

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10422

研究課題名(和文) 脊髄損傷に対するiPS由来神経幹細胞移植後の造腫瘍性の解明と制御

研究課題名(英文) Assessment of tumorigenic potential of human induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells for spinal cord injury

研究代表者

岩波 明生 (IWANAMI, AKIO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40327557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脊髄損傷に対するマウス及びヒトiPS細胞由来神経幹/前駆細胞(iPS-NS/PCs)移植の有効性を報告してきた。損傷脊髄部へのiPS-NS/PCs移植により、下肢運動機能が改善する一方で、iPS細胞株によっては移植後長期経過後glioma様の腫瘍を形成することも明らかとなった。脊髄損傷に対するiPS細胞療法をヒトに応用する場合、腫瘍化しない“安全な”iPS-NS/PCsの選別が重要である。本研究では、脊髄損傷に対するiPS-NS/PCs移植後の造腫瘍性に関わる候補遺伝子やエピゲノム変異を選別した。腫瘍化しない細胞株の選定と移植前細胞の至適継代数の調整が安全性の確保には重要である。

研究成果の概要(英文)：We have reported the effectiveness of transplanting human iPS cell-derived Neural Stem/Progenitor Cells (hiPS-NS/PCs) for spinal cord injury in rodents as well as primates. Although hiPSC derivatives are considered promising cellular resources for regenerative medicine, their tumorigenicity potentially limits their clinical application. Improved cell quality and safety will be crucially important for any clinical use of hiPSC-NS/PCs. To gain insight into the mechanisms underlying the regulation of tumorigenicity in hiPSC-NS/PCs, we performed a series of integrated DNA methylation and gene expression analyses using tumorigenic and non-tumorigenic hiPSC-NS/PCs. These results indicate that different NS/PC clones have different DNA methylomes and that DNA methylation patterns are unstable as cells are passaged. Therefore, DNA methylation profiles should be included in the criteria used to evaluate the tumorigenicity of hiPSC-NS/PCs in the clinical setting.

研究分野：脊髄損傷

キーワード：脊髄損傷 神経幹細胞 iPS細胞 再生医療 腫瘍化

1. 研究開始当初の背景

近年の幹細胞生物学の進歩により、胎児のみならず成人の脳・脊髄に神経幹細胞の存在が明らかとなり、中枢神経系における外傷や変性疾患に対する神経幹細胞の治療法への応用が注目されてきた。我々は、サル脊髄損傷に対するヒト神経幹細胞移植の有効性を過去に報告し (Iwanami A, et al., *J Neurosci Res* 2005)、ヒト神経幹細胞を用いた脊髄損傷の再生医療の実現を目指して積極的に研究に従事してきた。しかし、ヒト神経幹細胞の作製は墮胎した胎児の脳や脊髄から行われていたため、その倫理的な懸念から本邦での実現は、残念ながら困難であった。

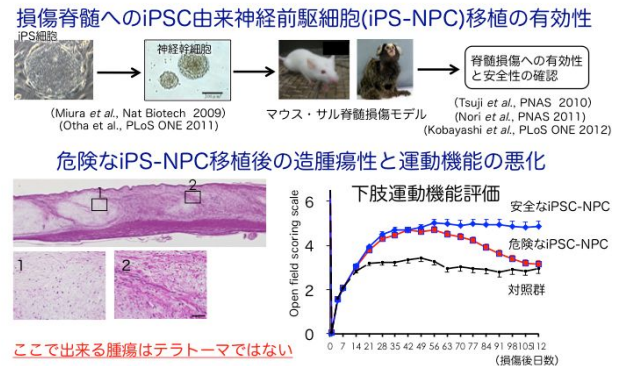
一方、京都大学山中研で樹立された iPS 細胞は、その万能性のみならず、倫理的な問題を払拭できる非常に有用な細胞である。そこで我々は、山中研で作製した iPS 細胞を神経系に分化させた iPS 由来の神経幹/前駆細胞 (iPS-NS/PCs) を用いて、脊髄損傷に対する iPS-NS/PCs 移植の有効性をマウスや霊長類マーモセットモデルを用いた実験系により報告してきた (Tsuji et al, *PNAS* 2010; Nori et al, *PNAS* 2011, Kobayashi et al, *PLoS One* 2012)。しかし、iPS 細胞株によっては、長期経過で損傷脊髄内に腫瘍を形成するものがあることが分かった (図 1)。腫瘍化した細胞は脊髄内で低悪性度の腫瘍を形成し、下肢運動機能をも悪化させた。これらの腫瘍の病理像は teratoma ではないことから、iPS 細胞の混入ではなく、iPS-NS/PCs が腫瘍化に寄与していることが考えられる。脊髄損傷に対する iPS-NS/PCs 移植の有効性を臨床に応用するためには、腫瘍化しない細胞の選別や腫瘍化の制御が必要不可欠である。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、脊髄損傷に対する iPS-NS/PCs 移植後の造腫瘍性を解明し、腫瘍形成能を制御することで、脊髄損傷に対す

る iPS-NS/PCs 移植の有効性・安全性を高めることである。

図 1 研究の出発点・背景



脊髄損傷後に移植した iPS-NS/PCs が腫瘍化する原因として、(1) 元となる iPS 細胞の作製方法によって腫瘍化が起こる (2) iPS 細胞から神経系に分化誘導を行い得られた iPS-NS/PCs が腫瘍形成能を獲得している (3) 移植後の損傷脊髄内の微小環境により腫瘍化が起こる という 3 つの可能性が考えられる。研究代表者は、これらのポイントを踏まえて以下の研究を行うこととした。

(1) 作製法の異なる iPS 細胞および iPS-NS/PCs の in vitro および in vivo での分化能、増殖能の比較解析

iPS-NSPCs が腫瘍化する原因として、iPS 細胞の作製過程に問題がある可能性がある。近年開発された episomal vector による integration free iPS 細胞 (Okita et al. *Nat Methods* 2011) を用いて iPS-NS/PCs を分化誘導し、in vitro での神経系への分化能・増殖能の解析を行い、従来の retroviral vector を用いたものと比較検討する。

(2) 腫瘍化・非腫瘍化 iPS 細胞株および iPS-NS/PCs における腫瘍原性の比較解析

iPS-NS/PCs が腫瘍化する原因として、もともと in vitro で腫瘍形成能を獲得しているのか、あるいは移植後の損傷脊髄内微小環境により、腫瘍化がおこるのかは不明である。まず、上記の iPS 細胞株および iPS-NS/PCs を培養し、細胞からゲノム DNA を抽出し純

化させた後、copy number variant(CNV)解析や DNA メチル化の解析を行い、腫瘍化するクローンとしないクローン間での差を解析する。また、これらの細胞を実際に免疫不全マウスの脊髄損傷モデルの損傷脊髄部に移植し、長期的に腫瘍化が起こるかどうかを *in vivo* で確認すると共に、脊髄組織から mRNA を抽出し、遺伝子発現解析を行い比較する。

3. 研究の方法

(1) 作製法の異なる iPS 細胞および iPS-NS/PCs の *in vitro* および *in vivo* での分化能、増殖能の比較解析

京都大学で樹立された integration free iPS 細胞 4 株 (414C2、409B2、836B1、836B3) を NS/PCs へと分化誘導した。これらを免疫不全マウスの胸髄圧挫損傷モデルの損傷中心部に 5×10^5 個ずつ損傷後 9 日目に移植した。移植後 3 ヶ月間 Bioluminescence imaging による細胞の生着・増殖の評価及び各種運動機能評価を行った。移植後 3 ヶ月の時点で損傷部脊髄を採取し組織学的解析を行うと共に、移植前の細胞と移植後 3 ヶ月の損傷中心部脊髄からそれぞれ mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。腫瘍形成能を持つ細胞株と持たない細胞株における遺伝子発現を比較し、腫瘍化に関わる候補遺伝子を選別した。

(2) 腫瘍化・非腫瘍化 iPS 細胞株および iPS-NS/PCs における腫瘍原性の比較解析

京都大学山中研で樹立された iPS 細胞 4 株 および これらの各細胞株を iPS-NS/PCs へ分化誘導した細胞株 iPS の feeder 細胞 Glioblastoma(GBM)細胞株 (U87 細胞) GBM 患者由来の細胞株 をそれぞれ培養し、これらのサンプルから Qiagen 社の DNeasy® を用いて DNA を抽出する。Illumina 社の Infinum システムを用いて、一塩基多型解析 (SNP array) による copy

number variant(CNV)解析や DNA メチル化の解析を行う。

CNV 解析では、それぞれのサンプルから 200 マイクログラムずつ、また DNA メチル化解析には、500 マイクログラムずつ DNA を準備する。本研究で使用された GBM 患者由来の細胞株は、研究代表者の留学先である UCLA, UCSD 病理学教室の Dr. Paul Mischel との共同研究により取得され、遂行した。

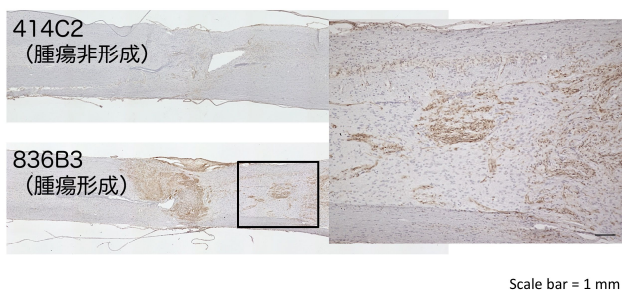
4. 研究成果

(1) 作製法の異なる iPS 細胞および iPS-NS/PCs の *in vitro* および *in vivo* での分化能、増殖能の比較解析

in vitro において、各 integration free iPS 細胞は、NS/PCs へ分化誘導が可能であった。いずれの細胞株由来 NS/PCs も beta-III tubulin 陽性のニューロン優位に分化し、GFAP 陽性のアストロサイトへの分化はごく少数であった。また CNPase 陽性のオリゴデンドロサイトへの分化は認めなかった。一方、*in vivo* においては、移植後 3 ヶ月の時点で損傷脊髄内における各 iPS 細胞由来 NS/PCs は生着し、beta-III tubulin 陽性のニューロン、GFAP 陽性のアストロサイトだけでなく、APC 陽性のオリゴデンドロサイトへも少数ながら分化した。また全ての iPS 細胞由来 NS/PCs 移植群は対照群に比べ、有意な後肢運動機能の回復を認めた。しかし 836B3 由来 NS/PCs 移植群では Bioluminescence imaging の結果、移植後に生着細胞数の経時的な増加を認めた。組織学的解析の結果でも、836B3 由来 NS/PCs 移植群では HE 染色にて損傷脊髄内で移植細胞の異常増殖を認めた。836B3 由来 NS/PCs 移植群における移植細胞の異常増殖部を、iPS 細胞樹立の際に用いる初期化遺伝子 Oct4 に対する蛍光免疫染色で評価した結果、Oct4 陽性の細胞は認めなかった。次に、明らかな異常増殖を認めた 836B3

由来 NS/PCs を腫瘍化群とし、異常増殖を認めなかった 414C2 由来 NS/PCs を非腫瘍化群として、これら 2 群の細胞からそれぞれ mRNA を抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、腫瘍化群で PDGFRA や PDGFRB の発現が非腫瘍化群と比べ、顕著に高かった。特に PDGFRB の発現は移植後に異常増殖した NS/PCs と移植前の NS/PCs のいずれにおいても腫瘍化群で顕著に発現が上昇していた。さらに PDGFRB の免疫組織染色を行った結果、836B3 由来 NS/PCs 移植群では移植細胞の異常増殖部に PDGFRB 陽性の細胞が多数存在することを確認した(図 2)。一方で、414C2 由来 NS/PCs 移植一方で、414C2 由来 NS/PCs 移植群では同様の染色性は認めなかった。

図 2 iPSC-NS/PCs移植後組織の免疫染色 (PDGFRB)

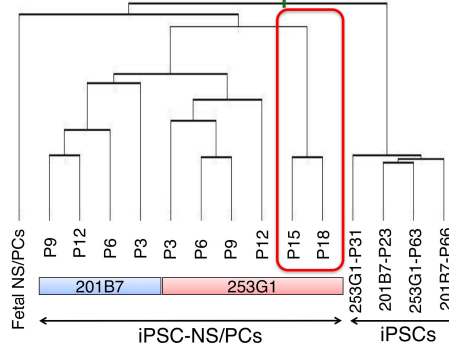


(2) 腫瘍化・非腫瘍化 iPSC 細胞株および iPSC-NS/PCs における腫瘍原性の比較解析

SNV 解析と DNA メチル化解析・CNV 解析において、造腫瘍性を持つ細胞株に特異的な変化を認め、その中に PSMD5 などの腫瘍抑制遺伝子のゲノム/エピゲノム変異や、第 2 染色体長腕の CNV を認め、Wnt シグナルなどの細胞増殖に関わる腫瘍関連遺伝子のエピゲノム異常が含まれていた。また SNV 解析、DNA メチル化解析、CNV 解析結果のいずれも、NS/PCs の継代を重ねるとゲノム不安定性が上昇することが分かった。例えば、造腫瘍性 253G1 株、安全な 201B7 株の各 iPSC 細

胞自体の DNA メチル化の状態に大きな差異はないが、造腫瘍性 253G1 細胞株由来の iPSC-NS/PCs と非腫瘍性 201B7 細胞株由来の iPSC-NS/PCs の DNA メチル化の比較において、その差は大きく階層化され、かつ継代が 15 継代以上になるとクラスターが大きく離れることが分かった(図 3)。これらの成果の中から、DNA メチル化に関する比較結果を論文として報告した(Iida T, et al., *Stem Cells* 2017)。

図 3 造腫瘍性細胞株 (253G1) と安全な細胞株 (201B7) の DNA メチル化の比較 (Whole genome)



253G1-NS/PCsの15継代目以上でメチル化に大きな差が出現

(考察)

iPS-NS/PCs を損傷脊髄に移植後、頻度は低いものの細胞株によっては腫瘍を形成することが明らかになった。Oct4 に対する免疫組織学的染色陽性の細胞がなかったこと・奇形腫でないことから、この腫瘍形成は未分化な iPSC 細胞の混在によるものとは考えにくい。また初期化遺伝子の再活性化による腫瘍化のリスクをなくすために、integration free iPSC 細胞株を用いているにもかかわらず腫瘍化を認めていることから、iPSC-NS/PCs による腫瘍化には初期化遺伝子の再活性化以外の要因が存在していると考えられる。今回同定した PDGFR は、受容体型チロシンキナーゼの一種で、グリオーマにもしばしば高発現していることから、移植前の安全性スクリーニングとして有用と考えられる。一方、腫瘍発生において DNA メチル化異常などのエピゲノム多様性もまた、その発生メカニズムに深く関与している。今回の網羅的遺伝子発

現解析・メチル化解析により、造腫瘍性に関連したがん遺伝子のSNPやDNAメチル化領域の差異が認められた。トランスクリプトーム解析のみでは、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が、造腫瘍性を規定するSNV及びDNAメチル化状態の評価系を組み合わせることで、より精度の高いiPS-NS/PCsの品質管理項目の作成が可能となる。さらに、iPS-NS/PCsの選別のみならず、継代数のコントロールも重要である。本研究結果より、CNVの出現やメチル化異常は、iPSC-NS/PCsの継代数が多くなればなるほど増加することが分かった。従って、安全な移植細胞を作製するために移植前の細胞継代数は低く調整する必要があると考えている。以上の結果は、脊髄損傷に対するヒトiPS細胞由来神経幹細胞移植療法の臨床応用に直結する成果であると共に、脊髄損傷以外のiPS細胞を用いた再生医療にも有用な知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- (1) Itakura G, Ozaki M, Nagoshi N, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Iida T, Kashiwagi R, Ookubo T, Yasutake K, Matsubayashi K, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Sci Rep*. 2017 Oct 11;7(1):12996. doi: 10.1038/s41598-017-13522-w. (査読あり)
- (2) Itakura G, Kawabata S, Ando M, Nishiyama Y, Sugai K, Ozaki M, Iida T,

Ookubo T, Kojima K, Kashiwagi R, Yasutake K, Nakauchi H, Miyoshi H, Nagoshi N, Kohyama J, Iwanami A, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Fail-Safe System against Potential Tumorigenicity after Transplantation of iPSC Derivatives. *Stem Cell Reports*. 2017 Mar 14;8(3):673-684. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.02.003. (査読あり)

- (3) Iida T, Iwanami A, Sanosaka T, Kohyama J, Miyoshi H, Nagoshi N, Kashiwagi R, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Whole-Genome DNA Methylation Analyses Revealed Epigenetic Instability in Tumorigenic Human iPSC-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells*. 2017 May;35(5):1316-1327. doi: 10.1002/stem.2581. (査読あり)
- (4) Ookubo T, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Ozaki M, Iida T, Matsubayashi K, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Pretreatment with a γ -Secretase Inhibitor Prevents Tumor-like Overgrowth in Human iPSC-Derived Transplants for Spinal Cord Injury. *Stem Cell Reports*. 2016 Oct 11;7(4):649-663. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.015. (査読あり)
- (5) Sugai K, Fukuzawa R, Shofuda T, Fukusumi H, Kawabata S, Nishiyama Y, Higuchi Y, Kawai K, Isoda M, Kanematsu D, Hashimoto-Tamaoki T, Kohyama J, Iwanami A, Suemizu H, Ikeda E, Matsumoto M, Kanemura Y, Nakamura M, Okano H. Pathological

classification of human iPSC-derived neural stem/progenitor cells towards safety assessment of transplantation therapy for CNS diseases. Mol Brain.

2016 Sep 19;9(1):85. doi:

10.1186/s13041-016-0265-8. (査読あり)

- (6) Nishiyama Y, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G, Kawabata S, Sugai K, Nishimura S, Kashiwagi R, Yasutake K, Isoda M, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H. Safe and efficient method for cryopreservation of human induced pluripotent stem cell-derived neural stem and progenitor cells by a programmed freezer with a magnetic field. Neurosci Res. 2016 Jun;107:20-9. doi: 10.1016/j.neures.2015.11.011. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

岩波明生 ヒトiPS細胞を用いた脊髄再生医療に向けた安全性の確立。日本脊髄障害医学会 2015.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩波 明生 (IWANAMI, Akio)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号 : 40327557

(4)研究協力者

岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki)

中村 雅也 (NAKAMURA, Masaya)

神山 淳 (KOHYAMA, Jun)

西村 空也 (NISHIMURA, Soraya)

西山雄一郎 (NISHIYAMA, Yuichiro)

菅井 桂子 (SUGAI, Keiko)

飯田 剛 (IIDA, Tsuyoshi)

大久保寿樹 (OKUBO, Toshiki)

Paul Mischel