

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

教授

研究要旨

ヒトiPS細胞の樹立方法が確立し、この技術を用いた新規創薬および再生医療の実現が期待されている。ヒトiPS細胞を利用した再生医療の実現に関してはヒト胚を破壊せずに樹立可能であるという倫理面からの優位性が存在するものの、造腫瘍性の課題があり、再生医療の実現に向けた大きな障壁となっている。ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞（hiPS-NPC）の造腫瘍性の原因となる細胞集団は、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。奇形腫は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現在存在しないため困難である。そこで本研究の目的は、hiPS-NPCを用いた再生医療実現化の為に造腫瘍性の制御し、hiPS-NPCの腫瘍原性を規定する細胞集団の同定およびその分子的基盤を明らかとすることである。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。また、造腫瘍性を規定する分子基盤の同定を目的として各種解析を行い、その原因となる因子を同定した。

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。本研究拠点では京都大学iPS細胞研究所

(CiRA)よりヒトiPS細胞の供与を受け、神経前駆細胞への誘導後に、マウス脊髄損傷モデルへの移植後の治療効果に関して検討してきた。その中で造腫瘍性を示す、iPS-NPCを複数見出してきた。

一方、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。本研究ではこれらの知見を生かし、造腫瘍性をきたすhiPS-NPC(unsafe hiPS-NPC)と造腫瘍性を呈さないhiPS-NPC(safe hiPS-NPC)との比較により、造腫瘍性を規定する分子的基盤の解明を目指す。また、造腫瘍性をきたした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)を樹立した。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。

B . 研究方法

(1) メチル化DNAのプロファイリング

CiRAより提供を受けた、レトロウイルスにより樹立されたiPS細胞株を利用し、胚葉体形成を利用し、神経前駆細胞への分化誘導を行った。このiPS細胞2株(201B7, 253G1)および、これらの各細胞株を神経幹細胞/前駆細胞へ分化誘導したもの、ヒト胎児由来神経前駆細胞をそれぞれ培養し、これらのサンプルからゲノムDNAを抽出して、イルミナ社のInfiniumシステムを用いて、全ゲノム領域のDNAメチル化状態を網羅的に解析を行った。

(2) iPS-NPCの造腫瘍性の検討

iPS-NPCの造腫瘍性を検討するために、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、免疫不全動物に感染させた。これらの細胞を 1×10^6 ずつそれぞれ脳、脊髄、損傷脊髄に移植した。移植を受けた動物はイメージングにより細胞の増殖の程度をルシフェラーゼの発光強度により定量し (IVIS system)、また移植細胞の増殖による組織圧迫等により生じる行動機能も同時に解析した。移植後3ヶ月、6ヶ月後にこれらの動物から組織標本を作成し、各種染色を施行後に組織内での広がりや病理学的な解析を行った。

(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) 造腫瘍性を規定するDNAメチル化領域同定

造腫瘍性とDNAメチル化の関連は多くの腫瘍組織において認められ、ガン抑制因子の転写制御領域のDNAメチル化の亢進によるガン抑制因子の発現低下とガン化の関連の報告は数多くなされている。しかし、iPS細胞、iPS-NPCにおけるメチル化状態の記載、造腫瘍性との関連は明らかではなかった。また、DNAメチル化は定量的解析が可能であるため、造腫瘍性と関連する

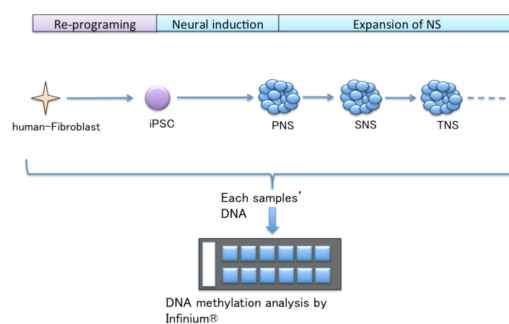


図1: Infiniumによる全ゲノムメチル化解析

Infinium methylation arrayを用いて全ゲノムメチル化解析を行った。対照群となる細胞とともに、iPS細胞およびiPS-NPCを各継代からのゲノムDNAを調整し、メチル化状態を網羅的に解析した。

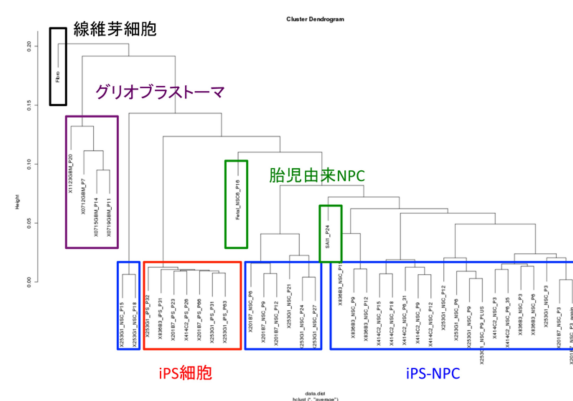


図2: 全ゲノムメチル化状態によるクラスタリング解析

ヒト線維芽細胞、ヒトiPS細胞、ヒトiPS-NPC、胎児由来NPC、グリオブラストーマよりゲノムDNAを調整し、Infinium methylation arrayを用いて解析を行った。全ゲノム領域のメチル化状態を指標としてクラスタリング解析を行い、細胞を分類した。

DNAメチル化領域の同定は再生医療実現に向けた品質管理項目として有用であると考えられる。そこでイルミナ社のInfiniumシステムを利用し、全ゲノムメチル化状態を解析した(図1)。対照群としてiPS細胞の由来となるヒト線維芽細胞、ヒト胎児由来神経前駆細胞(Fetal NS)そしてヒトグリオブラストーマの試料を用いた(全41サンプル)。全ゲノムのメチル化状態をもとに各サンプルをクラスタリング解析を行ったところ、まず特記すべき点として造腫瘍性を有する細胞のコントロールとして用いたグリオブラストーマとiPS細胞およびiPS-NPCは全ゲノムDNAメチル化状態が大きく異なることが分かった(図1)。さらに細胞の株による差異よりも細胞の状態の差異の方が大きく、ゲノム全体の状態から造腫瘍性の有無を規定する要因は見出せなかった。そこで継代による差異等を平均化し、iPS細胞、iPS-NPCおよび胎児由来NPCにおける全ゲノムDNAメチル化状態に関し、クラスタリング解析を行った(図2)。

しかし、興味深いことに造腫瘍性を呈する253G1由来の神経前駆細胞(unsafe hiPS-NPC)において継代によるDNAメチル化状態の変化を解析すると、継代を進めることによりDNAメチル化状態が上昇していく領域が存在した(図3)。プロモーター領域5kベースの領域に着目すると685遺伝子、転写開始部位近傍で解析すると457遺伝子においてDNAメチル化状態の上昇が見出された。一方で、iPS細胞においてはDNAメチル化状態の変動は限られており、継代を経たDNAメチル化によるエピジェネティクス変化に抵抗性を有していることが想定

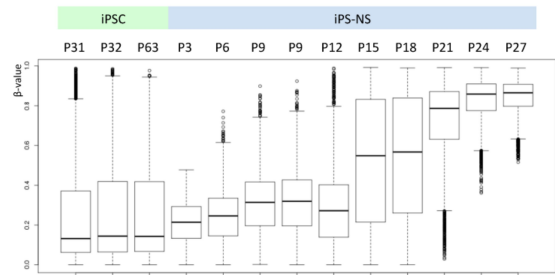


図3:unsafe iPS-NPCにおけるDNAメチル化遷移
造腫瘍性を呈するiPS細胞(253G1)において神経誘導過程におけるDNAメチル化状態を解析した。iPS細胞においては継代によるDNAメチル化変動は微細であるが、神経前駆細胞においては継代を経るごとにDNAメチル化頻度が上昇する領域が存在した。

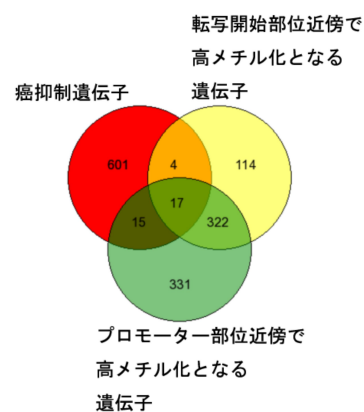


図4:unsafe iPS-NPCにおけるDNAメチル化変動遺伝子と癌抑制遺伝子
造腫瘍性を呈するiPS細胞(253G1)において継代を経るごとにDNAメチル化頻度が上昇する遺伝子と癌抑制遺伝子の相関をベン図で示した。

された。また、DNAメチル化変動領域はCOSMICに登録されているガン抑制遺伝子も含まれており、DNAメチル化状態は遺伝子発現と負に相関することからunsafe hiPS-NPCにおいてはガン抑制遺伝子のDNAメチル化により発現抑制により、造腫瘍性を規定しているのではないかという可能性が示唆された(図4)。さらに、201B7由来hiPS-NPC(safe hiPS-NPC)と253G1由来hiPS-NPC(unsafe hiPS-NPC)を比較することにより、両者において顕著に差の見られる領域を複数見出した(図5)。これらの領域は造腫瘍性と関連する遺伝子制御領域も

含まれているため、再生医療実現に向けた hiPS-NPCの品質管理項目として有用であると期待された。

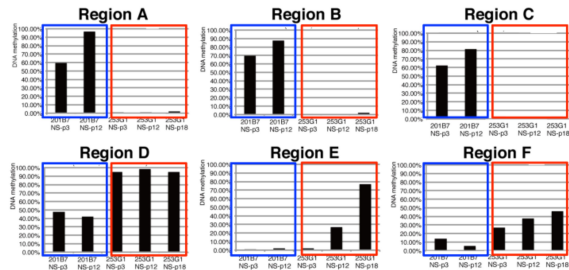


図5: DNAメチル化によるiPS-NPC品質管理項目の候補
安全なiPS-NPC(青枠)と造腫瘍性を呈するiPS-NPC(赤枠)を区別可能なDNAメチル化変動領域の候補

(2) iPS-NPCの造腫瘍性検討

本年度樹立したiPS-NPCの造腫瘍性を検討するため、本研究拠点では図6のようなパイプラインを作成し、解析を行った。まず移植後のiPS-NPCの生体内での増殖を定量的に解析するためにルシフェラーゼ発現レンチウイルスによる標識を行い、継時的に増殖度を定量した。また、移植後の細胞の異常増殖による組織圧迫およびそれに起因する機能低下を定量するために行動学的な評価を行った。また、細胞移植後の免疫不全動物は移植後3ヶ月

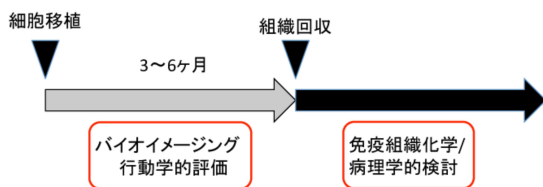


図6: 造腫瘍性検討のパイプライン
iPS-NPCを標識後、免疫不全動物の脳または脊髄、損傷脊髄に任意の細胞数移植し、3ヶ月もしくは6ヶ月の経過を観察した。特にバイオイメージングにより個体内での細胞増殖及び行動学的解析により顕著な機能低下が生じるかを検討した。また、経過観察後は組織学検討を行うために標本を作成し、任意の抗体を用いた細胞の分化傾向の解析もしくは造腫瘍性についての検討を行った。

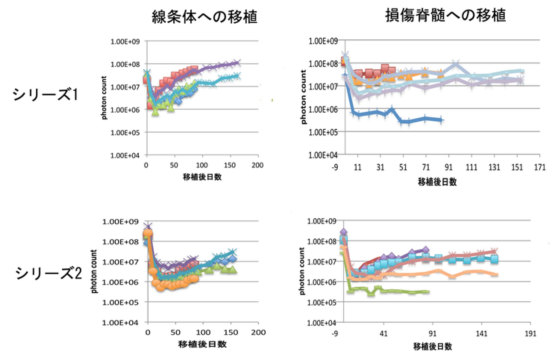


図7: ライブイメージングによる移植細胞の動態解析
1210B2由来iPS-NPCを線条体及び損傷脊髄に移植し、ルシフェラーゼによる活性(photon count)を指標として組織内での増殖を定量的に解析した。移植後一過的にphoton countは低下するが時間経過とともに微増していった。

| No | 局在 | 分化 | 増殖 | コメント | |
|----|--|---|--|--------------------|---|
| B2 | LAMIN 移植部位脊髄外に認められている場所には神経細胞(++)、脊髄実質内にはわずかに神経細胞あり(++) | NESTIN STEM121の分布(髄外)に一致して神経細胞様の分布(髄外)で顕性神経細胞が認められる(++), 脊髄実質内には認められない(++) | GFAP NESTINより強いが、同様の分布(髄外)で顕性神経細胞が見られる(+++) | OLIG NA Ki67 | 移植部位脊髄外に認められており、nestin陽性細胞が中程度に存在している。細胞の数が大きく、突起もでているが本分化印象を受ける。 |

図8: iPS-NPC移植マウスにおける組織学的評価の一例

6ヶ月での組織学的な解析を実施し、病理医の指導のもと病理組織学的な診断を行った。1210B2由来iPS-NPCを免疫不全マウス(脳:NOGマウス、脊髄:NOD/SCID)の中樞神経系に移植し、経時的にルシフェラーゼの活性(photon count)を解析した。全例において移植後一過的にphoton countの低下を認めるが、その後時間経過を経て、photon countは上昇し、生体内において増殖しているのが予想された。しかし、極端に個体内における細胞増殖を認める個体は存在せず、また行動異常や脊髄機能の低下を認める個体は存在しなかった。本研究拠点での予備的な検討からiPS細胞の残存により生じる奇形腫やグリオーマ由来の細胞は移植後に、数百%以上のphoton countの上昇を呈するため今回誘導した1210B2由来神経前駆細胞は個体内での増殖性に関して腫瘍とは一定の違いあることが推察された。

<移植細胞の造腫瘍性に関して>

取得画像のデータベース化

本年度の研究ではiPS-NPCの造腫瘍性の検討を行うために、HE染色での組織像に加え、ヒト由来細胞を特異的に認識する抗体 (STEM121, LAMIN) およびヒトGFAP, Nestin特異的抗体また増殖性を定量するためにKi67を用いた免疫組織学的解析を行った。本研究で得られる組織切片は脳もしくは脊髄由来の試料であり、各個体ごとに数十枚のスライドを作成した。このスライドを利用し、各種抗体染色やHE染色を行うため画像データが膨大となる。そこでNanozoomerを用いたスライド全体の画像の取得・保存を行い、必要に応じて病理医との病理診断の際の資料とすることができた。であり、1検体から数十枚の切片が。さらにこれらの染色像をデータベース化するためにNanozoomerを用い、画像の取得、保存を行い、この画像を元にした病理医との連携のシステムを構築した。

hiPS-NPCの造腫瘍性に関して

本年度利用した1210B2由来hiPS-NPCを移植した動物から得た組織標本に関しては各標本に関して病理医との連携により診断をつけた(図8)。結果として明らかな悪性腫瘍の発生は認められなかったが当初の予想とは異なり、かなりの組織学的な多様性を示していた。また興味深いことに同一の細胞株由来であっても誘導ごとや細胞の培養条件により最終的な移植細胞の組織学的な評価が異なることが明らかとなった。また、長期間の観察群においては当初の予定とは異なる組織が見出され

た。以下に本年度の解析により明らかとなった点を記載する。

1) 髄外病変が一定の確率で存在し、増殖性を有していた

今回の解析により、脊髄内、もしくは脳内に生着した細胞に関しては良好な生着及び分化傾向を示していたが髄外における細胞の生着及び増殖像を呈することがあった。

2) 短期経過群(3ヶ月)と長期経過群(6ヶ月)の比較に関して

本年度はhiPS-NPC移植後3ヶ月と6ヶ月の二点において病理組織学的解析を行ったが、3ヶ月経過時点において増殖性を有していた移植細胞も6ヶ月後においては増殖性が低くなっており、時間経過とともに組織内で分化及び成熟することが明らかとなった。3ヶ月においては比較的増殖性を有する組織切片が散見されたため、長期間での造腫瘍性判定が重要であることが明らかとなった。また、長期経過群においては異所性の骨化が見られることがあり、hiPS-NPCに含まれる微量な非神経系細胞が長期の時間経過を経て増殖することが認められた。しかし、組織学的には分化した骨組織であり、良性病変であることも明らかとなった。

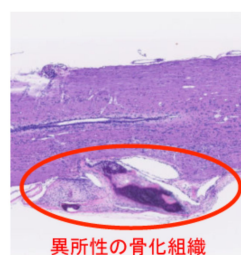


図10: iPS-NPC移植後長期観察群において見られた骨化組織
1210B2由来iPS-NPCを線条体及び損傷脊髄に移植し、6ヶ月後に見出された骨様組織。

D . 考察

本年度は本研究拠点で造腫瘍性の有無が明らかであるiPS-NPCとCiRAから提供された末梢血由来iPS-NPCの解析を行った。前者に関してはDNAメチル化という観点から解析し、造腫瘍性の有無による差異と細胞の継代ごとによる差異があることが明らかとなった。細胞の継代による差異から再生医療にむけた細胞の供給源としては少ない継代数のiPS-NPCを利用することが現実的であると考えられた。一方で、大量の細胞ストックの確保も必要であるため、エピジェネティックな観点から安定であるiPS細胞を大量に準備し、iPS-NPCストックを作成することが重要であると示唆された。

末梢血由来iPS-NPCに関する造腫瘍性に関しては今後の再生医療実現に向けた取り組みの加速化及び効率化の観点から解析のパイプラインを作成したが、造腫瘍性という観点からは多角的な検討が必要であり、造腫瘍性判定において重要な項目と必ずしも必須ではない項目があることが明らかとなった。

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

(原著論文)

1. Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Controlling immune rejection is a fail-safe system against potential tumorigenicity after human iPSC-derived neural stem cell transplantation. PLoS One. 2015 Feb 23;10(2):e0116413.
2. Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Control of the survival and growth of human glioblastoma grafted into the spinal cord of mice by taking advantage of immunorejection. Cell Transplantation (in press)
3. 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 protein and is a novel therapeutic target for glioblastoma. J Biol Chem. 2014 May 16;289(20):13974-85.
4. Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K. TLR9 signaling in microglial attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. Nat Commun. 2015 Mar 9;6:6514.

5. 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*, 7:24 2014
 6. Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H. Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice. *Stem Cell Reports* 3(2):242-249,2014
 7. Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudoh J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cell Reports* 4(3):360-373, 2015
- (学会発表)
1. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source of transplantation therapy for spinal cord injury. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
 2. Hori K, Kohyama J, Matsubayashi K, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Intracranial xenograft model as a validation system to assess tumorigenicity of NS/PCs for transplantation therapy. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
 3. Iida T, Kohyama J, Iwanami A, Yoshida R, Nishimura S, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Assessment of tumorigenic potential of induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
 4. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source for the treatment of spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 42nd Annual Meeting (Orlando, USA, 2014, 12)
 5. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫原性の検討. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
 6. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒトiPS細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価項目の確立. 第33回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
 7. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫学的特性の検討.

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2014,10)

8. 堀桂子, 神山淳, 坂野聡重, 岩波明生,
岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: マウス
脊髄損傷モデルにおけるエピジェネティ
ック修飾関連因子の解析, 第 29 回日本整
形外科学会基礎学術集会(2014,10)
9. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 吉田怜, 西
村空也, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅
也: iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性
評価系の確立. 第29回日本整形外科学会基
礎学術集会(2014,10)

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

