

図4: ff iPS-NPCの分化誘導能の確認  
iPS-NPCを2週間分化用培地で培養し、神経への分化誘導を行ったのちに神経マーカーであるNeuN, Dcx, TuJ1の発現を解析した。

そこで次に1231A3株を用いて同様の解析を行った。1231株において1210B2株と同様に誘導を行ったところ、Rosette形成は問題なく観察されたものの、iPS-NPCの維持が困難であり、神経前駆細胞のマーカーであるSox1, Sox2, Nestinの発現が少数の細胞しか見られず、同様にPSA-NCAMを用いたFACSの解析においても50%程度であり、神経系への分化抵抗性が見られた(図5)。

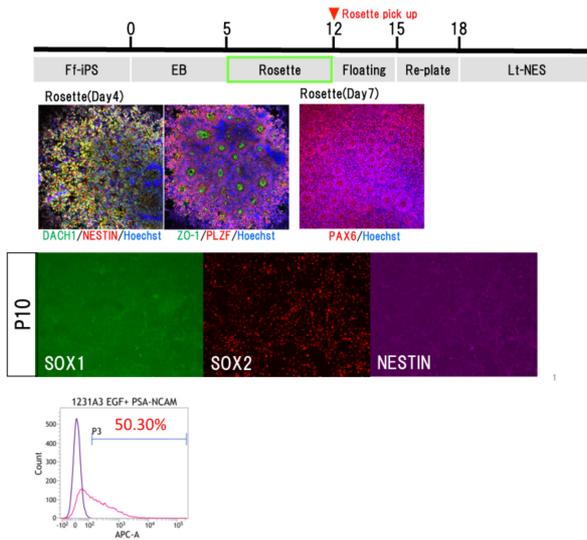


図5: 1231A3株における神経誘導への抵抗性  
1231A3株に対して神経誘導を試みるとRosette形成時には良好な分化傾向を示しており、RosetteマーカーであるZO1やPLZF, Pax6などの発現が高頻度に観察された(中段)。また、iPS-NPCにおいてはSox1, Sox2, Nestinの発現が一部の細胞にのみ観察されるのみであり、FACSにおいてもPSA-NCAMの発現が50%程度であった。

このiPS-NPCの神経細胞への分化誘導を試みたがニューロンマーカー陽性細胞数が少なく、NPCから神経細胞への分化においても抵抗性が認められた。この原因の一つとして1213A3株由来のiPS-NPCにおいては核型異常が見られており(図17)、染色体異常が分化抵抗性と関連していることが予想された。今後のiPS-NPCの再生医療への実現に向けての品質管理項目として核型異常は簡便な検査項目であり、未然に防げる可能性のあるものであるため、造腫瘍性検討を目的とした免疫不全動物への移植に関しては1231A3由来iPS-NPCは使用せず、1210B2由来iPS-NPCを利用すべきであると判断した。

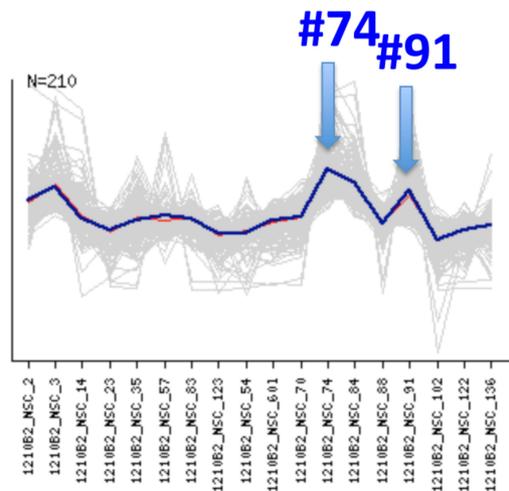


図9: iPS-NPC造腫瘍性関連遺伝子55遺伝子の遺伝子発現パターンによる細胞株の分類

当研究拠点で見出した造腫瘍性に関連する遺伝子(55遺伝子)の発現レベルの平均値(青ライン)により18株を分類したところクローン74とクローン91はこれら55遺伝子の発現が他の株より高かった。また、55遺伝子と同様の遺伝子発現パターンを示す遺伝子は210遺伝子存在した。

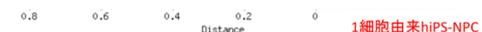


図7: 1細胞由来iPS-NPCの遺伝子発現解析

クラスタリング解析による相関解析。18株の1細胞由来hiPS-NPCの遺伝子発現解析を行ったところ、遺伝子発現様式が近似する細胞群が存在した。当研究室で従来使っている安全なhiPS-NPC(201B7由来hiPS-NPC)とは遺伝子発現様式が大きく異なっていた。