

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

ヒト iPS 由来神経前駆細胞の腫瘍形成能のメカニズムと
その制御による安全性確保の検討

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 雅也

平成 27 (2015) 年 4 月

目 次

I . 総括研究報告

ヒトiPS由来神経前駆細胞の腫瘍形成能のメカニズムとその制御による
安全性確保の検討 ----- 1

中村 雅也

II . 分担研究報告

1 . ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価系の確立とそのメカニズム
の解析 ----- 12

岩波 明生

2 . 造腫瘍性からみたヒトiPS細胞から神経前駆細胞への誘導法の検討 ----- 18

神山 淳

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

総括研究報告書

ヒトiPS由来神経前駆細胞の腫瘍形成能のメカニズムとその制御による安全性確保の検討

研究代表者 中村雅也

慶應義塾大学医学部 整形外科学教室

教授

研究要旨

ヒトiPS細胞の樹立方法が確立し、この技術を用いた新規創薬および再生医療の実現が期待されている。ヒトiPS細胞を利用した再生医療の実現に関してはヒト胚を破壊せずに樹立可能であるという倫理面からの優位性が存在するものの、造腫瘍性の課題があり、再生医療の実現に向けた大きな障壁となっている。ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)の造腫瘍性の原因となる細胞集団は、残存する未分化iPS細胞、腫瘍化したhiPS-NSC自体のいずれかにより生じると考えられる。奇形腫はiPS細胞の分化抵抗性に由来し、iPS細胞選択的マーカーにより理論的には除去可能であるがグリオーマに関しては神経幹細胞とグリオーマ幹細胞を区別する表面マーカーが現在存在しないため困難である。そこで本研究の目的は、hiPS-NPCを用いた再生医療実現化の為の造腫瘍性の制御し、hiPS-NPCの腫瘍原性を規定する細胞集団の同定およびその分子的基盤を明らかとすることである。本研究ではhiPS-NPC中に含まれると考えられる腫瘍原性を有する細胞(unsafe hiPS-NPC)の同定、実体を解明する為に一細胞分離(single cell sorting)により得られたhiPS-NPC由来クローン(siPS-NPC)の樹立を試みた。また、造腫瘍性を規定する分子基盤の同定を目的として各種解析を行い、その原因となる因子を同定した。

A. 研究目的

ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)の腫瘍原性の実体解明はhiPS-NPCを用いた再生医療の実現化において最も重要な課題である。本研究拠点では京都大学iPS細胞研究所

(CiRA)よりヒトiPS細胞の供与を受け、神経前駆細胞への誘導後に、マウス脊髄損傷モデルへの移植後の治療効果について検討してきた。その中で造腫瘍性を示す、iPS-NPCを複数見出してきた。

一方、hiPS-NPCは造腫瘍性という観点から不均一な集団であることが推定される(heterogeneity)。すなわち、一見均一に見受けられるhiPS-NPCにおいて全ての細胞が造腫瘍性を有する訳ではなく、一部の細胞が造腫瘍性を有していることが予想される。本研究ではこれらの知見を生かし、造腫瘍性をきたすhiPS-NPC(unsafe hiPS-NPC)と造腫瘍性を呈さないhiPS-NPC(safe hiPS-NPC)との比較により、造腫瘍性を規定する分子的基盤の解明を目指す。また、造腫瘍性をきたしたhiP-NPCをFACSを利用して、一細胞を調整し、維持・増殖させることで単一細胞由来iPS-NPC(siPS-NPC)を樹立した。また、樹立されたsiPS-NPCを免疫不全動物へと移植し、造腫瘍性を検討することにより造腫瘍性を有する細胞群の同定が期待される。

B . 研究方法

(1) メチル化DNAのプロファイリング

CiRAより提供を受けた、レトロウイルスにより樹立されたiPS細胞株を利用し、胚葉体形成を利用し、神経前駆細胞への分化誘導を行った。このiPS細胞2株(201B7, 253G1)および、これらの各細胞株を神経幹細胞/前駆細胞へ分化誘導したもの、ヒト胎児由来神経前駆細胞をそれぞれ培養し、これらのサンプルからゲノムDNAを抽出して、イルミナ社のInfiniumシステムを用いて、全ゲノム領域のDNAメチル化状態を網羅的に解析を行った。

(2) iPS-NPCの造腫瘍性の検討

iPS-NPCの造腫瘍性を検討するために、hiPS-NPCにルフシフェラーゼ発現用のレンチウイルスを感染させ、免疫不全動物に感染させた。これらの細胞を 1×10^6 ずつそれぞれ脳、脊髄、損傷脊髄に移植した。移植を受けた動物はイメージングにより細胞の増殖の程度をルシフェラーゼの発光強度により定量し(IVIS system)、また移植細胞の増殖による組織圧迫等により生じる行動機能も同時に解析した。移植後3ヶ月、6ヶ月後にこれらの動物から組織標本を作成し、各種染色を施行後に組織内での広がりや病理学的な解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学倫理委員会で人権擁護、不利益・危険性の排除、説明と同意に関して十分な審査を経た承認のもとに行われる。ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、下記の各種指針にもとづいて研究計画を立案・遂行するものとする。

- ・ ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
- ・ その他（文部科学省研究振興局長通知19文科振第852号）

実験動物を使用する研究を含む研究計画：

「動物の愛護及び管理に関する法律」および関連した指針に則って研究を行う。慶應義塾大学医学部では、動物実験委員会を設置し、関連法案および指針を遵守した審査が行われている。本研究に関する動物実験の多くは既に同委員会の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、新たな課題の必要が出てきた場合は、同委員会に申請し、承認を得るものとする。

ヒト細胞を用いた基礎研究計画：ヒト神経堤由来幹細胞を用いた脊髄再生研究、ヒトES細胞の使用研究、ヒトiPS細胞樹立等の基礎研究について、ヒト細胞入手法を含めて機関内倫理委員会（慶應義塾大学医学部の倫理委員会）の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、必要に応じて同委員会に申請を行い、承認を得るものとする。
尚、同委員会では、法令違反を行った場合等に備えて、臨時委員会を緊急に開催するなどの処置により、当該研究を中止することが出来る。

C.研究結果

(1)造腫瘍性を規定するDNAメチル化領域同定

造腫瘍性とDNAメチル化の関連は多くの腫瘍組織において認められ、ガン抑制因子の転写制御領域のDNAメチル化の亢進によるガン抑制因子の発現低下とガン化の関連の報告は数多くなされている。しかし、iPS細胞、iPS-NPCにおけるメチル化状態の記載、造腫瘍性との関連は明らかではなかった。また、DNAメチル化は定量的解析が可能であるため、造腫瘍性と関連する

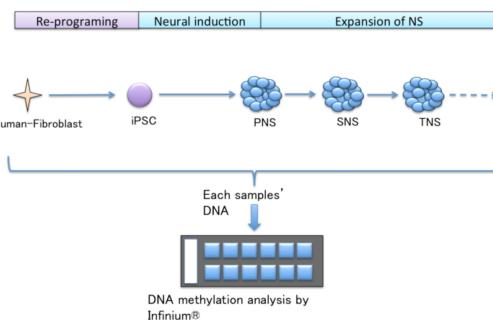


図1:Infiniumによる全ゲノムメチル化解析

Infinium methylation arrayを用いて全ゲノムメチル化解析を行った。対照群となる細胞とともに、iPS細胞およびiPS-NPCを各世代からのゲノムDNAを調整し、メチル化状態を網羅的に解析した。

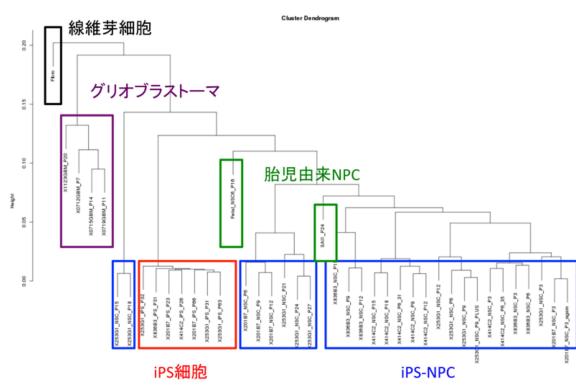


図2:全ゲノムメチル化状態によるクラスタリング解析

ヒト線維芽細胞、ヒトiPS細胞、ヒトiPS-NPC、胎児由来NPC、グリオblastomaよりゲノムDNAを調整し、Infinium methylation arrayを用いて解析を行った。全ゲノム領域のメチル化状態を指標としてクラスタリング解析を行い、細胞を分類した。

DNAメチル化領域の同定は再生医療実現に向けた品質管理項目として有用であると考えられる。そこでイルミナ社のInfiniumシステムを利用し、全ゲノムメチル化状態を解析した(図1)。対照群としてiPS細胞の由来となるヒト線維芽細胞、ヒト胎児由来神経前駆細胞(Fetal NS)そしてヒトグリオblastomaの試料を用いた(全41サンプル)。全ゲノムのメチル化状態をもとに各サンプルをクラスタリング解析を行ったところ、まず特記すべき点として造腫瘍性を有する細胞のコントロールとして用いたグリオblastomaとiPS細胞およびiPS-NPCは全ゲノムDNAメチル化状態が大きく異なることが分かった(図1)。さらに細胞の株による差異よりも細胞の状態の差異の方が大きく、ゲノム全体の状態から造腫瘍性の有無を規定する要因は見出せなかった。そこで継代による差異等を平均化し、iPS細胞、iPS-NPCおよび胎児由来NPCにおける全ゲノムDNAメチル化状態に関し、クラスタリング解析を行った(図2)。

しかし、興味深いことに造腫瘍性を呈する253G1由来の神経前駆細胞(unsafe hiPS-NPC)において継代によるDNAメチル化状態の変化を解析すると、継代を進めることによりDNAメチル化状態が上昇していく領域が存在した(図3)。プロモーター領域5kベースの領域に着目すると685遺伝子、転写開始部位近傍で解析すると457遺伝子においてDNAメチル化状態の上昇が見出された。一方で、iPS細胞においてはDNAメチル化状態の変動は限られており、継代を経たDNAメチル化によるエピジェネティクス変化に抵抗性を有していることが想定

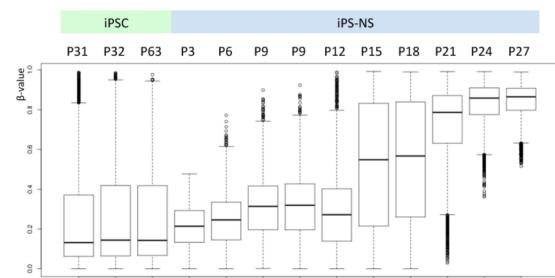


図3:unsafe iPS-NPCにおけるDNAメチル化遷移

造腫瘍性を呈するiPS細胞(253G1)において神経誘導過程におけるDNAメチル化状態を解析した。iPS細胞においては継代によるDNAメチル化変動は微細であるが、神経前駆細胞においては継代を経るごとにDNAメチル化頻度が上昇する領域が存在した。

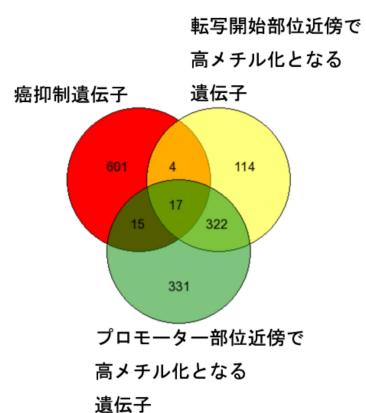


図4:unsafe iPS-NPCにおけるDNAメチル化変動遺伝子と癌抑制遺伝子
造腫瘍性を呈するiPS細胞(253G1)において継代を経るごとにDNAメチル化頻度が上昇する遺伝子と癌抑制遺伝子の相関をベン図で示した。

された。また、DNAメチル化変動領域はCOSMICに登録されているガン抑制遺伝子も含まれており、DNAメチル化状態は遺伝子発現と負に相關することからunsafe hiPS-NPCにおいてはガン抑制遺伝子のDNAメチル化により発現抑制により、造腫瘍性を規定しているのではないかという可能性が示唆された(図4)。さらに、201B7由来hiPS-NPC(safe hiPS-NPC)と253G1由来hiPS-NPC(unsafe hiPS-NPC)を比較することにより、両者において顕著に差の見られる領域を複数見出した(図5)。これらの領域は造腫瘍性と関連する遺伝子制御領域も

含まれているため、再生医療実現に向けた
hiPS-NPCの品質管理項目として有用であると
期待された。

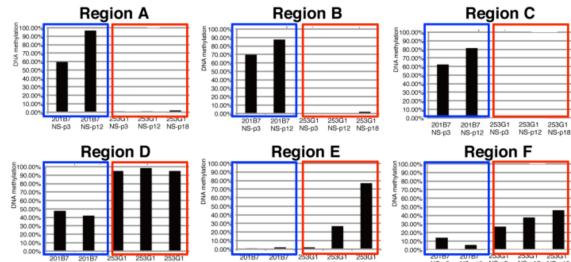


図5:DNAメチル化によるiPS-NPC品質管理項目の候補
安全なiPS-NPC(青枠)と造腫瘍性を呈するiPS-NPC(赤枠)を区別
可能なDNAメチル化変動領域の候補

(2) iPS-NPCの造腫瘍性検討

本年度樹立したiPS-NPCの造腫瘍性を検討するため、本研究拠点では図6のようなパイプラインを作成し、解析を行った。まず移植後のiPS-NPCの生体内での増殖を定量的に解析するためにルシフェラーゼ発現レンチウイルスによる標識を行い、継時的に増殖度を定量した。また、移植後の細胞の異常増殖による組織圧迫およびそれに起因する機能低下を定量するために行動学的な評価を行った。また、細胞移植後の免疫不全動物は移植後3ヶ月

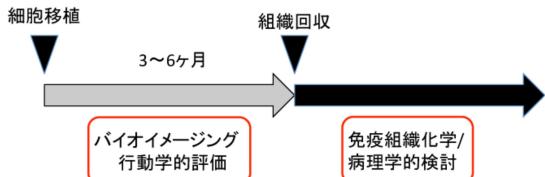


図6:造腫瘍性検討のパイプライン

iPS-NPCを標識後、免疫不全動物の脳または脊髄、損傷脊髄に任意の細胞数移植し、3ヶ月もしくは6ヶ月の経過を観察した。特にバイオイメージングにより個体内での細胞増殖及び行動学的解析により顕著な機能低下が生じるかを検討した。また、経過観察後は組織学検討を行うために標本を作成し、任意の抗体を用いた細胞の分化傾向の解析もしくは造腫瘍性に関しての検討を行った。

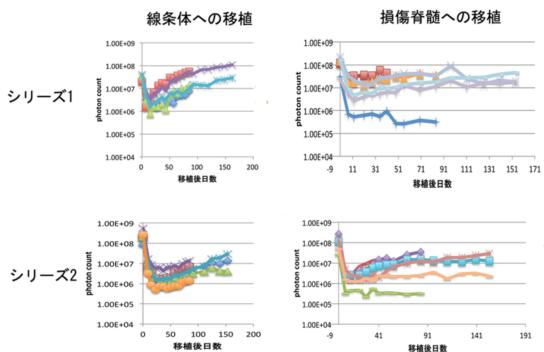


図7: ライブイメージングによる移植細胞の動態解析

1210B2由来iPS-NPCを線条体及び損傷脊髄に移植し、ルシフェラーゼによる活性(photon count)を指標として組織内での増定量した。移植後一過的にphoton countは低下するが時間経過とともに微増していった。

No	局在	分化	増殖	コメント
R2	LAMIN STEM NESTIN GFAP OLG Ki67	移植部近傍脛外に漏れ出している場所に陽性像(++)、脊髄内部にわずかに陽性像(++)。	NESTINより弱いが、同様の分布(脛外)で陽性像が見られる(++)。	NA NA 移植部近傍脛外に漏れ出しており、nestin陽性細胞がやや優位に残存している。細胞の核が大きく、突起もでているが未分化な印象を受ける。

図8:iPS-NPC移植マウスにおける組織学的評価の一例

6ヶ月での組織学的な解析を実施し、病理医の指導のもと病理組織学的な診断を行った。

1210B2由来iPS-NPCを免疫不全マウス(脳:NOGマウス、脊髄:NOD/SCID)の中枢神経系に移植し、経時的にルシフェラーゼの活性(photon count)を解析した。全例において移植後一過的にphoton countの低下を認めるが、その後時間経過を経て、photon countは上昇し、生体内において増殖しているのが予想された。しかし、極端に個体内における細胞増殖を認める個体は存在せず、また行動異常や脊髄機能の低下を認める個体は存在しなかった。本研究拠点での予備的な検討からiPS細胞の残存により生じる奇形腫やグリオーマ由来の細胞は移植後に、数百%以上のphoton countの上昇を呈するため今回誘導した1210B2由来神経前駆細胞は個体内での増殖性に関して腫瘍とは一定の違いあることが推察された。

<移植細胞の造腫瘍性に関して>

取得画像のデータベース化

本年度の研究ではiPS-NPCの造腫瘍性の検討を行うために、HE染色での組織像に加え、ヒト由来細胞を特異的に認識する抗体(STEM121, LAMIN)およびヒトGFAP, Nestin特異的抗体また増殖性を定量するためにKi67を用いた免疫組織学的解析を行った。本研究で得られる組織切片は脳もしくは脊髄由来の試料であり、各個体ごとに数十枚のスライドを作成した。このスライドを利用し、各種抗体染色やHE染色を行うため画像データが膨大となる。そこでNanozoomerを用いたスライド全体の画像の取得・保存を行い、必要に応じて病理医との病理診断の際の資料とすることことができた。であり、1検体から数十枚の切片が。さらにこれらの染色像をデータベース化するためにNanozoomerを用い、画像の取得、保存を行い、この画像を元にした病理医との連携のシステムを構築した。

hiPS-NPCの造腫瘍性に関して

本年度利用した1210B2由来hiPS-NPCを移植した動物から得た組織標本に関しては各標本に関して病理医との連携により診断をつけた(図8)。結果として明らかな悪性腫瘍の発生は認められなかつたが当初の予想とは異なり、かなりの組織学的な多様性を示していた。また興味深いことに同一の細胞株由来であっても誘導ごとや細胞の培養条件により最終的な移植細胞の組織学的な評価が異なることが明らかとなつた。また、長期間の観察群においては当初の予定とは異なる組織が見出され

た。以下に本年度の解析により明らかとなつた点を記載する。

1) 隅外病変が一定の確率で存在し、増殖性を有していた

今回の解析により、脊髄内、もしくは脳内に生着した細胞に関しては良好な生着及び分化傾向を示していたが、隅外における細胞の生着及び増殖像を呈することがあった。

2) 短期経過群(3ヶ月)と長期経過群(6ヶ月)の比較に関して

本年度はhiPS-NPC移植後3ヶ月と6ヶ月の二点において病理組織学的解析を行つたが、3ヶ月経過時点において増殖性を有していた移植細胞も6ヶ月後においては増殖性が低くなつてあり、時間経過とともに組織内で分化及び成熟することが明らかとなつた。3ヶ月においては比較的増殖性を有する組織切片が散見されたため、長期間での造腫瘍性判定が重要であることが明らかとなつた。また、長期経過群においては異所性の骨化が見られることがあり、hiPS-NPCに含まれる微量な非神経系細胞が長期の時間経過を経て増殖することが認められた。しかし、組織学的には分化した骨組織であり、良性病変であることも明らかとなつた。

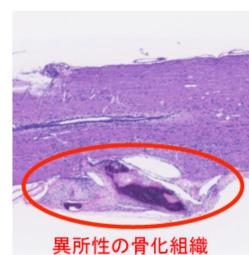


図10: iPS-NPC移植後長期観察群において見られた骨化組織
1210B2由来iPS-NPCを線条体及び損傷脊髄に移植し、6ヶ月後に見出された骨様組織。

D . 考察

本年度は本研究拠点で造腫瘍性の有無が明らかであるiPS-NPCとCiRAから提供された末梢血由来iPS-NPCの解析を行った。前者に関してはDNAメチル化という観点から解析し、造腫瘍性の有無による差異と細胞の継代ごとによる差異があることが明らかとなった。細胞の継代による差異から再生医療にむけた細胞の供給源としては少ない継代数のiPS-NPCを利用することが現実的であると考えられた。一方で、大量の細胞ストックの確保も必要であるため、エピジェネティックな観点から安定であるiPS細胞を大量に準備し、iPS-NPCストックを作成することが重要であると示唆された。

末梢血由来iPS-NPCに関する造腫瘍性に関しては今後の再生医療実現に向けた取り組みの加速化及び効率化の観点から解析のパイプラインを作成したが、造腫瘍性という観点からは多角的な検討が必要であり、造腫瘍性判定において重要な項目と必ずしも必須ではない項目があることが明らかとなった。

E . 結論

hiPS-NPCにおける造腫瘍性の実体解明には単一細胞由来のNPCの樹立が必須であり、本研究では再生医療用iPS細胞ストックを利用し作製されたhiPS-NPCの造腫瘍性の実体解明に向けた基礎的な基盤が確立されたもの考えており、これらをもとに腫瘍原性を事前に検出可能な腫瘍マーカーの同定が期待される。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

(原著論文)

1. Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Controlling immune rejection is a fail-safe system against potential tumorigenicity after human iPSC-derived neural stem cell transplantation. *PLoS One.* 2015 Feb 23;10(2):e0116413.
2. Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Control of the survival and growth of human glioblastoma grafted into the spinal cord of mice by taking advantage of immunorejection. *Cell Transplantation (in press)*
3. Qin Y, Fu M, Takahashi M, Iwanami A, Kuga D, Rao RG, Sudhakar D, Huang T, Kiyohara M, Torres K, Dillard C, Inagaki A, Kasahara N, Goodlick L, Braun J, Mischel PS, Gordon LK, Wadehra M. Epithelial membrane protein-2 (EMP2) activates Src protein and is a novel therapeutic target for glioblastoma. *J Biol Chem.* 2014 May 16;289(20):13974-85.
4. Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K. TLR9 signaling in microglial attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nat Commun.* 2015 Mar 9;6:6514.

5. Zhou Z, Kohda K, Ibata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. *Mol Brain*, 7:24 2014
- system to assess tumorigenicity of NS/PCs for transplantation therapy. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
6. Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H. Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice. *Stem Cell Reports* 382):242-249,2014
3. Iida T, Kohyama J, Iwanami A, Yoshida R, Nishimura S, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Assessment of tumorigenic potential of induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
4. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source for the treatment of spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 42nd Annual Meeting (Orlando, USA, 2014, 12)
7. Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudoh J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cell Reports* 4(3):360-373, 2015
5. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫原性の検討. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
6. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒトiPS細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価項目の確立. 第33回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
7. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫学的特性の検討.
- (学会発表)
1. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source of transplantation therapy for spinal cord injury. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
2. Hori K, Kohyama J, Matsubayashi K, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Intracranial xenograft model as a validation

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2014,10)

8. 堀桂子, 神山淳, 坂野聰重, 岩波明生,
岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: マウス
脊髄損傷モデルにおけるエピジェネティ
ック修飾関連因子の解析, 第 29 回日本整
形外科学会基礎学術集会(2014,10)
9. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 吉田怜, 西
村空也, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅
也: iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性
評価系の確立. 第29回日本整形外科学会基
礎 学術集会 (2014,10)

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）

該当する記載なし

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

分担研究報告書

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価系の確立とそのメカニズムの解析

研究分担者 岩波明生 慶應義塾大学医学部 整形外科学教室 助教

研究要旨

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性能は再生医療実現において大きな障壁である。本研究では、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞の腫瘍化の実体を明らかとし、その問題を多角的に解決することでヒトiPS細胞由来神経幹細胞を用いた臨床応用への加速を図る。iPS細胞およびiPS細胞由来神経幹細胞、ヒト脳腫瘍由来の細胞を用いて、その腫瘍原性を調べるべく、抽出DNAからがん遺伝子一塩基変異(SNP)や融合遺伝子の検索を行った。これらの結果はヒトiPS細胞由来神経幹細胞の腫瘍形成能のメカニズム解明につながる可能性があり、安全性の確保のための項目として利用できると考えられる。

A . 研究目的

ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)は、脊髄損傷や脳梗塞患者に対する再生医療の有用なツールとして注目されている。申請者らは、マウス及びヒトiPS細胞から分化誘導した神経前駆細胞をマウスや靈長類コモンマーモセット脊髄損傷モデルに移植し、その有効性と安全性を報告してきた。しかしその一方で、hiPS-NPC移植後の造腫瘍性の問題も明らかになってきている。そこで本研究の目的は、hiPS-NPCの腫瘍化のメカニズムを明らかにし、腫瘍化に対する安全性確保のための項目を開発することで、hiPS-NPCの臨床応用を実現可能なものとすることである。

B . 研究方法

(1) iPS 細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価系の確立

京都大学山中研で樹立された iPS 細胞 4 株(253G1, 201B7, 836B3, 414C2)および これらの各細胞株を神経幹細胞/前駆細胞へ分化誘導したものをそれぞれ培養し、これらのサンプルから DNA を抽出して、シーケノム社の MassARRAY システムを用いて、がん遺伝子の一塩基変異 (SNP) について網羅的に解析を行った。それぞれのサンプルから 2 マイクログラムずつ DNA を準備した。これらを、既存の癌遺伝子の代表的な SNP で、1 サンプルあたりの変異混入率を網羅的に解析可能なシーケノム社の OncoCarta panel v1.0, v2.0, v3.0、

OncoFOCUS を利用し、解析を行った。また、全ゲノム SNP アレイの実施を目的として Infinium の OmniExpress-24 BeadChip を用いた解析を行った。

2) 融合遺伝子の解析

サンプルとして 253G1 iPS 細胞由来の神経幹細胞と、それを NOD-SCID マウスに移植した 5 日目の組織および、103 日目の組織、さらに 201B7iPS 細胞由来の神経幹細胞と、それを NOD-SCID マウスに移植した 5 日目の組織と 103 日目の組織を使用した。103 日目の組織に関しては、253G1 は 6 検体、201B7 は 3 検体分の組織を用意した。

イルミナ社の Genome Analyzer を使用して 75 ベースの single read でのシーケンスと、Hiseq2500 を用いて 70 ベース 70 ベースの pair end でのシーケンスをおこなった。

Single read 法、pair end 法とともに FusionMAP を使用して解析を開始した。

本研究は、慶應義塾大学倫理委員会で人権擁護、不利益・危険性の排除、説明と同意に関して十分な審査を経た承認のもとに行われる。ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、下記の各種指針にもとづいて研究計画を立案・遂行するものとする。

- ・ ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
- ・ その他（文部科学省研究振興局長通知 19 文科振第 852 号）

実験動物を使用する研究を含む研究計画

「動物の愛護及び管理に関する法律」および関連した指針に則って研究を行う。慶應義塾大学医学部では、動物実験委員会を設置し、関連法案および指針を遵守した審査が行われている。本研究に関する動物実験の多くは既に同委員会の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、新たな課題の必要が出てきた場合は、同委員会に申請し、承認を得るものとする。

ヒト細胞を用いた基礎研究計画：

ヒト神経堤由来幹細胞を用いた脊髄再生研究、ヒト ES 細胞の使用研究、ヒト iPS 細胞樹立等の基礎研究について、ヒト細胞入手法を含めて機関内倫理委員会（慶應義塾大学医学部の倫理委員会）の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、必要に応じて同委員会に申請を行い、承認を得るものとする。尚、同委員会では、法令違反を行った場合等に備えて、臨時委員会を緊急に開催するなどの処置により、当該研究を中止することが出来る。

C. 研究結果

(1) SNP解析によるiPS細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価系の確立

平成25年度の解析により、iPSのfeeder細胞、253G1iPS細胞、253G1由来神経幹細胞（3継代目と12継代目）、201B7iPS細胞、201B7由来神経幹細胞（3継代目と6継代目）、836B3iPS細胞についてPanel v3.0で解析したところ、

253G1iPS細胞において、PDGFRAのD842_S847>EAの変異が13.2%混入していること、また201B7iPS細胞において同様にPDGFRAのD842_S847>EAの変異が18.4%混入していることがわかった。そこでOncoCarta Panel v1.0, v2.0およびOncoFocus Panel v1.0(図6-8)を用い、体細胞遺伝子変異プロファイリングの実験と解析を行った。さらに比較対照群としてヒト脳腫瘍由来試料（グリオblastoma）を利用した。

その結果、本年度実施した検体（全30検体）のうちSNP解析により変異の見出された遺伝子はTP53, PDGRAおよびJAK3であった（図9）。これらのうちTP53およびJAK3に関しては対照群として用いた腫瘍サンプルにおいてのみ見出された。一方、PDGFRAに関しては10%程度の確率でiPS-NPCにおいて見られたが、腫瘍原性を有しない201B7株由來のiPS-NPCにおいても観察されることから、造腫瘍性を規定する因子としては考えにくいという結果となった（図10）。さらに、SNPの結果を確認するために、Surveyor assayによりPDGFRAの当該領域に対する解析を行ったところ変異の検出ができなかった。

OncoCarta v1.0

OncoCarta v1	
ABL1	G250E, Q252H, Y253H, Y253F, E255K, E255V, D276G, F311L, T315I, M351T, E355G, F359V, H396R
AKT1	V461L, P388T, L357T, E319G, V167A, Q43X, E17del
BRAF	G440R, G464V/L, G466R, F468C, G469S, G469E, G469V, G469R, D594V/G, F595L, G596R, L597S, L597R, L597Q, L597V, T599I, V600E, V600R, V600L, K601N, K601E
CDK4	R108K, T263P, A289V, G500R, E709K/H, E709V/G/V, G719S/C, C719A, M746_A747del, E768I, V769_D770insASV, V770_D771insASV, V771_D772insASV, V772_D773insASV, N773_I774insASV, V774_D775insASV, H775_N776insASV, H773_N774insASV, H773_N775insASV, H774_C775insASV, T790S, L858R, L861Q, E746_T755del, E746_A750del, S752D, L747_E749del, L747_Q ins, E748_T750del, L747_Q ins (combined), L747_S752del, P753S, A750P, T751A, T751P, T751L, S752I/F, L752P, T753del, L747_Q ins (combined), L747_S752del, Q ins (combined)
EGFR	L755P, L756P, L757P, L758P, L759P, L760P, L761P, L762P, L763P, L764P, L765P, L766P, L767P, L768P, L769P, L770P, L771P, L772P, L773P, N774insASV, V774_C775insASV, T790S, L858R, L861Q, E746_T755del, E746_A750del, S752D, L747_E749del, L747_Q ins (combined), L747_S752del, Q ins (combined)
ERBB2	L755P, L756S/I/C, L757V/C/V, A775_G776insYVMA, P780_Y781insGSP, S779_P780insVG
FGFR1	S125L, P252T
FGFR3	G370C, Y373C, A391E, K650Q/E, K650T/M
FLT-3	I830M, I833H/Y, V617P
JAK2	D52N, Y503_F504insAY, W557R/R/G, V559D/A/G, V559I, V560D/G, K550_K558del, K558_E562del, V559del, V559I, V560del, V560del, Y570_L576del, E561K, L576P, P585P, D579del, K642E, D816V, D816H/Y, V825A, E839K, M552L, Y568D, F584S, P551_V555del, Y553_Q556del
MET	R897C, T992L, Y1230C, Y1235D, M1250T
PDGFR	V561D, Y562I, F808L, D846V, N870S, D1071N, D842_H845del, I843_D848del, S566_E571>K, I843_S847>T, D842V
PIK3CA	R889Q, N345K, C420R, P539R, E542K, E545K, Q546K, H701P, H1047R/L, H1047Y, R38H, C901F, M1043I
HRAS	G12V/D, G12C/R, G12S, G12W, G12D, G12A, G12F, G13V/D, A597, Q51E/K, Q61L/R/P, Q61H/H
KRAS	G12C, G12R, G12S, G12W, G12D, G12A, G12F, G13V/D, A597, Q51E/K, Q61L/R/P, Q61H/H
NRAS	G12V/A/D, G12C/S, G13V/A/D, G13C/R/S, A18T, Q61L/R/P, Q61H, Q61E/K
RET	E634R, C634W, C634Y, E632_L633del, M918T, A664D

図6:OncoCarta v1.0

OncoCarta v2.0

OncoCarta v2	
AKT-1	E17K
BRAF	R444D, R444W, R462I, I463S, G586K, V600D, G615E
CTNNB1	D32N, D32H, D32Y, S33P, S33Y, S33C, S33F, G34R, G34E, G34S, G34F
FBXW7	S88_L12L, L12Q, G30N, P76T
FGR2	R465C/R479G, R479Q, R479L
FGR3	S252W, Y376C
GNAT	A281V
GNATQ	Q209P, Q209L
KIT	K492R, M535V, M535T, M535I, M535N, Y553N, Y553K, K558R, K558G, Q560R, Q560G, R561K, R561G, R561S, R561N, R561Q, R561H, R561D, R561W, R561Y, R561F, R561C, R561P, S709P, D716N, R739G, D751G, T753A, C809G, D816F, D816A, D816G, D816V, D818V, D820Y, D820H, D820A, D820G, D820E, N882H, N882Y, D882K, Y882D, A829P
KRAS	G13A, G13V, G13D, T58I, V59V, G60D
MAP2K1	F53S, K57N, D67N, Y134C, E203K, E203Q
MAP2K2	F57L, F57C, F57L, K61E, R388Q
NRAS	A59T
PDGFR	N659K, Q842Y, D842F, Y849C
PIK3CA	S326F, E418K, E542I, E542K, E542V, E545Q, E545K, E545A, E545G, C546E, C546K, C546P, C546R, C546W
PTPN11	T507K
SOS1	R688Q, H888Q
TP53	R273L, S282H, D281Y, D281G

図7:OncoCarta v2.0&v3.0

OncoCarta v3.0

OncoCarta v3	
ABL1	M034V
APC	R510⁻S114⁺, E13095⁺, Q1429⁺, S1465f⁺, T16561⁺
BRAF	V473F, N583S, V600M
CDKN2A	R58*, E61*, E60*, H8Y, D84Y
CSF1R	L301S, Y969F, Y969C, Y969H, Y969*
CTNNB1	A13T, V22A, W25_D32DEL, S45A
EGFR	G719D, L730F, G735S, Y742A, L747_P753>S, L747_T751>P
ERBB2	D769H, V777L
FLT3	D850DEL, R836M
HRAS	G12C, G12R
JAK3	P132T, A572V, V722I
KRAS	Q22K
MET	T1010L, H1112R, H1112Y, M1268T, Y1248C, Y1248H
MILH1	V384D
MYC	P57S, K99W, T77P, N101T, A260A
PDGFR	D842_D845del, D842_D846>G, D842_D847>A, D842_D847>Y, D842_D847>R, D842_D847Y, R884_L884del, S556_E557>R
PTEN	K674⁺, R1309Y⁺, R130G, R173C, R173H, R233Y⁺, P248Y⁺, K267T⁺, V317T⁺, N323H⁺, V321L⁺
RB1	E137*, L199*, R320*, R455*, R556*, R579*, L660F⁺, C709P⁺
RET	A630F>Y630R, D631L, G633E, D631G, D688R_E690del, E632_R640del, F678D, F678L, G620Ddel
STK11	Q317*, Q317⁺, D194V, G196V, F264I⁺22, P281F⁺6, P281L, W332*
TP53	R303*
VHL	L85P, F148R⁺11, L158Q, R161*, R167W

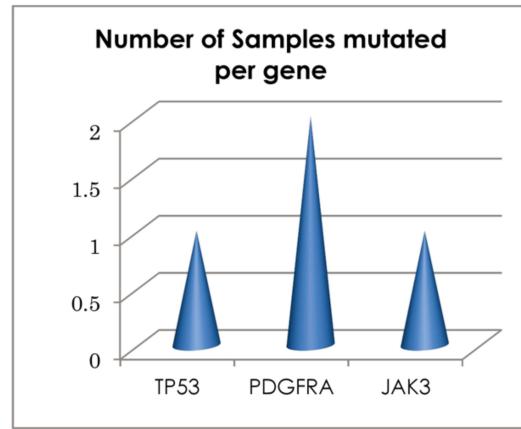


図9:SNP解析により同定された遺伝子変異
本年度の解析に用いた30検体中に見出された遺伝子変異

ONCOFOCUS PANEL V1.0 GENES AND MUTATIONS

GENE	MUTATION
BRAF	G469S, G469A, G469E, G469R, G469V, D594G, D594V, L597S, L597Q, L597V, L597R, T599_V600insT, T599_V600insTT, V600G, V600K, V600R, V600L, V600M, V600E, V600>YM
EGFR	R108K, T263P, A289V, A289D, G598V, E709V, E709H, E709K, E709G, E709Q, E709A, G719S, G719D, G719C, G719A, K745_E749delELRE, E746_S752>V, E746_A750>VP, E746_E749del, E746_A750>IP, E746_T751>Y, E746_A750>DP, E746V, E746_P753>VQ, E746_T751>A, E746_T751delELREAT, E746_A750>QP, E746_P753>VS, E746_S752>I, E746_T751>VA, E746_S752>D, E746_S752delELREATS, E746K, E746_T751>L, E746_T751>, E746_E749delELRE, E746_T751>IP, E746_T751>VP, E746_T751>Q, E746_S752>A, E746_P753>IS, E746_A750delELREA, E746_A750>RP, E746_P753>LS, L747_P753>Q, L747_T751>A, L747_K754>ST, L747_T751>P, L747_T751delELREAT, L747_P752>GH, L747_E749del, L747S, L747_P753>S, L747_A750>P, L747_T751>Q, L747_T751>S, L747_K754delELREATSPN, L747P, L747_S752>Q, L747_E749delELRE, L747_T751>PT, L747_S752delELREATS, L747_A755>AN, T751_I759>S, T751_I759>N, T751_E758delTPSKANKE, S752Y, P753_I759del, P753S, P753Q, P753_I759delTPSKANKEI, I759N, D761N, D761Y, M766_A767insAI, A767_S768insTLA, S768N, S768I, S768_L769>IL, V769_D770insGSV, V769_D770insCV, V769_D770insGVV, V769_D770insASV, D770>GY, D770_N771insSVD, D770_N771insG, D770_P772>ASVDNR, D770_N771insGL, D770_N771insAPW, D770_N771insGF, D770N, D770_N771>AGG, D770_N771insMATP(5' Detection Only), D770_N771insGD, N771>GF, N771_P772insRH, N771_P772>SVDRN, N771>SH, N771>TH, N771>GY, H773_V774insH, H773_V774insNPH, H773_V774insQ, H773_V774insPH, V774M, V774_C775insHV, V774L, R776C, R776H, T790M, T854A, L858M, L858R, L858K, L861R, E7091s*1, T751s*4, H773>NPY(3' Detection Only)
KRAS	G12W, G12C, G12E, G12Y, G12D, G12F, G12R, G12N, G12G, G12S, G12A, G12T, G12V, G12I, G12P, G12_G13insA, G12L, G13A, G13D, G13R, G13N, G13S, G13V, G13I, G13_V14insG, G13C, A59T, Q61K, Q61E, Q61R, Q61H, Q61P, Q61Q, A146G, A146T, A146V, A146P
NRAS	G12C, G12Y, G12N, G12A, G12E, G12V, G12P, G13A, G13D, G13R, G13V, G13N, G13Y, Q61K, Q61R, Q61H, Q61P, Q61Q, Q61E, Q61L

図8:OncоФocus v1.0

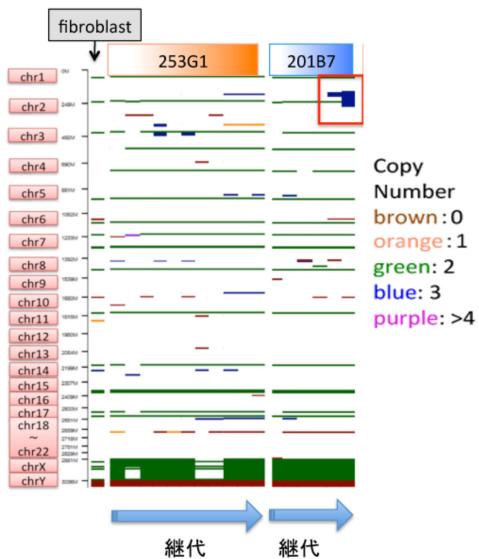


図11: iPS-NPCにおけるCNV解析
継代ごとにiPS-NPCのCNVが異常化をきたすことが明らかとなった。Safe iPS-NPCである201B7由来iPS-NPCにおいても長期間培養時には広領域にわたる欠失が観察された。

Sample	Gene	Assay	Mutation	Allele	WT Frequency	Mutation Frequency
1123GBM p20	TP53	TP53_107	R273C	A	0.307	0.693
253G1 iPS p32	PDGFRA	PDGFRA_427	D842_S847>EA	GGCC	0.864	0.136
201B7 iPS p29	PDGFRA	PDGFRA_427	D842_S847>EA	GGCC	0.882	0.118
0712GBM p7	JAK3	JAK3_401	V722I	T	0.345	0.655

図10:SNP解析により同定された遺伝子変異
本年度の解析に用いた30検体中に見出された遺伝子変異

MassArrayシステムによるSNPの検出に関しては、10%程度の変異率では偽陽性が出やすいこともわかり、本研究で目的とする少数の細胞集団へのアプローチとしては必ずしも最適でないことがわかった。また、全ゲノムSNPアレイによる造腫瘍性関連メカニズムの解析を目的として、OmniExpress-24 BeadChipを用いた解析を施行した。実験試料としてヒト線維芽細胞,iPS細胞(201B7及び253G1),iPS-NPCを複数の継代数から得られたゲノムDNAを用いた。その結果、興味深いことにiPS細胞においてはCNVに関しては継代ごとに大きな変動はなく安定しているのに対し、iPS-NPCに関しては継代ごとにCNVに異常化を来すことが分かった。本研究拠点においては造腫瘍性が見出されなかった201B7由来のiPS-NPCにおいても、長期間培養後では特定の染色体の広範な領域に欠失が見出された(図11)。

今後CNVやSNPに関して詳細な解析をし、造腫瘍性を規定する因子を見出すことを予定している。一方造腫瘍性という観点から、iPS細胞での継代数よりも、iPS-NPCの培養期間は可能な限り短縮した方がゲノムの安定性という点において有利であることが分かった。融合遺伝子の検索に関しては、現在single readおよびpair endでのシーケンスの予備実験が終了したところであり、single read、pair endの両方に共通のデータ部分に焦点を当てて、今後解析を進めていく予定である。

D . 考察

本研究成果より、細胞株間による genome

instability の違いと、hiPS-NS/PC の passageにより genome instability が悪化することが分かった。さらに、腫瘍を高率に形成する 253G1 iPS 細胞株において、他の細胞株にはない特異的な構造変異があることもわかった。ranscriptome 解析のみでは、遺伝子発現量のカットオフ値の設定が困難であるため、造腫瘍性の評価系としては不十分であった。しかし、造腫瘍性を規定する構造変異及び DNA メチル化状態や癒合遺伝子などの評価系を組み合わせることや細胞の継代数を厳重に管理することにより、より精度の高い iPS-NPC の品質管理項目の作成が可能となると期待される。

E . 結論

iPS細胞およびiPS細胞由来神経幹細胞、ヒト脳腫瘍由来の細胞を用いて、その腫瘍原性を調べるべく、抽出DNAからSNP解析や融合遺伝子の検索を行った。これらの結果はヒトiPS細胞由来神経幹細胞の腫瘍形成能のメカニズム解明につながる可能性があり、安全性の確保のための項目として利用できると考えられる。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

(原著論文)

1. Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Controlling immune rejection is a fail-safe system against potential tumorigenicity after human iPSC-derived neural stem cell transplantation. PLoS One. 2015 Feb 23;10(2):e0116413.
2. Iwanami A, Kobayashi Y, Takano M, Mikami S, Toyama Y, Nakamura M. Invasive dumbbell spinal meningiomas: report of four cases and a review of the literature. J Orthop Sci. 2014 Sep 8.
3. Qin Y, Fu M, Takahashi M, Iwanami A, Kuga D, Rao RG, Sudhakar D, Huang T, Kiyohara M, Torres K, Dillard C, Inagaki A, Kasahara N, Goodlick L, Braun J, Mischel PS, Gordon LK, Wadehra M. Epithelial membrane protein-2 (EMP2) activates Src protein and is a novel therapeutic target for glioblastoma. J Biol Chem. 2014 May 16;289(20):13974-85.

(学会発表)

1. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source of transplantation therapy for spinal cord injury. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
2. Hori K, Kohyama J, Matsubayashi K, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Intracranial xenograft model as a validation system to assess tumorigenicity of NS/PCs for transplantation therapy. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
3. Iida T, Kohyama J, Iwanami A, Yoshida R, Nishimura S, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Assessment of tumorigenic potential of induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)
5. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source for the treatment of spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 42nd Annual Meeting (Orlando, USA, 2014, 12)
6. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫原性の検討. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
7. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒトiPS細胞由来神経幹細胞における造腫瘍性評価項目の確立. 第33回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
8. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫学的特性の検討.

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2014,10)

9. 堀桂子, 神山淳, 坂野聰重, 岩波明生,
岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: マウス
脊髄損傷モデルにおけるエピジェネティ
ック修飾関連因子の解析, 第 29 回日本整
形外科学会基礎学術集会(2014,10)

10. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 吉田怜, 西
村空也, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅
也: iPS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性

評価系の確立. 第29回日本整形外科学会基
礎 学術集会 (2014,10)

**H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）**

該当する記載なし

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（再生医療関係研究分野）

分担研究報告書

ヒトiPS由来神経前駆細胞の腫瘍形成能のメカニズムとその制御による安全性確保の検討

研究分担者 神山 淳 慶應義塾大学医学部 生理学教室 准教授

研究要旨

本研究ではヒトiPS細胞を用いた再生医療実現に向けた障壁となる造腫瘍性の制御を目的とする。従来、iPS細胞を用いた再生医療に関する造腫瘍性は残存する未分化な細胞(iPS細胞)の混入による奇形腫形成であると考えられてきたが、当研究拠点での現在までの結果からヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の再生医療応用においてはグリオーマ等の神経系の腫瘍の形成が問題となることがわかつってきた。しかし、造腫瘍性の原因となる細胞集団の同定がなされておらず、この問題の根本的な解決手法は見出されていない。本研究ではヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)を用いた再生医療実現化の為の造腫瘍性の制御を目的とし、hiPS-NPCの腫瘍原性を規定する細胞集団の同定およびその分子的基盤を明らかとするため、一細胞分離(single cell sorting)により得られたhiPS-NPC由来クローン(siPS-NPC)の樹立を試み、解析を行った。本年度は当研究室の今までの研究で明らかとなった造腫瘍性を規定しうる55遺伝子の発現が高い細胞集団を見出した。本研究成果は再生医療実現に向けたiPS-NPCの品質管理項目設定につながる重要な知見であると考えられる。

A. 研究目的

ヒトiPS細胞を用いた神経系疾患の治療法確立に向け、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞(hiPS-NPC)の腫瘍原性の実体解明及びその制御は最も重要な課題である。本研究では京都大学iPS細胞研究所(CiRA)より提供を受けたヒトiPS細胞から神経前駆細胞への誘導法を

確立し、造腫瘍性を検討した上で造腫瘍性を有していた細胞株に関し、その腫瘍形成に關

わる分子機構を明らかとすることを目的とする。特にhiPS-NPCは造腫瘍性という観点から不均一な集団であり(heterogeneity)、この不均一性の問題を打開するためにFACSを利用し、

単一細胞由来iPS-NPC(siPS-NPC)を樹立を試みる。さらにこれらの細胞株を用いた解析を行うことで造腫瘍性の実体を明らかとすることを目的とする。

B . 研究方法

(1) ff-iPS細胞由来NPCストックの作成

再生医療用iPS細胞ストックの提供時期が平成27年度後半以降であるという状況から平成26年度は再生医療用iPS細胞ストックと同様の手法を用いて末梢血から作成されたiPS細胞(1210B2, 1231A3)より神経系への分化誘導を試みた。手法としてはFalkらが2012年にPlos One誌に発表した手法を一部改変し、基本培地を味の素社が開発したGMPグレードの神経前駆細胞用培地を利用した。誘導したhiPS-NPCに関しては分化能や神経前駆細胞マーカーの発現解析等により機能評価を行った。

(2) siPS-NPCの樹立と維持

上記の手法により樹立されたhiPS-NPCをFACSにより1細胞分取を行い、96wellプレート上に播種した。これらの細胞を神経前駆細胞用培地で維持し、2日ごとに培地交換及び液性因子を添加し、96wellプレート上で増殖した細胞は細胞の数に応じて培養のスケールを上げ、最終的に10cmの培養皿での培養が維持可能となった段階でRNAサンプルを調整のちに凍結を行った。

(3) 遺伝子発現解析

1細胞より得られた細胞株由来のRNAサンプルはイルミナ社のiScanを用いた全転写産物の発現解析を行った。

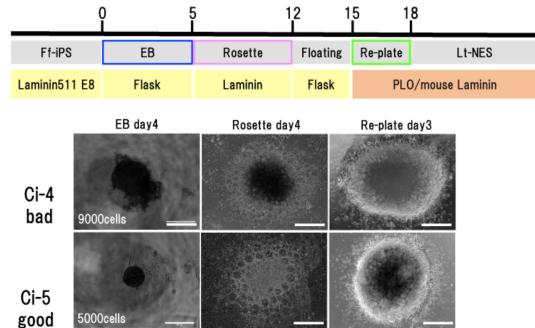


図1:ff iPS細胞から神経前駆細胞への分化誘導プロトコール
ff-iPS細胞から胚様体を形成したのち(左下参照)接着系へと細胞をうつし、Rosette形成を促した(左中図参照)。このRosetteを解PLO/Lamininコートしたプレート上で神経前駆細胞を増殖・維持した(右下図参照)。

(倫理面への配慮)

本研究は、慶應義塾大学倫理委員会で人権擁護、不利益・危険性の排除、説明と同意に関して十分な審査を経た承認のもとに行われる。ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、下記の各種指針にもとづいて研究計画を立案・遂行するものとする。

- ・ ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針
- ・ その他（文部科学省研究振興局長通知19文科振第852号）

実験動物を使用する研究を含む研究計画：
「動物の愛護及び管理に関する法律」および関連した指針に則って研究を行う。慶應義塾大学医学部では、動物実験委員会を設置し、関連法案および指針を遵守した審査が行われている。本研究に関する動物実験

の多くは既に同委員会の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、新たな課題の必要が出てきた場合は、同委員会に申請し、承認を得るものとする。

ヒト細胞を用いた基礎研究計画：ヒト神経堤由来幹細胞を用いた脊髄再生研究、ヒトES細胞の使用研究、ヒト iPS 細胞樹立等の基礎研究について、ヒト細胞入手法を含めて機関内倫理委員会（慶應義塾大学医学部の倫理委員会）の承認を得ている。今後本研究を遂行する上で、必要に応じて同委員会に申請を行い、承認を得るものとする。尚、同委員会では、法令違反を行った場合等に備えて、臨時委員会を緊急に開催するなどの処置により、当該研究を中止することが出来る。

C.研究結果

(1) ff-iPS由来NPC細胞の樹立および機能評価
iPS中核拠点からの再生医療用iPS細胞ストックの入手時期の問題から、末梢血から再生医療用iPS細胞ストックと同一手法により樹立されたfeeder free iPS細胞(ff-iPS細胞)2株(1210B12, 1231A3)を用い神経前駆細胞への誘導を行った(図1)。まず、1210B2を利用して誘導を開始したところ末梢血由來ff-iPS細胞も既報と同様に接着系での神経前駆細胞(iPS-NPC)培養が可能であった。また、これらの細胞を培養すると継代を経ても増殖性に変化はなく、また神経前駆細胞マーカーの発現も90%以上の細胞で観察された(図2)。

次に神経系への分化誘導効率および純度を解析するためにPSA-NCAMとCD133を用いて解析を行ったところ、98%程度の細胞がこれらのマーカーを発現しており、高純度な神経系細胞へと分化誘導されていることが明らかとなった(図3)。また、これらのiPS-NPCを14日間分化誘導を行ったところ高効率な神経誘導が可能であった(図4)。

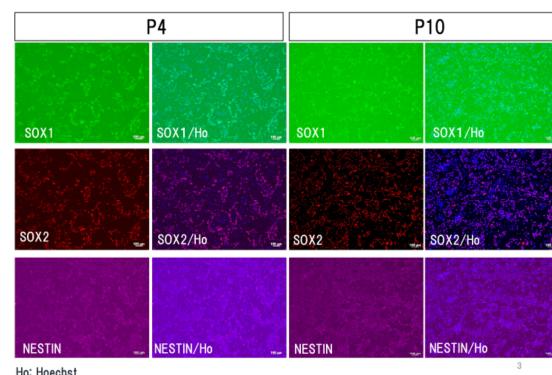


図2:ff-iPS-NPCにおける神経前駆細胞マーカーの発現解析
ff-iPS-NPCの4継代後(P4)と10継代後(P10)における神経前駆細胞マーカーSox1, Sox2およびNestinの発現を免疫組織学的に解析を行った。その結果これらの神経前駆細胞の発現が一様に観察された。

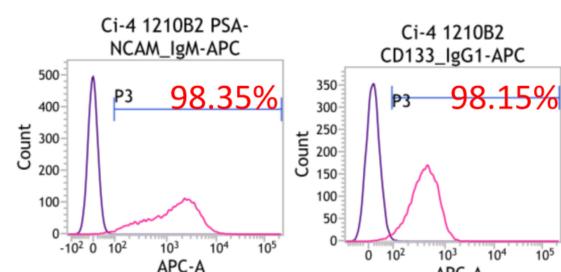


図3:ff-iPS-NPCにおけるCD133, PSA-NCAMの発現解析
ff-iPS-NPCにおけるPSA-NCAMおよびCD133の発現をFACSを用いて解析した。いずれのマーカーも90%以上の発現を示した。

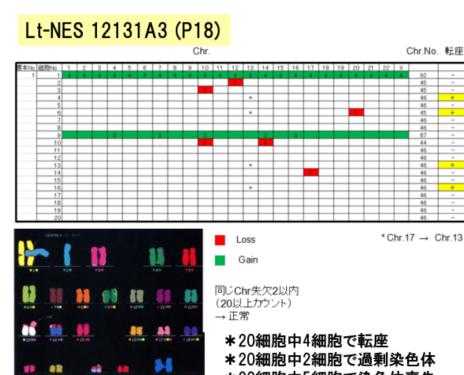


図4:1231A3株由来iPS-NPCの核型異常
1231A3株はiPS細胞では核型は正常であるが、神経誘導過程により核型異常を呈することが明らかとなった。

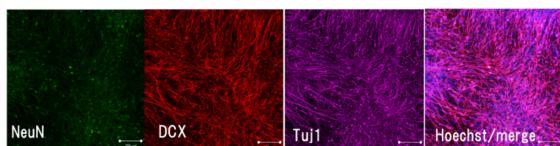


図4:ff iPS-NPCの分化誘導能の確認

iPS-NPCを2週間分化用培地で培養し、神経への分化誘導を行ったのちに神経マーカーであるNeuN, Dcx, Tuj1の発現を解析した。

そこで次に1231A3株を用いて同様の解析を行った。1231株において1210B2株と同様に誘導を行ったところ、Rosette形成は問題なく観察されたものの、iPS-NPCの維持が困難であり、神経前駆細胞のマーカーであるSox1, Sox2、Nestinの発現が少数の細胞しか見られず、同様にPSA-NCAMを用いたFACSの解析においても50%程度であり、神経系への分化抵抗性が見られた(図5)。

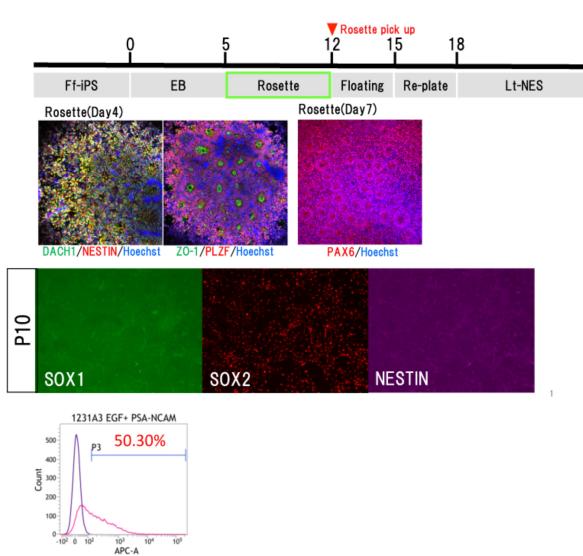


図5:1231A3株における神経誘導への抵抗性

1231A3株に対して神経誘導を試みるとRosette形成時においては良好な分化傾向を示しており、RosetteマーカーであるZ01やPLZF, Pax6などの発現が高頻度に観察された(中段)。また、iPS-NPCにおいてはSox1, Sox2, Nestinの発現が一部の細胞のみ観察されるのみであり、FACSにおいてもPSA-NCAMの発現が50%程度であった。

このiPS-NPCの神経細胞への分化誘導を試みたがニューロンマーカー陽性細胞数が少なく、NPCから神経細胞への分化においても抵抗性が認められた。この原因の一つとして1213A3株由来のiPS-NPCにおいては核型異常が見られており(図17)、染色体異常が分化抵抗性と連関していることが予想された。今後のiPS-NPCの再生医療への実現に向けての品質管理項目として核型異常は簡便な検査項目であり、未然に防げる可能性のあるものであるため、造腫瘍性検討を目的とした免疫不全動物への移植に関しては1231A3由来iPS-NPCは使用せず、1210B2由来iPS-NPCを利用すべきであると判断した。

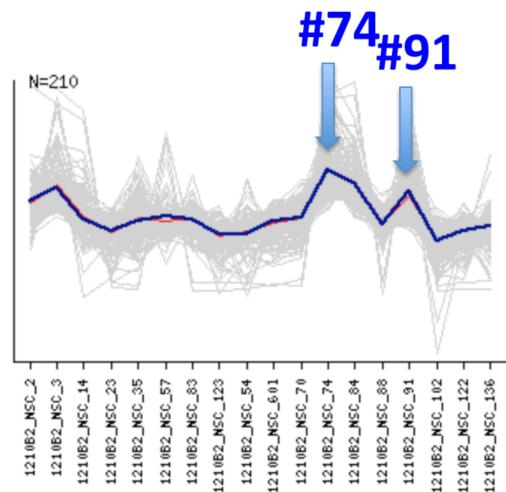


図9:iPS-NPC造腫瘍性関連遺伝子55遺伝子の遺伝子発現パターンによる細胞株の分類

当研究拠点で見出した造腫瘍性に関連する遺伝子(55遺伝子)の発現レベルの平均値(青ライン)により18株を分類したところクローニー74とクローニー91はこれら55遺伝子の発現が他の株より高かった。また、55遺伝子と同様の遺伝子発現パターンを示す遺伝子は210遺伝子存在した。

図7: 1細胞由来iPS-NPCの遺伝子発現解析

クラスタリング解析による相関解析。18株の1細胞由来iPS-NPCの遺伝子発現解析を行ったところ、遺伝子発現様式が近似する細胞群が存在した。当研究室で従来使っている安全なiPS-NPC(201B7由来iPS-NPC)とは遺伝子発現様式が大きく異なっていた。

(2) 単層培養系hiPS-NPCを用いたsingle cell sorting条件検討

NPCはFACSによる一細胞分取および一細胞由来NPCs樹立は細胞調整時の細胞死などの問題があり技術的な困難があった。そこで本年度はFACS施行前の細胞の前処理方法を検討した。その結果、FACS前のNPCにROCK阻害剤処理を施すことにより大幅に生存率が改善した。そこでこの手法を行い、hiPS-NPCからの1細胞分取を試みた。本年度の造腫瘍性検討から1210B2由来hiPS-NPCのCi-4株において明らかな造腫瘍性は認められないものの、移植後の長期経過後における移植細胞由来組織の増殖性や異所性骨化などが見られたため、1210B2由来hiPS-NPCの一つとして樹立したCi-4株を用いた。その結果本年度は100株程度の一細胞由来hiPS-NPC株が樹立可能であった。

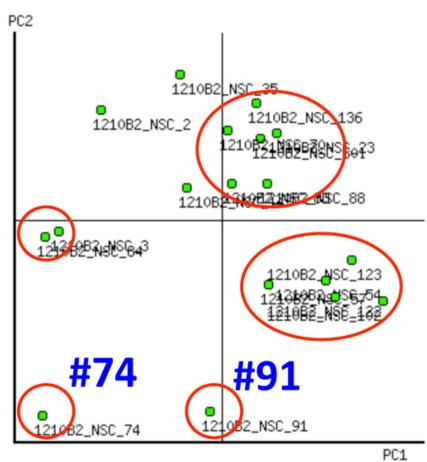


図8: 1細胞由来hiPS-NPC18株における主成分解析(PCA解析)
PCA解析により18株を解析したところ複数のclusterが見出された。
興味深いことに2株明らかに他の細胞株とは異なる遺伝子発現
様式を示していた(クローン74, クローン91)。

(3) 1細胞由来hiPS-NPCの遺伝子発現解析

本年度樹立した一細胞由来hiPS-NPCは最終的には実験動物に対する移植により造腫瘍性判定を行うことを計画していたが造腫瘍性判定には長期の解析が必要であり(中村の項目参照)移植により造腫瘍性判定を行う細胞株を選別する必要があった。そこで本年度は1細胞由来hiPS-NPCの転写レベルでの多様性を解析すべく、マイクロアレイによる解析を行った。70検体のマイクロアレイを施行し、うち18サンプル分に関しては二次解析を施行したので報告する。

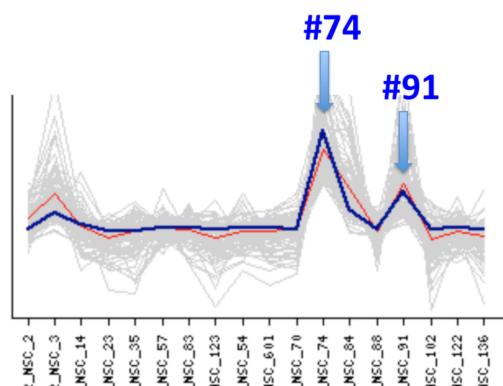


図10: PDGFRAの遺伝子発現パターン

による細胞株の分類
すでにhiPS-NPCの造腫瘍性と関連性があると分かっているPDGFRAの発現レベル(青い線)により18株を分類したところ
クローン74とクローン91はこれら55遺伝子の発現が他の株より高かった。

まず1細胞由来hiPS-NPC 18株の遺伝子発現をマイクロアレイにより解析し、クラスタリング解析による各株間の相関を解析した。比較対照群として当研究室で安全性が確認されている201B7由来hiPS-NPCの実験試料を利用した。その結果、今回樹立した18株は201B7由来hiPS-NPCとは大きく遺伝子発現パターンが違うことが分かった。これは神経誘導の手法が接着培養系と浮遊培養系(201B7由来

hiPS-NPC)の差に起因すると考えられる。興味深いことに18株の間の相関に関しても複数のクラスターを形成していることが予想された(図7)。

次に主成分解析による遺伝子発現パターンによる分類を行ったところクラスタリング解析と同様に複数のサブグループに分類された。特に2株(クローン74とクローン91)においては他の細胞とは明らかに性質の異なるものであることが示唆された(図8)。次に、すでに当研究室で造腫瘍性と関連すると想定している55遺伝子に関して着目し、これらの遺伝子の発現レベルの平均値をとり、各株における発現レベルを検討するとクローン74とクローン91は発現レベルが高いことが分かった(図9)。特にこの55遺伝子のうちもっとも造腫瘍性と関連すると考えられてきたPDGF receptor alpha (PDGFRA)に関してはこれら2クローンの発現レベルは他の株に比べ高い事が明らかとなった。

今後残りの株の発現解析を進めるとともに、クローン74やクローン91の株の細胞としての性質付けを進めることにより造腫瘍性の実体を明らかとしたい。

D . 考察

hiPS-NPCの造腫瘍性という観点からの細胞の不均一性(heterogeneity)の解明は重要な課題である。本年度の解析から末梢血由来iPS細胞からも神経前駆細胞の誘導が可能であり、また一細胞由来hiPS-NPCの樹立が可能であった。本年度に行った遺伝子発現解析により、hiPS-NPCには遺伝子発現という観点からも不均一性、多様性があることが明らかとなった。さらに、特定の細胞集団は当研究拠点で現在までに明らかにしてきた造腫瘍性関連遺伝子発現が高レベルで見られることが分かった。従来、hiPS-NPCの造腫瘍性は 残存未分化細胞(iPS細胞)による奇形腫形成 神経前駆細胞の腫瘍化によるアストロサイトーマもしくはグリオーマの形成が想定されてきたが、本年度の研究によりhiPS-NPCに含まれる特定の細胞集団が造腫瘍性の一部を担っている可能性が示唆された。今後はこの解析を引き続き継続し、造腫瘍性の実体解明および細胞の品質管理項目の設定に注力したいと考えている。

E . 結論

hiPS-NPCにおける造腫瘍性の実体解明には単一細胞由来のNPCの樹立が必須であり、本研究では再生医療用iPS細胞ストックを利用し作製されたhiPS-NPCの造腫瘍性の実体解明に向けた基礎的な基盤が確立されたもの考えており、これらをもとに腫瘍原性を事前に検出可能な腫瘍マーカーの同定が期待される。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

<原著論文>

1. TLR9 signaling in microglial attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K. Nat Commun. 2015 Mar 9;6:6514.

2. Zhou Z, Kohda K, Ibata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. Mol Brain, 7:24 2014

<学会発表>

1. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source of transplantation therapy for spinal cord injury. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)

2. Hori K, Kohyama J, Matsubayashi K, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Intracranial xenograft model as a validation system to assess tumorigenicity of NS/PCs for transplantation therapy. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)

3. Iida T, Kohyama J, Iwanami A, Yoshida R, Nishimura S, Okano H, Toyama Y,

Nakamura M. Assessment of tumorigenic potential of induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. 44th annual meeting of Society for Neuroscience (Washington DC, USA, 2014, 11)

5. Ozaki M, Itakura G, Iwai H, Kohyama J, Iwanami A, Okano H, Toyama Y, Nakamura M. Immunogenicity of human induced pluripotent stem cells-derived neural stem cells as a cell source for the treatment of spinal cord injury. Cervical Spine Research Society 42nd Annual Meeting (Orlando, USA, 2014, 12)
6. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫原性の検討. 第 33 回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
7. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒトiPS細胞由来 神経幹細胞における造腫瘍性評価項目の確立.第33回日本運動器移植・再生医学研究会 (2014, 9)
8. 尾崎正大, 板倉剛, 岩井宏樹, 吉田怜, 神山淳, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞移植治療における免疫学的特性の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014, 10)
9. 堀桂子, 神山淳, 坂野聰重, 岩波明生, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也: マウス脊髄

損傷モデルにおけるエピジェネティック
修飾関連因子の解析、第 29 回日本整形外
科学会基礎学術集会(2014,10)

10. 飯田剛, 神山淳, 岩波明生, 吉田怜, 西村
空也, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 : i
PS細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価系
の確立. 第29回日本整形外科学会基礎 学
術集会 (2014,10)

**H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）**

該当する記載なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
.							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.	Controlling immune rejection is a fail-safe system against potential tumorigenicity after human iPSC-derived neural stem cell transplantation.	PLoS One	10(2)	e0116413	2015
Itakura G, Kobayashi Y, Nishimura S, Iwai H, Takano M, Iwanami A, Toyama Y, Okano H, Nakamura M.	Control of the survival and growth of human glioblastoma grafted into the spinal cord of mice by taking advantage of immunorejection.	Cell Transplant			2014 (in press)
Qin Y, Fu M, Takahashi M, Iwanami A, Kuga D, Rao RG, Sudhakar D, Huang T, Kiyoohara M, Torres K, Dillard C, Inagaki A, Kasahara N, Goodlick L, Braun J, Mischel PS, Gordon LK, Wadehra M.	Epithelial membrane protein-2 (EMP2) activates Src protein and is a novel therapeutic target for glioblastoma.	J Biol Chem.	289 (20)	13974-13985	2014

Matsuda T, Murao N, Katano Y, Juliandi B, Kohyama J, Akira S, Kawai T, Nakashima K.	TLR9 signaling in microglial attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus.	Nat Commun	6	6514	2015
Zhou Z, Kohda K, Ibata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H.	Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors.	Mol Brain	7	24	2014
Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H.	Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice.	Stem Cell Reports	3(2)	242-249	2014
Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudoh J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H.	Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition.	Stem Cell Reports	4(3)	360-373	2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷

