

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 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
2. 研究開発代表者： 早川 堯夫（近畿大学薬学総合研究所 所長）
3. 研究開発の成果

ヒト iPS/ES 細胞株に由来する腫瘍の発生頻度、悪性度と機序、検査法の検討について、当該年度 (H27 年度) は以下のような研究開発を行った。

1. ヒト iPS/ES 細胞株の種類及び起源が異なることによる影響について

- 1.1. 昨年度までに細胞特性のプロファイリングを行ったヒト iPS 株 10 種を重度免疫不全動物 NOG マウスに皮下投与し、腫瘍形成率や腫瘍サイズの経時的な記録といった腫瘍（奇形腫）形成のモニターを 16 週間行った。同等の未分化性を有するにも関わらず、腫瘍サイズや腫瘍形成率は種類及び起源の異なる iPS 細胞株間で大きく異なることが明らかになった。
- 1.2. 上記移植試験において、ヒト iPS 株 10 種において 100 mm³ 以上の形成が認められた 41 検体の腫瘍の HE 染色を行い、卵巣奇形腫の分類に基づいた病理学的評価、三胚葉系への分化の確認、病理学的特性である未熟神経上皮成分の数によるグレード分けを行った。その結果、作成された奇形腫は、使用された iPS 細胞によりその組織像は異なっていた。解析を行った 41 検体のうち 2 例が成熟奇形腫であり、それ以外は未熟奇形腫で未熟神経組織を含んでいた。12 例は内胚葉成分を有しない二胚葉成分の奇形腫であり、それ以外は三胚葉成分の奇形腫であった。また、悪性像（癌腫、肉腫および胚細胞腫瘍における胎児性癌と絨毛癌）は、41 検体すべてにおいて認められなかったが、1 検体においては神経芽腫様の組織像を示した。
- 1.3. 奇形腫の悪性度と相関する因子の特定のため、マウス投与を行った細胞株に由来する腫瘍の形成率と病理学的特性のランキングを、腫瘍発生率と病理学的評価によって行った。その結果、これらのランキングの相関性は低いことが分かった。現在、腫瘍発生率および病理学的特性等の差異に相関する候補因子の同定を行っている。

2. 培養条件の差異が奇形腫悪性化へ及ぼす影響について

- 2.1. ヒト iPS/ES 細胞の培養条件の違いによる造腫瘍性への影響を移植マウスで観察するため、異なる培地とラミニン 521 マトリックスを用いてヒト iPS 細胞のシングル細胞培養を行い、15 継代培養した細胞の凍結保存液を融解し、NOG マウスへの移植を行った。現在、経時的に腫瘍形成とそのサイズのモニターを行っている。
- 2.2. 異なる培養条件下で馴化した iPS 細胞について、表現型・遺伝型のプロファイル解析を行った。その結果、培地が異なるシングル細胞培養において、ヒト iPS 細胞の未分化細胞マーカーの発現量は同等であるが、形態と増殖性が著しく異なることが分かった。また投与細胞の核型の G-バンド解析を行ったところ、染色体異常は認められなかった。

3. ゲノム編集によるがん関連遺伝子変異ヒト iPS/ES 細胞株の作製とその活用について

- 3.1. がん関連遺伝子を対象に、20 の配列を標的としたガイド RNA を 40 種類作製し、ヒト iPS 細胞におけるゲノム編集効率を確認した。高効率なゲノム編集が認められた 10 種類を選択し、そのガイド RNA 発現プラスミド、Cas9 発現プラスミドおよびインサートオリゴ DNA をヒト iPS 細胞に導入し、1 種類当たり 200 クローンの合計 2,000 のシングルセルクローニングを行い、ダイレクトシーケンシングによりクローン細胞での変異の有無を確認した。その結果、目的変異の入ったインサートオリゴ DNA がゲノムに組み込まれた株は ARID1A (R1989*) の 1 株であったが、20 株以上のがん関連遺伝子変異 iPS 細胞を樹立することができた。3 種類の異なるガイド RNA を導入した TP53 に関しては、ホモ変異体が各々 9、38、35 株、1 種類のガイド RNA を導入したのものに関しては、ARID1A ホモ変異体 4 株、PTEN ホモ変異体 26 株、NRAS ホモ変異体 3 株、ATM ホモ変異体 3 株、MLL3 ホモ変異体 11 株を取得することができた。