

201406016A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川真田 伸

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

公益財団法人先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

研究代表者 川真田 伸

目 次

I. はじめに	1
II. 研究組織	5
III. 平成26年度 総括研究報告書	
iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究	9
川真田 伸	
IV. 平成26年度 分担研究報告書	
iPS細胞由来神経前駆細胞の長期造腫瘍安全性試験の実施	15
郷 正博	
細胞label systemの開発	25
尾上 浩隆 / 田原 強	
iPS細胞、およびiPS細胞由来分化細胞の規格化研究	29
西下 直希 / 田村 尚	
V. 会議記録	35
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	39

はじめに

本報告書は、厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業の一つである「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」研究班における平成26年度の研究成果をまとめたものである。

本研究では、幹細胞治療では被験者保護の観点から、無限の分裂能をもつ多能性幹細胞由来細胞移植の安全性試験とりわけ腫瘍形成能の評価を主軸としたiPS細胞等多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験実施する。iPS細胞の細胞規格が未確定で、未分化状態で多能性幹細胞の規格を満たしていても、iPS細胞の樹立法の違いによっては、分化誘導の際に最終分化に至らない細胞の増殖がみられたこと、また多能性幹細胞を未分化培養状態で長期間培養すると、染色体構造異常が高頻度(約12%、Nature Rev Gen 2012:13 732-44)で出現するため、移植前の網羅的染色体検査方法の確立が必須であること、さらに、少数の移植細胞の転移を長期間観察するための適切な生体imaging systemがないこと等、これらの課題に答える新たな研究を実施する。最終的な安全性パッケージ構築の形としては、iPS細胞の遺伝子情報を造腫瘍性試験結果と関連づけ、ヒト癌臨床data baseと照合させることで、臨床に用いられるiPS細胞の分化抵抗性に関する評価を目指す。

II 研究組織

平成26年度厚生労働科学研究

「iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究」 研究班

研究組織

	役 割	氏 名	所 属
研究代表者	研究総括	川真田 伸	(公財) 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター
分担研究者	造腫瘍性試験 責任者	郷 正博	(公財) 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 細胞療法開発グループ
分担研究者	体内動態試験 責任者	尾上 浩隆	(独) 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能的イメージング部門 イメージング機能研究グループ
分担研究者	イメージング 実験の責任者	田原 強	(独) 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 生命機能的イメージング部門 イメージング機能研究グループ
分担研究者	細胞規格責任者	西下 直希	(公財) 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究・細胞評価グループ
分担研究者	細胞規格責任者 イメージング実験	田村 尚	(公財) 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究・細胞評価グループ
協力研究者	造腫瘍性試験	金村 星余	(公財) 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター 研究・細胞評価グループ

Ⅲ 平成26年度 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

代表研究報告書

iPS細胞等を用いた移植細胞の安全性データパッケージ構築に関する研究

代表研究者：川真田 伸

（公財）先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

研究要旨

本研究は、①iPS 細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験のデザインを策定し、造腫瘍性試験を実施し、その結果を案件開発者に feed back することを目的としている。加えて②細胞移植時に問題となる移植細胞の移植部位以外での増殖や腫瘍形成を検知できる生体内動態評価 system を開発し、長期造腫瘍性試験での遠隔転移評価を実施する。この目的のための移植細胞の標識技術とその検出技術の開発を行う。また③多能性幹細胞や多能性幹細胞由来細胞の遺伝子変異が腫瘍形成能獲得につながるため、real time (2-3 日)で遺伝子変異を検出できる検査法の開発を行った。

平成 26 年度は、①Malignant astrocytoma U251 を $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個を移植し、iPS 細胞由来神経幹細胞の腫瘍形成能評価の陽性対照として使用した。現在長期（3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月）経過観察中である。また臨床実施施設（慶應大学）から入手した iPS 細胞由来神経幹細胞 1210B2 由来 NSC proA (P6)（最終細胞規格ではない）の NOG マウス線条体移植試験を予備試験として開始した。

②マウス B6 由来 iPS 細胞を lenti-luciferase construct で label した安定株を樹立した。今後この label した細胞を B6 マウスの経尾静脈及び経皮肝臓で注入し、遠隔部位での腫瘍形成能と検出能を検討する（自家細胞移植モデル）予定である。

③染色体構造や遺伝子の変異を real time で検査するため custom made CHG array の design の策定とそれを用いた機能試験を、長期培養 iPS 細胞核を用いて行った。

【研究目的】

当研究課題は、幹細胞治療の被験者保護の観点から、無限の分裂能をもつ多能性幹細胞由来細胞移植の安全性試験のプロトコール策定とその実施を目的としている。そのため、1)腫瘍形成能の評価を主軸としたiPS細胞等多能性幹細胞由来分化細胞の造腫瘍性試験を実施。2)新規にImaging Probe開発を実施し転移性の造腫瘍性細胞の追跡評価法を開発。3)さらに無限に増殖を繰り返す可能性のある多能性幹細胞で頻発する遺伝子の変異は、腫瘍能獲得に直結するため、遺伝子変異検出試験の確立を研究目的としている。

【結果】

当該年度では、1)昨年度から実施している造腫瘍性試験陽性対照である U251 (malignant astrocytoma 細胞株)の移植試験を引き続き実施した。また慶應義塾大学と大阪医療センターとで共同開発していた iPS 細胞由来神経幹細胞の分化プロトコールが確立したため、同プロトコールで分化させた iPS 細胞由来神経前駆細胞 (iPS-NSC) 1210B2 由来 proA (P6)を 1.0×10^5

個 NOG マウス線条体に移植を開始した。観察期間は3ヶ月6ヶ月12ヶ月である。それに伴い細胞移植手技とプロトコールの確立と NOG マウス線条体移植での組織切片免疫染色法プロトコール確立を行った。2)移植細胞を標識して、長期に移植後の体内動態を評価できる pCAG-Luc-iP ベクターを開発し、in vivo での機能試験としてマウス乳癌細胞に遺伝子導入し、この細胞をマウスに移植することで移植細胞の転移モデルの確立を行った。さらに iPS-NSC の残存 iPS 細胞の遠隔転移を調べる目的で、マウス B6 由来 iPS 細胞に pCAG-Luc-iP ベクターを用いて Luc 遺伝子を導入し、安定導入株を樹立した。次年度はこの導入株を B6 マウスに移植し、この免疫障害がない自己移植モデルとして経尾静脈移植や経皮肝臓移植を行い、移植細胞の体内動態を調べる予定である。3) 多能性幹細胞の長期継代による染色体構造の不安定性である、染色体構造や遺伝子の変異は、腫瘍形成能獲得と結びつくため、iPS 細胞と iPS 細胞由来分化細胞の遺伝子構造変異を real time base(2-3

日)で評価できる新技術の開発を行った。具体的には、custom made CHG array の design を作成し、長期培養 iPS 細胞株を用いて継代数増加による遺伝子構造の変異についてこの試作 CGH array の機能検証を兼ねた試験を実施した。

【考察】

当該年度では、造腫瘍性試験、転移性試験における基盤要素技術（移植機器の整備、線条体への移植技術の導入、共有Protocolの構築、ルシフェラーゼ安定発現細胞株の樹立）の確立を行った。さらにcustom made CHG arrayの作成を行い、このarrayが有効に機能することを示した。次年度はこれらの研究実績の上にiPS細胞由来NSCの造腫瘍能についてさらに検討を進める予定である。

IV 平成26年度 分担研究報告書

iPS細胞由来神経前駆細胞の長期造腫瘍安全性試験の実施

分担研究者：郷 正博

(公財) 先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター

研究要旨

本年度の当該研究は、慶應義塾大学・岡野 栄之グループが推進する『iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療』を側面から支援し、臨床応用への開発工程を効率化・短縮化させることを目標とする。

上記研究グループと造腫瘍性試験に対する業務分担を行い、iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍試験、特に移植後の長期経過観察（1年以上）を計画した。本年度の研究では、1. NOGマウス線条体へのiPS細胞由来神経幹細胞移植時の造腫瘍性試験の試験結果の陽性対照として、U251細胞（アストロサイトーマ: JCRB細胞バンク）を用いて造腫瘍性感度試験を実施した。さらにその結果を踏まえ2. NOGマウス線条体へのiPS細胞由来神経幹細胞の移植を開始した。現時点では、iPS細胞由来神経幹細胞の最終細胞規格は決定していないが、最終細胞規格とほぼ同等という判断で、参考試験として本試験を実施した。これにより次年度の本試験実施に向けて移植手技の検討、投与方法、移植ルート、マウスのn数、観察期間などの移植プロトコール設定、組織染色法の選定を慶應義塾大学と協議し実施した。

【目的】

慶應義塾大学・岡野 栄之グループが推進する『iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷・脳梗塞の再生医療』を側面から支援し、臨床応用への研究開発工程を効率化・短縮化させることを目標とする。当該グループの分担業務として、iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性試験を担当している。神経幹細胞の造腫瘍性試験実施に際して、その前段階としてU251細胞をdoseを振って移植し、このU251細胞の造腫瘍能を陽性対照とした。そのうえで、iPS細胞由来神経幹細胞（臨床用の最終的な細胞規格は、H26年10月の段階では決まっていないが、実際に臨床で用いる移植細胞の細胞規格と比べ大きくは変わらないという前提）を参考データとして移植した（H27年1月）。この細胞についても、その造腫瘍能を（3ヶ月、6ヶ月、1年）の長期にわたって経過観察を行う予定である。

【試験概要】

iPS 細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性試験として、重症免疫不全動物である NOG マウスの脳・線条体に被験細胞を投与する試験系について検討する。脊髄への細胞移植は、技術的な困難が予想されるため、脊髄と解剖学的組織が似ている脳・線条体被験細胞を投与する試験系を用いた。平成 25 年 10 月・26 年 5 月にかけ脳・線条体移植に要する手技習得という観点でインク脳内注入を行った。

NOG マウスの脳・線条体造腫瘍性感度検討試験

1. 移植細胞: U251 細胞
造腫瘍性を有する陽性対照として U251 細

胞（アストロサイトーマ: JCRB 細胞バンク）を用いて移植部位における感度を実施した。U251 細胞の移植後、経過を観察し、腫瘍形成の有無を確認するために、3 か月後、6 か月後、脳を摘出したあとに組織切片の観察を行い、移植細胞の造腫瘍能を検討した。NOG マウス (NOD/Shi-*scid*,IL-2Rr^{null}) は主に 9 週齢を使用し、移植経路として 両側線条体 (Bregma より前方 1 mm, 側方 2 mm の箇所) から移植した。

移植細胞数: $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$

観察期間: 3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月

U251 細胞 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^5$ 個を NOG マウスに移植すれば、およそ 6 - 7 週時点で明らかな脳肥大が観察される。その組織切片を下記に示した。移植細胞を同定するためにヒト細胞特異的抗体である抗 Lamin-A 抗体を用いて染色を行った。その結果、移植細胞が移植部位（線条体近辺）から上方に増殖していることが確認された。

2. 1210B2 株由来神経前駆細胞の安全性評価研究

本研究では、被験細胞として 1210B2 由来 NSC の造腫瘍試験を実施し、移植後長期経過観察を実施する。これまでのプロトコール A で分化誘導した 1210B2 由来 NS/PC の脳移植では、組織学的に造腫瘍形成は認めないため、NOG マウスの脳・線条体に移植後、長期間観察での評価で再確認する。2015 年 2 月～（経過観察期間 最長 12 ヶ月）から移植を実施した。具体的には、マウスの脳・線条体造腫瘍性試験として、主に 9 週齢 ♂♀の NOG マウスに対して、移植細胞: 1210B2 由来 NSC proA (P6)を両側線条体に、移植細胞数: 1×10^6 /片側線条体 x

2（両側線条体）に移植した。観察期間は3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月で、観察匹数を各ポイント5匹、計15匹（移植する個体は各ポイント8匹、計24匹で施行した。

<被験細胞について>

大阪医療センター調整 凍結細胞ストック
準備

製造方法: 通常実験室で製造。

輸送方法: 2×10^6 / vial を24本_ドライアイス詰 クール宅急便（冷凍）、必要培地類（冷蔵）で輸送

【今後の予定】

H27 5月現在、臨床で使用されるiPS細胞（HLA homo細胞）が京大CiRAから慶応大学に送付され、神経幹細胞への分化を始めた。iPS細胞由来神経幹細胞の製造工程が、現段階で決定したので、それを被験細胞として造腫瘍試験を開始する。またU251細胞（アストロサイトーマ）に続いて、さらなる陽性対照として患者さん由来Glioblastoma細胞株を共同研究先の大阪医療センターから入手し、造腫瘍能の陽性対照として、スパイクテストも併せて実施する。被験細胞は 1×10^6 個をNOGマウスの線条体に移植し、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、15ヶ月 観察する。また移植細胞に関して、その細胞集団としての基本情報をFACS、抗体染色、Ki67染色、定量的RT-PCR等を用いて取得する予定である。

厚労安全性(iPS-NSC移植)工程表	H26年度												
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
U251移植(感度試験用、H25年度2月に移植)	→			→			→			→			
U251移植(免染検討用)	→			→			→			→			
U251移植(免染検討用)	→			→			→			→			
1210B2_proA(本番移植)												移植	
厚労安全性(iPS-NSC移植)工程表	H27年度												
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
1210B2_proA(本番移植)	3ヶ月観察			6ヶ月観察			12ヶ月観察						
1210B2_proA+GBMスパイク試験				移植	3ヶ月観察			6ヶ月観察					
HLAホモIPS-NSC(本番移植)								移植	3ヶ月観察				
厚労安全性(iPS-NSC移植)工程表	H28年度												
	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	
1210B2_proA+GBMスパイク試験	12ヶ月観察												
HLAホモIPS-NSC(本番移植)	6ヶ月観察			12ヶ月観察									

<H26-H28 年度 NOG 線条体への細胞移植を用いた造腫瘍性試験予定一覧表>

U251細胞
 NOGマウス ♂♀ 9週齢
 両側線条体

被験物	移植日	剖検予定期間	細胞数	観察期間	脳腫	その他剖検所見
U251細胞	2014/2/25	6週間	10 ⁵	6週間	有	♂特記事項なし
				7週間	有	♂特記事項なし
				8週間	有	♂突然死(出血跡、凝固血→血栓による脳梗塞?)
	2014/3/5	3ヶ月	10 ⁴	7週間		♀移植部位白っぽい? 削瘦、衰弱。臓器に異常なし。
				9週間	有	♂右目腫れ、削瘦、衰弱傾向
			10 ³	17週間		♀移植部位白っぽい? 削瘦、衰弱。臓器に異常なし。
				17週間		♂脳肥大有、胸腺肥大、脾臓肥大
			10 ²	15週間	判定不可。	♀旋回、眼球突出
				17週間		♂胸腺肥大、脾臓肥大
	2014/2/28~ 2014/3/6	6ヶ月	10 ³	24週間	判定不可。	♀削瘦、判定不可
				21週間	有	♂脳肥大有、削瘦
				18週間	判定不可。	♂死亡、判定不可
				26週間		♂脳肥大有
				26週間		♀異常なし
				26週間		♀異常なし
			10 ²	12週間	(生着確認) 無	♂削瘦、衰弱傾向 胸腺肥大、脾臓肥大
				26週間	(生着確認) 無	♂異常なし
				26週間	(生着確認) 無	♂異常なし
				26週間		♀異常なし
				26週間		♀異常なし
				26週間		♀異常なし
			10 ¹	26週間		♀脳肥大有
				26週間		♀脳肥大有
				26週間		♀脳肥大有
				26週間		♂異常なし
				26週間		♂異常なし
				26週間		♂異常なし
	2014/2/27, 2014/2/28	12ヶ月	10 ³	12ヶ月		♂安楽死
				24週間	有	♀頭部腫瘍、削瘦
				27週間		♀脳超肥大
10 ²			12ヶ月		♂安楽死	
			12ヶ月		♀安楽死	
			27週間		♀脳肥大	
10 ¹			12ヶ月		♀安楽死	
			12ヶ月		♀安楽死	
			12ヶ月		♂安楽死	

<U251 細胞の NOG 線条体造腫瘍性試験の結果のまとめ一覧 2015年 3月30日時点>

2014/02/25 U251細胞移植 1x10⁵ 線条体移植

2014/04/22 突然死 (脳に出血跡、凝固血在り→血栓による脳梗塞の可能性あり。) 急遽、脳摘出。脳組織の腐敗が進行していたので、一部顔面組織を残した状態で固定処置。BML社に委託。

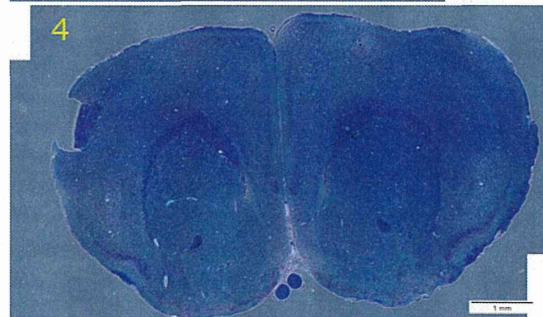
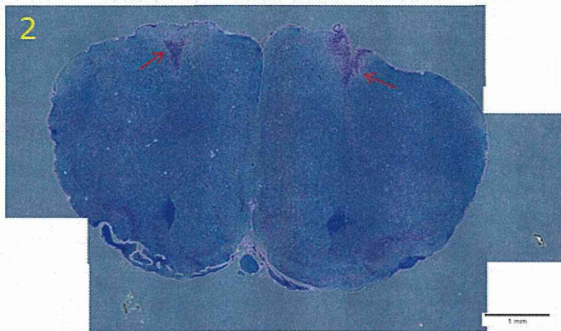
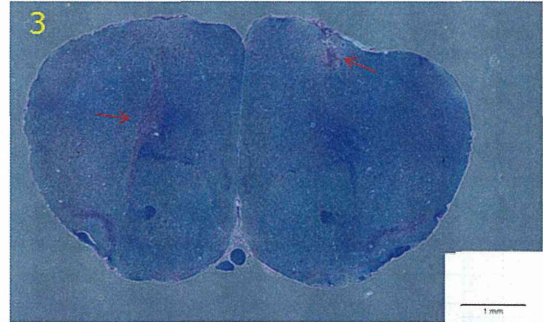
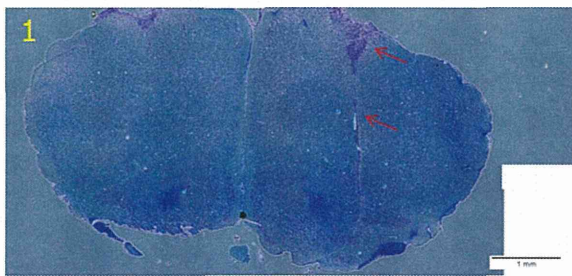
(個体番号 : NOG 143- 3)



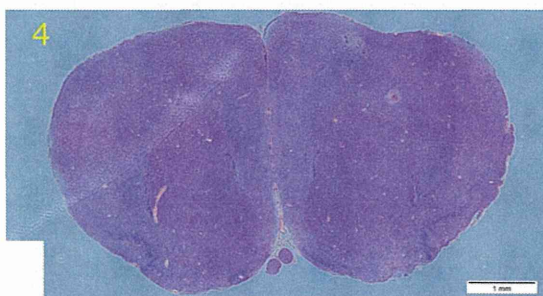
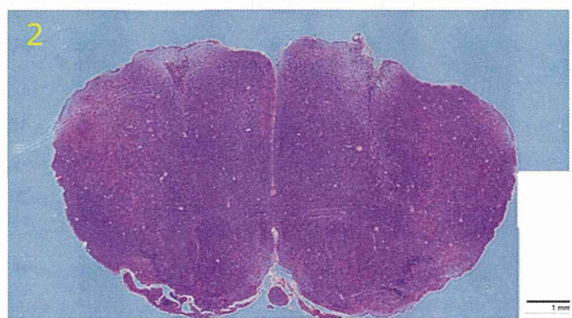
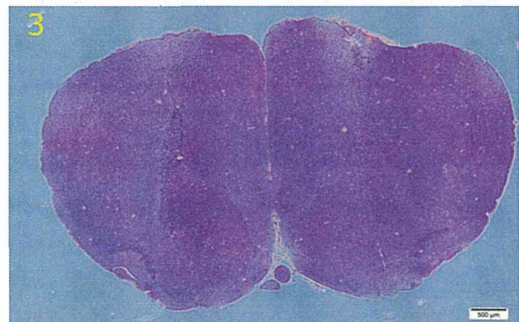
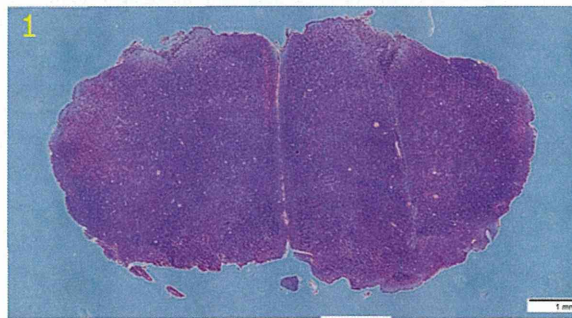
移植部位に腫瘤あり。白っぽい細胞群

線条体移植剖検例

クリューバー・パレラ染色 (KB染色)



HE染色



U251 移植細胞の組織染色

NOG150 慶応プロトコール

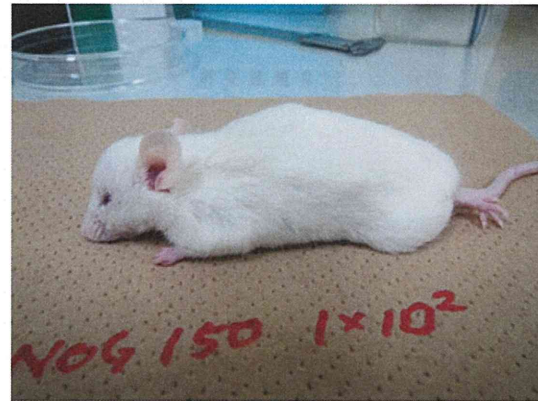
U251 1×10^3 移植
移植より27週観察



2014/09/04

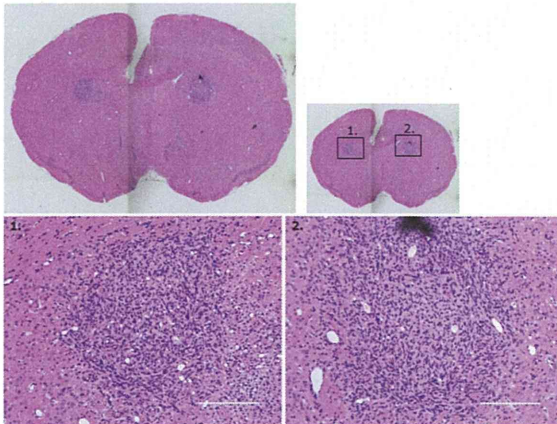
NOG150 慶応プロトコール

U251 1×10^2 移植
移植より27週観察。



両マウスともに顕著な脳肥大が観察されたため、観察予定期間である12ヶ月以前の27週目で殺処分。剖検による観察のみ行った。切片依頼せず。

HE染色



Nestin染色

