

① 253G1

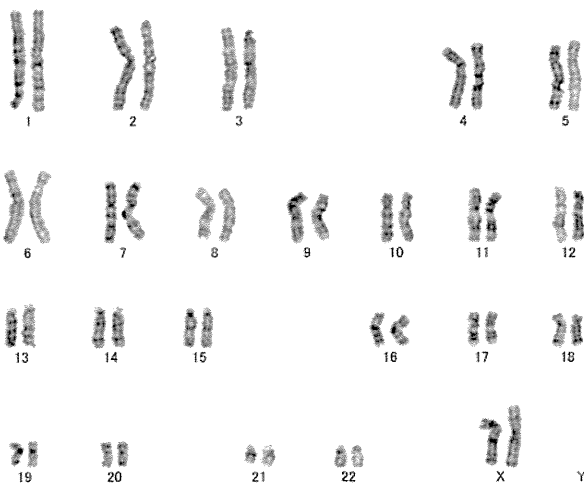
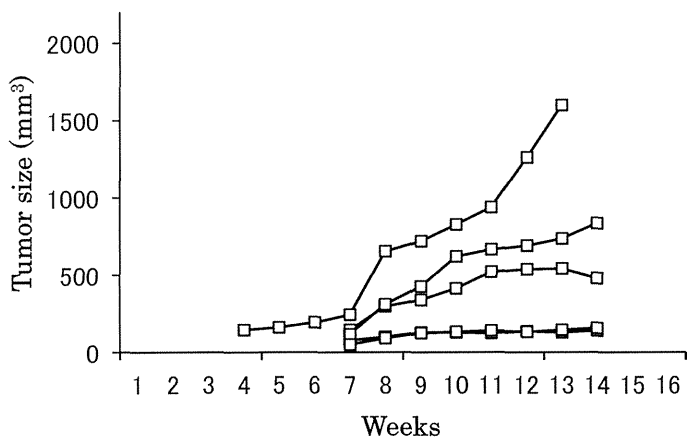
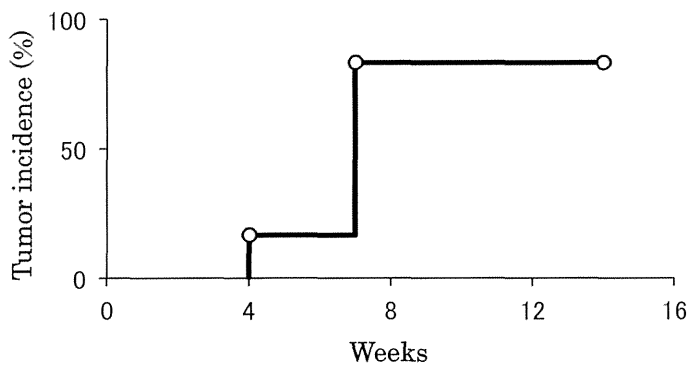


図 7 : 253G1 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (14 週目まで) および核型解析結果

② HiPS-RIKEN-2A

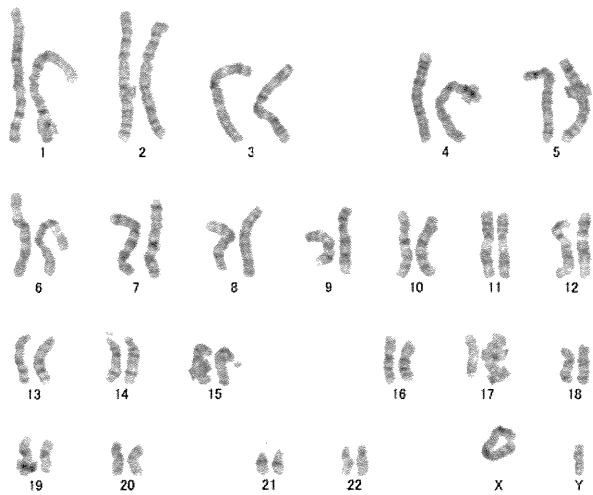
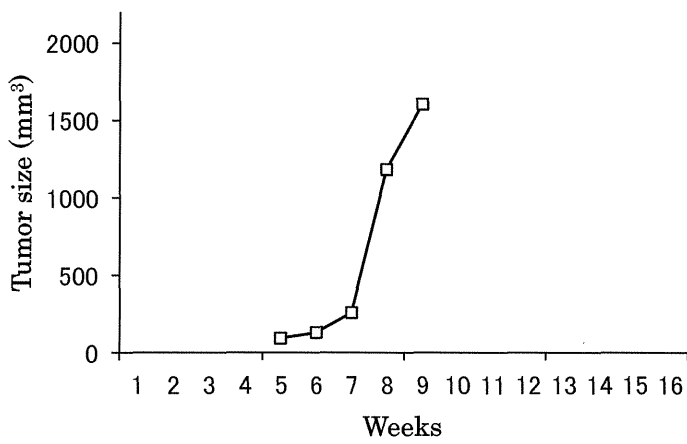
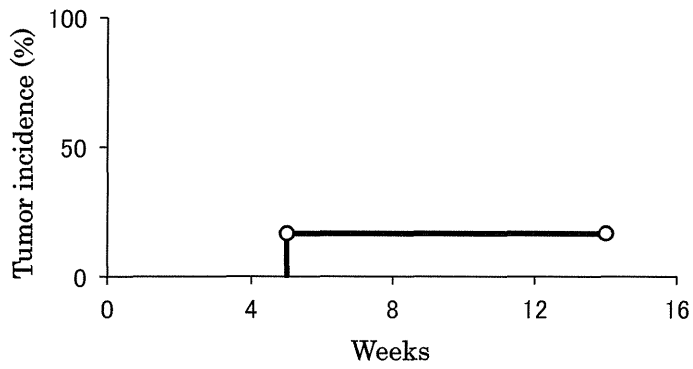


図8 : HiPS-RIKEN-2A 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (14 週目まで) および核型解析結果

③ 409B2

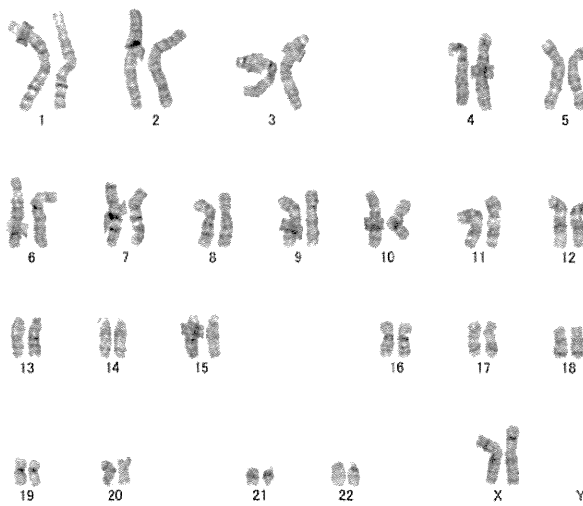
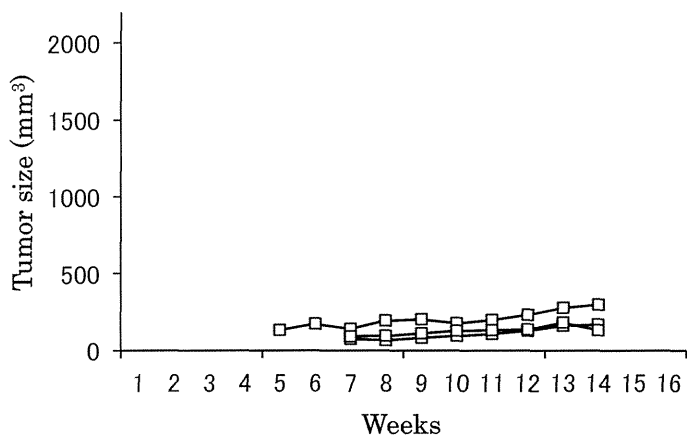
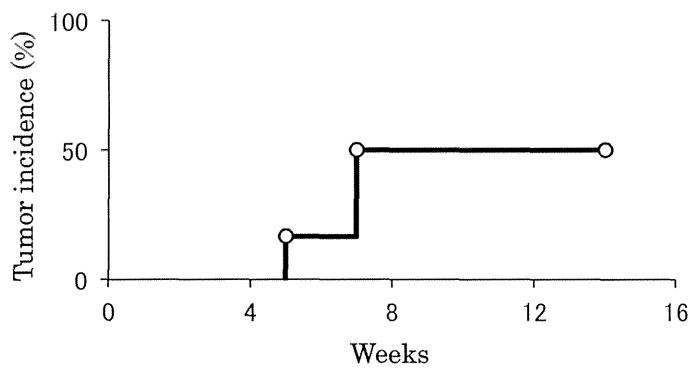


図 9 : 409B2 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (14 週目まで) および核型解析結果

④ mc-iPS

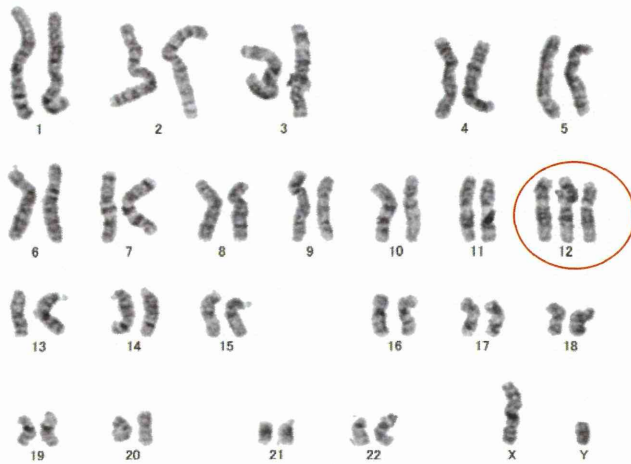
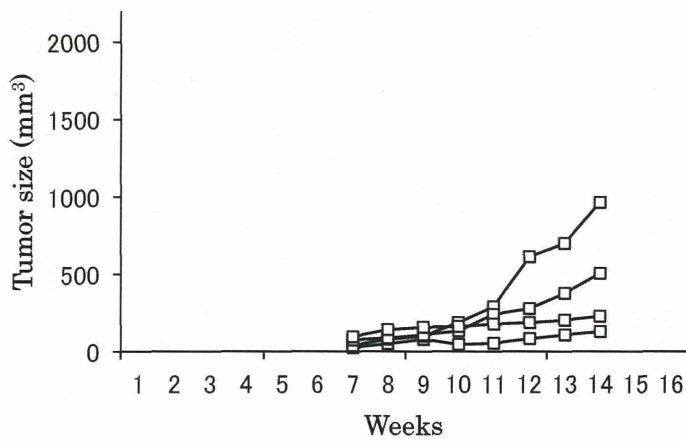
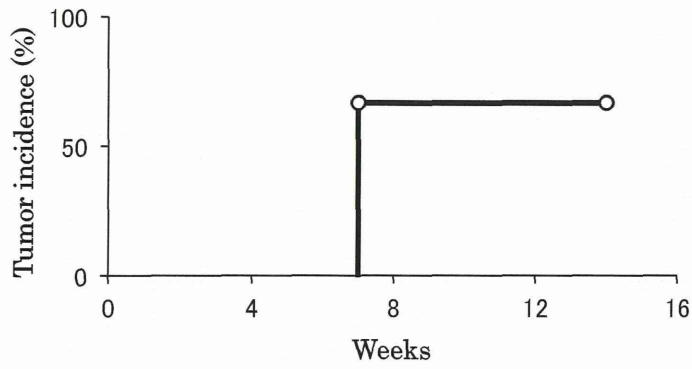


図 10 : mc-iPS 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (14 週目まで) および核型解析結果

⑤ 201B7

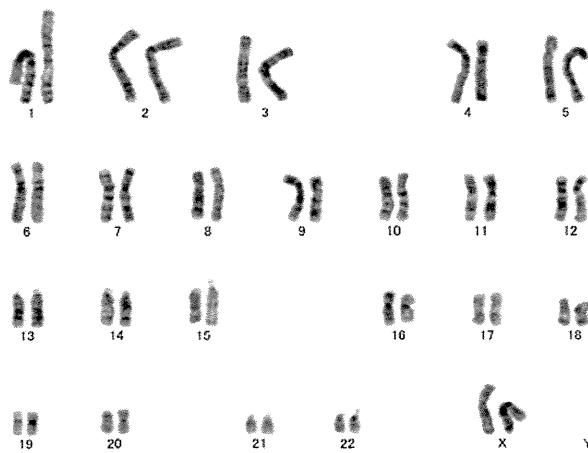
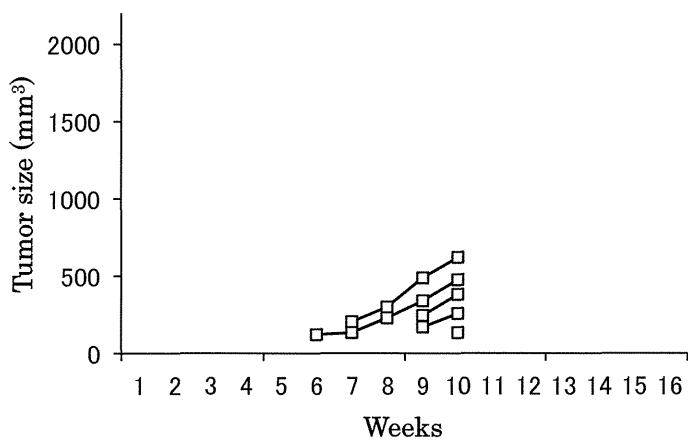
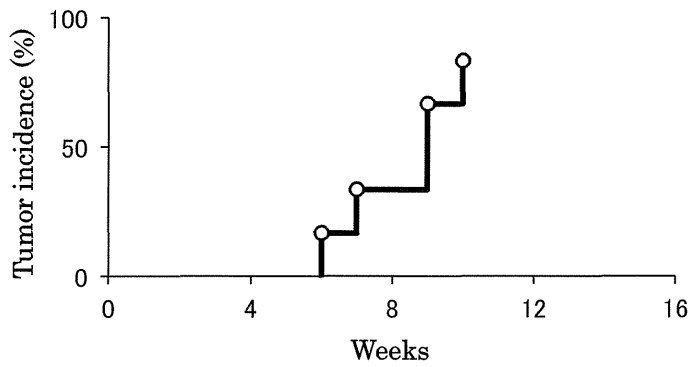


図 1 1 : 201B7 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

⑥ HiPS-RIKEN-1A

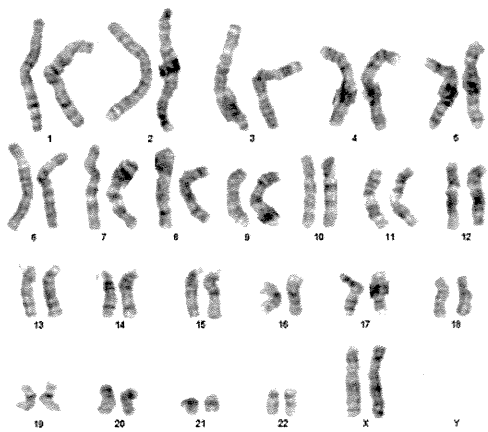
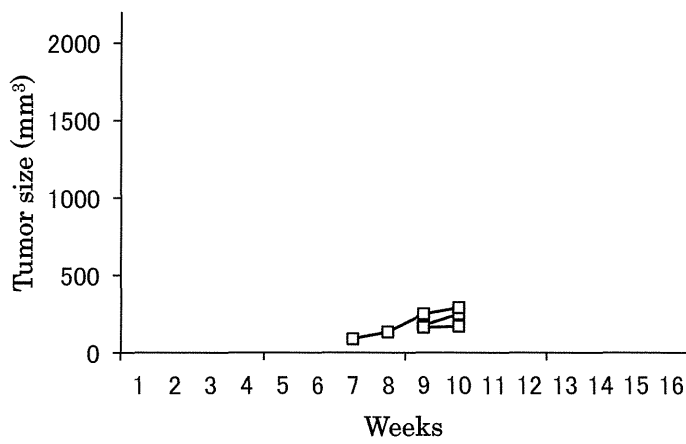
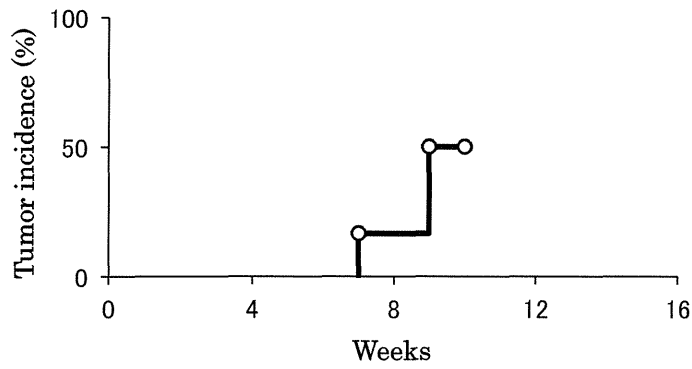


図 1 2 : HiPS-RIKEN-1A 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

⑦ HiPS-RIKEN-12A

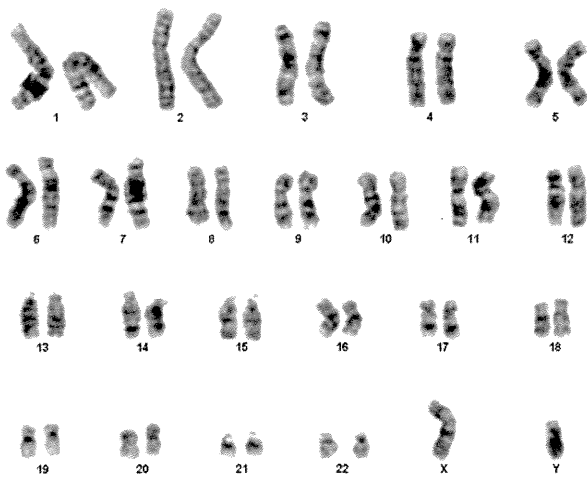
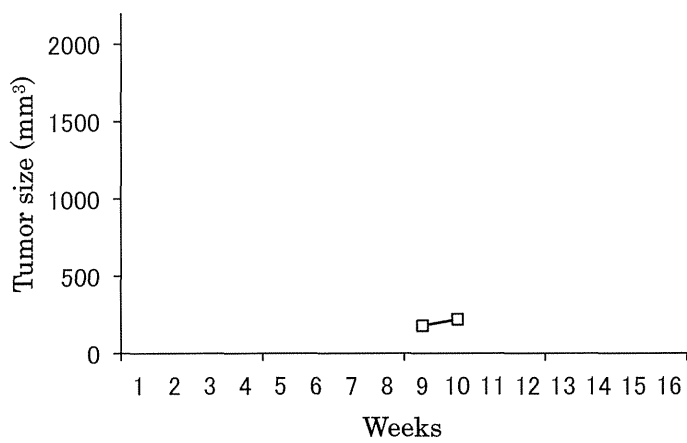
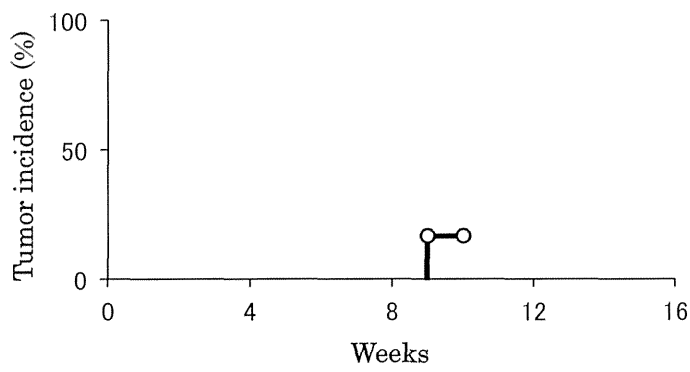


図 1 3 : HiPS-RIKEN-12A 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

⑧ ATCC-DYR0100

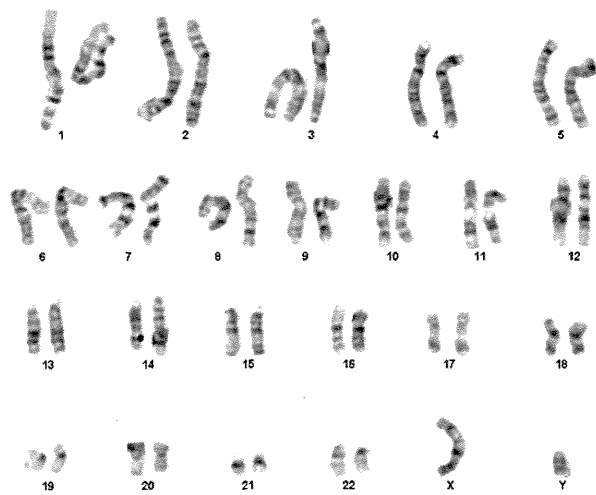
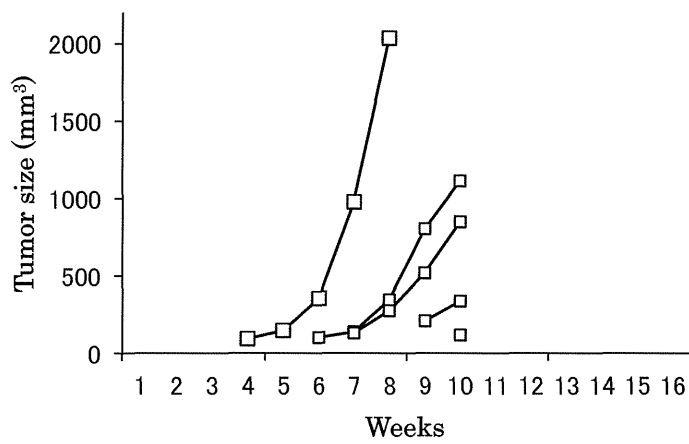
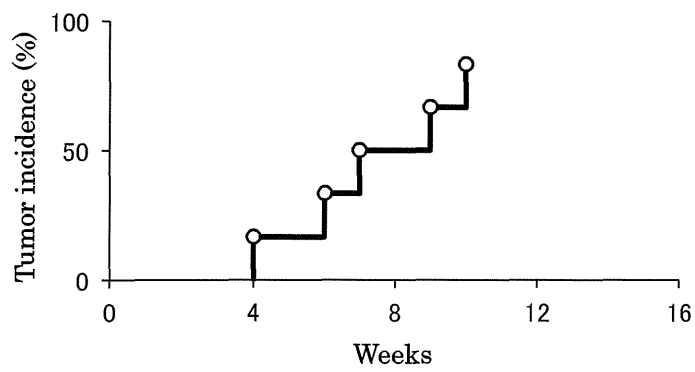


図 1 4 : ATCC-DYR0100 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

⑨ ATCC-HYR0103

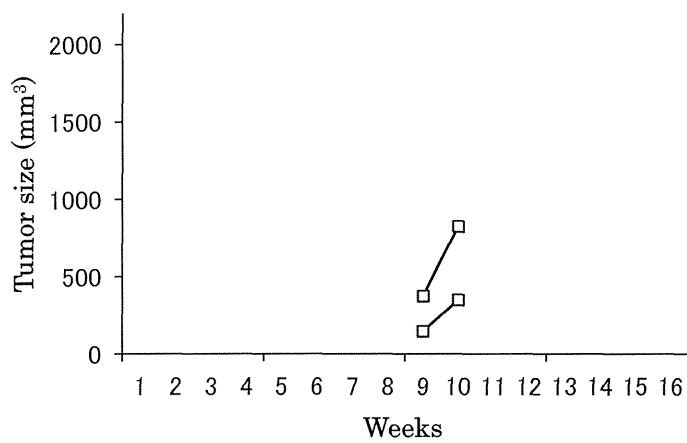
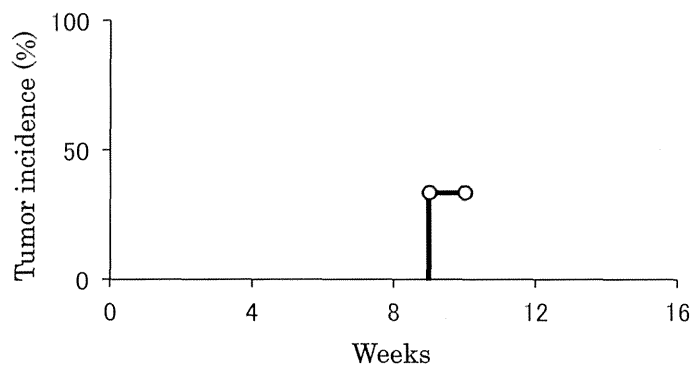


図 1 5 : ATCC-HYR0103 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

⑩ 454E2

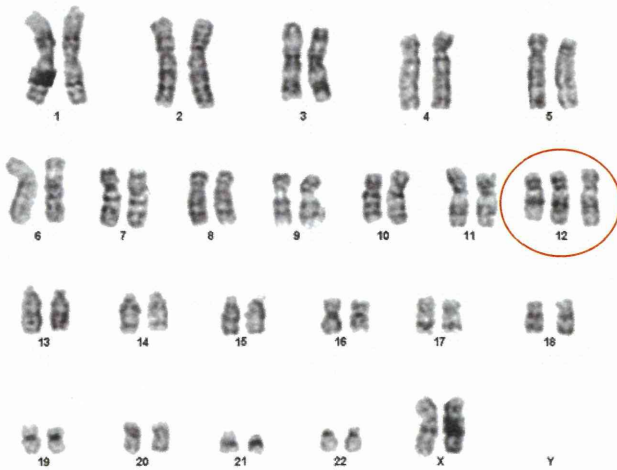
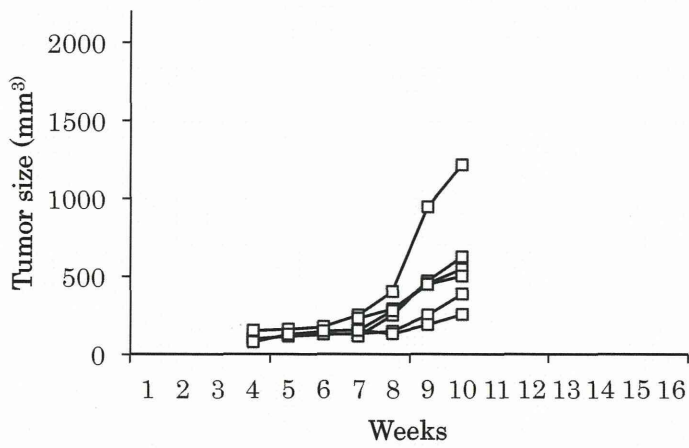
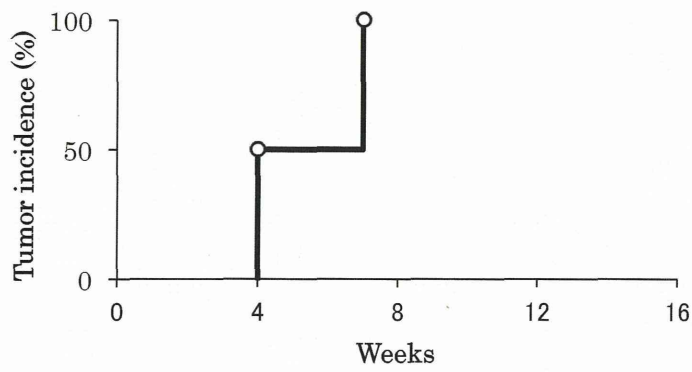


図 1 6 : 454E2 株の NOG マウスにおける結節形成の経時的変化 (10 週目まで) および核型解析結果

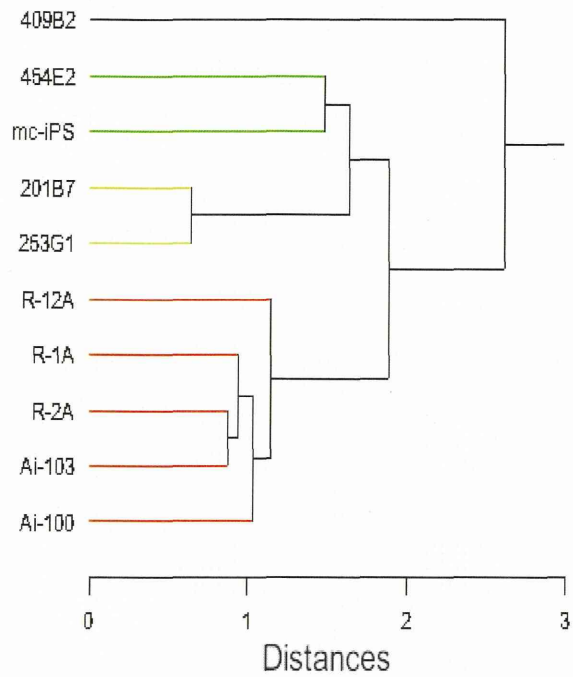
表3 NOG マウスにおける各種 iPS 細胞株生着能（14 週目の結果）と核型

移植細胞株	結節を呈した匹数/ 供試匹数	結節形成率 (%)	核型
253G1	5/6	83	46,XX[20]
HiPS-RIKEN-2A	1/6	17	46,XX[20]
409B2	3/6	50	46,XX[20]
mc-iPS	4/6	67	47,XY,+12[20]

表4 NOG マウスにおける各種 iPS 細胞株生着能（10 週目の結果）と核型

移植細胞株	結節を呈した匹数/ 供試匹数	結節形成率 (%)	核型
201B7	5/6	83	46,XX[20]
HiPS-RIKEN-1A	3/6	50	46,XX[20]
HiPS-RIKEN-12	1/6	17	46,XY[20]
A			
ATCC-DYR0100	5/6	83	46,XY[20]
ATCC-HYR0103	2/6	33	46,XY[20]
454E2	6/6	100	47,XX,+12[20]

Cluster Tree



Clusters Joining		at Distance	No. of Members
253G1	201B7	0.646	2
Ai-103	R-2A	0.874	2
Ai-103	R-1A	0.937	3
Ai-100	Ai-103	1.031	4
R-12A	Ai-100	1.14	5
454E2	mc-iPS	1.475	2
454E2	253G1	1.64	4
454E2	R-12A	1.888	9
409B2	4.54E2	2.622	10

図 1 7 : iPS 細胞株の遺伝子発現プロファイルをもとにした株間の階層的クラスタリング

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」
分担研究報告書

各種細胞調製と特性評価

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。

平成 26 年度は主に、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 細胞及び ES 細胞等の調製し、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、これらの細胞を用いて、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、脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を材料とした高品質かつ安全性の高いと予想される iPS 細胞を複数株樹立することに成功し、これらの iPS 細胞株は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ることから、造腫瘍性リスクの懸念があることが示唆された。しかしながら、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ことから、造腫瘍性リスクの懸念が低いことが示唆される結果となった。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。

研究協力者（順不同）

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る、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。

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、以下の方法により、ヒト iPS 細胞を調製し、細胞特性を解析した。

B-1. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の樹立と培養

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、以下のように調整した。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×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×B27 (insulin 非添加), 12 μM 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×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×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 μM SB431542 含有 KSR 培地 (15%KSR, 1×L-Glutamine, 1 × anti-B/M, 100 μM nonessential amino acids, 500 μM Monothioglycerol) に置き換える。分化誘導 2 日目、500 nM LDN193189, 10 μM SB431542, 3 μM CHIR99021 含有 KSR 培地に培地交換し、分化誘導 3 日目、10 μM SB431542, 3 μM 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×ITS, 100 μM Putrescine, 20 nM Progesterone 含有 DMEM/F12), 3 μM CHIR99021 に置き換え、分化誘導 6 日目、50% KSR 培地, 50% N2 培地, 3 μM 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 μM CHIR99021, 25 ng/mL BMP4, 100 nM EDN3 に置き換え、分化誘導 10 日目 3 μM 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/Mel 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 μM 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-β3 抗体 (CST 社; 1/1000)、マウス免疫抗 αSMA 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-3β 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℃、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ー解析

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ズ社) 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 社のプロトコールに準拠した。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、プロトコー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。

(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。

C. 研究結果

C-1. 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)。

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により、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、従来のようなヒト 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* におけるテラトーマ形成能については現在精査中ではあるが、概ね良好な結果が期待できると考えている。

D-2. 新規ヒト脂肪組織由来幹細胞由来 iPS 細胞の特性解析

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)、神経幹細胞 (図 6) に関しては一つの iPS 細胞株 (皮膚疾患特異的 Hx-hASC 由来) において、やや未分化マーカーの残存が確認された。このため、この iPS 細胞株を用いてこれらの細胞へ分化誘導する際は、残存する可能性のある未成熟細胞を取り除くかが肝になるものと思われる。しかし、この iPS 細胞株から肝細胞、心筋細胞、神経幹細胞へ分化誘導し、NOG マウスに移植した際、どの程度造腫瘍性リスクが増大するのかというポジティブコントロールとしての使用が期待出来るものと考えられる。また、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とから、これらの細胞は造腫瘍性リスクが少ないと期待される。

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基剤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 細胞を材料とした高品質かつ安全性の高いと予想される 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ため、造腫瘍性リスクが懸念された。しかし、メラノサイトやケラチノサイトへの分化誘導では造腫瘍性リスクは少ないと考えられた。来年度はこれらの細胞を NOG マウスへの投与実験を執り行い、*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。

F. 健康危険情報

なし