

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、iPS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を開発を行った。

平成 26 年度は、Malignant 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。

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。

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陽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ルが確立したため、同プロトコルで分化させた iPS 細胞由来神経前駆細胞 (iPS-NSC) 1210B2 由来 proA (P6)を  $1.0 \times$

$10^1 \sim 1.0 \times 10^5$  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。