

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871244

研究課題名(和文) iPS細胞由来移植細胞に混入する不死化細胞検出法の開発

研究課題名(英文) In vitro method for detection of immortalized cells in human retinal pigment epithelial cells.

研究代表者

黒田 拓也 (Kuroda, Takuya)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・研究員

研究者番号：70648857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮(RPE)細胞をモデルに、iPS細胞由来移植細胞に混入する不死化した形質転換細胞を検出する試験法の開発を行った。まず、不死化RPE細胞で有意に高発現している遺伝子を網羅的に探索し、不死化RPE細胞マーカーIRM1を同定した。qRT-PCRで測定したIRM1の遺伝子発現を指標とし、不死化RPE細胞を高感度に検出する試験法の開発を行った。不死化RPE細胞を短時間かつ簡便に分子マーカーによって検出する方法はこれまでに報告がなく、本試験法はiPS細胞由来移植細胞の品質管理に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cells (hPSCs), i.e. human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), are able to self-renew and differentiate into multiple cell types. Thus, numerous attempts have been made to utilize hPSCs in regenerative medicine/cell therapy. However hPSCs have tumorigenic potential. Therefore, residual undifferentiated hPSCs or contamination of the transformed cells in products that would eventually proliferate and form a teratoma is one of the most obvious safety issues to develop cell therapy hPSC-derived products. In the present study, we identified a new immortalized RPE cell marker and developed new qRT-PCR method to detect contamination of human RPE cells with immortalized RPE cells. This qRT-PCR assay can detect as few as 3% of immortalized RPE cells in normal RPE cells. This in vitro qRT-PCR method is expected to contribute to process validation and quality control of cell therapy products derived from hPSCs.

研究分野：分子生物学

キーワード：不死化細胞 網膜色素上皮細胞 造腫瘍性 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、体細胞へ特定の遺伝子(OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, LIN28等)を導入することにより作製される、あらゆる細胞へ分化できる多分化能と、無限に増殖できる自己複製能を併せ持つ細胞である。iPS細胞は、患者自身の体細胞から作成することができ、これまで得ることが難しかった心筋細胞、神経細胞、網膜細胞など、ヒト細胞を供給できる点において極めて魅力的である。近年、iPS細胞を原材料としてケガや病気で失われた体の組織や臓器を人工的に再生させようという「再生医療・細胞治療」への応用が、国内外で非常に活発に進んでいる。

このようにiPS細胞の臨床応用の期待が高まる一方で「iPS細胞由来移植細胞に未分化なiPS細胞が残存すると、移植後に腫瘍が発生する危険性があること」が指摘されてきた(Miura et al. Nature Biotech. 27, 743-745, 2009)。これは、iPS細胞が生体内に移植された際に腫瘍を形成する能力、いわゆる“造腫瘍性”を元来の特性として保持していることが原因と考えられる。私はこの問題点に着目し、iPS細胞の臨床応用に最も近いとされる網膜色素上皮(RPE)細胞をモデルとして、未分化iPS細胞の検出法の開発を行ってきた。この過程で、LIN28遺伝子(ES細胞、iPS細胞に特異的に発現)が優れた未分化細胞マーカー遺伝子として利用できることを発見し、定量RT-PCR法により、5万個のiPS細胞由来RPE細胞中に存在する1個の未分化iPS細胞(0.002%)を検出できる非常に高感度な試験法の開発に成功した(PLoS ONE, 2012)。本試験法は実際に、自己iPS細胞由来RPE細胞による加齢黄斑変成症治療の臨床研究において、未分化iPS細胞を検出する安全性評価試験に採用されている。近年、iPS細胞の造腫瘍性に関してはさらに研究が進んでおり、iPS細胞由来の移植細胞を作製する過程においては、未分化iPS細胞以外にも、前駆細胞や目的細胞以外の細胞が存在しており、これらの細胞が造腫瘍性を獲得する危険性があることが明らかになってきている。従って、iPS細胞由来移植細胞の造腫瘍性を評価するためには、未分化iPS細胞のみならず、iPS細胞由来移植細胞に混入する目的外細胞を包括的に、かつ高感度に検出する方法論を確立する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS細胞由来移植細胞を用いた再生医療の安全性に関し、最も危険性が懸念される「がん化」を評価する新たな試験方法を確立することである。具体的には、腫瘍性細胞に共通する特性「不死化」に着目し、移植細胞に含まれる不死化細胞の検出方法を確立する。そのために、上述のRPE細胞をモデルとして、(1) 不死化細胞特異的に発

現する遺伝子を網羅的に探索し、不死化細胞マーカー遺伝子を同定し、同定した不死化細胞マーカー遺伝子を用い、簡便且つ高感度に不死化細胞を検出する試験法を確立する。

### 3. 研究の方法

本研究では、不死化RPE細胞として、それぞれ別々の方法で樹立された不死化RPE細胞を用いて実験を行った。具体的には、

- ・ARPE-19: spontaneous に発生した不死化RPE細胞株
- ・ARPE-19/HPV-16: ARPE-19にHPV-16を感染させた不死化RPE細胞株。
- ・h1RPE7: SV40 large T antigen をトランスフェクトすることにより樹立された不死化RPE細胞株。

以上の3つの不死化RPE細胞株を使用した。

#### (1) 不死化細胞マーカー遺伝子の同定

正常RPE細胞では発現しておらず、不死化RPE細胞で高発現する不死化RPE細胞マーカー遺伝子を同定する(図1)。

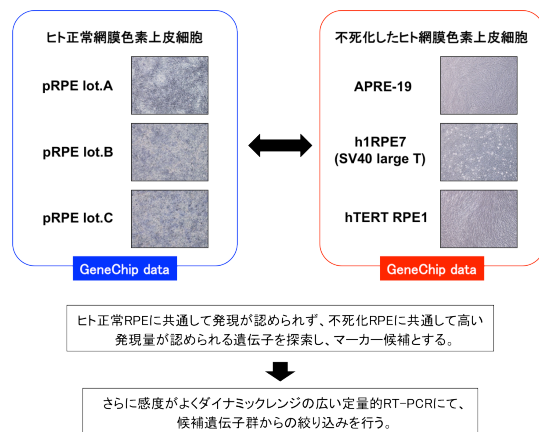


図1. 不死化RPE細胞マーカー遺伝子探索の流れ

#### (2) 不死化RPE細胞検出法の開発と科学的評価

ごく最近開発された「超微量mRNAを検出するデジタルPCR」を用いて、本研究で同定した不死化RPE細胞マーカーを定量する。これにより、正常RPE細胞に混入した不死化RPE細胞を検出する超高感度不死化RPE細胞検出法を開発する。さらに、本試験法がiPS細胞由来移植細胞の安全性評価法として有用であるかどうかを検証する。

### 4. 研究成果

まず初めに、足場非依存的増殖を指標に異常細胞を検出する軟寒天コロニー試験を利用した、不死化RPE細胞の検出を試みた。その結果、軟寒天培地では不死化RPE細胞株の全てが増殖出来ないため、軟寒天コロニー形成試験では不死化RPE細胞を検出出来ない事が分かった(図2)。

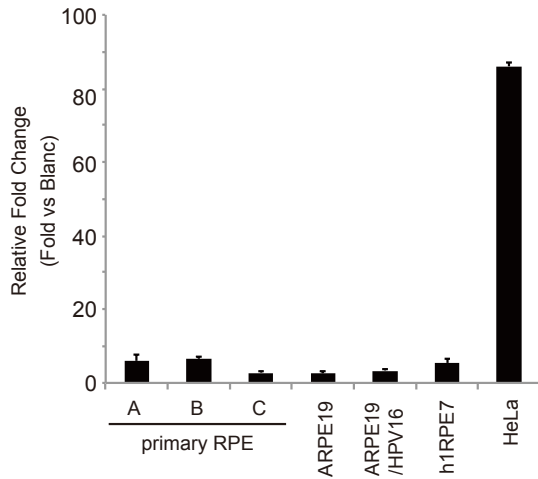


図2. 軟寒天コロニー形成試験

次に、がん細胞マーカー遺伝子として知られる、hTERT と Survivin の2 遺伝子をマーカーとして、不死化 RPE 細胞を検出可能か検討した。その結果、hTERT は不死化 RPE 細胞株で発現が非常に低く、Survivin は h1RPE7 細胞でのみ発現が高く、ARPE-19 株と ARPE-19/HPV-16 株の2 株では、primary RPE と殆ど発現量が変わらないため、hTERT と Survivin は不死化 RPE 細胞マーカーには適さない事が分かった (図3)。

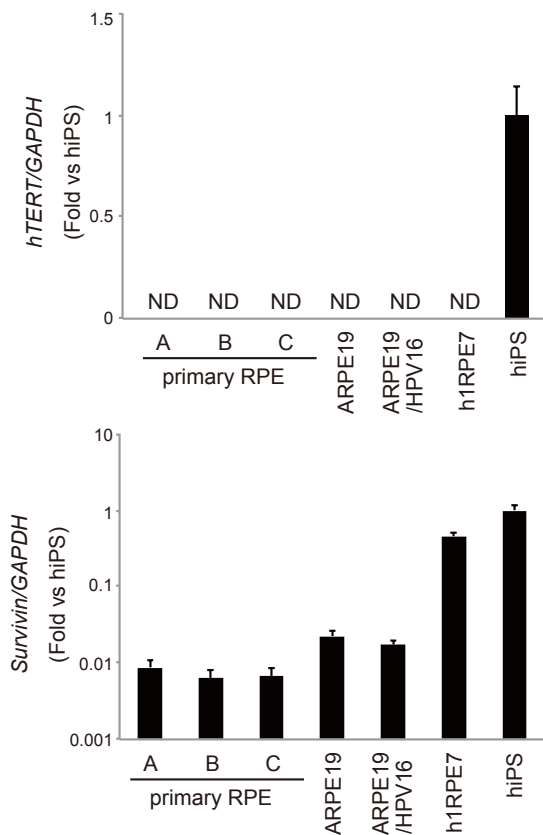


図3. 正常 RPE 細胞と不死化 RPE 細胞における hTERT (上) と Survivin (下) の発現量

以上の結果から、古典的ながん細胞検出法

は不死化 RPE 細胞の検出には適さない事が分かった。

そこで、次に、マイクロアレイ法を用いた新規不死化 RPE 細胞マーカーの網羅的探索を行った。不死化 RPE 細胞株3 株と、ヒト正常 RPE 細胞の3 ロット (Lonza 社) から total RNA を抽出し、mRNA 発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析することにより、ヒト正常 RPE で発現が認められず、不死化 RPE 細胞株で共通して高い発現量が認められる遺伝子を網羅的に探索した。

その結果、正常 RPE 細胞に比べ不死化 RPE 細胞株において 20 倍以上発現量が高い遺伝子 15 個を、不死化 RPE 細胞マーカーIRM (Immortalized RPE cell marker) の候補として同定した。その中から、不死化 RPE 細胞株と同様に無限増殖能を有する iPS 細胞においても発現が高い遺伝子として IRM1 を同定した。IRM は正常 RPE 細胞に比べて、不死化 RPE 細胞においておよそ 100 倍程度発現量が高いことが分かった。また、不死化 RPE 細胞株間での発現量のばらつきも少ない点も、マーカーとして適格である (図4)。

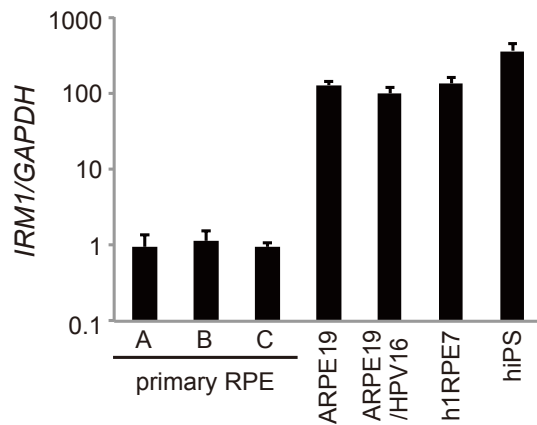


図4. 正常 RPE 細胞と不死化 RPE 細胞における IRM1 の発現量

qRT-PCR で測定した IRM1 の遺伝子発現を指標とし、正常 RPE 細胞に混入させた不死化 RPE 細胞の混入評価を検証した。正常 RPE 細胞に 10%から 0.1%の割合で不死化 RPE 細胞の ARPE-19 を混合し、Total RNA を抽出後、qRT-PCR により IRM1 を測定した。その結果、ARPE-19 のスパイク量依存的に IRM1 を検出した。また、正常 RPE 細胞5 ロットの平均値とそのばらつき (標準偏差, SD) から下方検出限界を次式 (下方検出限界=平均値+3.3 x SD) を用いて算出したところ、IRM1 をマーカーとした不死化 RPE 細胞検出法の下方検出限界は混入率 3%であると評価した (図5)

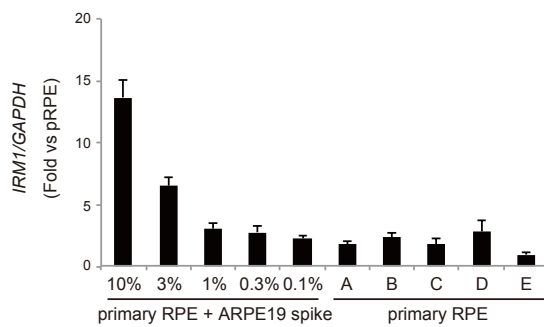


図5. スパイクサンプル (正常 RPE+ARPE19) における IRM1 の測定

最後に、iPS 細胞から実際に RPE 細胞へと分化させたサンプルにおける IRM1 の発現量を調べた。IRM1 は分化が進むに従って発現量が減少し、最終的に精製した RPE 細胞では IRM1 の発現が検出限界以下のレベルまで減少した (図 6)。

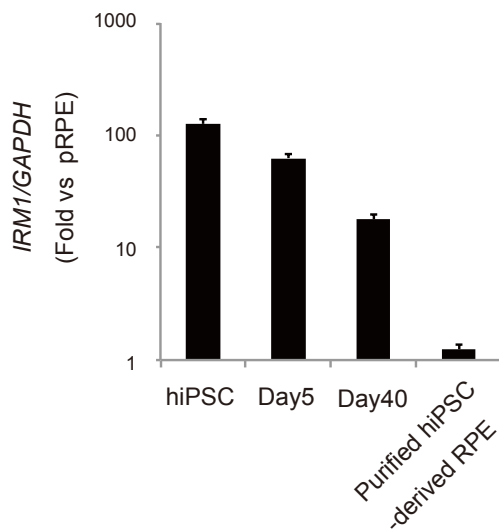


図6. iPS 細胞由来 RPE 細胞における IRM1 の測定

同定した IRM1 の正常 RPE 細胞における発現量は僅かではあるものの、qRT-PCR 法で十分検出可能なレベルであり、また、不死化 RPE 細胞株との発現量の差も約 100 倍程度で qRT-PCR 法のダイナミックレンジに十分納まる範囲であった。そのため、今回の研究では、デジタル PC 法ではなく、qRT-PCR 法による測定を行うこととした。

次に、フローサイトメトリーを用いた不死化 RPE 細胞の検出法の開発を試みた。以前の研究において、フローサイトメトリーを用いた未分化 iPS 細胞の検出では、TRA1-60 抗体を用いた場合、0.1%の割合で正常 RPE 細胞に混入する未分化 iPS 細胞を検出可能であることを示した。しかし、不死化 RPE 細胞の免疫染色に使用可能な抗 IRM1 抗体が市販されていなかったため、抗 IRM1 マウスモノクローナル抗体の作製を行った。ELISA スクリーニング陽性のハイブリドーマ培養上清 22clone について不死化 RPE 細胞の免疫染色による

スクリーニングを行った結果、不死化 RPE 細胞に発現する内在性レベルの IRM1 を認識する抗体 clone を得ることが出来なかった。

本研究のまとめ

- (1) 不死化 RPE 細胞は、軟寒天コロニー形成試験法では検出できないことが分かった。
- (2) 新規不死化 RPE 細胞マーカーIRM1 を同定した。
- (3) IRM1 をマーカーとした qRT-PCR 法を開発し、本試験法の下方向検出限界は約 3%であると評価した。

不死化 RPE 細胞を短時間かつ簡便に分子マーカーによって検出する方法はこれまでに報告がなく、この試験法は、iPS 細胞由来移植細胞の品質管理に貢献することが期待される。

#### 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 4 件)

- (1) Tano K, Yasuda S, Kuroda T, Saito H, Umezawa A, Sato Y. A novel in vitro method for detecting undifferentiated human pluripotent stem cells as impurities in cell therapy products using a highly efficient culture system. *PLoS One*. 2014 Oct 27;9(10):e110496.
- (2) Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36(2):189-92.
- (3) Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata S, Sato Y Ultra-sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products by digital analysis of soft agar colony formation. *Sci Rep*. 2015;5:17892.
- (4) Kuroda T, Yasuda S, Matsuyama S, Tano K, Kusakawa S, Sawa Y, Kawamata S, Sato Y Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Regenerative Therapy*. 2015;2:17-23.

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Kuroda T, Sawada R, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y: Validation of in vivo tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice. International Society for Stem Cell

- Research 11 th Annual Meeting, Boston, USA (2013 年 6 月)
- (2) Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Kawamata S, Sato Y Application of droplet digital PCR technology to detection of residual undifferentiated cells in cardiomyocytes derived from human iPS cells. World Stem Cell Summit 2013, San Diego, USA (2013 年 12 月)
  - (3) Kusakawa S, Machida K, Yasuda S, Takada N, Kuroda T, Sawada R, Matsuyama A, Tsutsumi H, Kawamata S, Sato Y Characterization of *in vivo* tumorigenicity test using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2rg<sup>null</sup> mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2013, San Diego, USA (2013 年 12 月)
  - (4) 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 松山さと子, 川真田伸, 澤芳樹, 佐藤陽治 デジタルPCRを用いたヒトiPS細胞由来分化細胞に残存する未分化iPS細胞の高感度検出法の開発. 第13回日本再生医療学会総会, 京都 (2014 年 3 月)
  - (5) 城しおり, 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 佐藤陽治 ヒトiPS細胞の分化プロペンシティ予測のための細胞特性プロファイリング. 第13回日本再生医療学会総会, 京都 (2014 年 3 月)
  - (6) Kusakawa S, Yasuda S, Kuroda T, Kawamata S, Sato Y: Digital analysis of soft agar colony formation for highly sensitive detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. World Stem Cell Summit 2015, Atlanta, USA (2015 年 12 月)
  - (7) Kuroda T, Yasuda S, Matsuyama S, Takada N, Nakashima H, Kusakawa S, Umezawa A, Matsuyama A, Kawamata S, Sato Y: Simple *in vitro* method for detection of immortalized cells in human retinal pigment epithelial cells. World Stem Cell Summit 2015, Atlanta, USA (2015 年 12 月)
  - (8) 黒田拓也, 安田智, 松山さと子, 高田のぞみ, 中島啓行, 草川森士, 梅澤明弘, 松山晃史, 川真田伸, 佐藤陽治 ヒトiPS細胞由来網膜色素上皮細胞中に混入する不死化細胞検出法の開発とその性能評価. 第15回日本再生医療学会総会, 大阪 (2016 年 3 月)
  - (9) 草川森士, 安田智, 黒田拓也, 川真田伸, 佐藤陽治 デジタル軟寒天コロニー形成試験を利用した再生医療製品の品質評価. 第15回日本再生医療学会総会, 大阪 (2016 年 3 月)
- 〔図書〕 (計1件)
- (1) Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. *In vitro* detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol.* 2014;1210:183-92.
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
黒田拓也 (KURODA, Takuya) 国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部 研究員 研究者番号: 70648857