

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

研究分担者 神山 淳 慶應義塾大学医学部 生理学教室 准教授

研究要旨

本研究ではヒトiPS細胞を用いた再生医療実現に向けた障壁となる造腫瘍性の制御を目的とする。従来、iPS細胞を用いた再生医療に関する造腫瘍性は残存する未分化な細胞(iPS細胞)の混入による奇形腫形成であると考えられてきたが、当研究拠点での現在までの結果からヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の再生医療応用においてはグリオーマ等の神経系の腫瘍の形成が問題となることがわかってきた。しかし、造腫瘍性の原因となる細胞集団の同定がなされておらず、この問題の根本的な解決手法は見出されていない。本研究ではヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)を用いた再生医療実現化の為の造腫瘍性の制御を目的とし、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ため、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、解析を行った。本年度は当研究室の今までの研究で明らかとなった造腫瘍性を規定しうる55遺伝子の発現が高い細胞集団を見出した。本研究成果は再生医療実現に向けたiPS-NPCの品質管理項目設定につながる重要な知見であると考えられる。

A . 研究目的

ヒトiPS細胞を用いた神経系疾患の治療法確立に向け、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及びその制御は最も重要な課題である。本研究では京都大学iPS細胞研究所(CiRA)より提供を受けたヒトiPS細胞から神経前駆細胞への誘導法を

確立し、造腫瘍性を検討した上で造腫瘍性を有していた細胞株に関し、その腫瘍形成に関わる分子機構を明らかとすることを目的とする。特にhiPS-NPCは造腫瘍性という観点から不均一な集団であり(heterogeneity)、この不均一性の問題を打開するためにFACSを利用し、

単一細胞由来iPS-NPC(siPS-NPC)を樹立を試みる。さらにこれらの細胞株を用いた解析を行うことで造腫瘍性の実体を明らかとすることを目的とする。

B . 研究方法

(1) ff-iPS細胞由来NPCストックの作成

再生医療用iPS細胞ストックの提供時期が平成27年度後半以降であるという状況から平成26年度は再生医療用iPS細胞ストックと同様の手法を用いて末梢血から作成されたiPS細胞(1210B2,1231A3)より神経系への分化誘導を試みた。手法としてはFalkらが2012年にPlos One誌に発表した手法を一部改変し、基本培地を味の素社が開発したGMPグレードの神経前駆細胞用培地を利用した。誘導したhiPS-NPCに関しては分化能や神経前駆細胞マーカーの発現解析等により機能評価を行った。

(2) siPS-NPCの樹立と維持

上記の手法により樹立されたhiPS-NPCをFACSにより1細胞分取を行い、96wellプレート上に播種した。これらの細胞を神経前駆細胞用培地で維持し、2日ごとに培地交換及び液性因子を添加し、96wellプレート上で増殖した細胞は細胞の数に応じて培養のスケールを上げ、最終的に10cmの培養皿での培養が維持可能となった段階でRNAサンプルを調整ののちに凍結を行った。

(3) 遺伝子発現解析

1細胞より得られた細胞株由来のRNAサンプルはイルミナ社のiScanを用いた全転写産物の発現解析を行った。

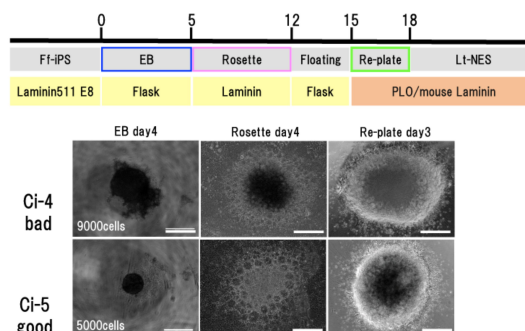


図1: ff-iPS細胞から神経前駆細胞への分化誘導プロトコール
ff-iPS細胞から胚様体を形成したのち(左下参照) 接着系へと細胞をうつし、Rosette形成を促した(左中図参照)。このRosetteを解PL0/Lamininコートしたプレート上で神経前駆細胞を増殖・維持した(右下図参照)。

(倫理面への配慮)

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) ff-iPS由来NPC細胞の樹立および機能評価
iPS中核拠点からの再生医療用iPS細胞ストックの入手時期の問題から、末梢血から再生医療用iPS細胞ストックと同一手法により樹立されたfeeder free iPS細胞(ff-iPS細胞) 2株(1210B12, 1231A3)を用い神経前駆細胞への誘導を行った(図1)。まず、1210B2を利用し、誘導を開始したところ末梢血由来ff-iPS細胞も既報と同様に接着系での神経前駆細胞(iPS-NPC)培養が可能であった。また、これらの細胞を培養すると継代を経ても増殖性に変化はなく、また神経前駆細胞マーカーの発現も90%以上の細胞で観察された(図2)。

次に神経系への分化誘導効率および純度を解析するためにPSA-NCAMとCD133を用いて解析を行ったところ、98%程度の細胞がこれらのマーカーを発現しており、高純度な神経系細胞へと分化誘導されていることが明らかとなった(図3)。また、これらのiPS-NPCを14日間分化誘導を行ったところ高効率な神経誘導が可能であった(図4)。

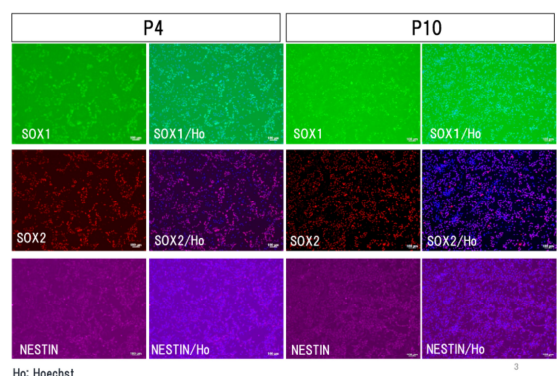


図2: ff-iPS-NPCにおける神経前駆細胞マーカーの発現解析
ff-iPS-NPCの4継代後(P4)と10継代後(P10)における神経前駆細胞マーカーSox1, Sox2およびNestinの発現を免疫組織学的に解析を行った。その結果これらの神経前駆細胞の発現が一様に観察された。

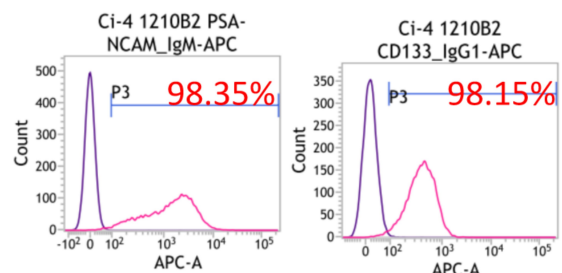


図3: ff-iPS-NPCにおけるCD133, PSA-NCAMの発現解析
ff-iPS-NPCにおけるPSA-NCAMおよびCD133の発現をFACSを用いて解析した。いずれのマーカーも90%以上の発現を示した。

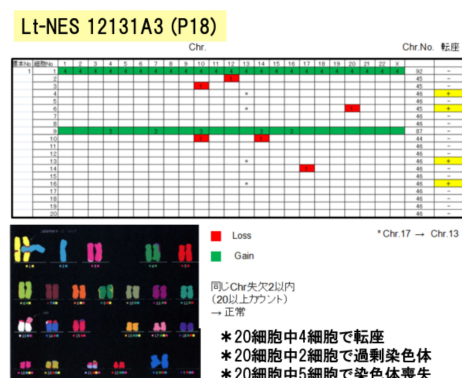


図6: 1231A3株由来iPS-NPCの核型異常

1231A3株はiPS細胞では核型は正常であるが、神経誘導過程により核型異常を呈することが明らかとなった。