

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 整形外科学教室 助教

研究要旨

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性能は再生医療実現において大きな障壁である。本研究では、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の腫瘍化の実体を明らかとし、その問題を多角的に解決することでヒトiPS細胞由来神経幹細胞を用いた臨床応用への加速を図る。iPS細胞およびiPS細胞由来神経幹細胞、ヒト脳腫瘍由来の細胞を用いて、その腫瘍原性を調べるべく、抽出DNAからがん遺伝子一塩基変異(SNP)や融合遺伝子の検索を行った。これらの結果はヒトiPS細胞由来神経幹細胞の腫瘍形成能のメカニズム解明につながる可能性があり、安全性の確保のための項目として利用できると考えられる。

A . 研究目的

ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)は、脊髄損傷や脳梗塞患者に対する再生医療の有用なツールとして注目されている。申請者らは、マウス及びヒトiPS細胞から分化誘導した神経前駆細胞をマウスや霊長類コモンマーモセット脊髄損傷モデルに移植し、その有効性と安全性を報告してきた。しかしその一方で、hiPS-NPC移植後の造腫瘍性の問題も明らかになってきている。そこで本研究の目的は、hiPS-NPCの腫瘍化のメカニズムを明らかにし、腫瘍化に対する安全性確保のための項目を開発することで、hiPS-NPCの臨床応用を実現可能なものとするところである。

B . 研究方法

(1) 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 (253G1, 201B7, 836B3, 414C2) 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 を利用し、解析を行った。また、全ゲノム SNP アレイの実施を目的として Infinium の OmniExpress-24 BeadChip を用いた解析を行った。

2) 融合遺伝子の解析

サンプルとして 253G1 iPS 細胞由来の神経幹細胞と、それを NOD-SCID マウスに移植した 5 日目の組織および、103 日目の組織、さらに 201B7iPS 細胞由来の神経幹細胞と、それを NOD-SCID マウスに移植した 5 日目の組織と 103 日目の組織を使用した。103 日目の組織に関しては、253G1 は 6 検体、201B7 は 3 検体分の組織を用意した。

イルミナ社の Genome Analyzer を使用して 75 ベースの single read でのシーケンスと、HiSeq2500 を用いて 70 ベース 70 ベースの pair end でのシーケンスをおこなった。

Single read 法、pair end 法ともに FusionMAP を使用して解析を開始した。

本研究は、慶應義塾大学倫理委員会にて人権擁護、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) SNP解析によるiPS細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価系の確立

平成25年度の解析により、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、PDGFRAのD842_S847>EAの変異が13.2%混入していること、また201B7iPS細胞において同様にPDGFRAのD842_S847>EAの変異が18.4%混入していることがわかった。そこでOncoCarta Panel v1.0, v2.0およびOncoFocus Panel v1.0(図6-8)を用い、体細胞遺伝子変異プロファイリングの実験と解析を行った。さらに比較対照群としてヒト脳腫瘍由来試料（グリオブラストーマ）を利用した。

その結果、本年度実施した検体（全30検体）のうちSNP解析により変異の見出された遺伝子はTP53, PDGFRAおよびJAK3であった（図9）。これらのうちTP53およびJAK3に関しては対照群として用いた腫瘍サンプルにおいてのみ見出された。一方、PDGFRAに関しては10%程度の確率でiPS-NPCにおいて見られたが、腫瘍原性を有しない201B7株由来のiPS-NPCにおいても観察されることから、造腫瘍性を規定する因子としては考えにくいという結果となった(図10)。さらに、SNPの結果を確認するために、Surveyor assayによりPDGFRAの当該領域に対する解析を行ったところ変異の検出ができなかった。

OncoCarta v1.0

OncoCarta v1	
ABL1	G250E, Q252H, Y253H, Y253F, E255K, E255V, D276G, F311L, T315I, F317L, M351T, E355G, F359V, H396R
AKT1	V461L, P388T, L357T, E319G, V167A, Q43X, E170del
AKT2	S302G, R371H
BRAF	G464R, G464V/E, G466R, F468C, G469S, G469E, G469A, G469V, G469R, D594V/G, F595L, G596R, L597S, L597R, L597Q, L597V, T599I, V600E, V600K, V600R, V600L, K601N, K601E
CDK4	R24C, R24H
EGFR	R108K, T263P, A289P, C598R, E709K/H, E709A/G/V, G719S/C, G719A, M766, A767insA1, S768L, V769, D770insASV, V769, D770insCV, D770, N771>AGG/V769, D770insAKV, D770, N771insG, N771, P772>SVDNR, P772, I773insV, H773>NPY, H773, V774insNPV/PH/H, V774, C775insH, V790M, L858R, L861Q, E746, T751del, E746, A750del, S752D, L747, E749del, L747, T750del, L747, T751del, L747, S752del, P753S, A750P, T751A, T751P, T751I, S752I/F, S752, I759del, L747, Q ins, E746, T751del, I ins (combined), E746, A750del, T751A (combined), L747, E749del, A750P (combined), L747, T750del, P ins (combined), L747, S752del, Q ins (combined)
ERBB2	L755P, G776S/L/C, G776V/C/V, A775, G776insVMA, P780, Y781insGSP, S779, P780insVGS
FGFR1	S125L, P252T
FGFR3	G379C, Y379C, A391E, K650Q/E, K650T/H
FLT3	D835del, D835H/Y
JAK2	V617F
KIT	D52N, Y503, F504insAY, W557R/R/G, V559D/A/G, V559I, V560D/G, K550, K558del, K558, V560del, K558, E562del, V559del, V559, V560del, V560del, Y570, L576del, E561K, L576P, P585P, D579del, K642E, D816V, D816H/Y, V825A, E839K, M552L, V568D, V584S, P551, V555del, Y553, Q556del
MET	R970C, T992I, Y1230C, Y1235D, M1250T
PDGFRA	V561D, T641, F808L, D846Y, N870S, D1071N, D842_H845del, I843, D846del, S566, E571>K, I843, S847>T, D842V
PIK3CA	R88Q, N345K, C420R, P539R, E542C, E545K, Q546K, H701P, H1047R/L, H1047Y, R38H, C901F, M1043I
HRAS	G12V/D, G13C/R/S, Q61H/H, Q61L/R/P, Q61K
KRAS	G12C, G12R, G12S, G12V, G12D, G12A, G12F, G13V/D, A59T, Q61E/K, Q61L/R/P, Q61H/H
NRAS	G12V/A/D, G12C/R/S, G13V/A/D, G13C/R/S, A18T, Q61L/R/P, Q61H, Q61E/K
RET	C634R, C634W, C634Y, E632, L633del, N918T, A664G

図6:OncoCarta v1.0

OncoCarta v2.0

OncoCarta v2	
AKT-1	E17K
BRAF	R443T, R444W, R442I, H463S, E586K, V600D, G615E
CTNNB1	D32N, D32H, D32Y, S33P, S33Y, S33C, S33F, G34R, G34E, G34V, S37A, S37Y, S37F, T41A, T41S, T41L, S45P, S45Y, S45C, S45F
FBX4	S8R, S12L, L23Q, G30N, P76T
FBXW7	R465C, R479G, R479Q, R479L
FGFR2	S252W, Y376C
FGFR3	A281V
GNAQ	Q209P, Q209L
KIT	K492R, M535V, M535T, M535L, Y553N, Y553K, K558R, K558N, V560E, G565R, N566D, V596G, P573A, P573L, T574A, R634W, V644A, N654A, T676, Y676C, K685E, S709P, D710L, R736G, D751G, T753A, C809G, D816F, D816A, D816G, D818V, D818E, D820Y, D820H, D820A, D820G, D820E, N822H, N822Y, N822K, R822D, R829P
KRAS	G13A, G13V, G13D, T58I, V59V, G40D
MAP2K1	F53S, K57N, D67N, Y134C, E203K, E203Q
MAP2K2	F57I, F57C, F57L, K61E, R388Q
NRAS	A59T
PDGFRA	N659K, D842Y, D842F, Y849C
PIK3CA	S326P, E418K, E542I, E542K, E542V, E545Q, E545K, E545A, E545E, Q546E, Q546K, Q546P, Q546R, Q546H, M1004G, G1007R, Y1021H, Y1021C, R1023Q, T1023A, T1025S, T1025I, A1035T, A1035V, Y1038C, M1043V, N1044K, I1058R, H1060L
PTPN11	T507K
SOS1	R688Q, H888Q
TP53	R273L, D281H, D281Y, D281G

OncoCarta v3.0

OncoCarta v3	
ABL1	M244V
APC	R876*, R1114*, E1309fs*4, Q1338*, Q1429*, S1465fs*3, T1661fs*9
BRAF	V473F, N615S, V600M
CDKN2A	R58*, E61*, E69*, H63Y, D84Y
CSF1R	L301S, Y969F, Y969C, Y969H, Y969*
CTNNB1	A13T, V22A, W25, D120del, S45A
EGFR	G719D, L793P, G735S, V742A, L747, P753>S, L747, T751>P, H773R, G815D, G815S, L858M,
ERBB2	D769H, V777L
FLT3	D835DEL, I836M
HRAS	G12C, G12R
JAK3	P132T, A372V, V722I
KRAS	Q22K
MET	T1010L, H1112R, H1112Y, M1268T, Y1248C, Y1248H
MU11	V384D
MYC	P57S, A59V, T73H, N101T, A260A
PDGFRA	D842, D846>E, D842, D846>G, D842, D846>N, D842, M844del, D842, S847>EA, D842I, D842Y, R841, D842del, S566, E571>H
PTEN	K661*4, R130fs*4, R130G, R173C, R173H, R233*, P248fs*5, K267fs*9, V313fs*3, N323fs*2, N323fs*2I, I317*, L199*, R120*, R453*, R556*, R579*, L660fs*2, C706E, F784*
RET	A883F, C634R, D631, L633>E, D631G, D898, E901del, E632, A640>VRP, E768D, F632, C620del
STK11	Q37*, Q170*, D194V, G196V, F264fs*22, P281fs*6, P281I, W332*
TP53	R306*
VHL	L85P, F148fs*11, L158Q, R161*, R167W

図7:OncoCarta v2.0&v3.0