

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 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

2. 研究開発代表者： 川真田 伸

(公益財団法人先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター センター長)

3. 研究開発の成果

多能性幹細胞由来細胞を用いた細胞治療の安全性試験では、移植細胞の腫瘍形成能の評価のため動物を用いた造腫瘍性試験の実施が重要である。また、造腫瘍性試験結果を意味あるものにするためには、移植細胞自体に関する情報や検査システム、例えば初期化された iPS 細胞の分化抵抗性に関する情報や長期培養に伴う染色体構造異常の迅速検査方法、さらには移植細胞の動態を長期間観察するための適切な生体イメージシステムの構築などが必要である。そこで、①慶應大学医学部で計画されている脊髄損傷治療の臨床に用いるヒト iPS 細胞由来神経幹細胞 (NSC) の造腫瘍性試験、②移植細胞の染色体を Luciferase で長期に渡り標識が出来る技術開発研究、そして③Custom CGH array を用いた染色体検査の開発を進めている。

- ① 昨年度から 2 種類のヒト iPS 細胞由来 NSC の造腫瘍性試験を引き続き進めている。約 1×10^6 個を重度免疫不全 NOG マウスの脳線条体 2 ヶ所へ移植し、3, 6, 12 ヶ月の経過観察と剖検を行う。今年度は、3, 6 ヶ月の脳組織切片を分化や増殖に関わるタンパク質の抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、移植したヒト iPS 細胞由来 NSC は NOG マウス脳内に生着し、分化していることが分かった。また、造腫瘍能の指標として増殖能に関与する Ki67 の陽性細胞率を求めた。その Ki67 の陽性細胞率は、陽性コントロール細胞としてヒト脳腫瘍細胞では 10%以上、無限増殖能を示すヒト iPS 細胞ではほぼ 100%であった。一方で、ヒト iPS 細胞由来 NSC は平均数%程度と陽性コントロール細胞と比べてかなり低いものであった。移植像としては、増殖能を示す陽性コントロール細胞の移植片の形状は辺縁不整、不連続の細胞塊であり、境界が不明瞭であったが、ヒト iPS 細胞由来 NSC の移植辺縁は整で周囲マウス脳線条体組織への浸潤像はなく、移植内部は充実性であった。これらのことから、移植片の形状、分化度、Ki67 陽性率などが、移植組織の増殖能や腫瘍形成能の評価には有用な指標であることが確認された。引き続き 9 ヶ月、12 ヶ月での観察結果を元に、移植ヒト iPS 細胞由来 NSC の造腫瘍性を総合的に評価する。
- ② 昨年度より引き続き、移植後の体内転移が最も考えられる自家 iPS 細胞移植モデルを用いて体内動態評価を行った。具体的には、Luciferase 遺伝子を導入した B6 マウス由来 iPS 細胞を B6 マウスに種々の route で投与し、IVIS imaging system を用いて体内動態の評価を実施した。移植 route としては、臨床案件があり、かつ技術的難易度が低い経肝臓 (ES 細胞由来肝細胞移植を想定)、経尾静脈 (iPS 細胞由来血小板輸注を想定) 移植を実施した。その結果、深部組織での移植細胞を検出できる最低の細胞数や、移植組織で移植 iPS 細胞が生着、増殖するために必要な細胞数が分かった。さらに、いくつかの臓器への遠隔転移も観察された。また、iPS 細胞由来心筋移植を想定した心外膜付近への iPS 細胞の投与方法として、縦隔内 (胸腔内) 投与方法を実施し、肺や心臓に傷をつけることなく、縦隔内 (胸腔内) に細胞を移植する方法を確立した。
- ③ 前年度に作動確認を行った Custom CGH array を改良した。さらに、培養条件で分化能特性が変容するメチル化領域の解析を行った。細胞培養条件の相違で分化能が喪失した細胞群と分化能を維持している細胞群のプロモーター領域でメチル化の異なるものが複数抽出された。現在は、その候補因子の分化能保持に関する機能評価を実施している。これらの研究を通じて分化能保持に関するプロモーター領域のメチル化部位を特定し、その部位のメチル化の状態を多能性幹細胞の分化能保持/非保持の指標に使う予定である。

以上の研究開発を通して、移植細胞の安全性を総合的に評価出来るシステムの構築を目指している。