

【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 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ月、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。