 臨床情報研究センター
分担研究者	細胞規格責任者	西下 直希	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 細胞評価グループ
分担研究者	造腫瘍性試験	金村 星余	公財) 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 細胞評価グループ

平成25年度 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）

代表研究報告書

iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究

代表研究者：川真田 伸

公財）先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門

研究要旨

幹細胞治療における被験者保護の観点から、無限の分裂能をもつ多能性幹細胞由来細胞移植の安全性試験とりわけ腫瘍形成能の評価が重要である。当研究課題は、iPS細胞等多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験であり、iPS細胞由来ドーパミン(DA)産生細胞、神経幹細胞、心筋細胞の造腫瘍性試験を実施し、各案件開発者に試験デザインと結果をfeed backすることを目的とした研究課題である。

加えて、iPS細胞等多能性幹細胞で未知なる目的外分化細胞が出現した際において、新規移植細胞生体内動態評価systemを開発することは、細胞の転移性試験や長期造腫瘍性試験を実施する上で重要な開発toolとなりえる。当研究課題では、これらローブ・ラベリング技術の開発を通じた新規研究・産業分野の開拓を目指すものである。平成25年度では、各種移植案件における基盤形成を目的とし、脳・線条体移植に要する物品確保と技術習得を図るとともに、造腫瘍性を有する陽性対照としてU251細胞（アストロサイトーマ：JCRB細胞バンク）を用いた移植部位の造腫瘍性感度試験を実施するために、U251細胞 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月と経過観察中である。また、新規移植細胞生体内動態評価systemを開発としては、移植後の細胞の移植部位における定着や他の臓器への移動の有無を調べるために、ルシフェラーゼ高発現ベクターの構築および発現安定株4T1-Luc細胞の樹立を確認した。

長期造腫瘍性試験における技術構築、ルシフェラーゼ高発現細胞株の樹立、移植細胞の定着および移動のためのラベリング技術開発等の技術基盤ができた。

【研究目的】

当研究課題は、幹細胞治療の被験者保護の観点から、無限の分裂能をもつ多能性幹細胞由来細胞移植の安全性試験とりわけ腫瘍形成能の評価を主軸としたiPS細胞等多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験を実施する。さらに既存の造腫瘍性試験に加えて転移性評価系として、新たにImaging Probe開発を実施し転移性の造腫瘍性細胞の追跡評価法を開発する事を目的としている。

当該年度では、1) 慶応義塾と大阪医療センターとで共同開発している分化プロトコルが確定次第、iPS細胞由来神経前駆細胞 (iPS-NSC)を用いて長期造腫瘍性安全性試験の実施計画を立案。2) iPS-NSC移植に伴うNOGマウス線条体移植Protocolの確立。3) NOGマウス線条体への造腫瘍性感度試験の実施。4) 線条体移植の組織切片作成法、組織免疫染色の法の共有Protocolの確立。5) pCAG-Luc-iPベクターを導入したマウス乳癌転移モデル細胞株の樹立を行った。各項目において、具体的に試験を実施できるように際簿準備、技術体系を整え次年度より、本格的に

転移性試験やiPS-NSCの長期安定性試験を実施する体制を整えた。

【結果】

iPS-NSCの造腫瘍性感度試験としては、NOGマウスへの線条体 (Bregmaより前方1 mm, 側方2 mmの箇所) へ移植し、造腫瘍性を有する陽性対照としては、U251細胞 (アストロサイトーマ: JCRB細胞バンク) を用いた。具体的には、U251細胞 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ、12ヶ月観察中である。現在、 1×10^5 個NOG線条体に移植することで、およそ6・7週間時点で明らかな脳肥大が観察している。ヒト細胞特異的抗体である抗Lamin-A抗体を用いて染色を行った結果、移植細胞が移植部位 (線条体近辺) から上方に増殖していることを確認した。また、新規イメージングProbeの開発としては、ルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター (pCAG-Luc-iP, pLenti-Luc-iV) を構築し、両発現ベクターからルシフェラーゼタンパク質の高発現を確認した。その後、

pCAG-Luc-iPベクターを導入したマウス乳癌由来細胞4T1の安定発現株（4T1-Luc細胞）を樹立し、マウス乳癌転移モデルを確立している。

【考察】

当該年度では、造腫瘍性試験、転移性試験における基盤要素技術（移植機器の整備、線条体への移植技術の導入、共有Protocolの構築、ルシフェラーゼ安定発現細胞株の樹立）の確立を行った。また、線条体移植における

U251細胞 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個を用いたNOGマウス線条体移植における造腫瘍性感度試験の結果を3ヶ、6ヶ、12ヶ、15ヶ月と観察中し、次年度でNOGマウス線条体への造腫瘍性試験の移植細胞数の結果について報告する。加えて、マウス乳癌由来細胞4T1の安定株を用いてマウス転移性試験を実施予定である。

以上、移植部位と細胞生着性、転移性との関係性を総合的に評価し、細胞移植治療における細胞種毎の造腫瘍性試験のあり方に対する提言の策定を目指す予定である。

平成25年度 分担研究報告書

細胞label systemの開発

分担研究者：尾上 浩隆

分担研究者：田上 強

(独)理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター
生命機能動的イメージング部門 イメージング機能研究グループ

研究要旨

再生医療の細胞移植における安全性の評価において、非侵襲的な評価系すなわちイメージング技術は、最適なツールの一つである。移植後の細胞の移植部位における定着や他の臓器への移動の有無を調べるために、本年度は、移植細胞ヘルシフェラーゼ遺伝子を導入し、*in vivo*で移植細胞の動態を観察できるシステムの構築を検討した。

二種類のルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター (pCAG-Luc-iP, pLenti-Luc-iV) を構築し、それぞれの発現ベクターがルシフェラーゼタンパク質を発現することおよび、ルシフェラーゼ活性を示すことを確認した。次いで pCAG-Luc-iP ベクターを導入したマウス乳癌由来細胞 4T1 の安定発現株を樹立 (4T1-Luc 細胞) し、その細胞を用いてマウス乳癌転移モデルを作製した。現在、*in vivo* イメージング装置を用いて本細胞の全身分布をどの程度観察できるか詳細に検討している。また、実際の移植細胞である iPS 細胞に遺伝子導入を行う場合を想定し、レンチウイルスベクター (pLenti-Luc-iV) の構築についても検討している。

【研究目的】

再生医療の細胞移植における安全性について、非侵襲的な評価系すなわちイメージング技術は、最適なツールの一つである。移植後の細胞の移植部位における定着や他の臓器への移動の有無を調べるために、本年度は、移植細胞ヘルシフェラーゼ遺伝子を導入し、*in vivo*で移植細胞の動態を観察できるシステムの構築を検討した。

【結果】

二種類のルシフェラーゼ遺伝子発現ベクター（pCAG-Luc-iP, pLenti-Luc-iV）を構築し、ウエスタンブロット法および免疫染色により、両発現ベクターからルシフェラーゼタンパク質が発現することを確認した。また発現したタンパク質がルシフェラーゼ活性を示すかどうか調べるために活性測定を行い、いずれも高い活性が示された。次いで、pCAG-Luc-iPベクターを導入したマウス乳癌由来細胞4T1の安定発現株（4T1-Luc細胞）を樹立するために、遺伝子導入後、2週間、puromycin 処理を行うことで安定発現株を選択し、その細胞を

用いてマウス乳癌転移モデルを作製した。安定株4T1-Luc細胞においてルシフェラーゼが高発現していることも確認された。

【考察】

ルシフェラーゼ高発現ベクターの構築および発現安定株4T1-Luc細胞の樹立ができたことで、移植細胞の定着および移動の観察に本システムが有用であるかどうか、実際の検討を行うことが可能になった。現在、*in vivo* イメージング装置を用いて本細胞の全身分布がどの程度観察できるかを詳細に検討している。また、実際の移植細胞であるiPS細胞に遺伝子導入を行う場合を想定し、プラスミドベクターのみならず、レンチウイルスベクター（pLenti-Luc-iV）による遺伝子導入についても検討を行っている。

iPS細胞由来神経前駆細胞の長期造腫瘍安全性試験の実施

分担研究者：金村 星余

分担研究者：西下 直希

分担研究者：郷 正博

分担研究者：永井 洋士

公益財団法人) 先端医療振興財団

研究要旨

当年度では、慶應義塾大学・岡野 栄之グループが推進する『iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療』を側面から支援し、臨床応用への開発工程を効率化・短縮化させることを目標とする。

上記の研究グループと造腫瘍性試験に対する業務分担を行い、iPS細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍試験、特に移植後の長期経過観察（1年以上）とSorting後の造腫瘍性（+）細胞と（-）細胞のスパイクテストを評価する予定計画を立案した。加えて本研究では、皮下移植よりも生着率が低いNOGマウス線条体への移植時に対する造腫瘍性感度試験をU251細胞（アストロサイトーマ: JCRB細胞バンク）を有する陽性対照として用いた試験を実施した。

<目的>

慶應義塾大学・岡野 栄之グループが推進する『iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療』を側面から支援し、臨床応用への研究開発工程を効率化・短縮化させることを目標とする。当該グループの分担業務として、iPS細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍試験、特に移植後の長期経過観察（1年以上）とSorting後の造腫瘍性（+）細胞と（-）細胞のスパイクテストを評価する。

<試験概要>

iPS細胞由来神経前駆細胞の造腫瘍性試験として、重篤免疫不全動物であるNOGマウスの脳・線条体に被験細胞を投与する試験系について検討する。平成25年度は移植における基礎的な基盤形成を目的とする。まずは、脳・線条体移植に要する物品確保と技術習得を図った。次に、造腫瘍性を有する陽性対照としてU251細胞（アストロサイトマ: JCRB細胞バンク）を用いて移植部位における感度を評価する。具体的には、U251細胞 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月観察する。U251細胞の移植は既に完了しており、今後経過観察をしていく。線条体移植の試験系では、明らかな脳肥大化が起きる場合を除き、腫瘍形成の有無を確認するために、脳を摘出したあとに組織切片の観察を行う必要がある。そのため、表1で示す観察期間の経過後、剖検を実施し造腫瘍性を評価する。

<試験方法>

NOGマウスの脳・線条体造腫瘍性感度検討試験

移植細胞: U251細胞

移植マウス: NOG (NOD/Shi-*scid*,IL-2R α ^{null}) 主に9週齢

移植経路: 両側線条体

移植細胞数: $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$

観察期間: 3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月

造腫瘍性を有する細胞としてU251細胞（図1）を使用し、NOGマウスに線条体投与（Bregmaより前方1mm, 側方2mmの箇所; 図2）した。U251細胞を 1×10^5 個NOG線条体に移植すると、およそ6-7週間時点で明らかな脳肥大が観察される。その例を図3、組織切片を図4に示した。移植細胞を同定するためにヒト細胞特異的抗体である抗Lamin-A抗体を用いて染色を行った。その結果、移植細胞が移植部位（線条体近辺）から上方に増殖していることが確認された。

<今後の予定>

iPS細胞由来神経前駆細胞の製造工程が決定すれば、それを被験細胞として造腫瘍試験を開始する。製造工程ではセルソーティング（FACS: Fluorescence-activated cell sorting）による選別を行う予定であり、選別後の造腫瘍性（+）細胞と（-）細胞のスパイクテストも併せて評価する。被験細胞は 1×10^6 個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、15ヶ月観察する。また移植細胞に関して、その細胞集団としての基本情報を取得する（キャラクタライゼーション）。具体的には、FACS、

抗体染色、定量的RT-PCR等の方法を用いる。

表 1. U251 細胞の NOG 線条体造腫瘍感度検討試験

被験物	移植日	剖検期間	細胞数	NOG マウス数
U251 細胞	2014 年 2 月下旬 ~ 2014 年 3 月上旬	6 週間	10^5	3
		3 ヶ月	10^4	2
			10^3	2
			10^2	2
		6 ヶ月	10^3	6
			10^2	6
			10^1	6
		12 ヶ月	10^3	3
			10^2	3
			10^1	3

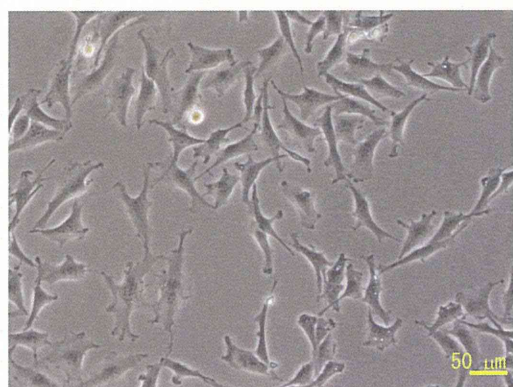


図 1. 造腫瘍感度検定試験における U251 細胞の位相差顕微鏡像

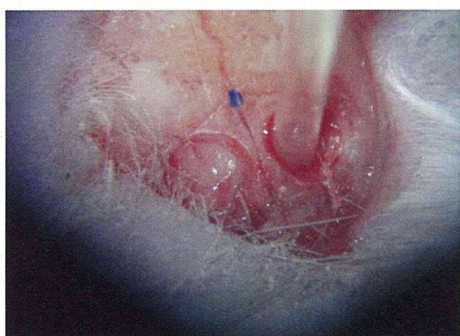


图 2. 线条体移植



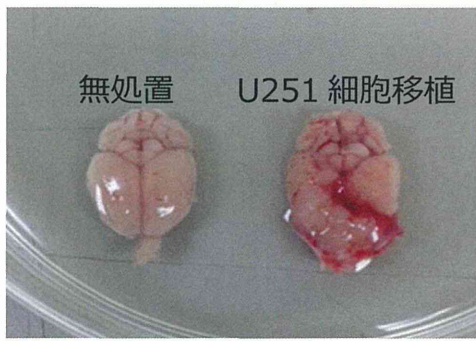
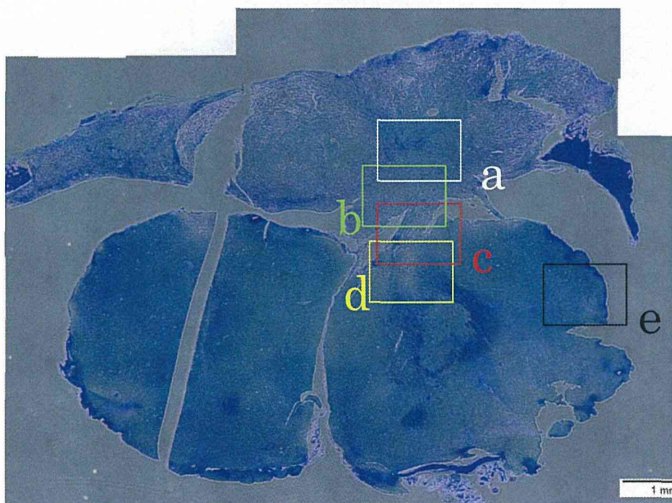
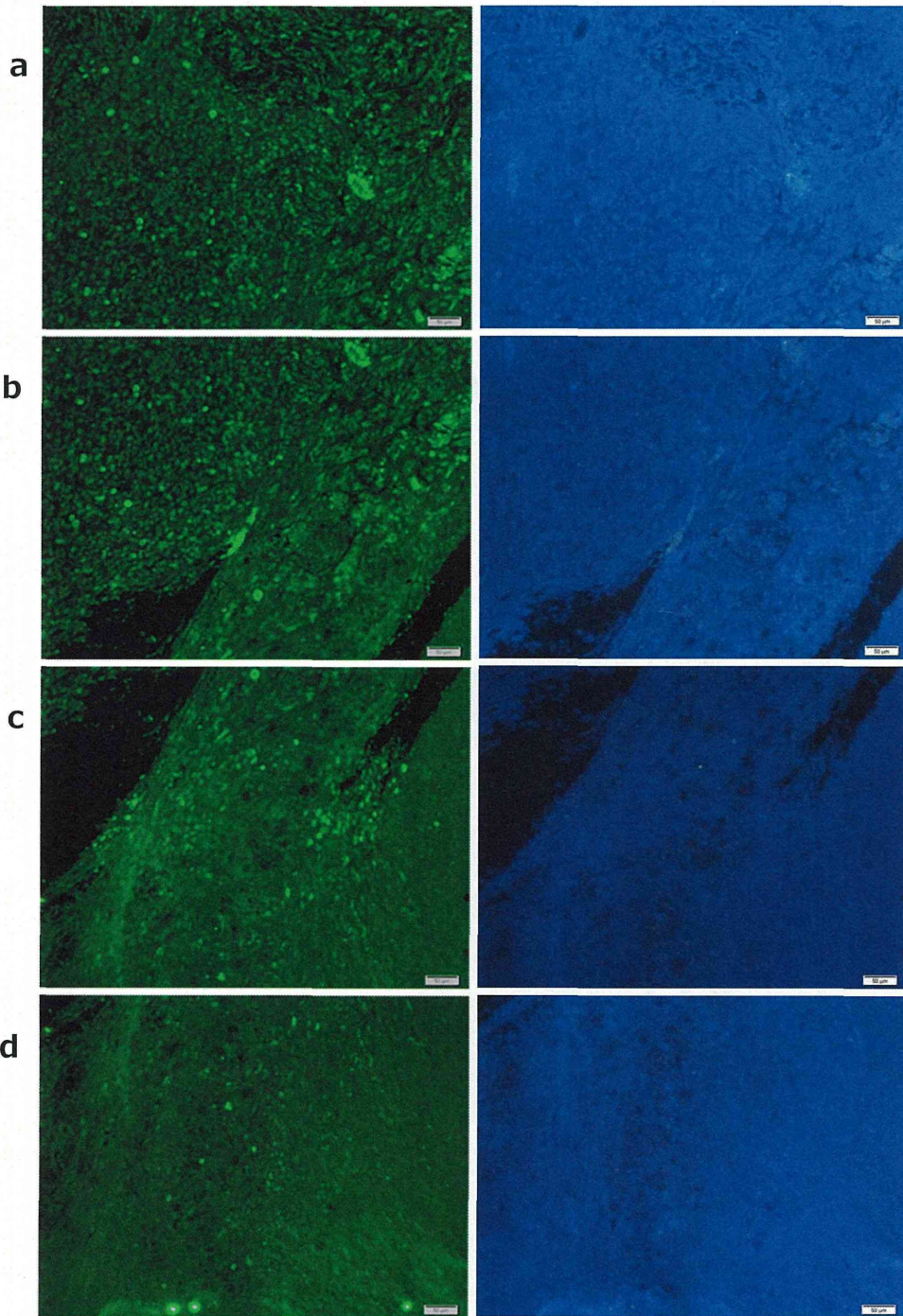


図 3. (上)左側マウス:細胞無し(コントロール)、右側マウス:U251 細胞移植
(中)U251 細胞移植部位肥大化、
(下)摘出脳 左側:細胞無(コントロール)、右側:U251 細胞移植





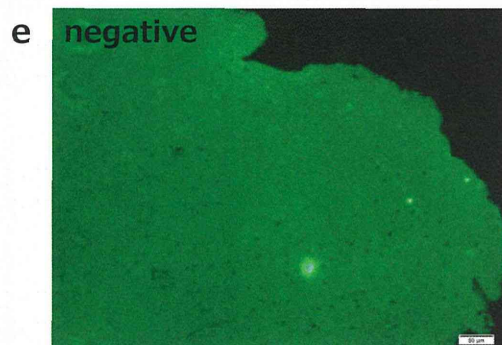


図 4. (上)クリューバー・バレラ染色 (a - e)長
方形で囲んだ領域は下図に相当する。
(下)(a - e) ヒト細胞特異的抗体(抗 Lamin 抗
体)