

201406019A

厚生労働省科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明と
その克服に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 早川 堯 夫

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働省科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明と
その克服に関する研究

平成 26 年度 総括分担研究報告書

研究代表者 早 川 堯 夫

平成 27 (2015) 年 3 月

目次	頁
I. 総括研究報告	
ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明とその克服に関する研究 早川 堯 夫	1
II. 分担研究報告	
1. 各種細胞調製と特性評価 早川 堯 夫	51
2. 細胞・腫瘍の各種分子生物学的評価手法の開発と活用およびモデル動物による 腫瘍形成と病理学的評価 佐藤 陽 治 安田 智	79
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	105
IV. 研究成果の刊行物・別刷	108

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
「再生医療早期実用化促進及び汎用性向上のための周辺基盤技術開発」

総括研究報告書

ヒト幹細胞の造腫瘍性における病態解明とその克服に関する研究

研究代表者：早川 堯夫 近畿大学薬学総合研究所 所長・特任教授

研究要旨

ヒト iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞が従来の医療の壁を越える製品を生み出し、病に苦しむ患者に光明をもたらす可能性が大きく期待されている。しかし、iPS/ES 細胞などから各種の革新的医療製品を開発していく際には、これら多能性幹細胞の特性である造腫瘍性にかかわるリスク対策を講ずる必要があり、これが実用化促進の最大の隘路の一つとされている。この造腫瘍性のリスク対策には、リスクの量的把握と質的把握が必要であるが、いずれも世界的に十分な検討がなされていない。わが国がこれらの問題解決に必要な技術基盤を世界に先駆けて構築できれば、ヒト iPS/ES 細胞や由来製品に関する研究開発の先駆性と併せ、再生医療実用化における国際的な優位性を確保できると期待される。本研究では、主に造腫瘍性リスクの質的把握に関して、とくに、原材料としての各種ヒト iPS/ES 細胞の造腫瘍性に関する発生頻度、悪性度とその機序、その検査方法の観点から検討し、対応策等の研究開発を行うことを目的としている。

我々はこれまで、形質が比較的安定なヒト脂肪組織由来幹細胞の作製、およびこの細胞由来の iPS 細胞の作製に至っている。また、ヒト多能性幹細胞は、酵素処理等により単一細胞にまで分散するとアポトーシスを起こすというユニークな性質をもつことが知られていることから、この「分散誘導性アポトーシス」を回避しつつ、NOG マウスにおいて高い生着性と再現性をもってヒト多能性幹細胞の造腫瘍性の評価のための試験プロトコルの検討を行ってきた。NOG マウスは、種差を超えてヒト細胞の腫瘍性細胞に対して免疫拒絶なく、高い生着率で腫瘍形成が期待できる、現在、最も免疫学的に不全なモデル動物で研究協力者となる実験動物中央研究所が独自に開発したものである。その結果、ヒト多能性幹細胞をヒト新生児由来繊維芽細胞および ROCK 阻害剤とともにマトリゲルに懸濁して背部皮下に投与するという方法を用いることで、100 個程度の少量の iPS 細胞の移植によっても腫瘍形成が観察されることを明らかにした。なお、ヒト多能性幹細胞の生着性・造腫瘍性向上はヒト新生児由来繊維芽細胞に特異的であり、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞との同時投与では ROCK 阻害剤およびマトリゲル共存下においても全く観察されないことも明らかにした。これらの結果を受け、平成 26 年度は主に、本研究課題の達成に必要な各種ヒト iPS 細胞を調製し、NOG マウス投与実験に供する被検細胞の充実を行うこと、ならびにそれらの性状解析を行った。また、すでに取得済みの iPS 細胞を用いて、初期化遺伝子の存在（量）その他の細胞特性を解析し、NOG マウスに移植して腫瘍を形成させることでその発生頻度を相互比較した。その結果、健常ヒトからの脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を材料とした iPS 細胞を複数株樹立することに成功し、これらの iPS 細胞株が三胚葉系への分化誘導能を有し、肝細胞、心筋細胞、

メラノサイト、ケラチノサイト、神経細胞（ドパミン産生細胞）へと高効率に分化誘導できることを確認した。また、軽度の皮膚疾患由来 ASC から樹立した iPS 細胞株の一つでは肝細胞、心筋細胞、神経幹細胞へ分化誘導した際、LIN28 遺伝子の発現が認められた。一方、メラノサイトやケラチノサイトへの分化誘導においては、LIN28 遺伝子の発現が認められなかった。今後はこれらの細胞を NOG マウスへ投与し、*in vivo* において詳細な造腫瘍性リスクについて検討を行う予定である。次に、重度免疫不全マウスである NOG マウスに種類および起源の異なる各種ヒト iPS 細胞 10 株を移植し、腫瘍（結節）を形成させることで、その発生頻度やサイズの相互比較、および、移植するヒト iPS 細胞について造腫瘍性リスクとの関連が示唆されている核型解析、さらに網羅的な遺伝子発現データをマイクロアレイによって取得し、移植細胞の特性解析を行った。その結果、 3×10^4 個の細胞移植時の NOG マウスにおけるヒト iPS 細胞の腫瘍形成率は細胞株で大きく異なり ($58 \pm 30\%$)、株間で生着にばらつきがあることが明らかになった。また移植した iPS 細胞の 10 株中 2 株に、多能性幹細胞に頻出する 12 番染色体のトリソミーが観察された。細胞株の網羅的な遺伝子発現プロファイルをもとに階層的クラスタリングを行った結果、作製方法と作製元による株間の類似性に加えて、核型異常を示した 2 株においても株間の類似性が認められた。今後は、本年度に得られた知見に加えて、病理学的な解析等により形成腫瘍の悪性度の評価を行い、腫瘍の形成率や悪性度等に関係する細胞特性指標の探索を行う予定である。

分担研究者（順不同）

佐藤 陽治

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 部長

安田 智

国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部第三室 室長

研究協力者（順不同）

堤 秀樹

(公財)実験動物中央研究所 試験事業部 部長

草川 森士

公益財団法人 先端医療振興財団 細胞療法開発事業部門 研究員

浦野 浩司

公益財団法人 実験動物中央研究所 試験事業部 室長

町田 一彦

公益財団法人 実験動物中央研究所 試験事業部 研究員

森山 博由

近畿大学 薬学総合研究所 准教授

森山 麻里子

近畿大学 アンチエイジングセンター 客員准教授

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞が従来の医療の壁を超える製品を生み出し、病に苦しむ患者に光明をもたらす可能性が大きく期待されている。しかし、iPS 細胞や ES 細胞などから各種の革新的再生医療製品を開発していく際には、これら多能性幹細胞の特性である造腫瘍性にかかわるリスク対策を講ずる必要があり、これが実用化促進の最大の隘路の一つとされている。この造腫瘍性のリスク対策には、リスクの量的把握と質的把握が必要であるが、いずれも世界的に十分な検討がなされていない。わが国がこれらの問題解決に必要な技術基盤を世界に先駆けて構築できれば、ヒト iPS/ES 細胞や由来製品に関する研究開発の先駆性と併せ、再生医療実用化における国際的な優位性を確保できると期待される。

本研究では、主に造腫瘍性リスクの質的把握に関して、とくに、原材料としての各種ヒト iPS 細胞及び ES 細胞の造腫瘍性に関する発生頻度、悪性度と機序、その検査方法の観点から検討し、対応策等の研究開発を行うことを目的としている。具体的な戦略としては、まず、各種のヒト iPS 細胞及び ES 細胞を調製し、初期化遺伝子の存在（量）その他の細胞特性を解析するとともに、NOG マウスに移植して腫瘍を形成させ、その発生頻度を相互比較する。NOG マウスは、種差を超えてヒト細胞の腫瘍性細胞に対して免疫拒絶なく、高い生着率で腫瘍形成が期待できる、現在、最も免疫学的

に不全なモデル動物であり、実験動物中央研究所において開発されたものである。ヒト iPS 細胞及び ES 細胞の特性解析プロトコール、および NOG マウスへの移植試験プロトコールを確立した後、各細胞からの形成された腫瘍の特性について、「良性か悪性か」や「悪性度」を含めて、病理学的手法や各種分子生物学的手法を駆使して解析し、悪性度等とその他の細胞特性指標の関係を検討する。また、iPS 細胞の培養条件の差異や製品細胞の移植部位の微小環境が移植時の奇形腫の悪性化に関与する可能性を検証する。これらをふまえて、腫瘍の悪性度に関する検査方法を確立するとともに、より安全な原材料としての多能性細胞を選択すべく対策を講ずることを予定している。平成 26 年度の本研究においては、樹立の際に用いた細胞種と作製法が異なる各種ヒト iPS 細胞を、NOG マウスに移植し腫瘍（結節）を形成させることで、その発生頻度やサイズを相互比較し、細胞株により腫瘍形成速度が異なることなどを観察した。

B. 研究方法

本研究の主な課題の一つは、ヒト iPS/ES 細胞株などの多能性幹細胞に由来する腫瘍の発生頻度、悪性度と機序、検査法の検討である。そのため、まず、様々なヒト多能性幹細胞株を調製し、それらの特性解析を行い、重度免疫不全動物 NOG マウスに投与し、腫瘍（奇形腫）形成をモニターすることにより、どのような特性指標を持つ細胞が腫瘍形成やその悪性度にどのような影

響を及ぼすかの検討を行おうとしている。そのため26年度は、造腫瘍性リスクの質的把握に関して、とくに、原材料としての各種ヒト iPS 細胞及び ES 細胞の造腫瘍性に関する発生頻度、悪性度と機序、その検査方法の観点から検討し、対応策等の研究開発を行った。

B-1. 健常および皮膚疾患患者からのヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の樹立と培養

健常および皮膚疾患患者からのヒト皮下脂肪組織は形成外科時の余剰部位として、インフォームドコンセントを十分に行い供与を受けた。研究プロトコルは近畿大学薬学総合研究所、公益財団法人先端医療振興財団、神戸大学病院、大阪市立大学医学部の倫理委員会によって承認されている。新規ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (hypoxia-induced human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Hx-hASC) は、以下のように調製した。ヒト脂肪組織は細かく切り刻んだ後、0.3 units/mL のコラゲナーゼ溶液中で 37°C、1 時間振盪し消化させた。消化物はセルストレイナーで漉した後、600 g で 10 分間遠心した。沈殿物を PBS で再懸濁し、赤血球を Lymphoprep (密度 1.077) で除去した後、DMEM に 10% ウシ胎児血清を加えた培地で培養した。24 時間後、浮遊細胞を除去するためにリン酸緩衝液で洗浄した後、低酸素濃度下で培養した。使用した培地は Knockout DMEM (Life Technologies 社)、

10 ng/mL epidermal growth factor (ペプロテック社)、10% ウシ胎児血清である。細胞は 4×10^3 細胞/cm² になるように培養ディッシュに播種し、2 日おきに培地交換を行った。

B-2. iPS 細胞の樹立

レンチウイルスを用いた山中 4 因子の導入には、pLM-fSV2A (Addgene より購入) を用いた。pLM-fSV2A、pCMV-VSVG-HSV-Rev、pCMV-HIVgp (理研 三好先生より供与された) を 293T 細胞に導入し、レンチウイルスベクターを作成し、Hx-hASC に感染させた。レトロウイルスを用いた山中 4 因子の導入には、pMX-hOCT4、pMX-hcMYC、pMX-hSOX2、pMX-hKLF4、pCMV-VSVG を Platinum-GP Retroviral Packaging Cell Line (Cell BioLabs 社) に導入し、レトロウイルスベクターを作製し、Hx-hASC に感染させた。エピゾーマルベクターを用いた山中因子の導入は以下のように行った。HxhASC に pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、pCXWB-EBNA1 (Addgene より購入) を Nucleofector 4D (ロンザ社) を用いて導入した。遺伝子導入した Hx-hASC はコンフルエントになった後、マトリゲル (コーニング社) でコートした 6 ウェルプレートに播種した。遺伝子導入後 2 日目に、hASC 用培地: mTeSR1 (Stem Cell Technologies 社) 1:1 培地に置き換え、3 日目に Hx-hASC 培地: mTeSR1 1:3 培地に置き換え、4 日目

に mTeSR1 培地に置き換え、以後毎日 mTeSR1 で培地交換した。遺伝子導入後約 18 日後、iPS のコロニーを顕微鏡下で拾い、マトリゲルコートしたディッシュで培養を行った。

B-3. iPS 細胞株からの分化誘導法

胚様体を介した三胚葉系への分化誘導は以下の様に行った。HEMA-MAA コートしたディッシュに iPS 細胞塊を播種し、20% Knockout Serum Replacement (KSR), 2 mM L-glutamine, 100 μ M nonessential amino acids, 500 μ M monothioglycerol, 1 \times anti-B/M 含有 DMEM/F12 培地で 8 日間浮遊培養を行い、胚様体を作製した。その後、ゼラチンコートしたディッシュに胚様体を付着させ、20% Knockout Serum Replacement (KSR), 2 mM L-glutamine, 100 μ M nonessential amino acids, 500 μ M monothioglycerol, 1 \times anti-B/M 含有 DMEM/F12 培地で 8 日間培養を行った。iPS 細胞から肝細胞への分化誘導は以下の様に行った。1 \times B27, 100 ng/mL Activin A 含有 RPMI1640 で 5 日間培養後、1 \times B27, 20 ng/mL BMP4, 10 ng/mL bFGF 含有 RPMI1640 で 4%酸素濃度下、5 日間培養した。さらに、1 \times B27, 20 ng/mL HGF 含有 RPMI1640 で 4%酸素濃度下、5 日間培養した。iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導は以下の様に行った。iPS が 100%コンフルエントに達してから、培地を 1 \times B27 (insulin 非添加), 5 μ M CHIR99021 含有 RPMI1640

に交換し、分化誘導を開始、24 時間後、培地を 1 \times B27 (insulin 非添加)含有 RPMI1640 に交換し、2 日間培養した。分化 3 日目、培地を 1 \times B27 (insulin 非添加), 12 μ M IWP4 含有 RPMI1640 に交換し、さらに 24 時間後、培地交換し、24 時間後、培地を 1 \times B27 (insulin 非添加) 含有 RPMI1640 に交換、24 時間後に培地交換を行う。分化 7 日目、培地を 1 \times B27 (insulin 添加) 含有 RPMI1640 に交換し、以後 3 日ごと、拍動細胞が現れるまで培地交換を行った。iPS 細胞からメラノサイトへの分化誘導は以下の様に行った。iPS 細胞を 50~70%コンフルエントになるくらいまで培養し、500 nM LDN193189, 10 μ M SB431542 含有 KSR 培地 (15%KSR, 1 \times L-Glutamine, 1 \times anti-B/M, 100 μ M nonessential amino acids, 500 μ M Monothioglycerol) に置き換える。分化誘導 2 日目、500 nM LDN193189, 10 μ M SB431542, 3 μ M CHIR99021 含有 KSR 培地に培地交換し、分化誘導 3 日目、10 μ M SB431542, 3 μ M CHIR99021 含有 KSR 培地に置き換えた。さらに分化誘導 4 日目、75% KSR 培地, 25% N2 培地 (1 \times ITS, 100 μ M Putrescine, 20 nM Progesterone 含有 DMEM/F12), 3 μ M CHIR99021 に置き換え、分化誘導 6 日目、50% KSR 培地, 50% N2 培地, 3 μ M CHIR99021, 25 ng/mL BMP4, 100 nM EDN3 に置き換えた。分化誘導 8 日目、25% KSR 培地, 75% N2 培地, 3 μ M CHIR99021, 25 ng/mL BMP4, 100 nM EDN3 に置き換え、分化誘導 10 日目 3 μ M CHIR99021, 25 ng/mL BMP4, 100 nM

EDN3 含有 N2 培地に置き換えた。分化誘導 11 日目、accutase で細胞を剥がし、poly-ornithine, laminin, fibronectin (PO/Lam/FN)コーティングプレートに細胞を播種した。培地は NB/MeI 培地を使用し、2 日ごとに培地交換した。iPS 細胞からケラチノサイトへの分化誘導は以下の様に行った。iPS を継代後、1 μ M all-trans retinoic acid, 10 ng/mL BMP4 含有 CnT-02 培地 (CellnTec 社) に置き換え、その 2 日後、培地交換を行った。さらにその 2 日後、CnT-02 培地へ置き換え、以後 3 日ごとに培地交換を行った。iPS 細胞から神経系への分化誘導は、PSC Neural Induction Medium (Life Technologies 社) を使用し、Life Technologies 社のプロトコルに則って行った。

B-4. 免疫染色法

iPS 細胞を 4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で固定し、2%スキムミルク、0.1% TritonX-100 含有 PBS で 1 時間ブロッキングした後、ウサギ免疫抗 tubulin- β 3 抗体 (CST 社; 1/1000)、マウス免疫抗 α SMA 抗体 (SIGMA 社; 1/500)、マウス免疫抗 AFP 抗体 (SIGMA 社; 1/1000)、マウス免疫抗 HNF-3 β 抗体 (abcam 社; 1/50)、ヤギ免疫抗 SOX17 抗体 (R&D systems 社; 1/20)、マウス免疫抗 Troponin-T 抗体 (Thermo Scientific; 1/200)、マウス免疫抗 MITF 抗体 (abcam 社; 1/1000)、ヤギ免疫抗 TRP2 抗体 (Santa Cruz 社; 1/1000)、マウス免疫抗 MART1 抗体 (Zymed 社; 1/100)、ヤギ免疫抗 PAX3 抗体 (R&D

systems 社; 1/40)、ウサギ免疫抗 K14 抗体 (Covance 社; 1/1000)、ウサギ免疫抗 Involucrin 抗体 (Covance 社; 1/1000)、ウサギ免疫抗 Loricrin 抗体 (Covance 社; 1/1000)、ニワトリ免疫抗 MAP2 抗体 (abcam 社; 1/10000)、ウサギ免疫抗 TH 抗体 (NOVUS Biological 社; 1/1000) を加え、4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトでインキュベートした。二次抗体は Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体、Alexa488 標識抗ニワトリ IgG 抗体、Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa546 標識抗ウサギ IgG 抗体、Alexa546 標識抗ヤギ IgG 抗体 (いずれも Life Technologies 社; 1/1000) を用いた。核は DAPI で染色し、観察、撮影は BioRevo (キーエンス社) で行った。

B-5. フローサイトメトリ解析

細胞を Accutase で回収し、FACS 染色液 (1% BSA, 2 mM EDTA, 0.1% アジ化ナトリウム含有 PBS) に懸濁し、BV421 標識抗 CD271 抗体、APC 標識抗 CD57 抗体 (全て BioLegend 社) で染色を行った。死細胞は Live/Dead Fixable Green Dead Cell Stain (ライフテクノロジー社) により除去した。解析は EC800 (SONY 社) を用いて行った。

B-6. 定量的 PCR

iPS 細胞と分化誘導後の細胞からの Total RNA は、RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した。方法は Qiagen 社のプロトコルに準拠した。

cDNA 合成は Verso cDNA Synthesis Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック社)を用い、プロトコルに準拠して行った。得られた cDNA は SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad 社)を用い、CFX96 で定量的 PCR に供した。使用したプライマーは表 1 に示した。

B-7 使用動物

本実験に用いた SPF の NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic (NOG マウス)およびは日本クレアから入手し、公益財団法人 実験動物中央研究所のバリア区域内の専用飼育室内で飼育した。NOG マウスは、6 週齢の雄を搬入し、1-2 週間の馴化期間の後に細胞の移植を行った。ケージはマウス Hi-TPX ケージ (日本クレア、155×245×148mm) を使用し、ケージ内動物数は最高 3 匹、ケージ交換回数は週 1 回、給餌方法は自由摂取とした。

B-8 ヒト iPS 細胞移植試験

本年度は、既に取得済みの種類および起源の異なる各種ヒト iPS 細胞 10 株のヒト健常細胞由来 iPS 細胞株 (201B7、253G1、409B2、454E2、ATCC-DYR0100、ATCC-HYR0103、mc-iPS、HiPS-RIKEN-1A、HiPS-RIKEN-2A、および HiPS-RIKEN-12A) を用いた。201B7、253G1、409B2、454E2、HiPS-RIKEN-1A、HiPS-RIKEN-2A および HiPS-RIKEN-12A は、理研バイオリソースセンターより入手した。ATCC-DYR0100

および ATCC-HYR0103 は、ATCC より入手した。mc-iPS は、System Biosciences より入手した。iPS 細胞作製に用いたヒト健常細胞およびその iPS 細胞作製法は表 2 で示した。フィーダー細胞を用いた iPS 細胞培養は、マイトマイシン C (和光純薬) 処理した SNL 細胞 (マウス線維芽細胞 STO 株にネオマイシン耐性遺伝子および LIF を発現させた細胞) 上において、4 ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF、和光純薬) を添加したヒト ES 細胞培地 (リプロセル) 中で培養することにより行った。フィーダーレスのヒト iPS 細胞培養は、マトリゲル (Corning) でコートしたディッシュまたはフラスコ内で、mTeSR1 培地 (STEMCELL Technologies) にて培養した。ヒト iPS 細胞は、オンフィーダー培養からフィーダーレス培養に切り替え、フィーダーレスの状態ですべて 3 回継代することで馴化させた後、動物への投与に用いた。

健常ヒト繊維芽細胞 (Neonatal Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF) は、Lonza 社のものを購入し、10% ウシ胎児血清と抗生物質 (ペニシリン/ストレプトマイシン) を含む MEM 培地で培養・継代した。NHDF は、移植日前日にマイトマイシン C を培地に 10 µg/ml の濃度で添加し、37℃/5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベートすることで、分裂増殖を停止させる処理を施した。

ヒト iPS 細胞の造腫瘍性試験は、平成 25 年度の本課題報告書において我々が最適化した Grop らの報告 (PLoS ONE 2012;

7(9): e45532.) を参考とした方法で行った。iPS 細胞は、Accutase (Life Technologies) を用い、単一細胞までの分散処理を施し、mTeSR1 培地で懸濁し細胞数を調整した。一方、NHDF はトリプシン/EDTA を用いて分散処理を施し、mTeSR1 培地で懸濁し細胞数を調整した。移植に際しては、ROCK 阻害剤である Y-27632 (和光純薬) を 10 μ M 含む培地とマトリゲルで 1:1 の割合で構成された 100 mL の細胞懸濁液を、無麻酔で保定した状態のマウスの後背部皮下に 25G の注射針を付けたシリンジで移植した。NHDF 10⁶ に対し、3 x 10⁴ の iPS 細胞を混入させた細胞懸濁液をマウスへ移植し、触診およびサイズ測定による結節形成の観察を 16 週間行った。結節体積 (V) は、結節の長径 (a) と短径 (b) から、 $V = 1/2 \times ab^2$ の計算式より算出した。結節体積が 1000 mm³ を超えた場合は、16 週間が経過していても、サンプル採取を行った。移植群は以下の 10 群からなる：①253G1 株、②HiPS-RIKEN-2A 株、③409B2 株、④mc-iPS 株、⑤201B7 株、⑥HiPS-RIKEN-1A 株、⑦HiPS-RIKEN-12A 株、⑧ATCC-DYR0100 株、⑨ATCC-HYR0103 株、⑩454E2 株で、一群各 6 例行った。

B-9 核型解析

iPS 細胞のコロニーを培養 (2~5 日) し、増殖中の細胞に分裂阻害剤コルセミドを添加し、中期分裂細胞を回収し、低張処理と固定の後、標本作製を行った。スライ

ド標本作製後、G 分染法 (トリプシンとギムザ染色液を用いて分染を行う) で染色した標本を分析した。分析後の核型表記は ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature) の表記法に準じて行った。

B-10 マイクロアレイ解析および統計解析

マイクロアレイ解析は、各細胞株あたり 3 サンプルで行った。iPS 細胞株 10 種類を未分化の状態、6-well プレート (BD Bioscience) にフィーダーレス条件下で 6~7 日間培養したのち、RNeasy mini kit (キアゲン) を用いて total RNA を抽出した。各 RNA の品質評価は Agilent RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) を用いて、28S と 18S の rRNA 比率を算出することにより純度を確認した。RNA サンプルのビオチンラベル化 cRNA 合成は、GeneChip 3' IVT Express kit (Affymetrix) を用いて、製品プロトコールに従い行った。GeneChip Hybridization Oven (Affymetrix) を用いて、Genechip アレイ Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) に作製したビオチンラベル化 aRNA をハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、GeneChip Wash and Stain Kit (Affymetrix) と GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) を用いて洗浄とフィコエリスリン染色を行った。その後、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) を用いて Genechip アレイの蛍光画像をス

キャンし、イメージ画像を取得した。得られた蛍光強度のデータは Expression Console Ver.1.1 (Affymetrix) を用いて解析した。シグナルのノーマライズは MAS5 アルゴリズム、および MSK ファイル (Affymetrix) を用いて行った。この際、Target Intensity は 500 に設定した。細胞株 10 種類のうちで発現量に有意な差のある遺伝子を抽出するために、以下の 3 種類のフィルターをかけることにより統計解析を行った。

フィルター①：遺伝子の発現が見られる probe set を選ぶために、アレイシグナルの Absolute Analysis (発現の有無を判定する解析) の結果、各細胞株のうち 2/3 以上で遺伝子発現あり (Present) と判断されること。

フィルター②：蛍光シグナルの値が閾値 (1.7) 以上である細胞株が 1 株以上あること。

フィルター③：細胞株による遺伝子発現の差を比較するためには細胞株間で差があるものを選ぶ必要があるため、一元配置分散分析 (One-Way ANOVA) において細胞株間の遺伝子発現の平均値の比較を行ったとき、有意水準 5% の条件で帰無仮説が棄却できること。

フィルター④：細胞株間での差が小さいと遺伝子発現に相関が無いものまで相関があるとして検出されてしまう危険性があるため、10 細胞株の最低の平均値と最高の平均値の差が 5 倍以上あること。

細胞株間の遺伝子発現プロファイル

の類似性を検討するため、上記のフィルターにより抽出された probe set 3777 個において、SYSTAT 13 ソフトウェア (HULINKS) を用いた階層的クラスタリングを行った。解析は、Distance Metric として Euclidean Distance を用い、Ward Minimum Variance Method によって行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、近畿大学薬学総合研究所の動物実験指針、研究倫理審査委員会規程等にある倫理面の審査・承認に係る一切の研究項目に該当しない。また、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞及びヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞由来 iPS 細胞はヒト検体より得られるが、検体提供元での倫理委員会にて近畿大学薬学総合研究所との共同研究を明記した倫理審査で研究が認められている。また、今回の研究実施用途から考えて、上述以上、特段に倫理面への配慮に該当するような事項はないと考えられる。

動物実験を行う際には、国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」および公益財団法人実験動物中央研究所「動物実験等に関する規程」に基づき、実験内容の審査と承認をうけた上で実施した。指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施した。また、ヒト由来の生体試料を用いる場合は、国立医薬品食品衛生研究所「研究倫理審査委員会規程」を遵守した上で研究を実施した。

C. 研究結果

C-1. 健常および皮膚疾患患者からの新規ヒト脂肪組織由来幹細胞由来 iPS 細胞の作製

昨年に引き続き、健常ヒト由来 Hx-ASC および皮膚疾患患者由来 Hx-ASC への単一レンチウイルスベクターによる山中 4 因子の導入、ならびにエピゾーマルベクターによる山中 4 因子の導入により、iPS 細胞株を作製した。その結果、皮膚疾患患者由来 iPS 細胞株は 4 株、健常ヒト由来 iPS 細胞株は 10 株樹立することに成功した。それらの iPS 細胞株は Oct3/4、Nanog、LIN28A、TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-3、SSEA-4、E-Cadherin 陽性であることが、免疫染色、フローサイトメトリー解析、ならびに定量的 PCR によって示された。さらに、胚様体を介した三胚葉系への分化誘導により、外胚葉、中胚葉、内胚葉いずれの胚葉にも分化誘導可能であることが示された (図 1)。

C-2. 樹立 iPS 細胞株の特性解析

C-2-1. 肝細胞への分化誘導

健常ヒト由来 iPS 細胞株 1 株、ならびに皮膚疾患患者由来 iPS 細胞株 1 株を肝細胞へと分化誘導した。分化誘導後 15 日目に、未分化性マーカーである *OCT4A*、*NANOG*、*LIN28A* の定量的 PCR を行ったところ、1 つの株ではやや未分化マーカーの発現残存が認められたが、有意な発現低下が確認された (図 2A)。また、*FOXOA2*、*ALB*、*AFP*

遺伝子に対する定量的 PCR ならびに *FOXA2*、*SOX17*、*AFP* に対する免疫染色で肝細胞への分化誘導を確かめたところ、いずれにおいても肝細胞への分化誘導が確認された (図 2B, C)。

C-2-2. 心筋細胞への分化誘導

健常ヒト由来 iPS 細胞株 1 株、ならびに皮膚疾患患者由来 iPS 細胞株 1 株を心筋細胞へと分化誘導した。分化誘導後 10 日目より拍動する細胞が見られ始め、分化誘導後 16 日目にはほぼすべての細胞で拍動が確認された (データ非掲載)。 *NKX2.5* 遺伝子に対する定量的 PCR で心筋細胞への分化誘導を確かめたところ、 *NKX2.5* 遺伝子の著しい発現を認めた (図 3A)。さらに、免疫染色により、Troponin-T による横紋様の染色像を得た (図 3C)。また、未分化性マーカーである *OCT4A*、*NANOG*、*LIN28A* の定量的 PCR を行ったところ、1 つの株ではやや未分化マーカーの発現残存が認められたが、有意な発現量低下が確認された (図 3B)。

C-2-3. メラノサイトへの分化誘導

健常ヒト由来 iPS 細胞株 2 株をメラノサイトへと分化誘導した。分化誘導後、11 日目にフローサイトメトリー解析を行ったところ、神経堤マーカーである *CD271* (*NGFR/p75*)、*CD57* (*HNK-1*) の発現が確認された (図 4A)。また、分化誘導後、26 日目で未分化性マーカーである *OCT4A*、*NANOG*、*LIN28A* の定量的 PCR を行った

ところ、メラノサイト分化誘導後にはこれら未分化性マーカーの顕著な発現量低下が確認された (図 4B)。また、免疫染色を行ったところ、DCT, MITF-M, MART-1, PAX3 の発現が確認され (図 4C)、メラニンの産生も認められた (図 4D) ことから、これらの iPS 細胞株は効率良くメラノサイトへと分化誘導されたことが示された。

C-2-4. ケラチノサイトへの分化誘導

健常ヒト由来 iPS 細胞株 1 株、ならびに皮膚疾患患者由来 iPS 細胞株 1 株を表皮ケラチノサイトへと分化誘導した。分化誘導後 30 日目、免疫染色により、ケラチン 14, インボルクリン、ロリクリンの染色像を得たことから、iPS 細胞がケラチノサイトへ分化したことが示された (図 5A)。また、*KRT14*, *IVL*, *SPRR2A* 遺伝子に対する定量的 PCR でケラチノサイトへの分化誘導を確かめたところ、これら遺伝子の著しい発現を認めた (図 5B)。さらに、未分化性マーカーである *OCT4A*, *NANOG*, *LIN28A* の定量的 PCR を行ったところ、いずれの遺伝子も著しく発現量の低下が認められ、*LIN28A*, *OCT4A* に関しては検出限界以下であることが分かった (図 5C)。

C-2-5. 神経細胞への分化誘導

健常ヒト由来 iPS 細胞株 1 株を神経幹細胞へと分化誘導した。分化誘導後 7 日目、*NES*, *NEFM*, *TUBB3* 遺伝子に対する定量的 PCR で神経系への分化誘導を確かめたところ、これら遺伝子の著しい発現を認めた

(図 6A)。また、未分化性マーカーである *OCT4A*, *NANOG*, *LIN28A* の定量的 PCR を行ったところ、*LIN28A* のみ発現残存が認められたが、基本的にはこれら遺伝子の有意な発現低下が確認された (図 6A)。また、この神経幹細胞をさらに分化誘導したところ、免疫染色により、*MAP2*, *TH* の染色像を得たことからこれらの細胞がドパミン産生細胞へ分化したことが示された (図 6B)。

C-3 iPS 細胞移植試験

本研究では、T 細胞、B 細胞および NK 細胞を欠損する重度免疫不全マウスモデルである NOG マウスにおいて、各種ヒト iPS 細胞株の生着性の差異を検討するため、結節形成の有無およびそのサイズを経時的に観察した。本実験では、ヒト iPS 細胞を投与する際の条件として、線維芽細胞、マトリゲルおよび Rho キナーゼ阻害剤を混合させた。線維芽細胞と細胞外マトリックスタンパク質を多く含むマトリゲルは、足場依存性増殖を示す細胞の生着性を上昇させることが知られている。またヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に酵素処理等で単一細胞まで分散するとアポトーシスを起こすという特性を有しており、Rho キナーゼ阻害剤は多能性幹細胞のアポトーシス抑制効果を示すことが報告されている。クランプの状態ではなく、単一細胞に分散させたヒト iPS 細胞の NOG マウスへの生着が可能になったことで、高感度でより定量性のあるヒト多能性幹細胞の造腫瘍性試験を

行うことができる。今回は、国内で一般的に入手可能なヒト iPS 細胞 10 株を移植実験に用いた。投与した iPS 細胞数は 1 匹当たり 3×10^4 個とし、その数は 201B7 株の TPD₅₀ (6.3×10^2) のおよそ 50 倍であり、201B7 株を移植した場合において、ほぼ全数に生着する細胞数と想定される。ヒト iPS 細胞 10 株を NOG マウスに移植し結節形成の観察を行い、現在までに、①253G1 株、②HiPS-RIKEN-2A 株、③409B2 株、④mc-iPS 株においては 14 週間、⑤201B7 株、⑥ HiPS-RIKEN-1A 株、⑦ HiPS-RIKEN-12A 株、⑧ATCC-DYR0100 株、⑨ATCC-HYR0103 株、⑩454E2 株においては 10 週間までの観察結果が得られている。また、移植前の iPS 細胞に関して核型解析を行った。

① 253G1 株

移植後 4 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、7 週目に新たに 4 匹のマウスに結節形成が見られた。14 週目の時点で、結節形成率は 83%であった。結節体積に関しては、1 匹において 12 週目に 1000 mm^3 を超えた結節が認められた。他の 4 匹においては結節の大きさ自体はばらばらについているが、11 週目から大きさが一定となる傾向が見られた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XX[20]であった (図 7)。

② HiPS-RIKEN-2A 株

移植後 5 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、その後新たな結節形成は見られなかった。14 週目の時点で、

結節形成率は 17%であった。結節体積に関しては、1 匹において 8 週目に 1000 mm^3 を超えた結節が認められた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XX[20]であった (図 8)。

③ 409B2 株

移植後 5 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、その後 7 週目に新たな結節形成が 3 匹のマウスに見られた。14 週目の時点で、結節形成率は 50%であった。結節体積に関しては、急激に大きくなる結節はなく、14 週目の時点ですべて 300 mm^3 未満であった。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XX[20]であった (図 9)。

④ mc-iPS 株

移植後 7 週目に最初の結節形成が 4 匹のマウスに認められ、その後、新たな結節形成は見られなかった。14 週目の時点で、結節形成率は 67%であった。結節体積に関しては、 1000 mm^3 を超えた結節はないが、14 週目の時点で $100 \sim 1000 \text{ mm}^3$ とばらつきが認められた。核型解析においては、観察した 20 細胞すべてにおいて 12 番染色体の数が 3 本になるトリソミーが見られ、分析結果は 47,XY,+12[20]であった (図 10)。

⑤ 201B7 株

移植後 6 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、その後、7 週目に 1 匹、9 週目に 3 匹、10 週目に 1 匹のマウスに結節形成が見られた。10 週目の時点で、結節形成率は 83%であった。結節体積に関しては、形成時期の早い結節で体積が大き

い傾向が見られた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XX[20]であった (図 11)。

⑥ HiPS-RIKEN-1A 株

移植後 7 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、9 週目に 2 匹のマウスに結節形成が認められた。10 週目の時点での結節形成率は 50%であった。結節体積に関しては、10 週目の時点ではすべて 300 mm³ 未満であった。核型解析においては、染色体異常は見られず、分析結果は 46,XX[20]であった (図 12)。

⑦ HiPS-RIKEN-12A 株

移植後 9 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスのみ認められた。10 週目の時点での結節形成率は 17%であった。結節体積に関しては、10 週目の時点で 300 mm³ 未満であった。核型解析においては、染色体異常は見られず、分析結果は 46,XY[20]であった (図 13)。

⑧ ATCC-DYR0100 株

移植後 4 週目に最初の結節形成が 1 匹のマウスに認められ、6 週目に 1 匹、7 週目に 1 匹、9 週目に 1 匹、10 週目に 1 匹のマウスに結節形成が見られた。10 週目の時点で、結節形成率は 83%であった。結節体積に関しては、1000 mm³ を超える結節が 2 匹のマウスで認められ、結節の大きさにばらつきが見られた。核型解析においては、染色体異常は認められず、分析結果は 46,XY[20]であった (図 14)。

⑨ ATCC-HYR0103 株

移植後 9 週目に最初の結節形成が 2 匹

のマウスに認められた。10 週目の時点での結節形成率は 33%であった。結節体積に関しては、まだ 1000 mm³ を超えるに至っていない。核型解析においては、染色体異常は見られず、分析結果は 46,XY[20]であった (図 15)。

⑩ 454E2 株

移植後 4 週目に最初の結節形成が 3 匹のマウスに認められ、その後 7 週目に新たな結節形成が 3 匹のマウスに見られた。14 週目の時点で、結節形成率は 100%であった。結節体積に関しては、1 匹のみ 1000 mm³ を超えているが、他の 5 匹に関しては徐々に大きくなる結節が認められた。核型解析においては、mc-iPS 細胞株と同様に、観察した 20 細胞すべてにおいて 12 番染色体のトリソミーが見られ、分析結果は 47,XX,+12[20]であった (図 16)。

①から⑩までの、結節を呈した匹数と供試匹数と結節形成率および核型解析結果を、表 3 と表 4 にまとめた。

各マウスで形成された結節は、それぞれ単離し、4%パラホルムアルデヒド溶液保存または RNAlater (Life Technologies) 溶液中に凍結保存する。今後、パラホルムアルデヒド溶液保存したサンプルについては、病理組織標本を作製し、iPS 移植によって NOG マウスで形成された結節の特性解析を行う予定である。具体的には、結節がヒト細胞由来であること、正常な iPS 細胞生着の指標となる 3 胚葉分化した良性腫瘍 (テラトーマ) であること等を、各種染色法、免疫組織化学的解析によって確認す

る予定である。また RNAlater に保存されたサンプルに関しては、RNA を抽出後、がん関連遺伝子等の定量 PCR を行い、結節の悪性度の評価を分子生物学的に行う予定である。

C-4 iPS 細胞株のマイクロアレイ解析

原材料としての iPS 細胞の造腫瘍性に関する品質評価においては、細胞の *in vivo* 造腫瘍性試験における結節形成率や悪性度に加えて網羅的な遺伝子発現解析等の細胞特性解析を行い、造腫瘍性に関連する細胞特性を把握する必要がある。将来的に造腫瘍性との相関が認められる何らかの因子が同定できれば、その因子の発現量を基に細胞の品質評価を行い、iPS 細胞の細胞加工物/再生医療等製品の原材料としての適格性を評価することが可能となる。

本年度の研究では、まず細胞特性解析の一環として投与した iPS 細胞の網羅的な遺伝子発現解析であるマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現プロファイルにもとづく階層的クラスタリングによる細胞株間の類似性を検討した。細胞株の遺伝子発現プロファイルの類似性において、

1. 409B2 株
2. 454E2 株と mc-iPS 株
3. 201B7 株と 253G1 株
4. HiPS-RIKEN-12A 株、HiPS-RIKEN-1A 株、HiPS-RIKEN-2A 株、ATCC-HYR0103 株と ATCC-DYR0100 株の4つのグループに分けられることが示

された (図 17)。

D. 考察

D-1. 新規ヒト脂肪組織由来幹細胞由来 iPS 細胞の作製

ヒト iPS 細胞/ES 細胞株に由来する腫瘍の発生頻度、悪性度と機序、検査法の検討課題を達成することは、ヒト iPS 細胞等由来製品の製造、品質管理に関わる重要な課題である。特に原材料となるヒト iPS 細胞/ES 細胞の種類及び起源が異なることによる影響を明らかとすることで、ヒト iPS 細胞/ES 細胞由来製品の造腫瘍性リスクの量及び質を把握することが可能となるものと期待される。そこで、既存の様々なヒト iPS 細胞/ES 細胞株 (国立成育医療研究センター、理研 BRC、WiCell 等より入手) に加え、前年度樹立した腫瘍リスクの少ない hASC、Hx-hASC、ならびにこれら細胞より樹立したヒト iPS 細胞株の造腫瘍性リスクを評価すべく、本年度は主に本課題達成に必要なヒト iPS 細胞株の樹立および維持に注力した。

ヒト iPS 細胞/ES 細胞株の特性解析およびプロファイリングについては、上述における Hx-hASC より樹立した初代 iPS 細胞の特性について、その性状を精査し、細胞特性およびプロファイリングの一端を明らかにした。それらの iPS 細胞株は形態学的、多能性幹細胞マーカーの発現のみならず、*in vitro* における三胚葉系への分化能を持つことが示された (図 1)。メチローム解析、核型解析、*in vivo* におけるテラトーム形成

能については検討中である。

D-2. 健常および皮膚疾患患者からの新規ヒト脂肪組織由来幹細胞由来 iPS 細胞の特性解析

健常および皮膚疾患患者から樹立した Hx-hASC 由来 iPS 細胞を、肝細胞 (図 2)、心筋細胞 (図 3)、メラノサイト (図 4)、ケラチノサイト (図 5)、神経細胞 (図 6) へそれぞれ分化誘導し、その分化マーカーの発現や機能について解析を行ったところ、いずれの細胞へにおいても、効率良く機能的な細胞へ分化誘導されることが示された。また、残存する未分化マーカーについて解析を行ったところ、肝細胞 (図 2)、心筋細胞 (図 3) に関しては皮膚疾患患者からの Hx-hASC 由来 iPS 細胞において、健常人由来の iPS 細胞と比較して未分化マーカー、特に LIN28A の残存量が高いことが確認された。この違いが皮膚疾患患者由来 iPS 細胞における造腫瘍性の悪性度あるいは分化抵抗性と関連があるのかは今後の課題である。なお、神経幹細胞への分化誘導では、健常ヒト細胞由来のものでも、LIN28A の有意な残存が認められた。分化抵抗性と関連があるのかは今後の課題である。

一方、メラノサイト (図 4) やケラチノサイト (図 5) への分化誘導後の細胞には、ほとんど未分化マーカーの残存が見られなかった。こうした特性をもつ健常および皮膚疾患患者からの新規ヒト脂肪組織由来幹細胞由来 iPS 細胞がモデル動物への移植により、どのような腫瘍 (結節) 形成状態

を示すのか、興味を持たれる。

D-3. 細胞・腫瘍の各種分子生物学的評価手法の開発と活用およびモデル動物による腫瘍形成と病理学的評価

造腫瘍性に関する細胞株の内因的な性質の差を捉えるためには、移植時の細胞の状態を可能な限り均一な状態に揃える必要がある。昨年度の報告書において、単細胞に分散させたヒト iPS 細胞を、フィーダー細胞として用いられるヒト新生児由来繊維芽細胞、分散誘導性アポトーシスを抑制する ROCK 阻害剤および細胞外マトリックスに富むマトリゲルを同時投与することにより、ヒト iPS 細胞を NOG マウスに移植した際の生着性・造腫瘍性が上昇することを示した。今回は、この至適化を行った投与条件を用いて、種類および起源が異なるヒト iPS 細胞株の NOG マウスへの移植を行い、腫瘍 (結節) 形成のモニターを行った。さらに造腫瘍性リスクとの関連が示唆されている核型解析も移植したヒト iPS 細胞について行い、また移植した細胞の特性解析を行うに当たり、網羅的な遺伝子発現データをマイクロアレイにより取得した。

今回の移植に用いたヒト iPS 細胞は、樹立の際に用いた細胞が、皮膚線維芽細胞、臍帯由来線維芽細胞、脂肪肝細胞、肝線維芽細胞または歯髄細胞と多岐に渡っている。また iPS 細胞の作製法も、導入方法についてはレトロウイルスベクター、エピソーマルベクターまたはプラスミドベクターを用いており、リプログラミングの初期化因子については Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、

l-Myc、Lin28、p53shRNA の組み合わせと多様である。したがって、これらの iPS 細胞 10 株を用いた造腫瘍性試験をまず行うことにより、全般的なヒト iPS 細胞株間の造腫瘍性におけるばらつきを把握できると考えられる。今回の移植に用いた細胞数は、1 匹当たり 3×10^4 個であり、201B7 細胞株の TPD₅₀ (6.3×10^2) のおよそ 50 倍であり、201B7 細胞株であれば、ほぼ全数のマウスに生着することが想定される細胞数である。また観察予定期間は 16 週間を予定しているが、昨年度の報告において移植後 9 週間で 201B7 細胞株の TPD₅₀ がほぼ安定することを我々は既に示している。14 週目 (4 株) および 10 週目 (6 株) での各種 iPS 細胞株の結節形成率の平均 \pm SD 値は、 $58\pm 30\%$ であった。これらの iPS 細胞株の結節形成率の違いは、細胞増殖速度、細胞分化速度、細胞生存率、悪性度などが影響することが考えられるが、解明のためには形成した結節の病理学および分子生物学的な解析を、今後行っていく必要があると思われる。

造腫瘍性リスクとの関連が示唆されている核型においては、mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株で染色体異常が観察され、他の 8 株においては正常であった。mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株での結節形成率は、それぞれ 67% および 100% であった。mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株で認められた染色体異常は、共に 12 番染色体が 3 本となるトリソミーであった。The International Stem Cell Initiative の報告によると、ヒト ES 細胞 125 株とヒト iPS

細胞 11 株を用いた核型解析において、34% の ES 細胞株と 27% の iPS 細胞において染色体異常が見られ、これらの異常は一般に 1、12、17、および 20 番染色体における変化であった。特に 12 番染色体のトリソミーは、すべての核型異常を示す iPS 細胞株で認められたが、樹立時に用いた体細胞には認められなかった (Nat Biotechnol. 2011;29:1132-44.)。本研究で用いた iPS 細胞である mc-iPS 細胞株および 454E2 細胞株においては、観察した 20 細胞すべてにおいて核型異常が見られたため、クローニングや培養における適応の過程で、選択的に核型異常を持つ細胞が増殖した可能性が考えられた。実際に、12 番染色体のトリソミーを有するヒト多能性幹細胞は細胞増殖速度が速く、in vivo 造腫瘍性が亢進することが報告されている (Ben-David et al. Nat Commun. 2014;5:4825.)。

iPS 細胞株の網羅的遺伝子発現プロファイルにもとづく階層的クラスタリングで、その類似性において 4 つのグループに分類された。1. レトロウイルスベクターを用いて京都大学で樹立された 201B7 と 253G1、2. レトロウイルスベクターを導入した理化学研究所で樹立された HiPS-RIKEN-12A 株、HiPS-RIKEN-1A 株、HiPS-RIKEN-2A 株と ATCC より入手した ATCC-HYR0103 株 と ATCC-DYR0100 株、3. 核型異常の見られた 454E2 株と mc-iPS 株、4. 409B2 株である。細胞株の作製元と作製方法による類似性が見られる一方で、12 番染色体トリソミ

一を示した株においても類似性が見られた。また歯髄細胞からエピソーマルベクターを用いて樹立した 409B2 株は、他の細胞株と最も類似性を持たないことも明らかになった。今後は、細胞株間の遺伝子プロファイルの類似性と、悪性度などの造腫瘍性との関連も検討したい。

E. 結論

前年度までに安全かつ倫理的問題の少ない再生医療細胞基材の一つとして注目されているヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞より、さらに形質が安定し、増殖・分化能力の高い Hx-hASC の創製に成功した。今年度は、その Hx-hASC 由来のヒト iPS 細胞を樹立し、その細胞特性を解析した。その結果、Hx-hASC 細胞を材料とした iPS 細胞を複数株樹立することに成功した。これら iPS 細胞株は三胚葉系への分化誘導能を持ち、肝細胞、心筋細胞、メラノサイト、ケラチノサイト、神経細胞（ドパミン産生細胞）へと高効率に分化誘導された。また、皮膚疾患由来 iPS 細胞株の一つでは肝細胞、心筋細胞、神経幹細胞へ分化誘導した際、多能性細胞が残存している可能性が示唆された。来年度はこれらの細胞を NOG マウスへの投与実験を行い、*in vivo* において詳細な造腫瘍性リスクについて検討を行う予定である。一方、昨年度までに入手していた各種 iPS 細胞を NOG マウスに移植し、腫瘍形成率や腫瘍サイズの経時的なモニターを行った。各種 iPS 細胞の造腫瘍性におけるばらつきを把握するとともに、核型解析や網

羅的遺伝子発現データ取得による細胞特性解析も行った。今後は病理学的な解析等により、形成腫瘍の悪性度の評価を行い、腫瘍の形成率や悪性度等に関係する細胞特性指標の探索を行う予定である。

<参考文献>

1. Gropp M, Shilo V, Vainer G, Gov M, Gil Y, Khaner H, Matzrafi L, Idelson M, Kopolovic J, Zak NB, Reubinoff BE. Standardization of the Teratoma Assay for Analysis of Pluripotency of Human ES Cells and Biosafety of Their Differentiated Progeny. PLoS ONE. 2012;vol.7 (9): e45532.
2. The International Stem Cell Initiative. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. Nat Biotechnol. 2011;29:1132-44.
3. Ben-David U, Arad G, Weissbein U, Mandefro B, Maaimon A, Golan-Lev T, Narwani K, Clark AT, Andrews PW, Benvenisty N, Carlos Biancotti J. Aneuploidy induced profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. Nat Commun. 2014;5:4825.