

## 69. ヒト iPS 細胞の造腫瘍性に基づく新しい品質評価法の開発

岡田 洋平

愛知医科大学 医学部 内科学講座 神経内科

Key words : ヒト iPS 細胞, 神経幹細胞, 造腫瘍性, リプログラミング, ゲノム不安定性

### 緒言

ES 細胞、iPS 細胞などの多能性幹細胞は、様々な臓器組織を構成する体細胞を *in vitro* で生み出せることから、中枢神経系における再生医学やヒト神経発生研究、神経疾患の病態解析における *in vitro* モデルへの応用が期待されてきた<sup>1)</sup>。我々は、これまでの研究で、マウス/ヒト ES/iPS 細胞から高効率に神経幹細胞を誘導するシステムを開発し<sup>2, 3)</sup>、脊髄損傷モデル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<sup>4-7)</sup>。一方、一部のマウス iPS 細胞株は神経幹細胞への分化誘導後に残存する未分化細胞が奇形腫を形成し得ること、その造腫瘍性は iPS 細胞樹立時に用いた体細胞の種類に依存することを明らかにした<sup>3)</sup>。さらに、従来良質とされてきた複数のヒト iPS 細胞株を神経幹細胞へと分化誘導して免疫不全マウスへ移植すると、一部の株から誘導した神経幹細胞はグリオーマ様腫瘍を形成することを見出した (Okada *et al.*, *in revision*)。これらの結果は、不完全な iPS 細胞は分化異常や造腫瘍性を示すことがあり、神経再生医療においては安全性を脅かし、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している。したがって、ヒト iPS 細胞の応用には、厳密な品質評価と評価基準の構築が必要であると考えられるが、「真に良質なヒト iPS 細胞」についてのコンセンサスはいまだ得られていない。そこで、本研究では、ヒト iPS 細胞の不完全なリプログラミングと、分化誘導に伴うゲノム不安定性、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性 (グリオーマ形成能) との相関に着目し、ヒト iPS 細胞の品質決定機構・腫瘍化メカニズムを解析し、さらに神経再生治療に用いることのできる「真に良質なヒト iPS 細胞」の迅速で効率的な評価方法を検討する。

### 方法および結果

#### 1. ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の造腫瘍性評価

京都大学山中研究室でレトロウイルスを用いて樹立されたヒト iPS 細胞 4 株 (Retro-hiPSCs: 201B6, 201B7, 253G1, 253G4<sup>8,9)</sup>)、エピゾーマルベクターを用いて樹立されたヒト iPS 細胞 2 株 (Epi-hiPSCs: 409B2, 414C2<sup>10)</sup>) を神経幹細胞へと分化誘導し、免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) の脳または精巣へ移植して *in vivo* における造腫瘍性を検討した。その結果、201B7 由来神経幹細胞は造腫瘍性を示すことはなかったが、253G4 および一部の 253G1 由来神経幹細胞は、低悪性度のグリオーマ様の組織像を示した。Epi-hiPSCs 2 株から誘導した神経幹細胞も、一部の個体においてグリオーマ様腫瘍を形成した。どの株においても、奇形腫の形成はみられなかった。また、253G4 由来神経幹細胞は、移植前後にレトロウイルス由来 OCT4 の発現を認め、Ki67 陽性の増殖性細胞がみられた。253G1 由来神経幹細胞も、移植後に OCT4 の発現を認めたが、腫瘍化した組織の一部においてのみ観察されたこと、Epi-hiPSCs 由来神経幹細胞も造腫瘍性を示したことから、レトロウイルス由来外来遺伝子の発現はグリオーマ様腫瘍の形成に寄与し得るが、造腫瘍性をすべて説明し得るものではないと考えられた。

#### 2. ヒト iPS 細胞および分化誘導した神経幹細胞における遺伝子発現プロファイルの比較

Retro-hiPSCs の神経幹細胞への分化誘導の前後においてマイクロアレイによる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、造腫瘍性を示したヒト iPS 細胞と、示さないヒト iPS 細胞において明らかな遺伝子発現プロファイルの違いを検出できなかった。そこで、独自に同定したヒト ES 細胞特異的遺伝子群 (hESC signature genes) 1,340 個について各株間の発現プロファイルを比較したところ、造腫瘍性を示さない 201B7 はヒト ES 細胞とよ

く類似していたが、分化異常や造腫瘍性を示した 201B6、253G1、253G4 は、リプログラミング前のヒト成人皮膚由来線維芽細胞（HDF）に類似した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。また、ヒト ES 細胞特異的遺伝子群のなかで、ゲノム修復に関わる 60 ないしは 17 遺伝子を抽出し、上記と同様の発現プロファイルの比較を行ったところ、これら二つのグループの細胞の違いを検出できることが明らかになった。次に、グリオーマの発生にはゲノム不安定性が関与すること、また造腫瘍性と関連してゲノム不安定性に関わる遺伝子群の発現低下がみられたことから、神経幹細胞への分化誘導前後において、aCGH（Agilent 180K CGH: comparative genomic hybridization）を用いたゲノムコピー数解析を行った。その結果、グリオーマ様腫瘍を形成した 253G1、253G4 では、未分化状態ではゲノムコピー数異常は見られないが、分化誘導によりゲノムコピー数異常が有意に増加していた。一方、造腫瘍性を示さない 201B7 ではゲノムコピー数異常の増加は見られなかった。

同様の解析を、Epi-hiPSCs についても行ったところ、aCGH によるゲノム不安定性評価では、軽度であるものの分化誘導に伴うゲノム不安定性が検出された。さらに、先に述べた 60 ないし 17 遺伝子の発現プロファイル解析では、造腫瘍性を示した Retro-hiPSCs ほどではないが、線維芽細胞に類似した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。これらの結果から、不完全にリプログラミングされたヒト iPS 細胞は、分化誘導に伴うゲノム不安定性により造腫瘍性を示す可能性が示唆された。また、60 ないし 17 個のゲノム修復関連遺伝子群がリプログラミング抵抗性遺伝子（Reprogramming recalcitrant genes）である可能性が、またその遺伝子の発現プロファイル解析により、不完全なリプログラミングを検出できる可能性が示唆された。

### 3. リプログラミング抵抗性遺伝子群の同定とゲノム不安定性、造腫瘍性

これまでの解析で用いたヒト ES 細胞 3 株、ヒト iPS 細胞 6 株（Retro-hiPSCs 4 株、Epi-hiPSCs 2 株）に加え、異なる線維芽細胞から樹立された Retro-hiPSCs 6 株（合計で 15 株）を用いて、これまでに取得したマイクロアレイ解析の結果を用いて、未分化状態におけるゲノム修復関連 17 遺伝子の発現プロファイル解析を行った。その結果、ほぼヒト ES 細胞と同様の遺伝子発現プロファイルを示す群（ヒト ES 細胞型: hESC type）、ほぼ線維芽細胞と同じ遺伝子発現プロファイルを示す群（線維芽細胞型: Fibroblast type）、その中間的な遺伝子発現プロファイルを示す群（中間型: Intermediate type）の 3 つのグループに分類されることが明らかになった（図 1A）。さらに、追加したヒト iPS 細胞から分化誘導した神経幹細胞の免疫不全マウス（NOD/SCID マウス）への移植実験の結果を再解析したところ、線維芽細胞型と中間型のヒト iPS 細胞については、何らかの造腫瘍性を示すことが明らかになった。また、神経幹細胞への分化誘導前後において CGH アレイによるゲノムコピー数解析を行うと、線維芽細胞型の多くのヒト iPS 細胞株が、また中間型の一部のヒト iPS 細胞株が、分化に伴うゲノム不安定性を示すことが確認され（図 1B）、17 遺伝子群がヒト iPS 細胞のリプログラミングの完全性を評価するための「Score Card」となり得る可能性が示唆された。

### 4. ヒト iPS 細胞由来奇形腫を用いた造腫瘍性解析

異なる分化誘導法や異なる組織における造腫瘍性との関連を検討するために、ヒト ES 細胞（KhES1）と Retro-hiPSCs 3 株（201B7、253G1、253G4）を、未分化状態で免疫不全マウス（NOD/SCID マウス）精巣へ移植して奇形腫を作製し、奇形腫内の様々な組織における造腫瘍性を検討した。その結果、造腫瘍性を示さなかった KhES1 と 201B7 は、奇形腫においても成熟した神経細胞、および軟骨細胞などへの分化が観察されたが、グリオーマ様腫瘍を形成した 253G1、253G4 から作製した奇形腫は、未熟奇形腫の組織像を呈し、また異常な形態を示す軟骨細胞や軟骨組織周囲に増殖性で未成熟な間葉系細胞の集簇が観察された。これらの結果から、不完全にリプログラミングされたヒト iPS 細胞株は、神経幹細胞への分化誘導のみならず、他の分化誘導法、および異なる組織への分化誘導においても造腫瘍性を示す可能性が示唆された。また、「Score Card」の 17 遺伝子を用いた評価により、様々な組織へ分化誘導した際の造腫瘍性も含めた、ヒト iPS 細胞の品質評価への応用が示唆された。

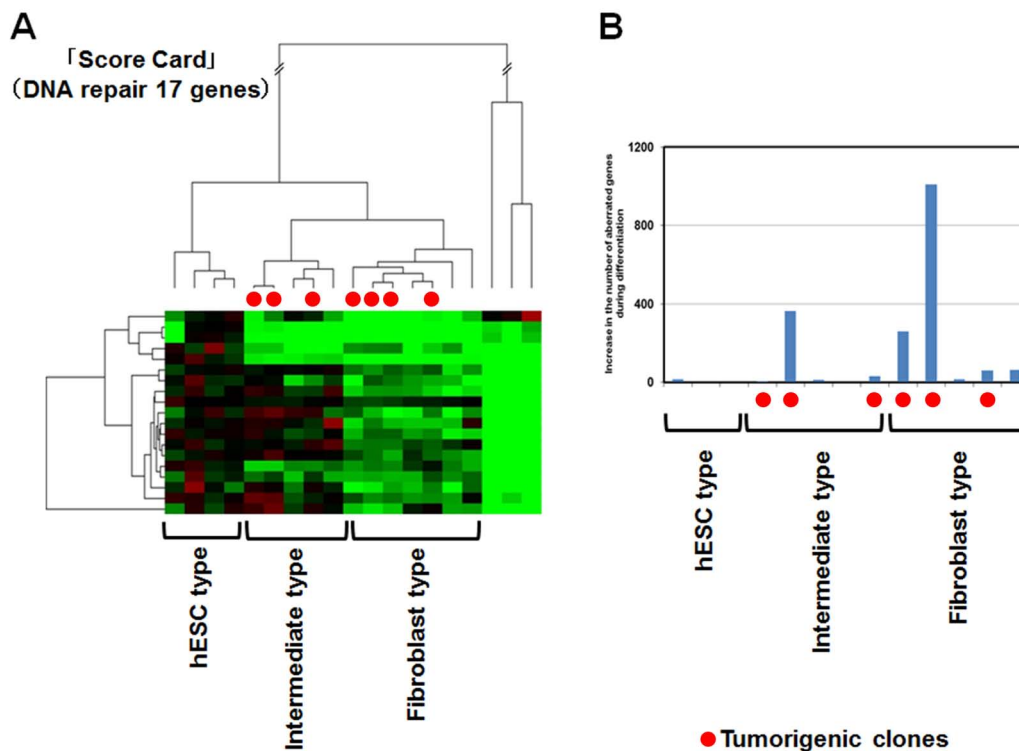


図1. 複数のヒト iPS 細胞株における DNA 修復 17 遺伝子の発現プロファイルと神経幹細胞への分化に伴うゲノム不安定性の変化

A) 複数のヒト iPS 細胞株の未分化状態での DNA 修復 17 遺伝子の発現プロファイル。ヒト ES 細胞型 (hESC type)、中間型 (Intermediate type)、線維芽細胞型 (Fibroblast type) に分けられる。中間型と線維芽細胞型のヒト iPS 細胞株のいくつかは、誘導した神経幹細胞の造腫瘍性を確認している。

B) A で解析に用いたヒト iPS 細胞株の神経幹細胞への分化に伴うゲノム不安定性の変化。中間型と線維芽細胞型の多くで分化に伴うゲノム不安定性の増加が観察された。

## 5. エピジェネティクスに基づくリプログラミングの不完全性の解析

ヒト iPS 細胞のリプログラミングの不完全性を、エピジェネティクスの観点から検討するために、ヒト ES 細胞 3 株 (KhES1、2、3)、およびヒト iPS 細胞 6 株 (Retro-hiPSC 4 株、Ep-iPSCs 2 株) を用いて DNA メチル化解析を進めている。まず、多能性幹細胞に特異的に発現する NANOG 遺伝子のプロモーターの DNA メチル化を Bisulfite sequence 法を用いて解析したところ、この 9 株において明らかなメチル化の違いは観察されなかった。そこで、Illumina Infinium の DNA メチル化アレイ (450k) による網羅的 DNA メチル化解析を行い、現在、各株の DNA メチル化プロファイルの違いについての検討を進めている。

## 考 察

複数のヒト iPS 細胞を用いた神経幹細胞への分化誘導と免疫不全マウスへの移植により、従来良質とされたヒト iPS 細胞であっても造腫瘍性を示しうることが明らかとなり、ヒト iPS 細胞の厳密な品質評価法の構築が重要であると考えられた。

複数のヒト多能性幹細胞の網羅的遺伝子発現解析から、造腫瘍性を示したヒト iPS 細胞株が、リプログラミング前の線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルを多く残しており、特にゲノム安定性の維持に関わる遺伝子群のリプログラミング状態が不完全であると考えられた。また、これらのヒト iPS 細胞株では、分化誘導に伴うゲノム不安定性が観察され、不完全にリプログラミングされたヒト iPS 細胞は、分化誘導に伴うゲノム不安定性を介して造腫瘍性を示す可能性が示された。また、ヒト ES 細胞特異的遺伝子群 (1,340 個)、DNA 修復関連遺伝子群に共通する約 60 個の遺伝子群の

発現プロファイルが、ヒト iPS 細胞由来神経幹細胞のグリオーマ様腫瘍形成能（造腫瘍性）をよく反映することが示された。特に DNA 修復関連 17 遺伝子は、造腫瘍性を示す株において有意に発現が低下していることが示され、リプログラミング抵抗性遺伝子群（Reprogramming recalcitrant genes）である可能性が示唆された。また、「Score Card」として、ヒト iPS 細胞の品質評価への応用が示唆された。

現在、さらに多くのヒト iPS 細胞による解析を進めており、17 遺伝子の発現プロファイルから、ヒト iPS 細胞が「ヒト ES 細胞型」「中間型」「線維芽細胞型」に分類されること、また様々な組織における造腫瘍性との関連も示唆されている。さらに詳細な DNA メチル化解析などから、ヒト iPS 細胞の不完全なリプログラミングとゲノム不安定性、造腫瘍性との関連についてより詳細に検討し、「Score Card」17 遺伝子の発現プロファイルによるヒト iPS 細胞の品質評価についての検証を進めていきたいと考えている。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学医学部生理学教室の岡野栄之、および理化学研究所の角田達彦、宮冬樹、山口大学大学院医学系研究科の池田栄二である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, Ikeda E, Yamanaka S, Miura K. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ Res.* 2013 112(3):523-33. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.256149. PubMed PMID:23371901
- 2) Okada Y, Matsumoto A, Shimazaki T, Enoki R, Koizumi A, Ishii S, Itoyama Y, Sobue G, Okano H. Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells.* 2008;26(12):3086-98. doi: 10.1634/stemcells.2008-0293. PubMed PMID: 18757299
- 3) Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol.* 2009;27(8):743-5. doi: 10.1038/nbt.1554. PubMed PMID: 19590502
- 4) Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H, Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama Y, Nakamura M, Okano H. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One.* 2009;4(11):e7706. doi:10.1371/journal.pone.0007706. PubMed PMID: 19893739
- 5) Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(28):12704-9. doi: 10.1073/pnas.0910106107. PubMed PMID: 20615974
- 6) Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(40):16825-30. doi:10.1073/pnas.1108077108. PubMed PMID: 21949375
- 7) Kobayashi Y, Okada Y, Itakura G, Iwai H, Nishimura S, Yasuda A, Nori S, Hikishima K, Konomi T, Fujiyoshi K, Tsuji O, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One.* 2012;7(12):e52787. doi: 10.1371/journal.pone.0052787. PubMed PMID: 23300777
- 8) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72. PubMed PMID: 18035408
- 9) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008 Jan;26(1):101-6. Epub 2007 Nov 30. PubMed PMID: 18059259
- 10) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods.* 2011;8(5):409-12. doi: 10.1038/nmeth.1591. PubMed PMID: 21460823