

(2) 単層培養系hiPS-NPCを用いたsingle cell sorting条件検討

NPCはFACSによる一細胞分取および一細胞由来NPCs樹立は細胞調整時の細胞死などの問題があり技術的な困難があった。そこで本年度はFACS施行前の細胞の前処理方法を検討した。その結果、FACS前のNPCにROCK阻害剤処理を施すことにより大幅に生存率が改善した。そこでこの手法を用い、hiPS-NPCからの1細胞分取を試みた。本年度の造腫瘍性検討から1210B2由来hiPS-NPCのCi-4株において明らかな造腫瘍性は認められないものの、移植後の長期経過後における移植細胞由来組織の増殖性や異所性骨化などが見られたため、1210B2由来hiPS-NPCの一つとして樹立したCi-4株を用いた。その結果本年度は100株程度の一細胞由来hiPS-NPC株が樹立可能であった。

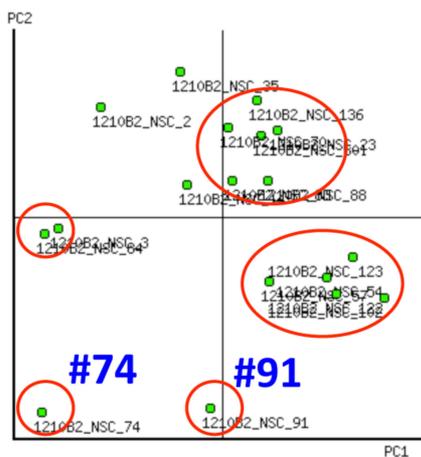


図8: 1細胞由来hiPS-NPC18株における主成分解析 (PCA解析)
PCA解析により18株を解析したところ複数のclusterが見出された。興味深いことに2株明らかに他の細胞株とは異なる遺伝子発現様式を示していた(クローン74, クローン91)。

(3) 1細胞由来hiPS-NPCの遺伝子発現解析

本年度樹立した一細胞由来hiPS-NPCは最終的には実験動物に対する移植により造腫瘍性判定を行うことを計画していたが造腫瘍性判定には長期の解析が必要であり(中村の項目参照)移植により造腫瘍性判定を行う細胞株を選別する必要があった。そこで本年度は1細胞由来hiPS-NPCの転写レベルでの多様性を解析すべく、マイクロアレイによる解析を行った。70検体のマイクロアレイを施行し、うち18サンプル分に関しては二次解析を施行したので報告する。

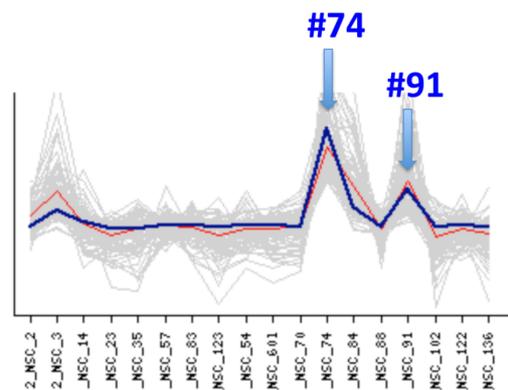


図10: PDGFRAの遺伝子発現パターンによる細胞株の分類

すでにhiPS-NPCの造腫瘍性と関連性があると分かっているPDGFRAの発現レベル(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。

まず1細胞由来hiPS-NPC 18株の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析し、クラスタリング解析による各株間の相関を解析した。比較対照群として当研究室で安全性が確認されている201B7由来hiPS-NPCの実験試料を利用した。その結果、今回樹立した18株は201B7由来hiPS-NPCとは大きく遺伝子発現パターンが違うことが分かった。これは神経誘導の手法が接着培養系と浮遊培養系(201B7由来

hiPS-NPC)の差に起因すると考えられる。興味深いことに18株の間の相関に関しても複数のクラスターを形成していることが予想された(図7)。

次に主成分解析による遺伝子発現パターンによる分類を行ったところクラスタリング解析と同様に複数のサブグループに分類された。特に2株(クローン74とクローン91)においては他の細胞とは明らかに性質の異なるものであることが示唆された(図8)。次に、すでに当研究室で造腫瘍性に関連すると想定している55遺伝子に関して着目し、これらの遺伝子の発現レベルの平均値をとり、各株における発現レベルを検討するとクローン74とクローン91は発現レベルが高いことが分かった(図9)。特にこの55遺伝子のうちもっとも造腫瘍性に関連すると考えられてきたPDGF receptor alpha (PDGFRA) に関してはこれら2クローンの発現レベルは他の株に比べ高い事が明らかとなった。

今後残りの株の発現解析を進めるととともに、クローン74やクローン91の株の細胞としての性質付けを進めることにより造腫瘍性の実体を明らかとしたい。

D . 考察

hiPS-NPCの造腫瘍性という観点からの細胞の不均一性 (heterogeneity)の解明は重要な課題である。本年度の解析から末梢血由来iPS細胞からも神経前駆細胞の誘導が可能であり、また一細胞由来hiPS-NPCの樹立が可能であった。本年度に行った遺伝子発現解析により、hiPS-NPCには遺伝子発現という観点からも不均一性、多様性があることが明らかとなった。さらに、特定の細胞集団は当研究拠点で現在までに明らかにしてきた造腫瘍性関連遺伝子発現が高レベルで見られることが分かった。従来、hiPS-NPCの造腫瘍性は 残存未分化細胞(iPS細胞)による奇形腫形成 神経前駆細胞の腫瘍化によるアストロサイトーマもしくはグリオーマの形成が想定されてきたが、本年度の研究によりhiPS-NPCに含まれる特定の細胞集団が造腫瘍性の一部を担っている可能性が示唆された。今後はこの解析を引き続き継続し、造腫瘍性の実体解明および細胞の品質管理項目の設定に注力したいと考えている。

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. TLR9 signaling in microglial attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K. Nat Commun. 2015 Mar 9;6:6514.
2. 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

<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)

5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)

10. 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: i
PS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