

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04278

研究課題名(和文) 不完全なリプログラミングとゲノム不安定性を指標としたヒトiPS細胞の品質評価

研究課題名(英文) Evaluation of human iPSCs by incomplete reprogramming and genome instability

研究代表者

岡田 洋平 (Okada, Yohei)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30383714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は、ES細胞と同様に個体を構成する様々な体細胞へと分化できるため、再生医療やヒト疾患の*in vitro*のモデルとして期待されてきた。しかし、分化異常や造腫瘍性が問題になることがあり、「真に良質なヒトiPS細胞」選択のための評価法が求められてきた。本研究では、不完全なリプログラミングとゲノム不安定性により引き起こされるヒトiPS細胞株間の造腫瘍性(グリオーマ産生能)の違いに着目してリプログラミング抵抗性遺伝子群「Score Card」を同定し、ヒトiPS細胞の品質評価への応用を検討した。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells (iPSCs) hold great promise for regenerative medicine and *in vitro* modeling of human diseases. To overcome their abnormal differentiation and tumorigenicity, the method to evaluate bona fide “appropriately reprogrammed human iPSCs” has been expected. In this study, by focusing on the differences of the tumorigenicity (glioma-like tumor formation) among human iPSC clones caused by the incomplete reprogramming and genomic instability, we identified reprogramming recalcitrant genes as “Score card”, and examined their applicability to the evaluation of human iPSCs.

研究分野：分子神経生物学、幹細胞生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 造腫瘍性 ゲノム不安定性 不完全なリプログラミング

## 1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞は、ES 細胞と同様に個体を構成する様々な体細胞へと分化できるため、再生医療への応用や、発生研究や創薬における *in vitro* モデルとしての応用が期待されてきた。我々は、これまでに、マウス・ヒト ES/iPS 細胞から神経幹細胞を誘導するシステムを確立し (Okada et al., Stem Cells 2008, Miura, et al., Nat Biotech 2009)、脊髄損傷モデルマウスの運動機能の改善における、その移植治療の有効性を報告してきた (Kumagai et al., PlosOne 2009, Tsuji et al., PNAS 2010, Nori\* and Okada\* et al., PNAS 2011, Kobayashi\* and Okada\* PlosOne 2012)。しかし、多数のマウス iPS 細胞から神経幹細胞を誘導し、免疫不全 (NOD/SCID) マウスの脳へ移植すると、一部の iPS 細胞株から誘導した神経幹細胞は、未分化細胞の残存による奇形腫を形成すること、そのリスクは iPS 細胞樹立に用いた体細胞の違いに依存しており、よりリプログラミングされにくい成体マウス皮膚由来線維芽細胞から樹立されたマウス iPS 細胞が、高い奇形腫形成率を示すことを突き止めた (Miura et al., Nat Biotech 2009)。これらの結果は、不完全な iPS 細胞は分化異常や造腫瘍性により、再生医療における安全性を脅かし、また疾患解析では間違った病態解析へと導いてしまう可能性を示唆している。そのため、様々な方法により、iPS 細胞株の品質評価が行われ、「良質な iPS 細胞」の選択が試みられてきた。しかし、「真に良質なヒト iPS 細胞」の条件と評価方法に関するコンセンサスは未だ得られていない。

一方、我々は、「従来の評価基準」により「良質なヒト iPS 細胞」と評価された、成人皮膚線維芽細胞よりレトロウイルス、またはエピソードベクターにより樹立されたヒト iPS 細胞を神経幹細胞へと分化誘導したところ、一部の iPS 細胞株から誘導した神経幹細胞は、NOD/SCID マウス脳へ移植すると脳腫瘍の一種であるグリオーマ様の腫瘍を形成した。どの場合も分化誘導後の未分化細胞の残存や奇形腫の形成は認めず、またヒト iPS 細胞樹立時の *c-Myc* 使用の有無は造腫瘍性には関与しなかった。したがって、(1)「従来の評価基準」で「良質なヒト iPS 細胞」と評価されても分化異常や造腫瘍性を示し得ること、(2)造腫瘍性リスクと考えられてきた、ヒト iPS 細胞樹立時の *c-Myc* の使用、分化誘導後の未分化細胞の残存、リプログラミング因子のゲノムへの挿入等とは別の造腫瘍性リスク因子の存在が示唆された。

そこで前述の各株においてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、全プローブを用いた解析では、分化誘導の前後において、ヒト ES 細胞も含め株間の明確な違いは検出されなかった。そこで、独自にヒト ES 細胞特異的遺伝子群を同定し、その発現プロファイルと比較したところ、造

腫瘍性を示すヒト iPS 細胞株は線維芽細胞に近い発現プロファイルを残しており、「不完全なリプログラミング」が示唆された。さらに aCGH (array comparative genomic hybridization : Agilent 180K CGH アレイ) によるゲノムコピー数解析を行ったところ、造腫瘍性を示す株は、分化誘導後にゲノム不安定性が観察され、腫瘍化の原因となっている可能性が示唆された。したがって、「従来の評価基準」では見いだすことのできない、「分化誘導後のゲノム不安定性」や「不完全なリプログラミング」をも検出できる、新たなヒト iPS 細胞の品質評価システムが必要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、複数のヒト iPS 細胞株間の神経分化能と造腫瘍性 (グリオーマ産生能) の違いに着目し、ヒト iPS 細胞のリプログラミング評価、ヒト iPS 細胞の品質を規定するリプログラミング抵抗性遺伝子群「Score Card」の同定により、「真に良質なヒト iPS 細胞」の条件を明らかにし、その品質評価法を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現とエピジェネティクスによるヒト iPS 細胞のリプログラミング評価

神経分化能と造腫瘍性を詳細に解析した 6 株のヒト iPS 細胞 (レトロウイルスにより樹立されたヒト iPS 細胞 4 株、エピソードベクターにより樹立されたヒト iPS 細胞 2 株) と 3 株のヒト ES 細胞、および iPS 細胞の作製に用いた線維芽細胞を用いて、遺伝子発現とエピジェネティクスの観点から、各ヒト iPS 細胞株のリプログラミング状態を評価する。

(2) 様々な細胞種への分化誘導における分化異常・造腫瘍性評価  
未分化ヒト iPS 細胞を免疫不全 (NOD/SCID) マウス精巣へ移植して奇形腫を形成し、その組織像から複数の細胞種における分化能と造腫瘍性を同時に検討する。

(3) ヒト iPS 細胞の品質を規定する遺伝子群「Score Card」の同定と「真に良質なヒト iPS 細胞」の品質評価法の開発

ヒト iPS 細胞の不完全なリプログラミングを検出し得る最小限のリプログラミング抵抗性遺伝子群「Score Card」を同定し、未分化状態におけるリプログラミングの評価を検討する。

また、これまでに様々な線維芽細胞から樹立した約 10-20 株のヒト iPS 細胞を用いて神経分化誘導を行い、未分化状態における「Score Card」遺伝子群の発現プロファイル解析、分化誘導前後における CGH アレイによるゲノム安定性解析、分化誘導した神経幹細胞の NOD/SCID マウス精巣への移植により、造腫瘍性評価を行い「Score Card」として用いたヒト iPS 細胞の品質評価法の妥当性を検討する。

(4)異なる分化誘導法や中枢神経系以外での造腫瘍性の検討

ヒト iPS 細胞から異なる方法で分化誘導した神経系前駆細胞を坐骨神経損傷モデルへ移植し、造腫瘍性を検討する。

(5)「Score Card」遺伝子群によるゲノム不安定性と造腫瘍性のレスキュー

「Score Card」の中で特に顕著に発現変化が見られた遺伝子を、造腫瘍性を示したヒト iPS 細胞株に薬剤 (Doxycycline) 誘導性 PiggyBac vector により強制発現し、ゲノム不安定性と造腫瘍性をレスキューし得るかを解析する。

#### 4. 研究成果

(1)遺伝子発現とエピジェネティクスによるヒト iPS 細胞のリプログラミング評価

神経分化能と造腫瘍性を詳細に解析した 6 株のヒト iPS 細胞と 3 株のヒト ES 細胞、および iPS 細胞の作製に用いた線維芽細胞を用いて、独自に同定したヒト ES 細胞特異的遺伝子群とそこから絞り込んだ遺伝子群の発現プロファイル解析を行った。その結果、分化誘導後にゲノム不安定性が観察されたヒト iPS 細胞株 (造腫瘍性を示した株) は、どちらの場合も線維芽細胞に近い発現プロファイルを示し、不完全なリプログラミングが示唆された。さらに、エピジェネティクスの観点から不完全なリプログラミングを評価するために、同じ株を用いて網羅的 DNA メチル化解析 (Illumina Infinium methylation assay: 450k) を行った。

(2)様々な細胞種における造腫瘍性評価

造腫瘍性解析に用いた 6 株のヒト iPS 細胞と 1 株のヒト ES 細胞を NOD/SCID マウス精巢へ移植して奇形腫を形成したところ、造腫瘍性を示すヒト iPS 細胞から作成した奇形腫では未成熟な神経上皮組織が多数みられ、また幼若で増殖性の高い間葉系の前駆細胞が観察された。一方、造腫瘍性を示さないヒト iPS 細胞やヒト ES 細胞ではこのような組織像は見られなかった。ヒト卵巣腫瘍における未熟奇形腫の悪性度分類 (Norris et al., 1990) では、未熟神経上皮成分の割合が悪性度と相関することが示されており、奇形腫の組織像は、分化誘導後の神経幹細胞の造腫瘍性とよく関連していると考えられた。また、iPS 細胞の造腫瘍性評価において、奇形腫の組織像が有用であると考えられた。

(3)ヒト iPS 細胞の品質を規定する遺伝子群「Score Card」の同定と「真に良質なヒト iPS 細胞」の品質評価法の開発

レトロウイルスで作成したヒト iPS 細胞の中で造腫瘍性を示す株では、ヒト ES 細胞特異的な 17 遺伝子に着目すると、線維芽細胞と同様の発現プロファイルを示した。そこで、エピゾーマルベクターで樹立したヒト iPS 細胞においても比較解析したところ、造腫瘍性を示した株においては、やはり同じ 17 遺伝子の発現プロファイルが線維芽細胞に類似

していた。したがって、この 17 遺伝子が線維芽細胞における「リプログラミング抵抗性遺伝子」であり、iPS 細胞由来神経幹細胞のゲノム不安定性や造腫瘍性への関与が示唆された。さらに、その発現プロファイルはヒト iPS 細胞のリプログラミング状態を反映し、品質評価における「Score Card」になり得ると考えられた。そこで、さらに多くのヒト iPS 細胞を用いて、未分化状態における 17 遺伝子の発現プロファイル解析を行ったところ、ヒト iPS 細胞のリプログラミング状態が、ヒト ES 細胞とほぼ同様のパターンを示すもの (A)、一部が線維芽細胞様のプロファイルを示すもの (B)、ほぼ線維芽細胞のプロファイルに近いもの (C) の 3 段階に分類され、(B) と (C) においては、高頻度に分化誘導後のゲノム不安定性と造腫瘍性が観察された。したがって、17 遺伝子の「Score Card」は、ヒト iPS 細胞の品質評価に有用であると考えられた。

(5)異なる分化誘導法や中枢神経系以外での造腫瘍性の検討

これまでの解析で造腫瘍性を示さなかったヒト iPS 細胞株を、これまでとは異なる方法で神経系前駆細胞へと分化誘導し、坐骨神経切断モデルへと移植したところ、いくつかの個体で造腫瘍性が観察された。組織学的解析により、奇形腫様組織像が観察されたことから、本解析で注目している造腫瘍性メカニズムとは異なると考えられるが、異なる分化誘導法、異なる移植標的の場合は、個別に造腫瘍性を検討する必要性が示唆された。

(6)「Score Card」遺伝子群によるゲノム不安定性と造腫瘍性のレスキュー

「Score Card」の中で特に顕著に発現変化がみられるものを 4 個同定した。これらの遺伝子を薬剤 (Doxycycline) 誘導性 PiggyBac vector へクローニングしており、今後、造腫瘍性を示したヒト iPS 細胞株に導入し、ゲノム不安定性と造腫瘍性をレスキューし得るかを検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

1. Miyawaki S, Okada Y, Okano H, Miura K, Teratoma Formation Assay for Assessing Pluripotency and Tumorigenicity of Pluripotent Stem Cells, Bio-protocol, 7(16), 2017 doi: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2518>

2. Ishigaki S, Fujioka Y, Okada Y, Riku Y, Udagawa T, Honda D, Yokoi S, Endo K, Ikenaka K, Takagi S, Iguchi Y, Sahara N, Takashima A, Okano H, Yoshida M, Warita H, Aoki M, Watanabe H, Okado H, Katsuno H, Sobue G. Altered tau isoform ratio caused by loss of Fus and Sfpq function leads to FTL-like phenotypes Cell Reports 18(5):1118-1131. 2017 doi: [10.1016/j.celrep.2017.01.013](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.013).

3. Miyawaki S, Kawamura Y, Oiwa Y, Shimizu A, Hachiya T, Bono H, Koya I, Okada Y, Kimura T, Tsuchiya Y, Suzuki S, Onishi N, Kuzumaki N, Matsuzaki Y, Narita M, Ikeda E, Okanoya K, Seino K, Saya H, Okano H, Miura K. Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats Nat. Commun. 7:11471. 2016, doi: 10.1038/ncomms11471.
  4. Ichianagi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, Akamatsu W, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuiji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H. Establishment of in vitro FUS-associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells Stem Cell Reports. 6(4):496-510. 2016 doi: 10.1016/j.stemcr.2016.02.011.
  5. Shimojo D, Onodera K, Doi-Torii Y, Ishihara Y, Hattori C, Miwa Y, Tanaka S, Okada R, Ohyama M, Shoji M, Nakanishi A, Doyu M, Okano H\*, Okada Y\*. Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells. Mol Brain. 8(1):79. 2015 doi: 10.1186/s13041-015-0172-4.
- \*corresponding authors
6. Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Takahashi K, Hayakawa H, Nagai M, Ohyama M, Ryo M, Ogino M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F, Okano H. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 signaling pathway. Hum Mol Genet. 24(17):4879-900. 2015 Sep doi: 10.1093/hmg/ddv212.
  7. Nori S, Okada Y, Nishimura S, Sasaki T, Itakura G, Kobayashi Y, Renault-Mihara F, Shimizu A, Koya I, Yoshida R, Kudo J, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Long-term safety issues of iPSC-based cell therapy in a spinal cord injury model: oncogenic transformation with epithelial-mesenchymal transition. Stem Cell Reports 4(3) 360-373 2015 doi:10.1016/j.stemcr.2015.01.006

〔学会発表〕(計52件)

1. Okada Y, Onodera K, Ito T, Shimojo D, Ishihara Y, Tanaka S, Katsuno M, Doyu M, Sobue G, Okano H Pathophysiological analysis of spinal-bulbar muscular atrophy using disease specific iPSCs, Society for Neuroscience Annual Meeting, Neuroscience 2017, Washington DC, USA, 2017.11.12 (Nanosymposium)

2. 岡田洋平、iPS細胞を用いた神経・筋疾患研究、第3回筋ジストロフィー研究会、名古屋、2016年10月14日(シンポジウム・招待講演)
3. 岡田洋平、不完全なリプログラミングとゲノム不安定性を指標としたヒトiPS細胞の造腫瘍性評価、京都大学iPS細胞研究所セミナー、2015年10月28日(招待講演)
4. 岡田洋平、疾患特異的ヒトiPS細胞を用いた運動ニューロン疾患の病態解析、第33回日本神経治療学会総会、名古屋、2015年11月26日(シンポジウム・招待講演)
5. 岡田洋平、iPS細胞を用いた神経再生と神経疾患研究、第21回糖尿病性神経障害を考える会学術講演会、東京、2015年10月24日(特別講演・招待講演)
6. 岡田洋平、iPS細胞を用いた神経疾患研究、第2回愛知医科大学糖神合同セミナー、長久手、2015年10月20日(招待講演)
7. 岡田洋平、iPS細胞を用いた神経疾患研究、第34回日本認知症学会学術集会、青森、2015年10月4日(シンポジウム・招待講演)
8. 岡田洋平、iPS細胞を用いた神経疾患研究、先端医療振興財団・臨床研究情報センター・講演会、神戸、2015年8月4日(招待講演)
9. 岡田洋平、ES細胞、iPS細胞を用いた神経再生と神経疾患研究、第12回名古屋脊椎髄セミナー2015、名古屋、2015年7月18日(招待講演)
10. 岡田洋平、多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)を用いた神経再生と神経疾患研究、第3回横浜神経疾患レクチャー、横浜、2015年6月11日(招待講演)
11. 岡田洋平、ヒト疾患iPS細胞の可能性、第62回日本実験動物学会総会LASセミナー、京都、2015年5月28日(招待講演)
12. 岡田洋平、iPS細胞を用いた神経疾患研究、第56回日本神経学会学術大会、新潟、2015年5月23日(シンポジウム・招待講演)

〔図書〕(計5件)

1. 岡田洋平、祖父江元、疾患特異的iPS細胞を用いた神経変性疾患の病態解析・創薬研究 Clinical Neuroscience 36(3), 328-332, 2018年3月 中外医学社
2. 岡田洋平、祖父江元、難治性神経変性疾患における治療開発～患特異的iPS細胞を用いた神経疾患モデルの構築と治療薬の開発トランスレーショナルリサーチを支援する遺伝子医学MOOK32号「難病研究up-to-date-臨床病態解析と新たな診断・治療法開発を目指して-」株式会社メディカルドゥ、株式会社メディカルドゥ、110-116、2017
3. 伊藤卓治、岡田洋平、ここが知りたい今後の治療開発に向けてiPSでのドラッグスクリーニング、アクチュアル脳・神経疾患の臨床「神経疾患治療ストラテジー」、中山書店、368-379、2017
4. 小野寺一成、岡田洋平、iPS細胞を用いた

認知症モデル、最新医学 3 月増刊号 71  
563-569、2016 年 3 月 最新医学社  
5. 沼澤佑子、岡田洋平、岡野栄之、【再生医  
療-新たな医療を求めて-】臨床応用を目指し  
た基礎研究 疾患モデル細胞、iPS 細胞を用  
いた毒性評価と創薬研究 iPS 細胞を用いた  
大脳白質形成不全症の病態解析、日本臨床  
73, 396-400, 増刊 5 再生医療 2015 年 6 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:iPS 細胞のクローンの選択方法、及び  
その選択方法に用いる遺伝子の選択方法  
発明者:岡田洋平、岡野栄之、角田達彦、宮  
冬樹

権利者:学校法人慶應義塾

種類:特許

番号:PCT/JP2012/054800

出願年月日:2012 年 2 月 27 日

国内外の別:PCT

取得状況(計 2 件)

名称:ヒト分化細胞由来多能性幹細胞に由来  
する胚様体及び/又は神経幹細胞の培養方  
法

発明者:岡野栄之、岡田洋平、中村雅也

権利者:学校法人慶應義塾

種類:特許

番号:第 6099867 号

取得年月日:2017 年 3 月 3 日

国内外の別:国内

名称:人工多能性幹細胞のクローン選択方法  
発明者:岡野栄之、岡田洋平、山中伸弥、三  
浦恭子

権利者:学校法人慶應義塾、国立大学法人京  
都大学

種類:特許

番号:第 5777113 号

取得年月日:2015 年 7 月 17 日

国内外の別:国内

〔その他〕

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060703/02.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 洋平 (OKADA YOHEI)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号:30383714

(2)連携研究者

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号:60160694

(3)連携研究者

宮 冬樹 (MIYA FUYUKI)

東京医科歯科大学・医学部・助教

研究者番号:50415311

(4)連携研究者

池田 栄二 (IKADA EIJI)

山口大学・医学部・教授

研究者番号:30232177

(5)連携研究者

安田 宗義 (YASUDA MUNEYOSHI)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号:10440752