

令和 5 年 1 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18856

研究課題名（和文）前眼部を用いた新規造腫瘍試験モデルの構築と応用

研究課題名（英文）A New Anterior Chamber Transplantation Model of In Vivo Tumorigenicity Test Towards iPSC Derived Cell Treatment

研究代表者

稲垣 絵海（INAGAKI, Emi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特別研究員（PD）

研究者番号：40464903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、iPS細胞、間葉系幹細胞など多数の再生医療製品が開発され、今後の発展が期待されている。細胞加工製品となる細胞には目的細胞や未分化細胞が混在している可能性を排除できず、従来のin vivo造腫瘍試験モデルでは免疫不全動物の背部皮下などで実施され腫瘍形成を判定するまでに時間と費用を要する事が問題であった。申請者らの研究グループでは視認性に優れ、免疫寛容部位である前眼部を用い簡便で短期で低コストに評価可能な造腫瘍性試験評価系を開発し前眼部造腫瘍性試験モデルとしての妥当性につき検討した。結果、ヒト二倍体線維芽細胞と目的細胞を同時に移植することで良好な感度を得、また外挿性も確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞やES細胞は奇形腫形成能による造腫瘍性を保持することから、これらの混在量を腫瘍形成のある目的外細胞の混在量とともに品質特性を評価し明らかにすることが重要である。従来のin vivo造腫瘍試験モデルでは腫瘍形成を判定するまでに時間と費用がかかることが問題になっていた。申請者らの研究グループでは視認性に優れ、免疫寛容部位である前眼部を用い簡便で短期で低コストに評価可能な造腫瘍性試験評価系を開発し、前眼部造腫瘍性試験モデルとしての妥当性について検討した。結果、ヒト二倍体線維芽細胞と目的細胞を同時に移植することで高い検出感度を担保し、造腫瘍性試験モデルとして適切であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Since the discovery of induced pluripotent stem cells (iPS cells), stem cell research has advanced rapidly and stem cell products are now seeing therapeutic applications. The tumor forming potential of human iPSC derived cells should be examined using a suitable animal model prior to clinical administration. The current protocol for assessing tumorigenicity in vivo involves subcutaneous transplantation, which requires over 3 months for tumors to form. Here, we established a novel tumorigenicity test in vivo by using the anterior chamber of immunodeficient rats. Taking advantage of the unique transparent characteristic of the cornea, this method enabled us to detect the onset of tumors rapidly and accurately.

研究分野：再生医科学

キーワード：iPS細胞 造腫瘍性試験 前眼部

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会、高度情報化社会の到来により、失明を克服し視機能を維持することは国民の生活において大変重要な課題である。近年、iPS 細胞、間葉系幹細胞など多数の再生医療製品が開発され、本邦の眼科学領域からも世界に先駆けて様々な試みが報告され今後の発展が著しく期待されている。(Mandai et al, NEJM 2017) (Kinoshita et al, NEJM 2018) 角膜内皮細胞は生後分裂能に乏しく、また加齢により細胞数が減少することから、再生医学による細胞移植治療あるいは創薬によるアプローチが探索されている。申請者らの研究室においても細胞移植治療の実現化をめざし、iPS 細胞、神経堤由来幹細胞および間葉系幹細胞といった多能性幹細胞を細胞源として眼発生に関連するシグナル関連分子を促進させる化合物を用いた直接誘導方法を基軸に機能的な角膜内皮細胞の分化誘導の検証を行ってきた。(Hatou et al, Stem Cells Dev 2013) (Inagaki et al, Stem Cells Transl Med 2017) (Yamashita, Stem Cell Dev 2019) しかしながらそれらの細胞加工の中間製品あるいはもとの細胞の未分化細胞が混在している可能性を排除できないことが指摘されていた。

特にヒト iPS 細胞や ES 細胞は奇形腫形成能による造腫瘍性を元の特性として保持していることから、これらの材料を腫瘍形成のある目的外細胞の材料と共に品質特性を評価し明らかにすることが重要である。(Tsuji et al, PNAS 2010) (Yasuda et al, Biologicals 2015)。従来の *in vivo* 腫瘍モデルにおいては主に免疫不全動物の背部皮下、腎被膜下、精巣などで行われ肉眼による腫瘍形成を判定するまで数か月を要する為に時間そして費用がかかることが問題になっていた。(Henze et al, Stem Cell Res 2019)

2. 研究の目的

本研究では前眼部造腫瘍性試験モデルの妥当性および検出感度を明らかにする。まず残存未分化 iPS 細胞の検出を目的とした *in vivo* 造腫瘍性予備試験を実施し、そして本試験デザインが残存未分化細胞を検出するために適切であるか検証を行う。つぎに形質転換細胞の検出を目的として悪性腫瘍細胞株を用いた検討を実施し、他の分野への外挿性について検証をする。さらに前房内移植細胞の体内動態を好感度のウイルスベクターを用いて追跡することで、より詳細に細胞移植後の生着部位を解析する。これまで感度の観点から不明であった前房内移植細胞の挙動や生着部位を追跡することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 移植方法の確立 免疫不全動物としてヌードラット (F3 4 4/NJcl-rnu/rnu) を用いた。デッドスペースの少ないインスリン針を用い、眼球を保持し、穿刺し、細胞を移植する 3step 法を考案した。(図 1 A) ヌードラット前房内に 2 種の iPS 細胞株 (201B7) を 1×10^6 個前述の方法で前房内、および従来法である皮下へとマトリゲルと共に移植を実施し、腫瘍形成までの期間を経過観察した。皮下においては蝕知可能なサイズになった時点で腫瘍形成と判定した。前房に関しては前房容積の 1/2 以上を占める腫瘍形成をもって腫瘍形成と判定し Kaplan-Meier 曲線を作製した。観察期間終了後に眼球切片を病理診断した。

(2) iPS 細胞ストックのラボ専用株 FFI01s01) を 1×10^2 から 1×10^6 個の細胞数でマトリゲルと混合し移植した。前房容積の 1/2 以上を占める腫瘍形成をもって腫瘍形成と判定した。観察期間終了後に眼球切片を病理診断した。

(3) 厚労省からのパブリックコメント(案件番号 295170151: ヒト細胞加工製品の未分化多能性幹細胞・形質転換細胞検出試験、造腫瘍性試験及び遺伝的安定性評価に関する留意点)を踏まえ、感度を高めるための工夫として正常ヒト二倍体細胞であるヒト線維芽細胞に iPS 細胞および HeLa 細胞を Spike させ TPD50 を算出した。

(4) 野生型マウス由来の神経堤細胞由来形質を有した角膜実質幹細胞を分離し、(Yoshida et al) レンチウイルスベクターを用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、実験に供した。同細胞を 0.5×10^6 個用い、野生型マウスへの同種移植を前房内に実施した。IVIS imaging system (生体内の目に見えない非常に微弱な発光や蛍光を超高感度冷却 CCD カメラで捉え、定量化できる *in vivo* イメージングシステム)を用い、ルシフェリン投与下で発光強度 (ROI: Region of Interest) を計測し、局在や生着を経時的に確認した。

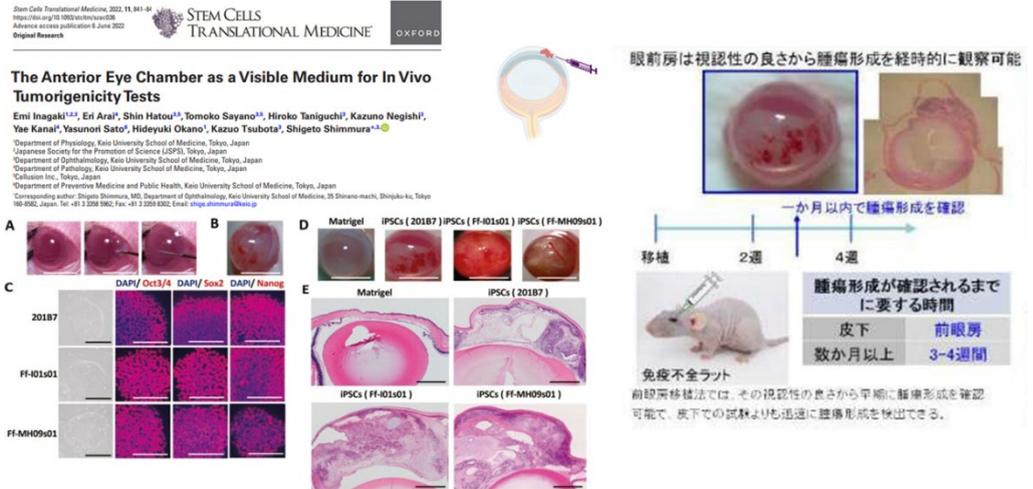
4. 研究成果

(1) 簡便な手法で前房内移植モデルの手順を固定化(眼球を保持し、穿刺し、細胞を移植)することで誰でも実施が可能にした。

(図1A, B, D) ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) 201B7, Ff-MH09s01, FfI01s01, Ff-I01s04 は京都大学iPS細胞研究所 (CiRA) より入手しすべて多能性マーカーである

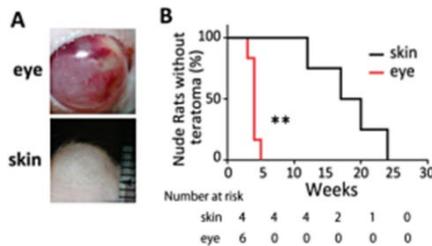
OCT3/4、SOX2、NANOGを発現していた。(図1C) 皮下移植では腫瘍検出に数か月を要するのに対し、前房内移植では視認性の良さから概ね4週で奇形腫の形成を確認した(図1E)

図1: 眼前房を用いた造腫瘍性試験の構築

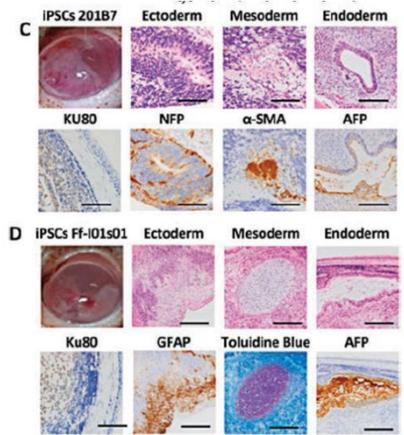


前房内移植群 (n=15) はすべてで良好な腫瘍形成を確認した。 Kaplan-Meier 生存曲線を作成すると有意に皮膚移植群と比較し、前房内移植群が早期に腫瘍形成を認めることができた。(図2A, B) さらに病理組織学

図2: 眼前房では早期に腫瘍形成を確認できた



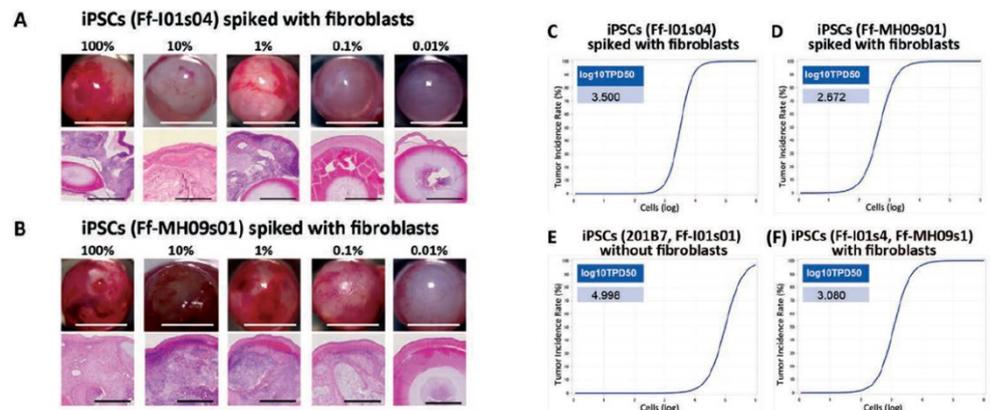
的検討にて腫瘍内に 3 胚葉成分を確認し、奇形腫形成を確認した。(図2C, D) 抗NFP染色および抗GFAP染色により、それぞれ神経系細胞の存在が示され、外胚葉からの分化が指摘された。抗αSMAおよびトルイジンブルー染色は、それぞれ中胚葉からの平滑筋および軟骨細胞への分化を確認した。抗AFP染色は、外胚葉の一部である卵黄嚢から分化した未熟な消化器系由来であることを検証した。抗ヒト核抗体 (Ku80) による陽性染色によってこれらの奇形腫のほとんどがヒト由来細胞であることを確認した。



(2) 1×10^2 から 1×10^6 個の範囲で移植細胞数依存的に iPS 細胞の奇形腫瘍形成率が増加した。また、8 週間の経過観察において 201B7 は FfI01s01 より有意に奇形腫瘍形成率が高く ($p=0.04$,

Log rank test)、株間差を有する事が示唆された。(図3C-F) 移植動物の50%に腫瘍を形成する移植細胞の用量 (TPD50) を、各hiPSC株の腫瘍形成の感度を評価するた

図3: ヒト線維芽細胞によるiPS細胞のスパイク試験



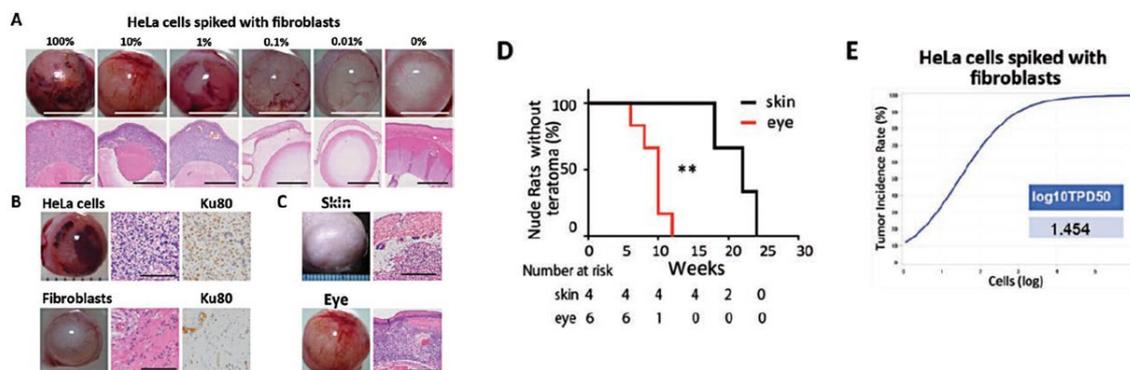
めに、ロジスティックモデルを用いた非線形回帰により推定した。マトリゲルを用いたhiPSCの log₁₀TPD50は、201B7 hiPSCとFfI01s04 hiPSCでそれぞれ5.256と5.094であった。一方で 1×10^6 個

のhiPSCをマトリゲルと一緒に注入すると、短時間で100%の奇形腫形成が認められたが、50%の動物でテラトマを形成するには、少なくとも 1×10^5 個が必要であった。このアッセイにより、比較的多数のhiPSCからテラトマの形成を効率的に促進できることが実証された。

(3)次に、このアッセイの感度を高める工夫として線維芽細胞をスパイクした。Ff株、MH株のiPSCを様々な濃度で移植した結果100% (iPSC 1×10^6)、10% (iPSC 1×10^5)、1% (iPSCs 1×10^4)、0.1% (iPSC 1×10^3)、0.01% (iPSCs 1×10^2)、および0% (1×10^6 線維芽細胞)で実施した。これらの結果を肉眼的所見および病理学的な所見に基づき陽性比率のデータを図3に示す。奇形腫が検出された最低濃度は、Ff-I01s04で1%、Ff-MH09s01で0.1%であり、MH-09s01細胞の方が短期間に奇形腫を形成する能力が高いことが示唆された。また、 1×10^2 個以下のiPSCを線維芽細胞と一緒に移植した動物では、腫瘍形成は観察されなかった。線維芽細胞を添加したiPSCによるテラトマ形成の \log_{10} TPD50は、以下の通りであった。Ff-I01s04 iPSCでは3.500、Ff-MH09s01 iPSCでは2.672だった(図3C、図3D)。線維芽細胞を含まない2つのiPSC株(201B7、FFI01s01)による奇形腫形成の \log_{10} TPD50は3.080であったが、一方、線維芽細胞を含む別の2つのiPSC株(FFI01s04、FFI-MH09s01)による奇形腫形成の \log_{10} TPD50は4.998だった(図3E、図3F)。よって線維芽細胞にスパイクした 1×10^3 個のiPSCが、動物の50%においてテラトマ形成を誘導するのに十分であり線維芽細胞を用いない試験よりもヒト二倍体細胞であるヒト線維芽細胞にiPS細胞を添加させると数十倍の良好な感度を得ることが実証された。

さらに、iPS細胞から分化させた細胞のde novo tumorigenesis assayの陽性対照として、HeLa細胞を用いたアッセイを実施した。線維芽細胞にスパイクした様々な濃度のHeLa細胞をヌードラットの前房に移植し、上記のように腫瘍形成が観察されるまで毎週動物を観察した(前房全体の腫瘍占有と眼の突出)(図4A)。線維芽細胞のみを移植した動物では、腫瘍は観察されなかった。HeLa細胞の \log_{10} TPD50は1.454であり(Fig. 4E)、0.1% (10^3 HeLa細胞)以上の濃度では100%の動物で腫瘍形成が認められた。0.01% (10^2 HeLa細胞)という低濃度でも腫瘍形成が確認され、発生率は66.7%、平均観察期間は15.3週間であった。HE染色と抗Ku80抗体染色を行い、すべての腫瘍がヒトHeLa細胞由来であることを確認した(図4B、4C)。HeLa細胞を用いた検討では良好な感度を得ることができ、前眼部腫瘍形成アッセイが前臨床安全性試験に使用可能であることが示唆された。

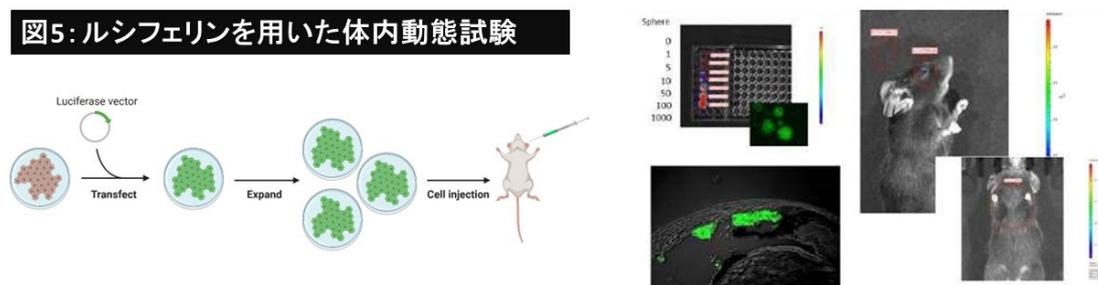
図4: ヒト線維芽細胞によるHela細胞のスパイク試験



このアッセイにより、比較的多数のhiPSCからテラトマの形成を効率的に促進できることが実証

(4) IVIS を用いた in vivo イメージングによる経時的観察では、移植細胞をホタル由来の発光イメージング基質 D-Luciferin で励起することでリアルタイムに経時的に観察することが可能であった。移植直後に前房内において ROI の強度は最大値を得て以降減弱を認めた。細胞移植ああと一か月においてそのシグナルは前房に限局していることが確認された。本系によって前房内の細胞挙動を追跡し、生着部位について解析を実施できた。動物愛護の観点からも剖検することなく、検証が可能な本系は非常に有用であることが示唆された。

図5: ルシフェリンを用いた体内動態試験



5. まとめ

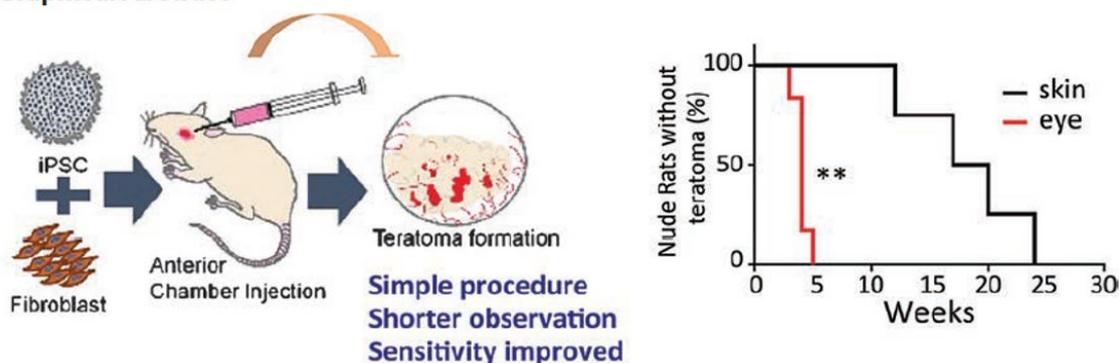
我々は、簡便、迅速、かつ高感度な腫瘍形成アッセイプロトコルを開発しました。このモデルは、PSC 由来の細胞治療製品の奇形腫および de novo 腫瘍の形成に関する前臨床安全性試験として使用することができる。このプロトコルをさらに検証することで、幹細胞あるいは腫瘍研究のための新しい実験モデルになる可能性がある。

また、前房は全身のなかでも希少な免疫寛容部位であり、前房免疫偏移 (ACAID) と呼ばれる性質が、Streilein によって初めてマウスで確認されている。そのためヒト細胞を、免疫不全動物で長期間観察することが可能である。ACAID に加え、角膜と水晶体は無血管であり、虹彩は色素上皮に覆われているため、前房は血管がない状態である。したがって、前房は、腫瘍の微小環境における血管形成を含む腫瘍の発達を 3D で観察するための理想的な環境であることが推察される。

皮下に比べて前房の容積が小さいことは、特定の種類の腫瘍を研究する上で制約となる可能性がある。我々は、一般的に使用されている HeLa 腫瘍細胞株も、iPSC 由来の奇形腫よりも高い感度で我々のモデルで検出できることを示している。

本研究成果は Stem Cell Tran Med 誌に論文として報告した。また今後はオルガノイドの評価モデルあるいは他の腫瘍評価系への有用性あるいは汎用性など様々な試験系としての最適化を目的としたバリデーション研究をすすめていく予定である。

Graphical Abstract



6. 謝辞

本論文を作成するにあたり慶應義塾大学眼科学教室・病理学教室・生理学教室・臨床研究推進センターの皆様のお力添えに感謝致します。また資金を供与いただきました日本学術振興会に厚く御礼を申し上げます。

<執筆文献>

The Anterior Eye Chamber as a Visible Medium for In Vivo Tumorigenicity Tests
Emi Inagaki, Eri Arai, Shin Hatou, Tomoko Sayano, Hiroko Taniguchi, Kazuno Negishi, Yae Kanai, Yasunori Sato, Hideyuki Okano, Kazuo Tsubota, Shigeto Shimmura
Stem Cells Transl Med. 2022 Aug 23;11(8):841-849.
PMID: 35666752 PMCID: PMC9397653 DOI: 10.1093/stcltm/szac036

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Emi Inagaki, Eri Arai, Shin Hatou, Tomoko Sayano, Hiroko Taniguchi, Kazuno Negishi, Yae Kanai, Yasunori Sato, Hideyuki Okano, Kazuo Tsubota, Shigeto Shimmura	4. 巻 11
2. 論文標題 The Anterior Eye Chamber as a Visible Medium for In Vivo Tumorigenicity Tests	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 841-849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stcltm/szac036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Inagaki E, Hatou S, Arai E, Miyashita H, Sayano T, Kanai Y, Okano H, Tsubota K, Shimmura S.
2. 発表標題 New Anterior Chamber Transplantation Model of In Vivo Tumorigenicity Test Towards iPSC Derived Cell Therapy.
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2020 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Short-term oncogenic screening system.	発明者 榛村重人、羽藤晋、 稲垣絵海、坪田一男	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02019-026903.	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------