

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659575

研究課題名(和文)放射線照射によるiPS細胞移植治療時の腫瘍発生抑制法の開発

研究課題名(英文)Development of methods to inhibit tumorigenesis after transplantation of differentiated iPS cells

研究代表者

松村 耕治(Matsumura, Kouji)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部共同利用研究施設・講師)

研究者番号：30272610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞の移植医療において移植後の腫瘍発生は、分化誘導組織に残存する未分化iPS細胞によるところが多い。放射線照射は未分化細胞へ高感受性を示し、ヒトiPS細胞及びマウスiPS細胞分化誘導後に照射を行いマウスへ移植したところ腫瘍形成は有意に抑制が認められた。温熱により未分化iPS細胞は43.5℃で感受性が認められたが移植実験においては有意差はみられなかった。抗癌剤5FUは未分化iPS細胞除去に有用とフローサイトメーターでは認められたため移植実験を進めている。ヒトiPS細胞の移植細胞に対して、これらの腫瘍抑制法を併用した残存未分化iPS細胞の割合を減らして安全な移植治療へ役立てたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：In transplant medical treatment of the iPS cells, most etiology of tumor genesis after the transplant depends on undifferentiated iPS cells remaining in induced differentiation tissues. Since the irradiation showed high sensitivity to undifferentiated cells, the induced differentiation cells of human iPS cells and mouse iPS cells were irradiated. As results, tumor genesis was significantly reduced when it was transplanted into mouse. The hyperthermia showed sensitivity at 43.5 degrees Celsius to undifferentiated iPS cells. However, in transplant experiment, the significant difference was not observed. By flow cytometer, anticancer agent (5FU) was useful for a removal of the undifferentiated iPS cells. Therefore, we advance transplant experiment. For graft cells of the human iPS cells, these tumor inhibition methods can reduce a ratio of residual undifferentiated iPS cells and these methods will help safe transplant treatment.

研究分野：再生医療学

キーワード：iPS細胞 腫瘍 放射線照射 5FU 温熱 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を用いた細胞移植治療は、脊髄損傷、重症心不全、等に応用が期待されている。治療は iPS 細胞を直接移植せずに体外で分化誘導した組織を移植する。しかし、移植後に腫瘍化する問題点があり、主な原因は移植組織内の残存未分化 iPS 細胞と考えられている。iPS 細胞由来の神経前駆細胞中に 0.02%以上の未分化細胞により移植後に奇形腫が生じる (Miura K, Yamanaka S, et al. Nature Biotechnol. 2009)。腫瘍発生を防ぐために、心筋特異的なマーカーを利用して心筋細胞のみを選別後に移植する報告もある。

2. 研究の目的

iPS 細胞を用いた再生医療において副作用として最も懸念される「移植後の腫瘍発生」は、移植する心筋等、分化誘導した組織内に残存する未分化 iPS 細胞が原因の一つと考えられている。その未分化細胞は放射線に感受性が高い仮説を考える。放射線照射による未分化細胞の選択的な除去により腫瘍化のリスクを抑えた移植組織の作製をめざす。具体的な目的を以下に挙げる。

- (1) 放射線照射の分化誘導後の組織内における残存未分化 iPS 細胞への殺細胞効果を解析
- (2) 心筋等へ分化誘導した組織をマウスへ移植して放射線照射による腫瘍発生の有無の検討
- (3) 腫瘍発生を抑制する至適線量等の確立、遺伝子レベルでの生着組織の安全性評価

3. 研究の方法

本研究は、iPS 細胞の安全な再生医療を行うにあたり、移植細胞への放射線照射が治療後の腫瘍発生を抑制することに有用であるか否か基礎的な検討を行った。

- (1) マウス iPS 細胞の分化誘導細胞へ放射線照射を行い免疫不全マウスの精巣へ移植して腫瘍発生の有無の検討
- (2) 至適線量、照射法、移植時期をマウスへの移植を通して確認する
- (3) マウス iPS 細胞の純化した分化誘導細胞(心筋、神経細胞)へ放射線照射を行い免疫不全マウスの各々の組織欠損部へ移植して腫瘍発生の有無を検討
- (4) ヒト iPS 細胞による同様な腫瘍発生の有無の検討

4. 研究成果 マウス iPS 細胞

- (1) マウス iPS 細胞、ES 細胞を神経細胞、心筋細胞などへ分化誘導する際に、その誘導に反応しない、抵抗性の未分化細胞の検出を行った。利用したマウス iPS 細胞は、Nanog-GFP-IRES-Puro Tg マウスの線維芽細胞から作成されている (京都大学山中研究室提供)。

そこで未分化性を維持していれば Nanog 遺伝子と GFP の発現が伴っている。その蛍光をマーカーとして、分化した細胞と残存した未分化細胞が区別可能で、それらの割合はフローサイトメトリーを利用すれば測定できる。上述の未分化な iPS 細胞の胚様体が出現した後、附着性のディッシュで培養すると、2、3 日で拍動を伴った細胞がみられ、心筋細胞へ分化した事が確認される。同時に、神経細胞、骨格筋、平滑筋、消化管様細胞なども出現する。心筋は拍動するために容易に同定可能である。残存未分化細胞は拍動する心筋細胞の近傍や、胚様体の中心部跡等に認められた (図1. A)。蛍光色素が組み込まれていない場合、SSEA1 等の未分化細胞マーカーの抗体を利用して残存細胞の割合を検出した(図 1. B)。フローサイトメーターによる GFP 陽性の未分化 iPS 細胞の割合は、誘導前 42% (図1. C)、胚様体で 12%と減少するも(図1. D)、分化誘導 10 日目でも約 1.6%認められた (図1. E)。この未分化細胞も心筋細胞と一緒に移植されるため腫瘍様細胞が出現すると考えられた。我々はさらに、この分化誘導に抵抗性の残存未分化細胞を選択的に除去できれば安全に移植が可能と考え、医用工学的手法を取り入れて除去する手段を試みた。

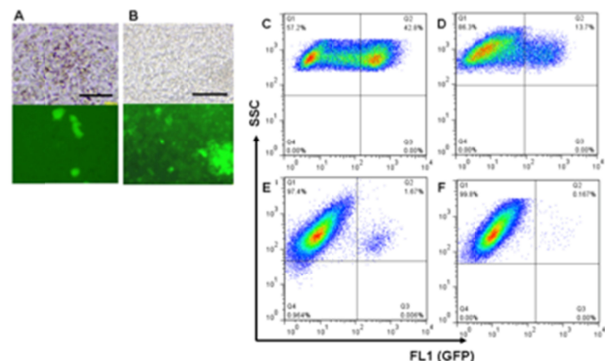


図1 マウスiPS細胞の分化誘導後の未分化iPS細胞

- (2) 我々は、レーザーを利用して、未分化細胞を除去する試みを行った。皮膚科領域では血管腫、あざの治療法としてレーザーを利用して色素選択的に赤色あるいは黒色系の細胞を死滅させる。これは、レーザー照射に伴う局所加温の効果による。iPS 細胞の分化誘導に際しても、*in vitro* で未分化細胞を色素標識して選択的除去が可能であると考えた。予備的に実施した実験法は、未分化細胞を蛍光抗 SSEA1 抗体で標識する。その際、標識した色素の励起波長にあわせた波長のレーザーを照射すれば、選択的細胞除去の効果が期待できる。連続 Nd:YAG レーザーの第 2 高調波 (532nm) にてディッシュ上の細胞を直接照射した。結果として、蛍光標識なしの抗体に結合した細胞はコロニー形成が行われるが Phycoerythrin (PE) 標識した抗体に結合した細胞は増殖が認められなかった。すなわち、蛍光色素によるレーザー光の吸収に伴う局所加温により細胞死が引き起こされたと考えられた。レーザー照射領域には

フィーダー細胞のみ残存していた (図2)。これらの基礎実験により、蛍光標識+レーザー照射で未分化細胞を選択的に除去する可能性を示した。しかし、レーザー照射による局所加温の効率は高くない。そこで、スポット状で小さいレーザー光の強度を上げるためには、ディッシュのような広範囲に当てるスキャンニング照射が必要で、時間を要する。また、照射スポット径を大きくするためには、より高出力のレーザー装置を必要とするか、あるいは、効率のよいレーザー照射による局所加温を可能とする色素の開発が望まれる。

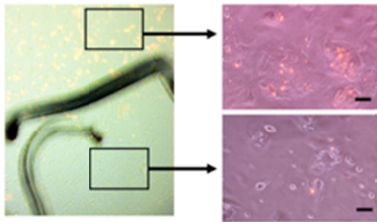


図2 レーザー光による未分化細胞の除去

次に、未分化細胞除去のため放射線に着目した。放射線照射は癌治療に利用されており、癌細胞の DNA 障害による増殖抑制、細胞死が誘導される。iPS 細胞の放射線感受性を検討した。すなわち、未分化 iPS 細胞の培養 1 日目に放射線照射を行いコロニー形成能を調べた。結果として、8 Gy 以上の照射によりコロニーは全く形成されず、高い感受性を示した。iPS 細胞は細胞死を起こしたと考えられた。一方で、フィーダー細胞の線維芽細胞は付着したままであるため、放射線の影響を受けていないと考えられた (mES, miPS, 図3)。次に、分化誘導後に放射線照射した細胞を単離してフローサイトメーターで解析した。非照射群の未分化細胞 1.6% に対して、照射群の未分化細胞は 0.1% に減少した (図1. F)。この際、心筋細胞の拍動に肉眼的な変化は認められなかった。以上の *in vitro* の実験で、放射線照射により未分化細胞が特異的に影響を受けて何らかの細胞死を起こした事が判明した。分化した細胞への放射線照射の影響は形態学的には認められず、また、心筋拍動への影響もなかった。

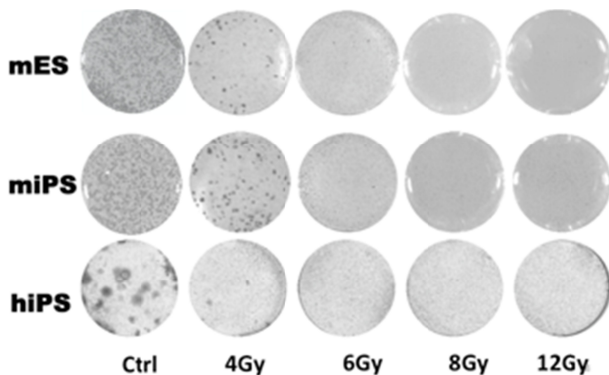


図3 放射線線量によるコロニー形成能の違い

(4) 以上の結果を踏まえて、我々は、移植前の

分化誘導細胞・組織へ放射線照射を行うと腫瘍発生が抑制できる仮説の元でさらに基礎的な実験を進めた。すなわち、培養ディッシュ上で分化誘導した iPS 細胞へ直接 X 線を 8Gy 照射した。翌日、細胞を単離して免疫不全 (Severe combined immunodeficiency, SCID) マウス精巣皮膜下へ移植して、10 週間程度観察して奇形腫の発生を調べた。その結果、コントロール群 (放射線照射なし) はすべてのマウスに奇形腫が発生した (10mm ~ 50mm 径) (図4, 5)。しかし、実験群 (放射線照射) は、約 60% のマウスに肉眼的な奇形腫は発生しなかった。分化細胞を移植した精巣は、その内部に限局的に奇形腫の組織像が認められた。残りのマウスにおいては、いずれも 20mm 径以下の小さな腫瘍が認められた。したがって、分化誘導した細胞への放射線照射により有意に発生が抑制された (図5)。

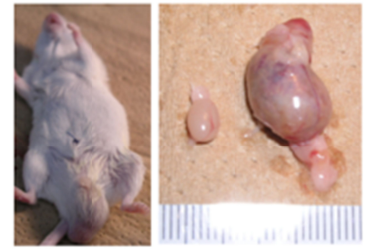


図4 分化マウス iPS 細胞移植後の奇形腫

の小さな腫瘍が認められた。したがって、分化誘導した細胞への放射線照射により有意に発生が抑制された (図5)。

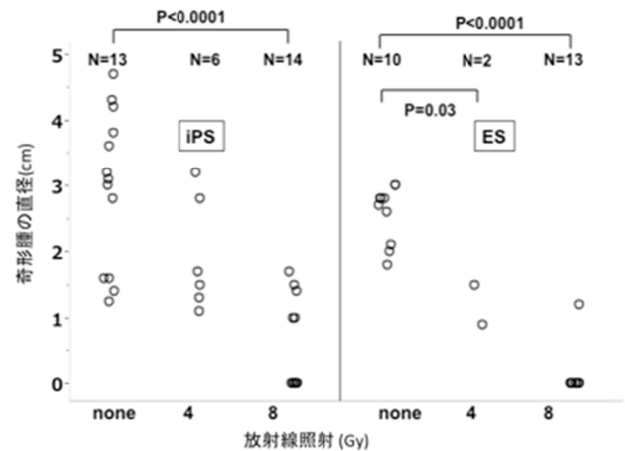


図5 分化誘導した細胞への放射線照射効果

ヒト iPS 細胞

(5) 放射線による分化誘導後に目的以外の細胞を除去を行った。「分化誘導後に目的以外」の細胞を除去する移植後の腫瘍発生を考えた場合、残存する増殖未分化細胞をいかに特異的に除去するかが重要となる。癌治療における放射線照射は、細胞の増殖抑制を示す。それによりがん細胞を消滅または減少させる。白血病治療法として放射線を照射が利用される。未分化な骨髄細胞は感受性が高いため細胞が増殖抑制される。その際、正常に分化した周りの骨、筋肉、神経への影響は少ない。また、妊娠初期に放射線を照射することは胎児へ影響を与えてしまうので禁忌である。それらの事実より未分化 iPS 細胞は癌細胞や骨髄細胞、胚と

同様、細胞分裂が亢進していることから、分化した細胞に比べ、細胞死につながる増殖抑制を受けやすいのではないかと考えた。最初に、未分化 iPS 細胞における放射線感受性を調べるためコロニー形成能を示すヒト iPS 細胞に放射線照射を行ったところ、4 Gy 以上で放射線の影響を受けた。その際、フィーダー細胞として利用される線維芽細胞は放射線による影響はみられなかった (hiPS, 図3)。次に、分化誘導ヒト iPS 細胞に放射線照射を行い、残存する分化抵抗性未分化細胞の割合をフローサイトメーターとマウスへの移植実験により調べた。分化誘導法は胚葉体 (Embryoid Body, EB) 経路にて付着系で分化誘導を行った。フローサイトメーターでは放射線照射した分化誘導 iPS 細胞に残存する分化抵抗性未分化細胞はコントロール (図6. D) と比べて 1% 以下と少ない割合となった (図6. B)。

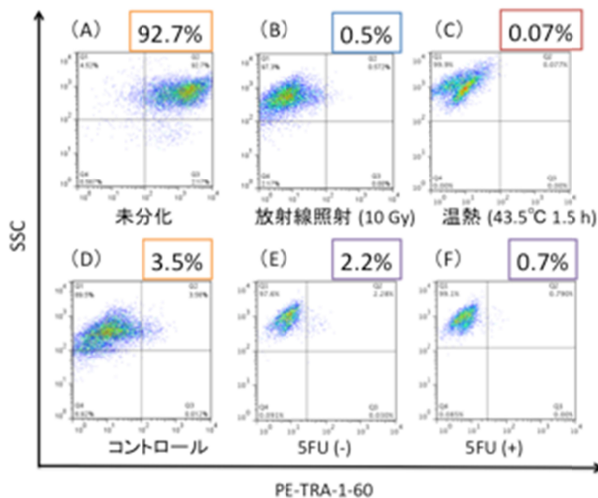


図6 ヒトiPS細胞の分化誘導後の未分化iPS細胞

(6) また、マウス移植実験では放射線照射を行っていない分化誘導細胞は移植後8週で未分化細胞の強い増殖が皮膜下で精巣肥大を伴って認められた。有意差を持って移植後の腫瘍発生を抑える事が認められた (図7. A, B)。一方、放射線照射を行った細胞を移植した精巣は12週経過後も正常な間質、精細管がみられ、iPS 細胞は精巣内に増大せず留まっていることが認め

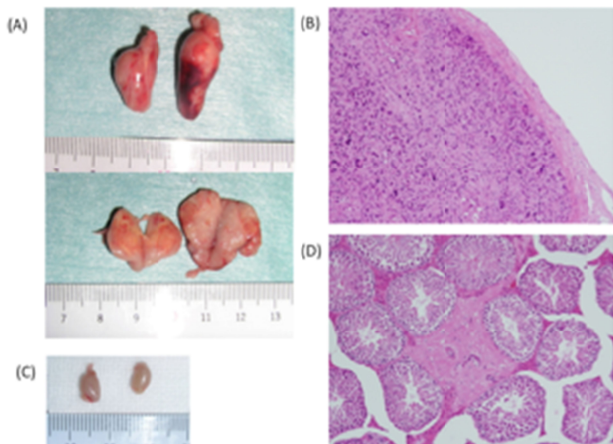


図7 ヒトiPS細胞の分化誘導細胞の移植

られた (図7C, D)。

(7) 癌治療に抗ガン剤、放射線治療等と併用して熱を加えることにより細胞の増殖を抑制させる治療がある。癌細胞の熱感受性が高い事を利用し細胞の増殖を抑制するものである。そのことより、ヒト iPS 細胞において、分化誘導 iPS 細胞に残存する増殖する未分化細胞を抑制、除去できるか検討した。そこで前述の放射線感受性解析の際に用いたコロニー形成能のある未分化 iPS 細胞に 43.0°C~43.5°C の温熱を加えたところ1時間30分程度で高い感受性を示した。その際、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) や線維芽細胞 (WI38) 等の正常細胞へも同様の実験を行ったが影響は認められなかった。このことから、放射線照射同様、分化誘導細胞内に残存する未分化細胞が温熱により増殖抑制され、移植後に腫瘍発生を防止する方法であると考えられる。そこでフローサイトメーターによる残存未分化細胞を測定したところ分化抵抗性未分化細胞の割合は 0.1% と極めて少ない割合であった (図6. C, D)。マウスの精巣へ移植実験を行ったところ、温熱の効果が認められる傾向があるが、明らかな有意差は示さなかった。

(8) 分化誘導した細胞に含まれる少量の未分化細胞を除去する方法として、抗癌剤等の薬剤も利用可能と考えられる。分化した細胞はすでに増殖せず、未分化 iPS 細胞は増殖能を持っている事から抗癌剤が分化抵抗性未分化細胞の抑制に有効ではないかと考え検討した。コロニー形成能のある未分化細胞へ 5FU といわれる抗癌剤を作用させたところ、コロニー形成が阻害された。次に心筋に分化誘導を行った iPS 細胞にこの抗癌剤を添加させ、分化抵抗性未分化細胞の増殖抑制あるいは除去されているか否かフローサイトメーターで測定した。その結果、抗癌剤を作用させた分化誘導 iPS 細胞は、作用させていない細胞に比べ、分化抵抗性未分化細胞の割合が減少している事が認められた (図6. D-F)。以上より分化誘導ヒト iPS 細胞の分化細胞に混在する未分化細胞の除去に 5FU などの薬剤は有効である可能性がある。現在我々はマウスの精巣に移植実験を行い、腫瘍の発生の有無を調べている。

(9) iPS 細胞の移植治療において、「良い iPS 細胞」は、神経細胞や心筋細胞などへ分化誘導を行うと目的の細胞や組織へほぼ 100% 変化し、移植しても腫瘍が発生しないであろう。iPS 細胞は現在様々な臓器で樹立されているが、その全てが「良い細胞」とは限らない。たとえ良い細胞であっても、培養中に何らかの要因で細胞の形質が変化する事も考えられる。移植医療において、移植細胞の安全性の担保は重要な点であり、数段階でその安全性を確保する必要がある。その様な細

胞へ、我々がやっている実験より、放射線や薬剤などを併用することにより、より安全性のある移植が可能になるのではないかと。

(10) 放射線照射において分化抵抗性未分化細胞は低い放射線量でも影響を受け、マウス実験において移植後の腫瘍様細胞形成は有意差をもって抑制が認められた。温熱実験は正常な細胞に比べ未分化 iPS 細胞は 43.0℃～43.5℃ で感受性が認められたが、移植実験においては現在検討中である。薬剤添加は分化抵抗性未分化 iPS 細胞に有効であることがフローサイトメーターでは認められたため、移植実験を進めている。各々の実験において分化抵抗性未分化 iPS 細胞の割合は減少したが、0%ではない。ヒト iPS 細胞から分化誘導を行った移植細胞に対して、これらの腫瘍抑制法を併用した残存未分化 iPS 細胞の割合を減らして安全な移植治療へ役立てたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

梅山悠伊, 松村耕治, 宮平靖. ヒト iPS 細胞の移植治療時における腫瘍抑制法の開発. 査読あり, Cytometry Research. 2014;24(1):13-7.

<http://www.cytometry.jp/wordpress/wp-content/uploads/Vol.24-No.1.pdf>

〔学会発表〕(計21件)

梅山悠伊, 松村耕治, 石原美弥, 市来やよい, 高田雄三, 水野博司, 宮平靖. 分化誘導ヒト iPS 細胞の薬剤による移植後の奇形腫抑制法の検討. 第14回日本再生医療学会; 3/19-3/21; 横浜市 2015.

松村耕治, 石原美弥, 梅山悠伊, 市来やよい, 富澤正一, 高田雄三, 新井仁明, 宮平靖. ヒト iPS 細胞移植治療のフローサイトメーターによる奇形腫発症の評価. 第14回日本再生医療学会; 3/19-3/21; 横浜市 2015.

梅山悠伊, 松村耕治, 石原美弥, 市来やよい, 高田雄三, 宮平靖. 移植治療時におけるヒト iPS 細胞由来の奇形腫発症のフローサイトメーターによる評価. 第32回日本ヒト細胞学会; 8/30-8/31; 東京都 2014.

松村耕治, 石原美弥, 梅山悠伊, 宮平靖, 佐々木功典. 臨床検査におけるフローサイト活用の可能性 移植・再生医療に活用する(招待講演). 第61回日本臨床検査医学会; 11/22-11/25; 福岡市 2014.

松村耕治, 梅山悠伊, 石原美弥, 櫛引俊宏, 市

来やよい, 高田雄三, 福田孝一, 廣井禎之, 佐々木功典, 宮平靖. iPS 細胞と最近の話題 (シンポジウム)分化誘導したヒト iPS 細胞への薬剤による移植後の腫瘍抑制法の検討. 第24回日本サイトメーター学会; 6/28-6/29; 大阪 2014.

梅山悠伊, 松村耕治, 石原美弥, 市来やよい, 高田雄三, 小賀厚徳, 佐々木功典, 小林靖. 分化誘導したヒト iPS 細胞への温熱による残存未分化細胞除去の検討. 第23回日本サイトメーター学会; 6/22-6/23; 東京都 2013.

梅山悠伊, 松村耕治, 石原美弥, 市来やよい, 高田雄三, 小林靖, 宮平靖. 分化誘導したヒト iPS 細胞への放射線照射・温熱による残存未分化細胞除去の検討. 第31回日本ヒト細胞学会; 8/10-8/11; 所沢市 2013.

松村耕治, 石原美弥, 市来やよい, 高田雄三, 梅山悠伊, 吉田一路, 新井仁明, 石原雅之, 佐々木功典, 小林靖. ヒト iPS 細胞の分化誘導に抵抗する未分化細胞の検出及びその除去法の検討. 第12回日本再生医療学会総会; 3/21-3/23; 横浜市 2013.

松村耕治, 石原美弥, 佐々木功典. シンポジウム:iPS 細胞の純化・安全性:iPS 細胞の分化誘導時に残存する未分化細胞の検出及び除去法の検討. 第23回日本サイトメーター学会; 6/22-6/23; 東京都 2013.

新井仁明, 今村宰, 松村耕治, 伊達木穰, 瀧嶋邦夫. 神経突起伸長への srob1 の関与. 第86回日本生化学会大会; 9/11-9/13; 横浜 2013.

Matsumura K, Ishihara M, Umeyama Y, Ichiki Y, Takada Y, Fujita M, Arai M, Miyahira Y. Contamination of therapeutic human iPS cells with residual undifferentiated cells and their selective elimination by irradiation and hyperthermia. 第36回日本分子生物学会; 12/3-12/6; 神戸市 2013.

松村耕治, 石原美弥, 市来やよい, 石原雅之, 唐沢容子, 小賀厚徳, 高田雄三, 佐々木功典, 小林靖, 菊地眞. シンポジウム PS 細胞の新展開 ヒト・マウス iPS 細胞の分化誘導に抵抗する未分化細胞の検出及びその除去法の検討. 第22回日本サイトメーター学会; 6/25-6/26; 大阪府豊中市 2012.

吉田一路, 辻本広紀, 松村耕治, 熊野勲, 高畑りさ, 松本祐介, 堀口寛之, 平木修一, 小野聡, 山本順司, 長谷和生. 胃癌細胞株における CD47 発現と CD47 を標的とした治療の可能性 (Enhanced proliferation, tumorigenicity of CD47 high gastric cancer cell and therapeutic potential

of CD47 blockage). 第 71 回日本癌学会学術総会; 9/19-9/21; 札幌市 2012.

Matsumura K, Ishihara M, Ichiki Y, Arai M, Ishihara M, Kobayashi Y, Oga A, Sasaki K, Kikuchi M. Radiation exposure on mouse and human induced pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells in the transplantation of differentiated cells. 10th annual Meeting International Society for Stem Cell Research; 6/13-6/16; Yokohama, Japan, 2012.

新井仁明(ARAI, Hitoaki)
防衛医科大学校医学教育部・助教
研究者番号:50534864

〔図書〕(計 1 件)

松村耕治, 石原美弥. 第 6 章第 2 節 iPS 細胞の移植治療時の腫瘍発生を抑制する方法. 再生医療における臨床研究と製品開発, 448-453 技術情報協会; 2013, 577 p.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

第 24 回日本サイトメトリー学会技術講習会主催,
2013.9.7. 東京

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松村耕治 (MATSUMURA, Kouji)
防衛医科大学校医学教育部・講師
研究者番号: 30272610

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中井完治 (NAKAI, Kanji)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号: 20420838

林 克己(HAYASHI, Katsuki)
防衛医科大学校病院・講師
研究者番号: 10532517

石原美弥 (ISHIHARA, Miya)
防衛医科大学校医学教育部・教授
研究者番号: 30505342

石原雅之 (ISHIHARA, Masayuki)
防衛医科大学校防衛医学研究センター
研究者番号: 10508500