

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 月にかけて脳-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-2R^{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。

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
			10 ²	26週間		異常なし
				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		
	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	

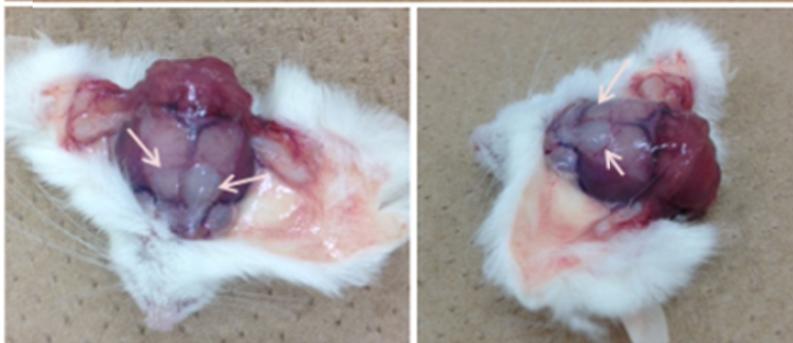
< U251 細胞の NOG 線条体造腫瘍性試験の結果のまとめ一覧 2015年 3月30日時点 >

2014/02/25 U251細胞移植 1×10^5 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。) 急速、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)

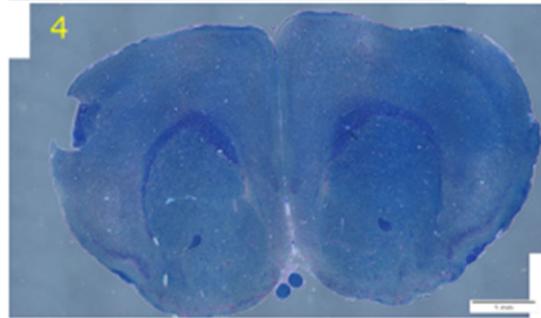
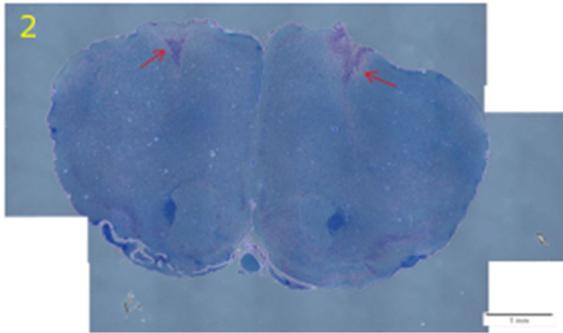
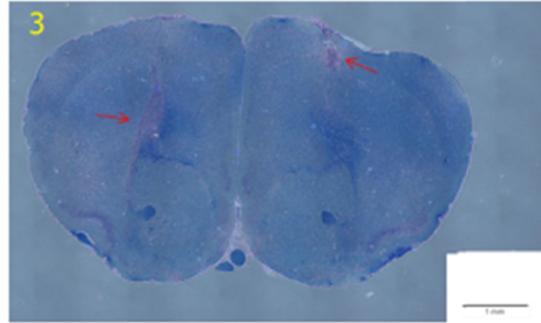
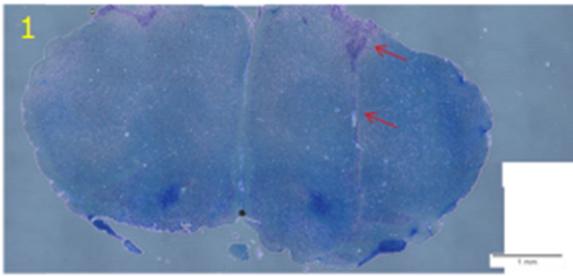
U251細胞移植



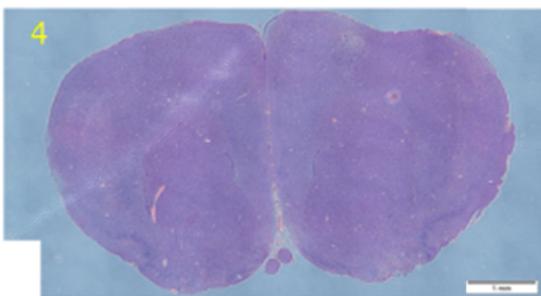
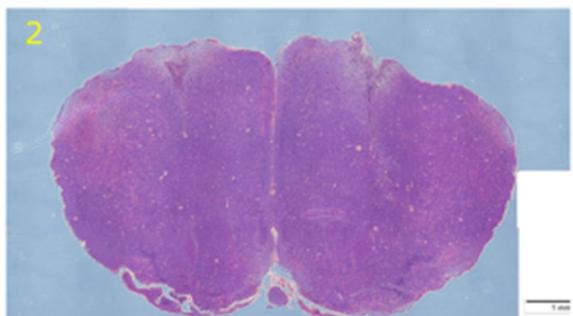
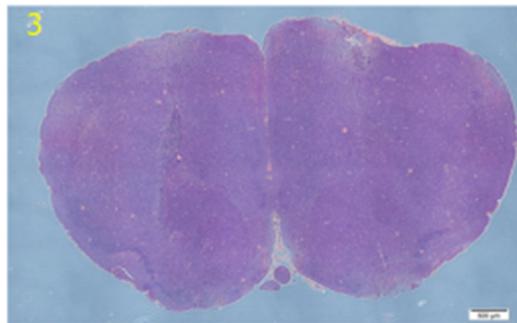
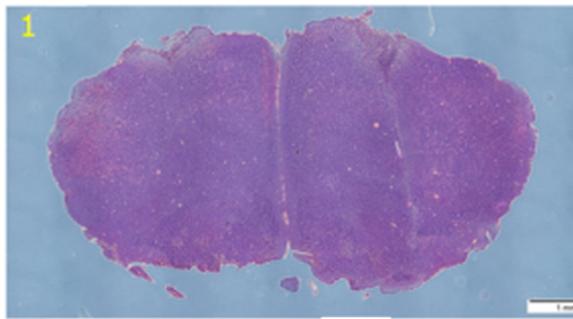
移植部位に腫瘍あり。白っぽい細胞群

線条体移植剖検例

クリューバー・バレラ染色 (KB染色)



HE染色



U251 移植細胞の組織染色

移植細胞	1210B2-NSC proA (P6)								
移植細胞数	1 x 10 ⁶ /片側線条体 x 2 (両側線条体)								
移植部位	両側線条体								
移植動物	NOG 9週齢								
移植日	2015/02/02~2015/02/10								
	凍結融解後の全細胞数	凍結融解後の生細胞数	凍結融解後の生存率	回復培養後の全細胞数	回復培養後の生細胞数	回復培養後の生存率	#	移植細胞数 (片側線条体辺り) x 2	
1	1.4 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	87%	1.6 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	97%	1	0.71 x 10 ⁶	
2	2 x 10 ⁶	1.7 x 10 ⁶	85%	1.1 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶	92%	2	0.71 x 10 ⁶	
3	1.6 x 10 ⁶	1.3 x 10 ⁶	82%	2.0 x 10 ⁶	1.7 x 10 ⁶	86%	3	0.78 x 10 ⁶	
4	1.6 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	72%	1.7 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	89%	4	0.78 x 10 ⁶	
5	1.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	90%	2.5 x 10 ⁶	2.1 x 10 ⁶	80%	5	0.78 x 10 ⁶	
6	1.5 x 10 ⁶	1.3 x 10 ⁶	87%	1.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	89%	6	0.90 x 10 ⁶	
7	1.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	92%	2.1 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁶	96%	7	0.90 x 10 ⁶	
8	2.7 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	93%	2.3 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁶	85%	8	0.57 x 10 ⁶	
9	1.1 x 10 ⁶	0.90 x 10 ⁶	81%	1.6 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	91%	9	0.57 x 10 ⁶	
10	1.2 x 10 ⁶	0.90 x 10 ⁶	75%	1.7 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	81%	10	0.57 x 10 ⁶	
11	1.1 x 10 ⁶	0.95 x 10 ⁶	88%	2.0 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	56%	11	0.46 x 10 ⁶	
12	1.1 x 10 ⁶	0.95 x 10 ⁶	90%	2.0 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶	49%	12	0.46 x 10 ⁶	
13	1.6 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	86%	1.1 x 10 ⁶	0.88 x 10 ⁶	82%	13	0.46 x 10 ⁶	
14	1.5 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	93%	0.99 x 10 ⁶	0.88 x 10 ⁶	91%	14	0.93 x 10 ⁶	
15	1.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	94%	1.1 x 10 ⁶	0.99 x 10 ⁶	95%	15	0.93 x 10 ⁶	
16	0.95 x 10 ⁶	0.85 x 10 ⁶	89%	1.5 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	97%	16	0.93 x 10 ⁶	
17	0.90 x 10 ⁶	0.8 x 10 ⁶	86%	2.3 x 10 ⁶	2.2 x 10 ⁶	96%	17	0.69 x 10 ⁶	
18	1.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	92%	2.1 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁶	96%	18	0.69 x 10 ⁶	
19	1.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	88%	1.4 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	94%	19	0.69 x 10 ⁶	
20	1.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	90%	1.5 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	91%	20	0.75 x 10 ⁶	
21	1.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	91%	1.6 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁶	89%	21	0.75 x 10 ⁶	
22	1.2 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	93%	1.7 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	92%	22	0.75 x 10 ⁶	
23	1.2 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	100%	1.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	96%	Ave	0.72 x 10 ⁶	
24	1.1 x 10 ⁶	0.95 x 10 ⁶	90%	1.8 x 10 ⁶	1.8 x 10 ⁶	98%			
Ave	1.4 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	88%	1.7 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶	88%			

< 1210B2 株由来神経前駆細胞 移植細胞数一覧 2015年 3月30日時点 >

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

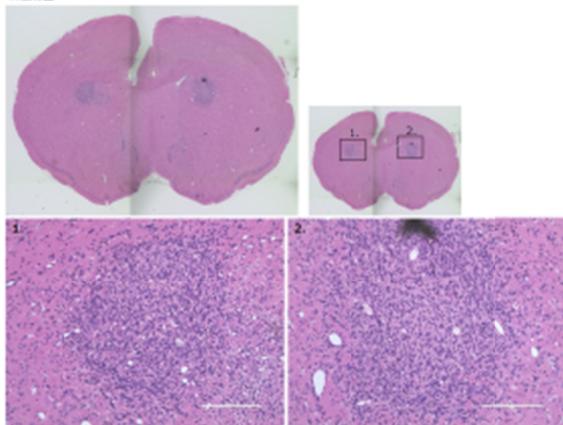
NOG150 慶応プロトコール

U251 1×10^2 移植
移植より27週観察。

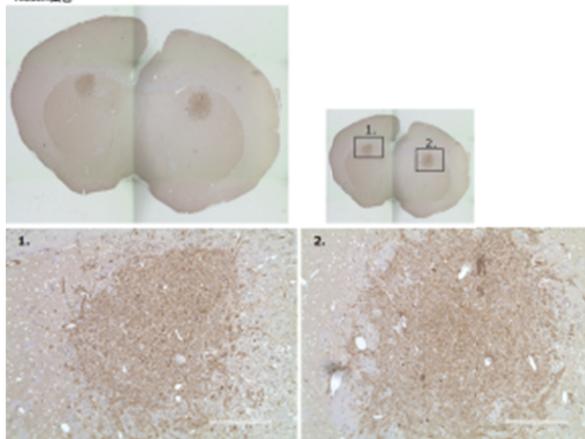


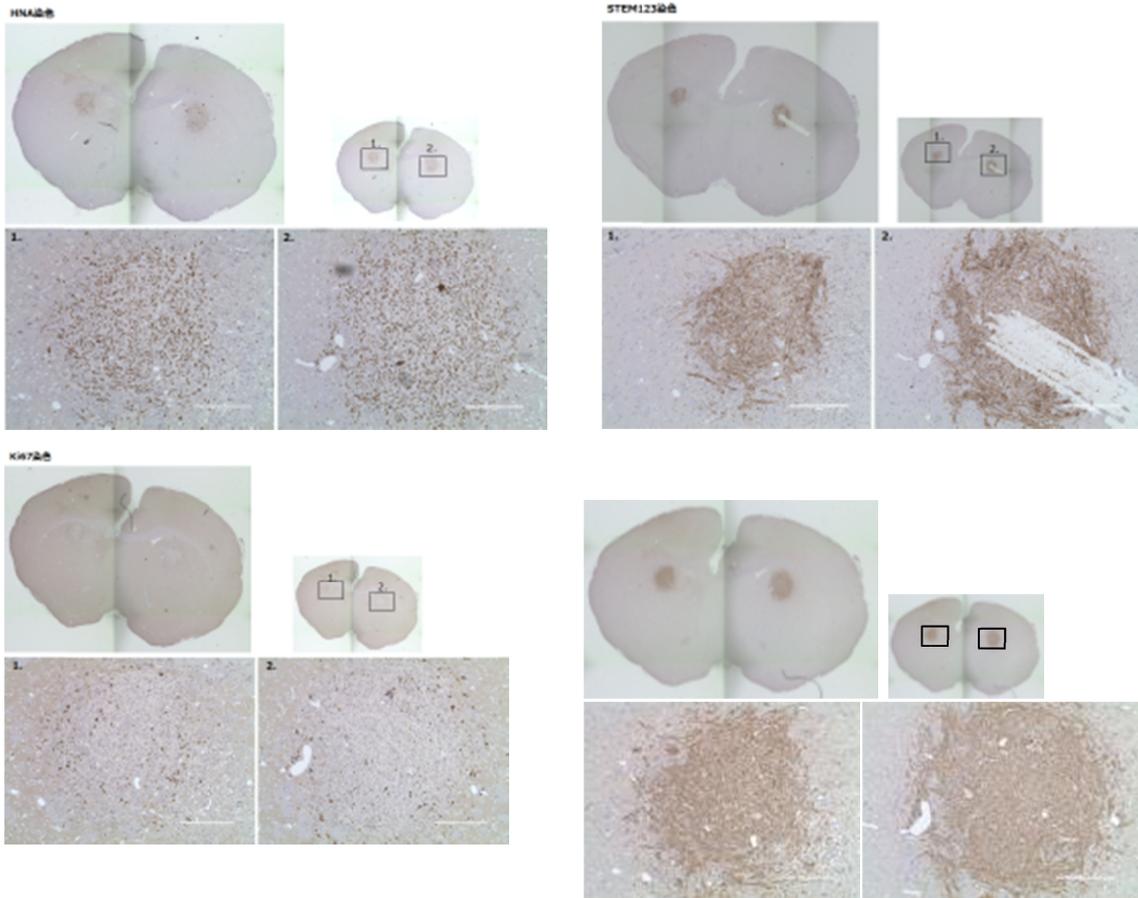
両マウスともに顕著な脳肥大が観察されたため、観察予定期間である12ヶ月以前の27週目で殺処分。剖検による観察のみ行った。切片依頼せず。

HE染色



Neotin染色





1210B2 株由来神経前駆細胞の移植細胞の組織像。上段左 HNA 染色、右 STEM 123 染色
 下段 左 Ki67 染色、右 STEM 123 染色。