

# **iPS 細胞由来細胞の腫瘍化に関する研究**

**2013 年度**

**指導：坂口 卓也 教授**

**倉敷芸術科学大学大学院**

**産業科学技術研究科**

**機能物質化学専攻**

**西森 誠**

-目次-

要旨	4
第 1 章 序論	7
第 2 章 Nanog 発現を指標とした、iPS 細胞の分化誘導後に未分化細胞 が残存するか否かの検討	
2-1 研究の背景および目的	28
2-2 研究の方法	40
2-3 研究結果	44
2-4 考察	47
2-5 引用文献	50
第 3 章 iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞の造腫瘍能解析	
3-1 研究の背景および目的	57
3-2 研究の方法	60
3-3 研究結果	62
3-4 考察	78
3-5 引用文献	81

<b>第 4 章 iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞の形態学的解析</b>	
4-1 研究の背景および目的	87
4-2 研究の方法	89
4-3 研究結果	91
4-4 考察	100
4-5 引用文献	103
<b>第 5 章 結論</b>	<b>111</b>
<b>業績リスト</b>	<b>112</b>
<b>謝辞</b>	<b>115</b>

## 要旨

人工多能性幹 (iPS) 細胞は胚性幹 (ES) 細胞が抱えている倫理的問題および免疫拒絶の問題を克服した多能性幹細胞であり、再生医療への応用が期待されている。ところが iPS 細胞は目的とする細胞や組織へ分化誘導後に生体へ移植した場合において宿主に腫瘍を形成することが知られており、再生医療への応用の障壁となっている。この腫瘍化の原因は分化誘導後に残存する未分化細胞であることが示唆されている。本研究は iPS 細胞から分化誘導した後に残存する未分化細胞を検出することを目的としたものである。

第 1 章では、再生医療の現状について述べた。また、再生医療には幹細胞が役立つと考えられており、幹細胞の中でも特に iPS 細胞が注目されているため、iPS 細胞の成り立ちと、iPS 細胞を再生医療へ応用する際の問題について記述した。

第 2 章では、iPS 細胞を胚様体形成により分化誘導し、その後、未分化細胞が残存することを見出した結果について述べた。この研究は未分化細胞で特異的に発現している Nanog を未分化マーカーとする手法を用いて行った。未分化細胞で特異的に活性化する Nanog プロモーターによって緑色蛍光タンパク質である green fluorescent protein (GFP) を発現するマウス iPS 細胞株を用いた。iPS 細胞の分化誘導後に蛍光顕微鏡を用いて GFP 発現を指標に未分化細胞の有無を観察し

たところ、胚様体中に未分化細胞の混在を認めた。次に、これらの未分化細胞が GFP 発現を維持するか否か検討したところ、中には長期間 GFP 発現を維持するものが認められた。

第 3 章では、iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞の造腫瘍能を検討した結果について述べた。iPS 細胞を胚様体形成によって分化誘導し、未分化細胞が残存している胚様体と分化細胞のみで構成される胚様体を免疫不全マウスであるヌードマウスの皮下へ移植し、造腫瘍能を検討した。その結果、未分化細胞が残存している胚様体は悪性腫瘍に分類されている未熟奇形腫 Grade 3 を形成したが、分化細胞のみで構成される胚様体は腫瘍を形成しなかった。この結果から、iPS 細胞に由来する細胞の腫瘍化の原因は Nanog を発現する未分化細胞であることが判明した。

第 4 章では、iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞を形態学的に解析した結果について述べた。胚様体を酵素処理で個々の細胞に分散後、細胞分取機能を有するフローサイトメーター (FACS) を用いて GFP 発現を指標に未分化細胞と分化細胞を分取し、パパニコロウ染色後の標本の画像を画像解析ソフトである ImageJ を用いて核面積、細胞面積、核細胞質比について測定した。その結果、胚様体中の未分化細胞は分化細胞に比し小型で核細胞質比の高い細胞であることが明らかとなった。また、マウス iPS 細胞の場合においては、未分化細胞は

GFP 発現により分化細胞と区別できるが、ヒト iPS 細胞の場合は倫理的に遺伝子操作が不可能であるため Nanog-GFP に依存した鑑別は困難である。本研究の結果から、移植の際に細胞面積と核細胞質比を指標にすることで iPS 細胞の分化誘導体から腫瘍を形成する細胞を検出可能であることが示唆された。

本研究によって得られた成果が iPS 細胞に由来する細胞の移植後の腫瘍化を防ぐことに大きく貢献し、iPS 細胞の再生医療への応用を促進することが期待される。

## 第 1 章

### 序論

現在、内科的・外科的治療での治癒が困難な疾病を患った場合、臓器移植を余儀なくされる場合がある。ところが臓器移植においてはドナーが不足していることから、移植に必要な臓器を確保することが困難となっている。そのため、細胞移植療法などの再生医療が注目されている。再生医療とは失われた身体の細胞、組織、器官の再生や機能回復を目的とする医療である<sup>1)</sup>。

生物には体の損傷を修復する能力がある。特に顕著な例では、イモリの足を切り取った場合、あるいは目を剝り抜いた場合においても再生し元通りに機能する<sup>2,3)</sup>。さらに驚いたことに、淡水、海水および湿気の高い陸上に生息するプラナリアはバラバラに切断した場合においてもそれぞれが再生し個体になる<sup>4-6)</sup>。ところが、ヒトにおける再生可能な部位は皮膚など限られた組織のみである。

現在行われている再生医療の 1 つに患者の表皮細胞をシート状に培養し、自家培養皮膚を移植することで治療する方法がある<sup>7)</sup>。自家培養皮膚の利点としては、広範囲の火傷であっても皮膚が残っていればそこから表皮細胞を取り、培養し増殖させてから移植が可能なことである。他には自家培養軟骨を移植する方法がある<sup>8)</sup>。軟骨組織には血管がないため、損傷を受けてもそれを修復する細胞を増やすための栄養

が供給されない。そのため軟骨組織は一度損傷を受けると自然には再生しない。ところが、軟骨細胞には増殖する能力があるため、患者から軟骨組織の一部を取り出し、培養し増殖させてから移植することが可能である。

他には幹細胞を用いる方法がある。幹細胞とは他の細胞へ分化できる能力（分化能）と細胞分裂を経てもその能力を維持できる能力（自己複製能）を併せ持つ細胞と定義されている<sup>9)</sup>。一般的に細胞は細胞分裂で DNA 複製が行われる度にテロメアが短縮していくため分裂回数に限界があるが、幹細胞はテロメラーゼ活性を有しており無制限に増殖することが可能であると考えられており<sup>10)</sup>、成体においては成体幹細胞がある<sup>5)</sup>。成体幹細胞は体性幹細胞や組織幹細胞とも呼ばれ、胚発生後の身体の至る所に見られる未分化な細胞であり、死んだ細胞を補充するために細胞分裂によって増殖し、損傷した組織を再生する<sup>11,12)</sup>。成体幹細胞にはいくつかの種類が確認されており、その種類に応じて限られた種類の細胞を生み出す。例えば、骨髄にある造血幹細胞は赤血球、白血球などの複数の種類の細胞へ分化する。他には神経細胞や神経膠細胞へ分化する神経幹細胞などが確認されている。成体幹細胞の再生医療への応用例として骨髄移植（造血幹細胞移植）があり、白血病や再生不良性貧血などの血液難病の患者に対する有効な治療法として用いられている<sup>13)</sup>。このように再生医療は従来の方法では治癒で



きないといわれてきた状態から回復することが期待される。ところがこれらの細胞は生体外で維持することが難しい、分裂回数に限界がある、一度に採取できる量が限られているなどの問題がある。

また、幹細胞には悪性奇形腫由来の幹細胞（胚性癌腫細胞：EC細胞）も存在する<sup>14)</sup>。EC細胞は悪性奇形腫に存在する幹細胞にて樹立された細胞で、多能性と無限増殖能を有し、再生医療へ役立つと考えられていた。いくつかのマウス系統では精巣や卵巣に悪性奇形腫を自然発生することが見出され、この腫瘍細胞を培養することによって、様々な種類の細胞に分化するEC細胞株が樹立された<sup>15)</sup>。その後、マウス初期胚を精巣などに移植することにより、マウスの種々の系統で奇形腫の形成を誘導できることが明らかになった。

これらのEC細胞株はいったん悪性奇形腫としての段階を通過した後、樹立された細胞株であるので、どの程度の多能性を有するかなどの性質は各々の細胞株によって異なる。EC細胞株のなかで比較的多能性を保持している細胞にはキメラ形成能を持つものがあるが、生殖系列キメラをつくる能力を維持した細胞株は少ない<sup>16,17)</sup>。これは腫瘍組織由来のEC細胞では染色体数や遺伝子発現の異常が高頻度に存在するため、正常細胞に分化し難いのであろうということで研究者の見解は一致した。

1981年、体を構成するあらゆる細胞へ分化可能な能力（多能性）を有する正常核型の幹細胞が胚盤胞から直接樹立され、胚性幹（ES）細胞と名付けられた<sup>18)</sup>。組織幹細胞に対してES細胞は多能性を維持している間に無制限に増殖する能力を有するため、再生医療への応用が期待されている<sup>19)</sup>。ところがES細胞は細胞株樹立時に生命の萌芽である胚を破壊しなければならない（Fig. 1）。そのため、ES細胞の樹立には倫理的問題が伴う。そして、移植において移植片と患者のヒト白血球抗原（HLA）が適合していない場合、拒絶反応が起こる。HLAは6番染色体短腕上にあるDNAによって決定されるタンパク質で、核を持った細胞の表面上に存在する。HLAの中でも、拒絶反応に関わるものはHLA-A、HLA-B、HLA-DRの3種類である。ヒトはHLAの存在する6番染色体を両親から1つずつ受け継ぐことから、これらの臓器移植で重要なHLAを各々2つずつ、計6つ持っている。さらに、これらのHLAにはサブタイプが存在しており、多様な組み合わせがあることから、家族でも異なる場合がある（Fig. 2）。従って、臓器移植を行う場合には、最大6つのHLAの型を一致させる必要があり、ES細胞は患者自身の細胞ではないため、免疫拒絶が起こる可能性がある。

かつては、一旦分化した細胞は受精卵が持つ遺伝情報の多くを失い、多能性を有する状態には戻れないとの説が有力であった。ところが、1962年にオタマジヤクシの除核した卵に腸の細胞の核を移植すると、

クローンのオタマジヤクシが誕生することが **John Bertrand Gurdon** によって発見された。この研究によって、分化した後の細胞においても全ての遺伝子を持ち続けていることが証明された<sup>20,21)</sup>。この理論を応用し、1996年に **Ian Wilmut** らは羊の乳腺細胞と除核した未受精卵とを細胞融合することで核移植し、クローン羊のドリーを生み出した<sup>22)</sup>。このことから、哺乳類においても除核した受精卵によって分化細胞の核を初期化可能であることが明らかとなった。この分化した体細胞の核を多能性を有する発生初期の細胞へ初期化することをリプログラミングという。オタマジヤクシもドリーも卵を使用してクローンを作製したため、卵に体細胞の核を初期化する能力があると考えられたが、詳しい仕組みは不明である。初期化の研究をする場合、卵を多数採取しなければならぬため実験を行うことが困難であった。数年後、無制限に増殖可能な **ES** 細胞と細胞融合することでも体細胞の核を初期化可能であることが発見された<sup>23,24)</sup>。この発見により、初期化の研究は促進された。また、**MyoD** という 1 つの遺伝子を強制発現させることで線維芽細胞が筋細胞へ変換することが発見された<sup>25)</sup>。これは 1 つの遺伝子で細胞の運命が変えられることを示唆しており、京都大学の山中教授らのグループは同様に遺伝子を操作することで体細胞の核の初期化も可能になると考察した。そして、2006年に4種類の転写因子 (**Oct3/4**、**Sox2**、**Klf4**、**c-Myc**) を導入することによりマウスの体細

胞から直接 ES 細胞様の細胞株を樹立する技術が開発された (Fig. 3)<sup>26)</sup>。このようにして造られた細胞を人工多能性幹 (iPS) 細胞という。2007 年にマウスで導入されたものと同様の転写因子を組み合わせてヒトの体細胞からも iPS 細胞を樹立できることが明らかとなった<sup>20)</sup>。iPS 細胞は細胞株樹立時に胚を破壊することなく、患者自身の細胞から作製できるため ES 細胞が抱えている倫理的問題および免疫拒絶の問題を克服している<sup>27)</sup>。

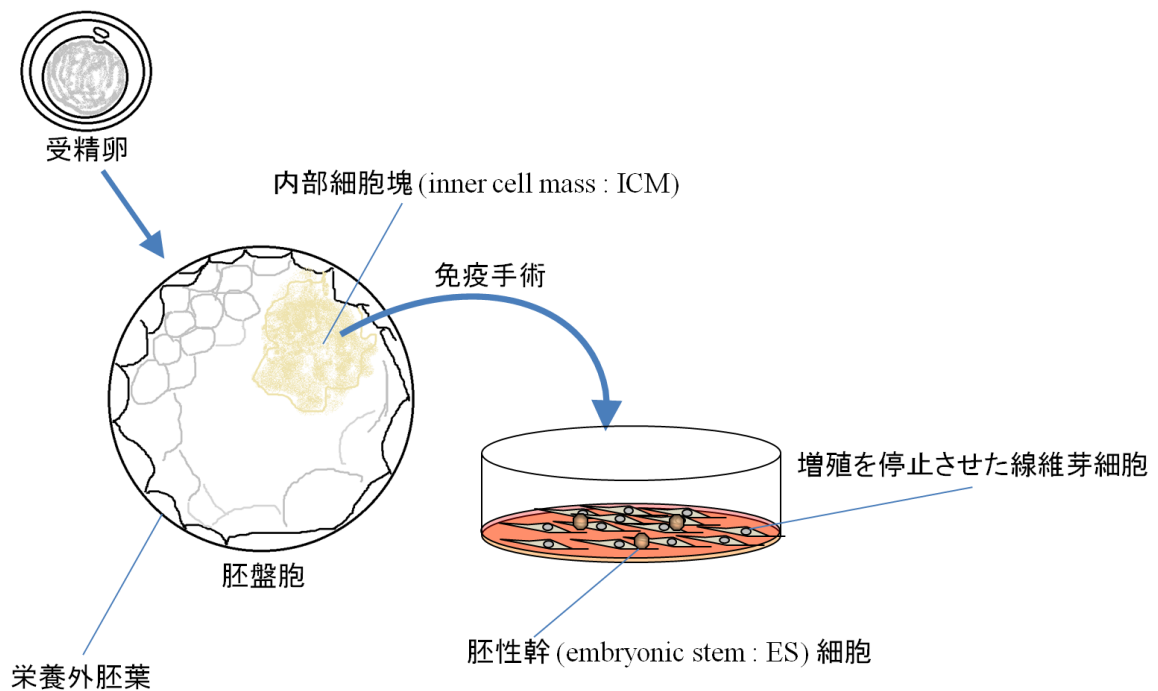
iPS 細胞は病態解明、薬剤の副作用評価、新薬の探索や開発、そして、細胞移植治療などの再生医療に活用できると考えられている。例えば、難治性疾患の患者の体細胞から iPS 細胞を作り、それを神経、心筋、肝臓、膵臓などの患部の細胞に分化させ、その細胞の状態や機能がどのように変化するかを研究することで、今まで明らかにされていなかった病気の原因が解明できる可能性がある。さらに、その細胞を利用すれば、薬剤の有効性や副作用を評価する検査や毒性のテストが可能になり、新しい薬の開発が大いに進むと期待されている。

現在までに、遺伝性の重症型脊髄性筋萎縮症、パーキンソン病、ファンコニー貧血、 $\beta$ -サラセミア、家族性自律神経失調症、1型糖尿病などの様々な疾患の患者の細胞から iPS 細胞株が樹立できることが報告されている<sup>28-40)</sup>。また、iPS 細胞は細胞移植療法における魅力的な細胞源であり、滲出型加齢黄斑変性、脊髄損傷、心筋梗塞、肝不全、糖

尿病などの様々な疾患を治療するために網膜色素上皮、神経幹細胞、心筋細胞、肝細胞、膵島細胞などに分化誘導し、移植して治療する研究が動物に対して行われている<sup>41-46)</sup>。増殖させたヒト iPS 細胞から体外で目的とする細胞を作製し、患部へ移植する細胞移植療法を開発することは移植用臓器の不足を解決する手段となる可能性がある (Fig. 4)<sup>47)</sup>。ところが、目的とする細胞への分化効率が低く、移植後の腫瘍形成などの安全性に問題が残るために、臨床応用の手前で足踏みしている<sup>48)</sup>。

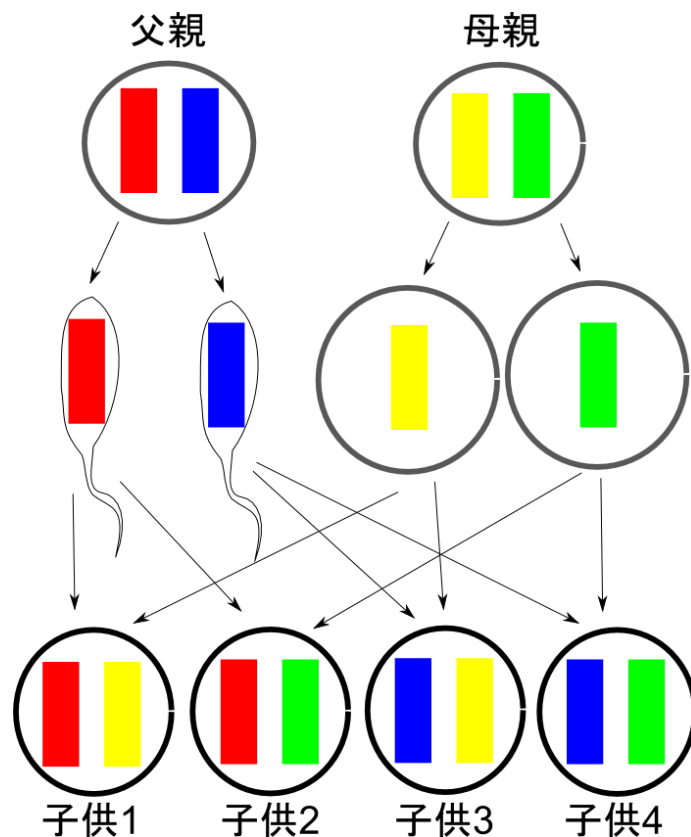
ヒト細胞を異種成分にさらすことは、病原体の感染や移植細胞の免疫拒絶といったリスクを増大させるため、異種成分を含まない培養試薬を使用する方法、ヒトの線維芽細胞からそれ自身をフィーダー細胞として用いてヒト iPS 細胞を樹立する方法、フィーダー細胞無しで樹立する方法などが開発されてきており、移植時における安全性が向上してきている<sup>49-52)</sup>。

iPS 細胞に由来する細胞の移植後に腫瘍化する問題は解決していない。iPS 細胞を臨床に応用するためには移植後の腫瘍化を防がなければならない。本研究は iPS 細胞に由来する細胞の移植後の腫瘍化を防ぐことを目的としたものである。



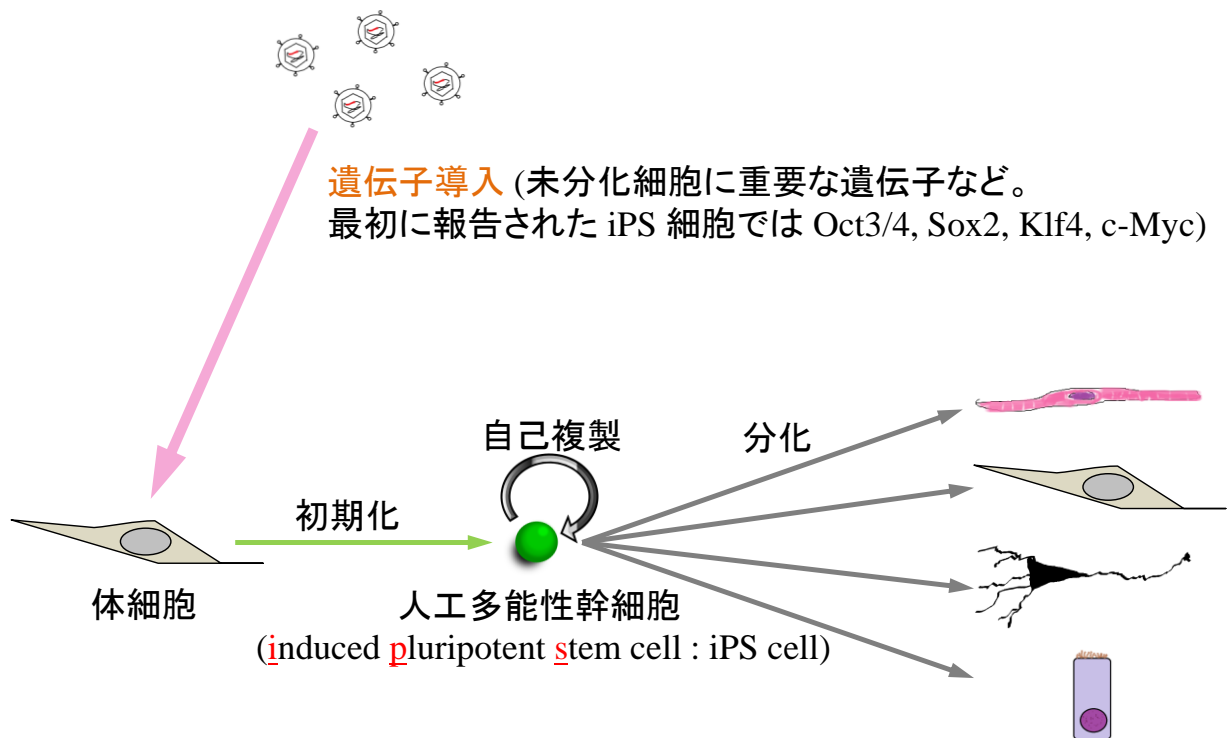
**Fig. 1 ES 細胞株の樹立**

ES 細胞株は受精卵が成熟した胚盤胞の中にある内部細胞塊から樹立される。胚盤胞をそのまま線維芽細胞上で培養すると栄養外胚葉の細胞が混入し未分化維持を困難にする。そのため内部細胞塊の分離には抗血清および補体を用いた免疫手術のような方法が必要となる。そして、取り出した内部細胞塊を増殖を停止させた線維芽細胞上で培養することで ES 細胞が樹立できる。



**Fig. 2 HLA (ヒト白血球抗原) と拒絶反応**

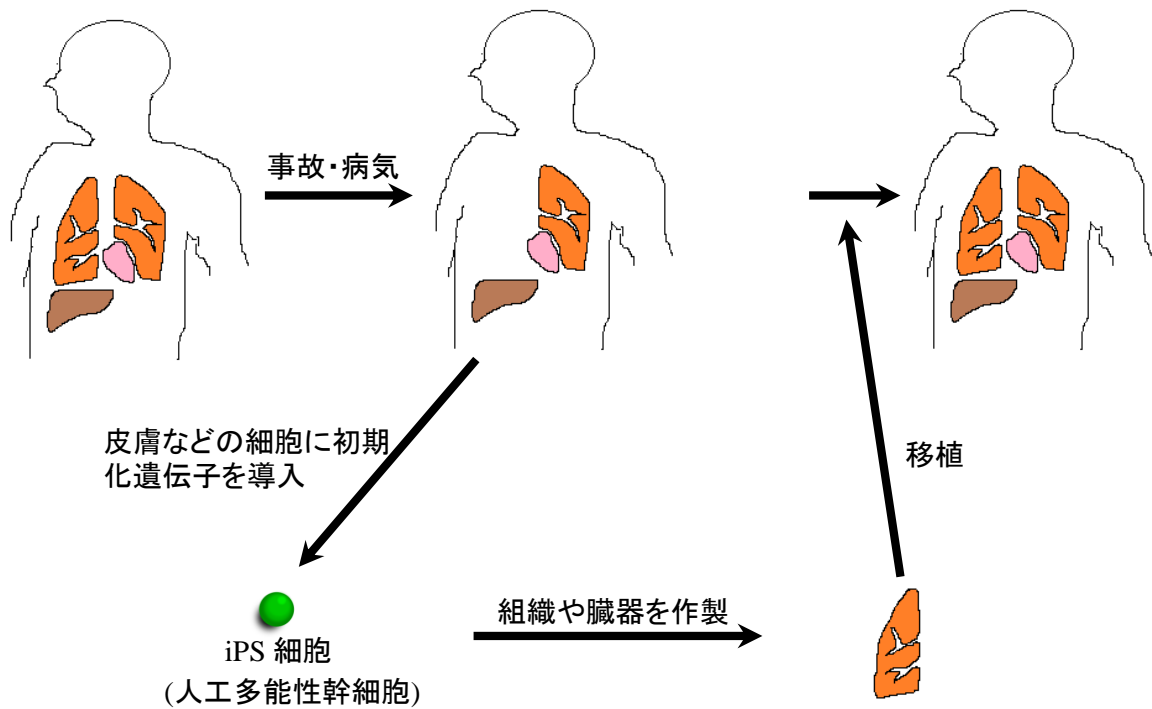
臓器移植において重要なのは HLA の型を一致させることである。この図では HLA の型を色で表している。2 段目は生殖細胞を表しており、減数分裂により対立遺伝子の片方のみを保持する。HLA の型は非常に多様であり、兄弟でも異なる場合がある。HLA は共優性で発現するため、移植の際に HLA の型を一致させないと拒絶反応が起こる可能性がある。



**Fig. 3 iPS 細胞の作製**

体細胞に初期化因子を導入すると、初期化が起こり未分化細胞に変化する。このようにして作製された細胞は iPS 細胞と呼ばれる。iPS 細胞は自己複製や体を構成するあらゆる細胞へ分化可能である。





**Fig. 4 再生医療における iPS 細胞の臓器再生への適応例**

再生しない臓器が事故や病気によって損傷を受けたとしても、皮膚などの細胞からあらゆる細胞へ分化できる iPS 細胞を作製し、分化誘導後に移植することで治癒できる可能性がある。

## 引用文献

1. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 3: 1-5, 2008.
2. Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH, Tanaka EM. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460: 60-65, 2009.
3. Eguchi G, Eguchi Y, Nakamura K, Yadav MC, Millán JL, Tsonis PA. Regenerative capacity in newts is not altered by repeated regeneration and ageing. *Nat Commun* 2: 384, 2011.
4. Shibata N, Rouhana L, Agata K. Cellular and molecular dissection of pluripotent adult somatic stem cells in planarians. *Dev Growth Differ* 52: 27-41, 2010.
5. Wagner DE, Wang IE, Reddien PW. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332: 811-816, 2011.
6. Tasaki J, Shibata N, Nishimura O, Itomi K, Tabata Y, Son F, Suzuki N, Araki R, Abe M, Agata K, Umesono Y. ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* 138: 2417-2427, 2011.

7. Hasegawa T, Suga Y, Mizoguchi M, Muramatsu S, Mizuno Y, Ogawa H, Kubo K, Kuroyanagi Y. An allogeneic cultured dermal substitute suitable for treating intractable skin ulcers and large skin defects prior to autologous skin grafting: three case reports. *J Dermatol* 32: 715-720, 2005.
8. Fujita N, Matsumoto T, Kubo S, Matsushita T, Ishida K, Hoshino Y, Nishimoto K, Kurosaka M, Kuroda R. Autogenous osteochondral graft transplantation for steroid-induced osteonecrosis of the femoral condyle: A report of three young patients. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* 4: 13, 2012.
9. Brecher G, Bookstein N, Redfearn W, Necas E, Pallavicini MG, Cronkite EP. Self-renewal of the long-term repopulating stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6028-6031, 1993.
10. Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases. *FEBS J* 280: 3180-3193, 2013.
11. Esmailpour T, Huang T. Advancement in Mammary Stem Cell Research. *J. Cancer Mol* 4: 131-138, 2008.
12. Abburi C, Anand A. Ciliary epithelium: an underevaluated target for therapeutic regeneration. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22: 87-95, 2012.

13. Chung SJ, Park SW, Kim MK, Kang MJ, Lee YA, Lee SY, Shin CH, Yang SW, Kang HJ, Park KD, Shin HY, Ahn HS. Growth after hematopoietic stem cell transplantation in children with acute myeloid leukemia. *J Korean Med Sci* 28: 106-113, 2013.
14. Evans MJ. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol* 28: 163-176, 1972.
15. Kahan BW, Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst* 44: 1015-1036, 1970.
16. Papaioannou VE, Gardner RL, McBurney MW, Babinet C, Evans MJ. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol* 44: 93-104, 1978.
17. Illmensee K, Mintz B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 549-553, 1976.
18. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.

19. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
20. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10: 622-640, 1962.
21. Vajta G, Gjerris M. Science and technology of farm animal cloning: state of the art. *Anim Reprod Sci* 92: 211-230, 2006.
22. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813, 1997.
23. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309: 1369-1373, 2005.
24. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11: 1553-1558, 2001.
25. Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve,

- fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5434-5438, 1989.
26. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
  27. 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* 131: 861-872, 2007.
  28. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457: 277-280, 2009.
  29. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136: 964-977, 2009.
  30. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, Consiglio A, Castellà M, Río P, Sleep E, González F, Tiscornia G, Garreta E, Aasen T, Veiga A, Verma IM, Surrallés J, Bueren J, Izpisua Belmonte JC. Disease-corrected haematopoietic

- progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460: 53-59, 2009.
31. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9826-9830, 2009.
  32. Wang Y, Jiang Y, Liu S, Sun X, Gao S. Generation of induced pluripotent stem cells from human beta-thalassemia fibroblast cells. *Cell Res* 19: 1120-1123, 2009.
  33. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, Ganat YM, Menon J, Shimizu F, Viale A, Tabar V, Sadelain M, Studer L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461: 402-406, 2009.
  34. Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 15768-15773, 2009.
  35. Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowey S, Williams DM, Jang YY, Dang CV, Spivak JL, Moliterno AR, Cheng L. Human-induced pluripotent stem

- cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114: 5473-5480, 2009.
36. Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M, Osaki M, Kajitani N, Hoshiya H, Hiramatsu K, Yoshino T, Kazuki K, Ishihara C, Takehara S, Higaki K, Nakagawa M, Takahashi K, Yamanaka S, Oshimura M. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 18: 386-393, 2010.
  37. Agarwal S, Loh YH, McLoughlin EM, Huang J, Park IH, Miller JD, Huo H, Okuka M, Dos Reis RM, Loewer S, Ng HH, Keefe DL, Goldman FD, Klingelhutz AJ, Liu L, Daley GQ. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* 464: 292-296, 2010.
  38. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, Yang L, Kaplan AD, Adler ED, Rozov R, Ge Y, Cohen N, Edelman LJ, Chang B, Waghray A, Su J, Pardo S, Lichtenbelt KD, Tartaglia M, Gelb BD, Lemischka IR. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465: 808-812, 2010.
  39. Moretti A, Bellin M, Welling A, Jung CB, Lam JT, Bott-Flügel L, Dorn T, Goedel A, Höhnke C, Hofmann F, Seyfarth M, Sinnecker D,



- Schömiig A, Laugwitz KL. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363: 1397-1409, 2010.
40. Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, Ying L, Sommer AG, Jean JM, Smith BW, Lafyatis R, Demierre MF, Weiss DJ, French DL, Gadue P, Murphy GJ, Mostoslavsky G, Kotton DN. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28: 1728-1740, 2010.
41. Jin ZB, Okamoto S, Mandai M, Takahashi M. Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J Genet* 88: 417-424, 2009.
42. 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* 26: 3086-3098, 2008.
43. 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 USA* 107: 12704-12709, 2010.
44. Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J* 34: 1147-1156, 2013.
45. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499: 481-484, 2013.
46. Yanai G, Hayashi T, Zhi Q, Yang KC, Shirouzu Y, Shimabukuro T, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Electrofusion of mesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy: a rat model. *PLoS One* 8: e64499, 2013.
47. Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 26: 739-740, 2008.
48. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S,

- Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12: 127-137, 2013.
49. Rodríguez-Pizà I, Richaud-Patin Y, Vassena R, González F, Barrero MJ, Veiga A, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Stem Cells* 28: 36-44, 2010.
50. Takahashi K, Narita M, Yokura M, Ichisaka T, Yamanaka S. Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *PLoS One* 4: e8067, 2009.
51. Ross PJ, Suhr ST, Rodriguez RM, Chang EA, Wang K, Siripattarapivat K, Ko T, Cibelli JB. Human-induced pluripotent stem cells produced under xeno-free conditions. *Stem Cells Dev* 19: 1221-1229, 2010.
52. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One* 5: e14099, 2010.

## 第 2 章

### Nanog 発現を指標とした、iPS 細胞の分化誘導後に未分化細胞が残存するか否かの検討

#### 2-1 研究の背景および目的

再生医療は、失われた身体の細胞・組織・器官の再生さらには機能回復を目的とする治療法である。現状では臓器や組織の機能が損なわれた疾患では臓器移植や人工臓器に頼らざるを得ない。ところが、臓器移植に関しては拒絶反応の問題や、それを抑えるための免疫抑制剤による副作用の医学的問題と、深刻なドナー不足という社会的問題がある。人工臓器に関しては生体適合性等の問題を抱えている。これらの重大な諸問題を解決するためにも、再生医療の果たす役割に対して大きな期待が寄せられている。再生医療には幹細胞が役に立つと考えられる。

幹細胞の中でも特に胚性幹 (ES) 細胞や iPS 細胞は自己複製能と身体を構成する 3 胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) に属する細胞系列全ての細胞に分化可能であるため、再生医療への応用が期待されている<sup>1,2)</sup>。しかし、ES 細胞には細胞株を樹立する際に生命萌芽である受精卵を破壊するという倫理的な問題、および移植に伴う拒絶反応の問題がある。他方、人工多能性幹 (iPS) 細胞は体細胞に 4 種類の初期化因子

(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入することで作製できる<sup>3,4)</sup>。患者自身の体細胞から作製することが可能であるため、ES 細胞における拒絶反応や倫理的な問題を克服している。さらに、iPS 細胞は ES 細胞と同等の自己複製能と多能性を有している。

マウス ES 細胞やマウス iPS 細胞は白血病阻害因子 (LIF) の存在下で Nanog などの多能性に関連する遺伝子が活性化し、未分化状態を維持し増殖することが可能である (Fig. 1)<sup>5)</sup>。また、マウス胎仔線維芽細胞はマウス ES 細胞やマウス iPS 細胞の多能性を維持する作用がある LIF などのタンパク質を培地中に分泌する<sup>6)</sup>。そのため、マウス胎仔線維芽細胞をフィーダー細胞として用い、マウス iPS 細胞と共培養することで未分化状態を維持させる方法がよく用いられている<sup>7)</sup>。マウス胎仔線維芽細胞はマイトマイシン C で処理することにより細胞分裂を停止状態で生存させることが可能である。マウス iPS 細胞を LIF の非存在下で浮遊培養した場合、iPS 細胞は凝集し、胚様体と呼ばれる胚盤胞に似た構造を形成し、外胚葉、中胚葉、内胚葉の 3 胚葉全ての細胞に分化する (Fig. 2)<sup>3,4)</sup>。

iPS 細胞を再生医療へ応用する際の問題点として腫瘍化しやすいことが挙げられるが、iPS 細胞に由来する腫瘍には大きく分けて 2 種類ある。1 つはキメラマウスの子孫に形成される腫瘍で、他方は移植後に形成される腫瘍である。iPS 細胞を作製した場合、性質が ES 細胞

に類似した細胞の他に、集塊の形態が ES 細胞の集塊と異なるものや、未分化マーカーを発現しないもの、あるいは 3 胚葉へ分化する能力を持たないものなど性質が異なる様々な細胞が出現する。そのため、作製された iPS 細胞の質を評価する必要がある、いくつかの方法が確認されている (Table. 1)<sup>8,9)</sup>。iPS 細胞の質を評価する方法の 1 つに iPS 細胞を胚盤胞の胞胚腔に移し、キメラマウスを作製するという方法がある。さらに、生殖系列へ分化した方がより多能性を有していると考えられているため、キメラマウスを交配させて iPS 細胞に由来する精子から子孫が生まれるかを評価することがある (Fig. 3)。

2007 年に、レトロウイルスベクターで 4 種類の転写因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を導入して造られた iPS 細胞に由来するキメラマウスの子孫の首に悪性腫瘍が形成されたという報告がある<sup>10)</sup>。レトロウイルスベクターで導入した場合、導入遺伝子は染色体に組み込まれ、細胞分裂後にも残存する<sup>11)</sup>。染色体に組み込まれた導入遺伝子は発現を持続するが、導入された細胞が ES 細胞様に変化すると導入遺伝子の発現は抑制される (Fig. 4)。ところが、キメラマウスの子孫に形成された悪性腫瘍を解析したところ、レトロウイルスベクターで導入された外来性の c-Myc が再活性化していた。このことから、キメラマウスの子孫の首に悪性腫瘍が形成された原因はレトロウイルスベクターによって導入された外来性の c-Myc の再活性化であることが明らかとな

った<sup>10)</sup>。従って、*c-Myc* を導入しない、あるいは *c-Myc* を導入した際に染色体に挿入させない作製法の開発が望まれた。

その後、4 因子と比べ *iPS* 細胞の樹立効率が低いものの、*c-Myc* を除く 3 因子 (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*) を用いて *iPS* 細胞を誘導することに成功した<sup>12)</sup>。この 3 因子で作製された *iPS* 細胞に由来するキメラマウスでは、腫瘍の形成により死亡したマウスは報告されていない。ところが、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合、染色体上に遺伝子を挿入するため、レトロウイルスの *long terminal repeat (LTR)* の強力なプロモーター活性により近傍にある癌遺伝子が活性化する恐れがある。腫瘍形成に外来性遺伝子の挿入が癌化に関与するか否かは、*iPS* 細胞で明らかな報告はないが、重症免疫不全症に対する遺伝子治療において *moloney murine leukemia virus (MMLV)* を骨格としたレトロウイルスベクターが癌遺伝子である *LMO2* などの遺伝子近傍に組み込まれ、白血病を生じたという報告がある<sup>13)</sup>。これは *iPS* 細胞においても理論上起こり得るため、導入遺伝子が染色体に挿入される数を減らすことを目的として、少ない導入遺伝子の組み合わせ (*Oct3/4* と *Klf4* の 2 因子、*Oct3/4* と *c-Myc* の 2 因子、または *Oct3/4* 単体) で *iPS* 細胞を樹立する方法が研究されてきた<sup>14-17)</sup>。

その後、染色体上に遺伝子を挿入せず、一時的な遺伝子発現誘導が可能なアデノウイルスを用いて *iPS* 細胞を樹立したという報告があり、

上記の問題は克服された<sup>18)</sup>。続いて、プラスミドベクターやセンダイウイルスベクターなどの導入遺伝子が染色体に挿入され難いベクターを用いた安全性の高い iPS 細胞の作製法が相次いで報告された<sup>19-22)</sup>。これらの方法を用いることによりキメラマウスの子孫の腫瘍化の問題は回避できる。

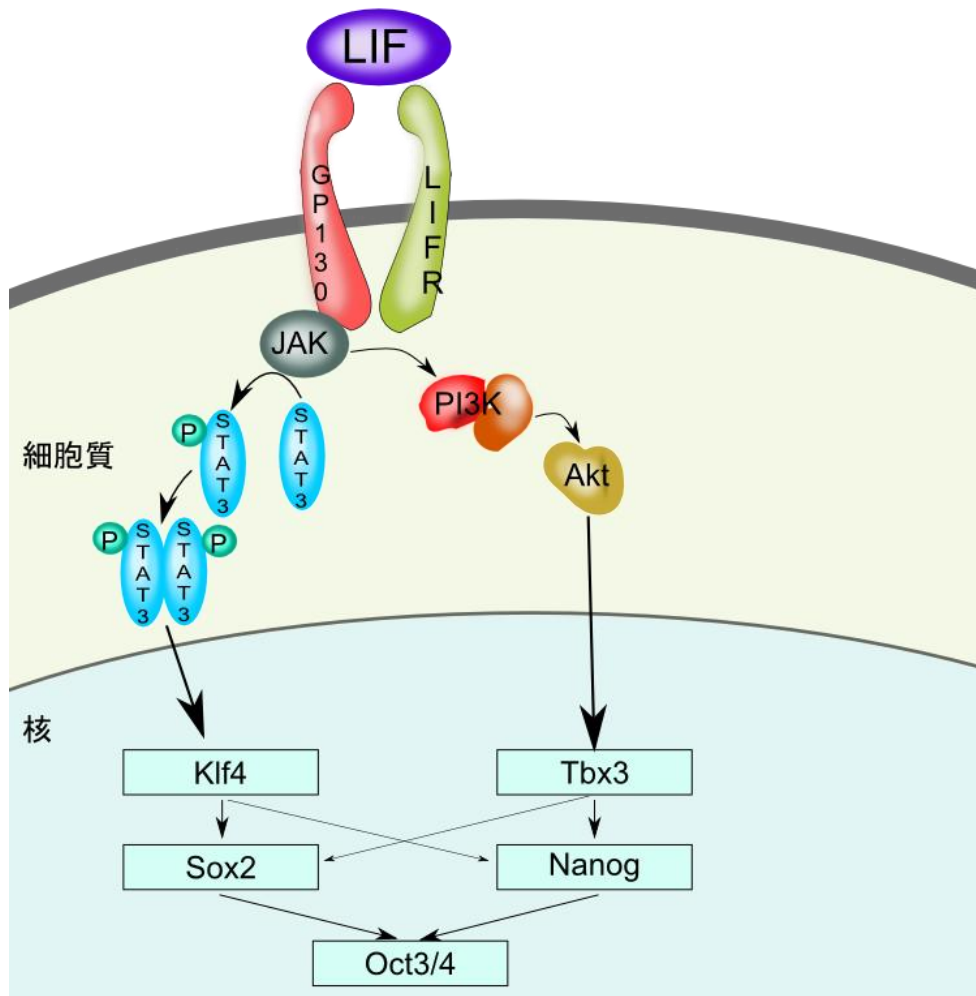
一方、iPS 細胞に由来する細胞の移植後に生じる腫瘍化の問題は未だ解決していない。iPS 細胞を未分化状態のまま生体に移植すると腫瘍を形成するため、分化誘導により iPS 細胞を目的とする細胞（例えば神経細胞、筋細胞、肝細胞）へ分化させた後に臨床応用する方法が考えられている。しかし、iPS 細胞を分化誘導して得られた細胞においても移植後の腫瘍形成が報告されている<sup>23)</sup>。形成される腫瘍が iPS 細胞が形成するものと同じ奇形腫であることから、その原因は分化誘導後の細胞集塊中に残存する未分化細胞であると考えられている<sup>24-28)</sup>。

Nanog は未分化な細胞に特異的に発現する遺伝子であり、Nanog の恒常的発現は ES 細胞の未分化状態を維持する<sup>29,30)</sup>。ある遺伝子が発現しているか否かを容易に判別するために、その遺伝子に蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子を組み込む方法がある。レポーター遺伝子として広く普及しているものに green fluorescent protein (GFP) がある。GFP はリアルタイムかつ細胞破壊の必要がなく検出でき、他のタンパク質との融合タンパク質としても機能することから、特に細胞内



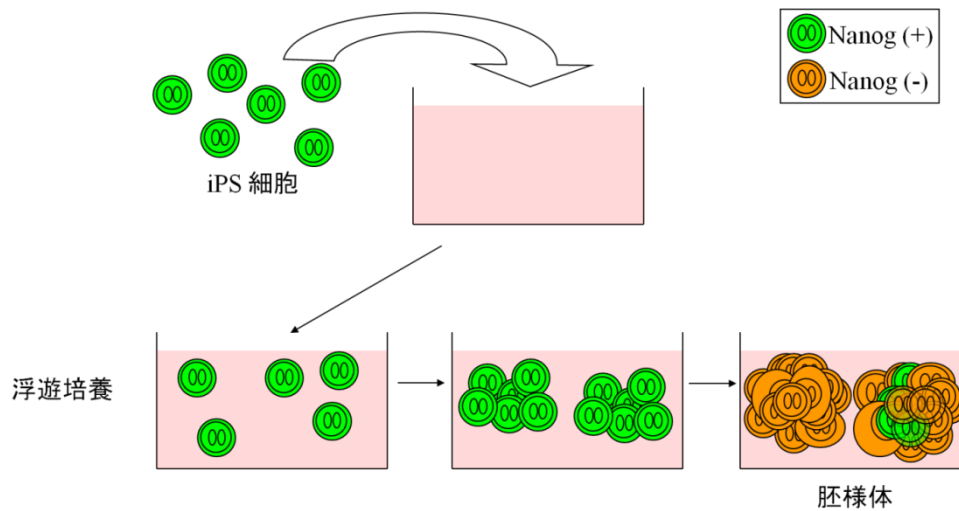
のシグナル伝達などに関与するタンパク質の細胞内局在を明らかにする手段としても有用である。GFP は青色の光で励起され、緑色の蛍光を放つ。2007 年に京都大学の山中教授らのグループは未分化細胞に特異的に活性化されている Nanog プロモーターで GFP の転写を開始するように遺伝子改変したマウスの胎仔に由来する線維芽細胞から iPS 細胞株を樹立した<sup>10)</sup>。分化した細胞は Nanog を発現しないため、GFP を発現しないが、初期化されて ES 細胞様 (iPS 細胞) になると Nanog を発現するため GFP を発現する。Nanog の発現を指標に樹立された iPS 細胞株は ES 細胞株と性質が似ている。また、この iPS 細胞株は分化すると Nanog を発現しなくなり GFP 蛍光を消失する (Fig. 5)。

iPS 細胞に由来する腫瘍化の原因と考えられる未分化細胞が存在するか否かを確認するため、Nanog プロモーターにて GFP を発現するマウス iPS 細胞株を用い、胚様体形成による分化誘導後に Nanog を発現する未分化細胞が残存するか否かを検討した。



**Fig. 1 LIF によるマウス iPS 細胞の多能性を維持するシグナル伝達経路**

LIF にはマウス iPS 細胞の未分化状態を維持する役割がある。それは LIF 投与により Jak-Stat 経路、PI3 キナーゼ-Akt 経路が活性化され、Nanog などの多能性維持に関連する遺伝子が発現することに基づく。

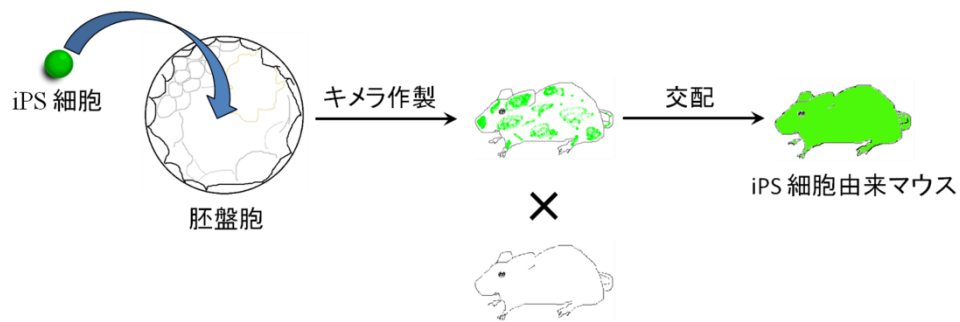


**Fig. 2 胚様体形成法による分化誘導法**

iPS 細胞を試験管内で分化させる方法としては、浮遊培養によって胚様体と呼ばれる擬似的な胚を形成させる方法が利用されている。iPS 細胞を LIF を加えずに高密度になるまで培養し、培養容器に接着しないように浮遊培養させて細胞塊を形成させると、その後、様々な種類の細胞に分化することが知られている。胚様体形成によって分化を誘導すると Nanog の発現は抑制される。

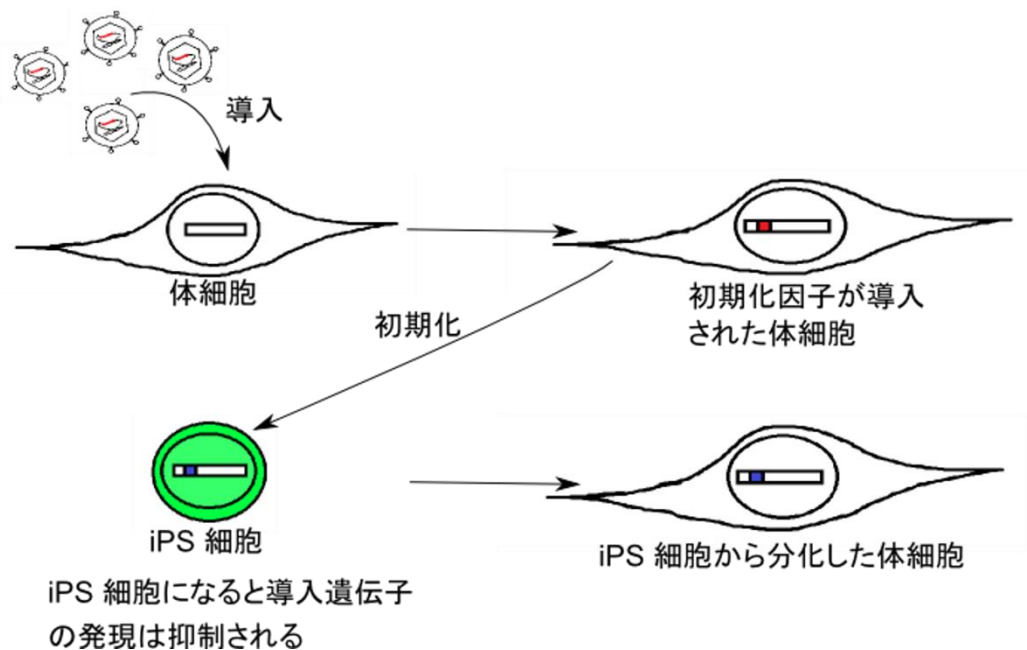
**Table 1. マウス/ヒト iPS 細胞の評価方法**

評価法	マウス	ヒト
集塊の形態学的解析	○	○
RT-PCR による多能性遺伝子の発現の解析	○	○
免疫染色による多能性遺伝子の発現の解析	○	○
Bisulfite sequencing による DNA メチル化解析	○	○
転写産物の網羅的解析	○	○
核型	○	○
ES 細胞様ヒストン修飾 (ChIP)	○	○
X クロマチン再活性化 (FISH)	○	○
胚様体形成 (生体外における分化能の解析)	○	○
奇形腫形成 (生体内における分化能の解析)	○	○
胚盤胞注入によるキメラ作製 (生体内における分化能の解析)	○	×
生殖系列への寄与 (生体内における分化能の解析)	○	×
四倍体補完法によるキメラ作製 (生体内における分化能の解析)	○	×



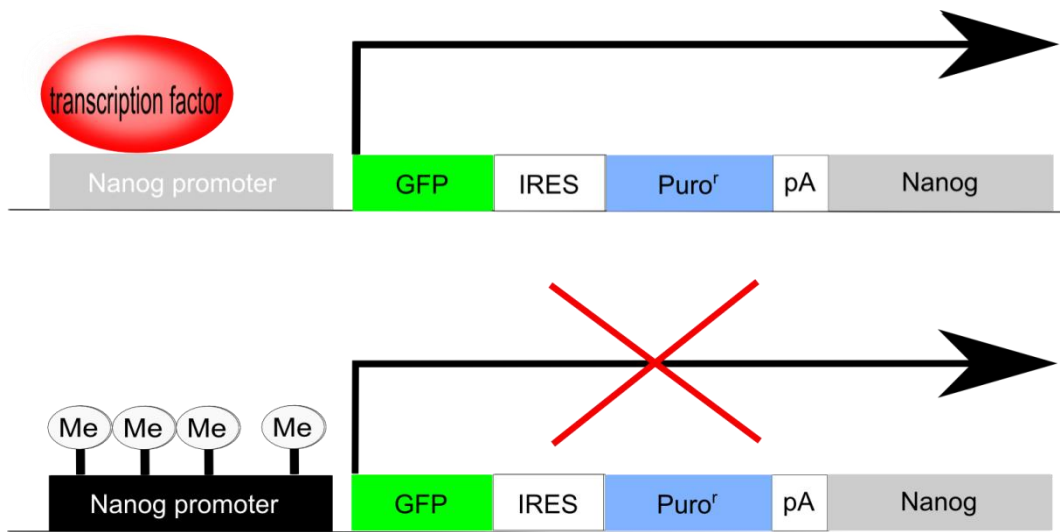
**Fig. 3 キメラマウス作製と生殖系列伝達による iPS 細胞の多能性の評価**

iPS 細胞を胚盤胞の胞胚腔へ移すと胚盤胞由来の細胞と iPS 細胞由来の細胞で構成された個体が生まれる。この様にして造られた個体をキメラといい、iPS 細胞が様々な細胞種へ分化できることを証明するときに作製される。さらに、iPS 細胞が生殖細胞へ分化できることを証明するために、キメラマウスを交配させ、iPS 細胞由来の精子からマウスが生まれるかを試験する場合がある。



**Fig. 4 レトロウイルスベクターを用いた初期化**

レトロウイルスベクターを用いて遺伝子を導入すると、導入遺伝子は宿主の染色体に組み込まれ残存する。導入した初期化遺伝子は発現を持続するが、細胞の初期化が起こり体細胞が ES 細胞様 (iPS 細胞) に変化すると導入した遺伝子の発現は抑制される。



**Fig. 5 Nanog-GFP レポーター遺伝子**

Nanog プロモーターの下流に GFP-internal ribosome entry site (IRES)-puromycin resistance gene (Puro<sup>r</sup>) カセットが挿入されている。未分化細胞の場合は Nanog プロモーターが活性化するため、GFP が発現し緑色の蛍光を放つ。分化細胞の場合は Nanog プロモーター領域の CpG がメチル化されて転写因子が結合しないため、Nanog が発現しない。従って、分化細胞は GFP を発現しないため、緑色の蛍光を放たない。

## 2-2 研究の方法

### 細胞株

今回の実験には、京都大学 再生医科学研究所の山中教授らのグループにより樹立されたマウス iPS 細胞株である iPS-MEF-Ng-20D-17 (Riken Bioresource Center, Japan, APS0001) を用いた。この iPS 細胞株は Nanog プロモーターによって GFP と puromycin 耐性遺伝子を発現する (Fig. 4)<sup>10)</sup>。Nanog は ES 細胞や iPS 細胞などの未分化細胞で特異的に発現するが、分化するとプロモーター領域がメチル化されて発現しなくなる<sup>30,31)</sup>。

### 培養容器のゼラチンコート法

細胞培養皿 (Becton Dickinson Labware, USA) にゼラチン溶液である embryomax® ES cell qualified 0.1% gelatin solution (Millipore, USA) を添加し、室温で 4 時間静置した。ゼラチン溶液を除き、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、乾燥させた。

### マウス胎仔線維芽細胞のマイトマイシン C 処理

フィーダー細胞としてマウス胎仔線維芽細胞である embryomax® primary mouse embryo fibroblasts, hygro resistant, not mytomicin C treated, strain C57/BL6, passage 3 (Millipore, USA) を用いた。線維芽細



胞を細胞培養皿上に播種し、LIF を含まない ES 細胞用培地 (15% fetal bovine serum (FBS), 1% embryomax® ES cell qualified MEM, non essential amino acids (100X), 1% embryomax® ES cell qualified nucleosides (100X), 110µM 2(β)-merccaptoethanol, 1% embryomax® ES cell qualified penicillin-streptomycin solution (100X), 1% embryomax® ES cell qualified L-glutamine souldion (100X), 80% DMEM high glucose (Wako, Japan)) で培養した。線維芽細胞をコンフルエントにした状態で、終濃度 10µg/mL のマイトマイシン C (Kyowa Hakko Kirin, Japan) により 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 3 時間処理した。

### 細胞培養

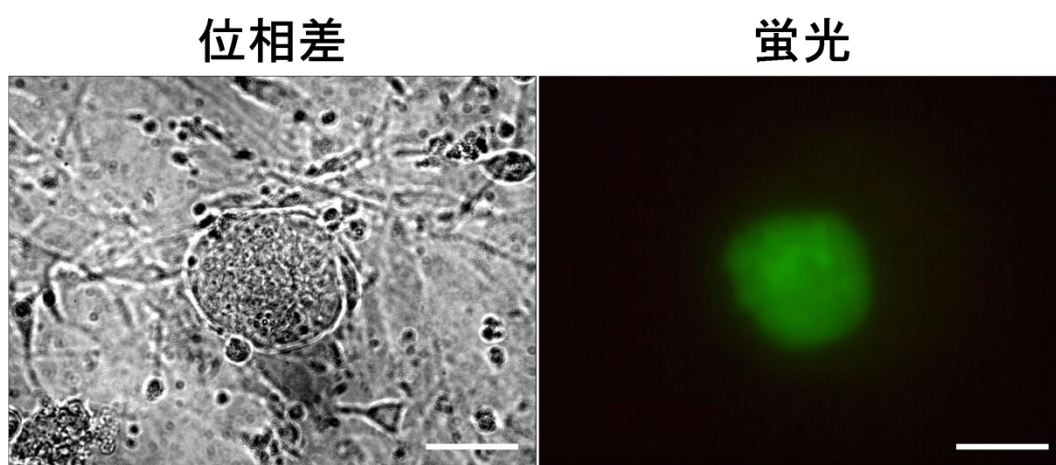
iPS 細胞はマイトマイシン C 処理済みのマウス胎仔線維芽細胞のフィーダー層上で、ES 細胞用培地 (15% fetal bovine serum (FBS), 1% embryomax® ES cell qualified MEM, non essential amino acids (100X), 1% embryomax® ES cell qualified nucleosides (100X), 110µM 2(β)-merccaptoethanol, 1% embryomax® ES cell qualified penicillin-streptomycin solution (100X), 1% embryomax® ES cell qualified L-glutamine souldion (100X), 500 U/mL leukemia inhibitory factor (LIF, Millipore) を含んでいる DMEM high glucose) 中に維持された。毎日培地交換を行い、2~3 日毎に継代を行った。

## iPS 細胞の分化誘導

iPS 細胞の分化誘導には胚様体を形成させる方法を用いた。トリプシン処理によって回収された iPS 細胞を  $5 \times 10^4$  個/mL に懸濁し、細菌培養皿 (Iwaki, Japan) に移し、LIF を含まない ES 細胞用培地中で浮遊培養することにより胚様体を形成させた。

## 未分化細胞が残存するか否かの検討

胚様体の形成開始から 7 日後の時点で、蛍光顕微鏡を用いて胚様体を観察した。胚様体形成から 7 日後、Nanog-GFP を発現する未分化細胞を含む胚様体をパスツールピペットで分取し、セルカルチャー 48 ウェル マルチウェルプレート (Becton Dickinson, USA) の 1 穴に 1 つずつ移した。胚様体の分取から 26 日間、胚様体中の未分化細胞が GFP の発現を維持するか否かを調べるために蛍光観察を毎日行った。



**Fig. 4 iPS 細胞の集塊**

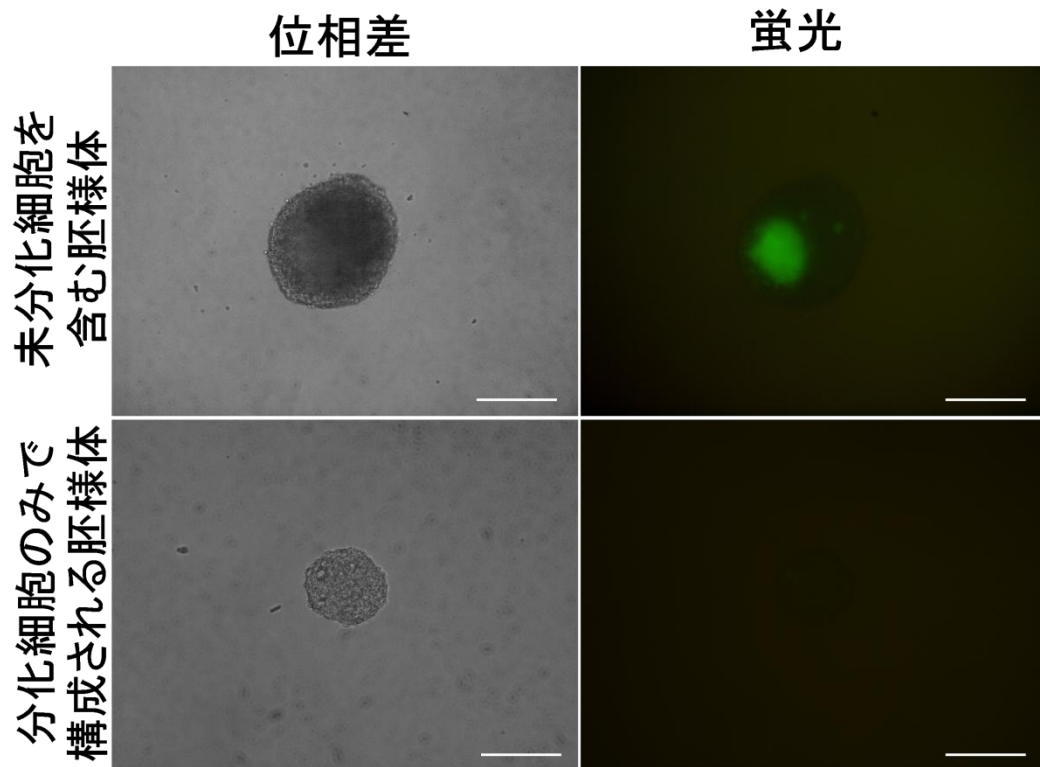
iPS 細胞は未分化状態であるため Nanog を発現する。そのため、GFP を発現し、緑色の蛍光が認められる。左に位相差像、右に蛍光像を示す。(対物 10 倍、キャリブレーション = 50  $\mu\text{m}$ )

## 2-3 研究結果

### 未分化細胞が残存するか否かの検討

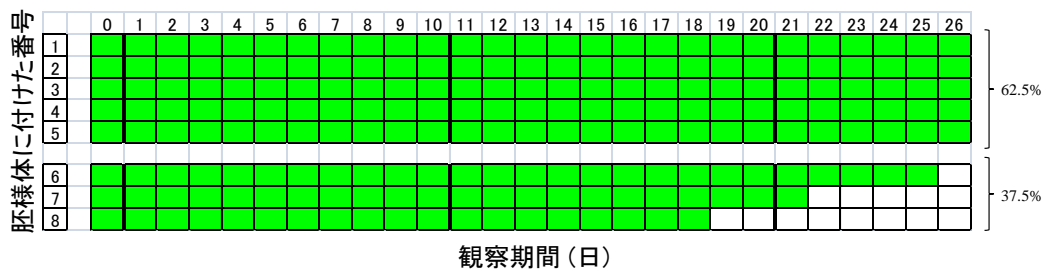
細胞を接着させ易くするために培養皿をゼラチン溶液で処理し、その培養皿上で iPS 細胞の未分化状態を維持するためのフィーダー細胞として用いる、マウス胎仔線維芽細胞の細胞分裂を停止させるためにマイトマイシン C で処理を行った。そのフィーダー細胞層上に iPS 細胞を播種し、iPS 細胞の未分化状態を維持したまま増殖させた。トリプシン処理によって iPS 細胞を回収し、iPS 細胞の浮遊液を低接着性の細菌培養皿に移し、LIF を含まない ES 細胞用培地中で浮遊培養することで胚様体形成を開始させた。胚様体形成開始から 7 日後の時点で胚様体を蛍光観察したところ、Nanog-GFP を発現する未分化細胞とこれを発現しない分化細胞が混在する胚様体（未分化細胞を含む胚様体）および、分化細胞のみで構成される胚様体が観察された (Fig. 5)。

次に、未分化細胞を含む 8 つの胚様体が 26 日間 GFP 発現を維持するか否か観察したところ、5 つの胚様体 (62.5%) は 26 日間 GFP 発現を維持していた。残りの 3 つの胚様体 (37.5%) は観察からそれぞれ 19、22、26 日後に GFP 発現を消失した (Fig. 6)。



**Fig. 5 胚様体形成 7 日後の未分化細胞を含む胚様体と分化細胞のみで構成される胚様体**

胚様体形成 7 日後の時点では未分化細胞と分化細胞が混在する胚様体（未分化細胞を含む胚様体）と分化細胞のみで構成される胚様体が形成されていた。左に位相差像、右に蛍光像を示す。（対物 10 倍、キャリブレーション = 50  $\mu\text{m}$ ）



**Fig. 6 未分化細胞を含む胚様体の GFP 発現と観察日数**

未分化細胞を含む 8 つの胚様体を選び、26 日間 GFP 発現を維持するか否か検討した。観察開始時に GFP を発現している胚様体のみを表示している。横軸は観察日数を表す。縦軸は胚様体に付けた番号を表示している。緑色にマーキングした箇所は GFP 発現が認められた日、白抜きの箇所は GFP 発現が認められなかった日を表す。26 日間 GFP 発現を維持する胚様体や途中で GFP 発現を消失する胚様体が認められた。

## 2-4 考察

分化誘導を施した iPS 細胞に由来する細胞の移植後に腫瘍が形成される原因は、分化誘導後に残存する未分化細胞であると考えられている。マウス iPS 細胞に対し、胚様体形成法による分化誘導を試みたところ、胚様体中に Nanog-GFP を発現する未分化細胞の混在を認めた。また、長期間 GFP 発現を維持する未分化細胞が存在することも確認した。本研究で用いた iPS 細胞には Nanog プロモーターの下流に GFP-IRES-Puro<sup>r</sup> カセットが導入されていることから、胚様体中の Nanog-GFP を発現する細胞は未熟な細胞であることが示唆される。

今回用いた iPS 細胞株はレトロウイルスベクターを用いて 4 つの初期化遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) をマウス胎仔線維芽細胞へ導入することにより作製された<sup>3,4)</sup>。そのため染色体中に Oct3/4 が 7 箇所、Sox2 が 6 箇所、Klf4 が 10 箇所、c-Myc が 7 箇所以上挿入されている<sup>32)</sup>。iPS 細胞に Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc を恒常的に発現させると分化できないことが報告されている<sup>33)</sup>。レトロウイルスベクターで導入された初期化因子は導入された体細胞が iPS 細胞化するとサイレンシングされて発現しなくなるが、培養中にサイレンシングが解除され初期化因子が再活性化されることが示唆されている<sup>34)</sup>。これらの報告から、今回の胚様体形成による分化誘導後に残存する未分化細胞は再活性化した導入遺伝子により iPS 細胞が分化せず残存した

ものとも考えられる<sup>33)</sup>。また、体細胞に Sox2 を除いた 3 因子 (Oct4、Klf4、c-Myc) を導入するといくつかの ES 細胞マーカーの発現を引き起こす一方で多能性を獲得できない (言い換えると、体細胞に Sox2 を除いた 3 因子を導入した場合は無能性細胞を生じる) という報告から、胚様体中の未分化細胞は Sox2 を除いた 3 因子が再活性化している可能性も示唆される<sup>3)</sup>。

Nanog は ES 細胞、iPS 細胞、胚性生殖細胞、多能性生殖幹細胞、FAB 幹細胞など、未分化もしくは未熟な細胞における発現が報告されていることから、本研究で認められた胚様体中に混在している Nanog-GFP を発現する細胞も、同様に未分化もしくは未熟な細胞であると示唆される<sup>3,35-37)</sup>。



本研究の一部は以下にて公表済みである。

- Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hum Cell* 27: 29-35, 2014.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における Nanog 発現と造腫瘍能の解析. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における分化抵抗性細胞の形態解析. 第 30 回日本ヒト細胞学会学術集会 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Morphological analysis of Nanog-positive and Nanog-negative cells in iPS cell-derived embryoid bodies. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.
- 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞に由来する Nanog 発現細胞の形態解析. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.

## 2-5 引用文献

- 1) Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.
- 2) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
- 3) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
- 4) 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* 131: 861-872, 2007.
- 5) Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460: 118-122, 2009.
- 6) Jin M, Wu A, Dorzhin S, Yue Q, Ma Y, Liu D. Culture conditions for bovine embryonic stem cell-like cells isolated from blastocysts after external fertilization. *Cytotechnology* 64: 379-389, 2012.
- 7) Hamilton B, Feng Q, Ye M, Welstead GG. Generation of induced pluripotent stem cells by reprogramming mouse embryonic fibroblasts

- with a four transcription factor, doxycycline inducible lentiviral transduction system. *J Vis Exp* 10.3791/1447, 2009.
- 8) Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3: 595-605, 2008
  - 9) Shutova MV, Bogomazova AN, Lagarkova MA, Kiselev SL. Generation and characterization of human induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae* 1: 91-92, 2009.
  - 10) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317, 2007.
  - 11) Van Damme A, Chuah MK, Collen D, VandenDriessche T. Onco-retroviral and lentiviral vector-based gene therapy for hemophilia: preclinical studies. *Semin Thromb Hemost* 30: 185-195, 2004.
  - 12) 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* 26: 101-106, 2008.
  - 13) Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K,

- Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118: 3132-3142, 2008.
- 14) Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454: 646-650, 2008.
- 15) Hester ME, Song S, Miranda CJ, Eagle A, Schwartz PH, Kaspar BK. Two factor reprogramming of human neural stem cells into pluripotency. *PLoS One* 4: e7044, 2009.
- 16) Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136: 411-419, 2009.
- 17) Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR. Transcriptional signature and memory retention of

- human-induced pluripotent stem cells. PLoS One 4: e7076, 2009.
- 18) Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science 322: 945-949, 2008.
  - 19) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science 322: 949-953, 2008.
  - 20) Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85: 348-362, 2009.
  - 21) Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Cell Stem Cell 7: 11-14, 2010.
  - 22) Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi

- T, Nakanishi M. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* 286: 4760-4771, 2011.
- 23) 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* 27: 743-745, 2009.
- 24) Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hum Cell* 27: 29-35, 2014.
- 25) 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における Nanog 発現と造腫瘍能の解析. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 要旨集 365, 2012.
- 26) 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における分化抵抗性細胞の形態解析. 第 30 回日本ヒト細胞学会学術集会要旨集 68, 2012.
- 27) 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之,

- 坂口卓也, 大野英治. Morphological analysis of Nanog-positive and Nanog-negative cells in iPS cell-derived embryoid bodies. 第 71 回日本癌学会学術総会要旨集 341, 2012.
- 28) 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞に由来する Nanog 発現細胞の形態解析. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会要旨集 167, 2013.
- 29) Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631-642, 2003.
- 30) Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138: 722-737, 2009.
- 31) Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655, 2003.
- 32) Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321: 699-702, 2008.

- 33) Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2: 151-159, 2008.
- 34) Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita JK. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118: 498-506, 2008.
- 35) Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* 5: 639-646, 2005.
- 36) Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119: 1001-1012, 2004.
- 37) Chou YF, Chen HH, Eijpe M, Yabuuchi A, Chenoweth JG, Tesar P, Lu J, McKay RD, Geijsen N. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135: 449-461, 2008.



## 第 3 章

### iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞の造腫瘍能解析

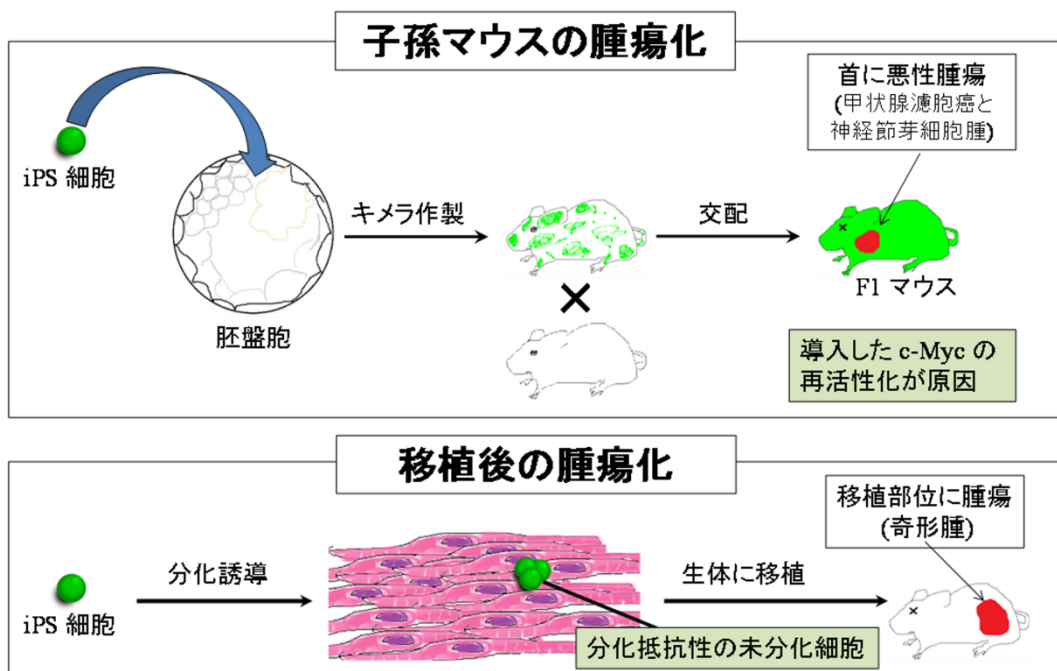
#### 3-1 研究の背景および目的

iPS 細胞に由来する腫瘍の 1 つに、レトロウイルスベクターによって染色体に挿入された c-Myc の再活性化によりキメラマウスの子孫に生じるものがある。この腫瘍化は染色体に挿入させない方法で導入する、もしくは c-Myc を用いない方法で樹立することで回避できる。近年、癌化しない iPS 細胞の作製法を開発したという報告があるが、それらはいずれもキメラマウスの子孫における癌化が起こらないだけであり、移植後の腫瘍化が起こらないというわけではない (Fig. 1)<sup>1)</sup>。iPS 細胞を臨床に応用するためには移植後の腫瘍化を防がなければならない。

ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞に由来する分化誘導体の移植後の腫瘍化の原因は、分化誘導後に残存する未分化細胞であると考えられている<sup>2-7)</sup>。この時に形成される腫瘍は奇形腫と呼ばれる腫瘍であり、一般的に良性といわれている<sup>1)</sup>。

第 2 章において、胚様体形成による分化誘導後の iPS 細胞由来胚様体中には未分化マーカーである Nanog を発現する細胞が残存することを明らかにした。iPS 細胞由来胚様体中の Nanog-GFP を発現する細

胞（未分化細胞）の造腫瘍能を明らかにすることを目的に、胚様体形成による分化誘導後に未分化細胞を含む胚様体および、分化細胞のみで構成される胚様体を免疫不全マウスであるヌードマウスの皮下へ移植した。



**Fig. 1 iPS 細胞に関連する腫瘍**

上段：子孫マウスの腫瘍化。iPS 細胞由来マウスの首に悪性腫瘍が形成される。その原因はレトロウイルスベクターで導入された外来性の c-Myc の再活性化である。そのため c-Myc を用いない、あるいは染色体に挿入させない方法で導入することで腫瘍化を回避できる。

下段：移植後の腫瘍化。分化誘導後に生体に移植すると腫瘍を形成する可能性がある。その原因は分化誘導後に残存する未分化細胞であると考えられている。

## 3-2 研究の方法

細胞株、細胞培養、iPS 細胞の分化誘導は第 2 章に準ずる。

### 造腫瘍能解析

胚様体の形成開始から 7 日後の時点で、蛍光顕微鏡を用いて胚様体を観察した。胚様体形成から 7 日後、未分化細胞を含む胚様体と分化細胞のみで構成される胚様体をパスツールピペットで分取し、セルカルチャー 48 ウェル マルチウェルプレートの 1 穴に 1 つずつ移した。胚様体の分取から 26 日間、GFP の発現および、消失を維持していることを調べるために蛍光観察を毎日行った。分取から 26 日後、1 穴に存在する全ての細胞を LIF を含まない ES 細胞用培地 100 $\mu$ L 中に浮遊させ、ヌードマウスの皮下へ移植した。

腫瘍の組織型を調べるために、摘出した腫瘍を 20% 緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、薄切標本を作製しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。また、細胞像を見るために腫瘍の断面をスライドガラスに捺印し、95% エタノールで固定後、パパニコロウ染色を施した。

造腫瘍能解析は倉敷芸術科学大学動物実験委員会の承認の下 (承認番号; 24-21)、National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) に基づいて行った。

## 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色には高分子ポリマー法を用いた。形成された腫瘍のパラフィン切片をキシレンで脱パラフィン後、エタノール下降系列にて親水し、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を目的として 3% 過酸化水素 (Kanto Chemical, Japan) を室温にて 15 分間反応させた。流水水洗後、抗原賦活化を目的として 10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) を用いてオートクレーブで 121℃、10 分間加熱処理した。室温にて冷却し、PBS で洗浄 (5 分, 3 回) した。その後、非特異的反応の抑制のため、5% ウシ血清アルブミン (BSA, Nacalai Tesque, Japan) 加 PBS を室温にて 30 分間反応させた。一次抗体にはマウスモノクローナル抗  $\beta$ III tubulin 抗体 (clone TUJ1, 1:500, Covance, USA) を用い、4℃にて一晚反応させた。PBS にて洗浄後 (5 分, 3 回)、histofine simple stain max-po (multi) (Nichirei, Japan) を室温にて 30 分反応させた。発色基質には 0.05% 3,3-diaminobenzidine (Tokyo Chemical Industry, Japan) を含む 0.6% 過酸化水素加 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) を用いて発色した。流水水洗後、Mayer's hematoxylin (Muto Pure Chemicals, Japan) にて対比染色を施し、エタノール上昇系列にて脱水後、キシレンで透徹後封入した。

### 3-3 研究結果

#### 未分化細胞を含む胚様体と分化細胞のみで構成される胚様体の造腫瘍能の比較

分化誘導により iPS 細胞から形成させた分化細胞のみで構成される胚様体をヌードマウスの皮下に移植したところ、移植から 90 週経過しても 4 個全て腫瘍を形成しなかった。一方、未分化細胞を含む胚様体をヌードマウスの皮下に移植したところ、移植から 2~5 週の間 5 個中 5 個腫瘍形成が確認された (Table. 1)。

未分化細胞を含む胚様体をヌードマウスの皮下に移植後 6 週目に解剖したところ、転移は認められなかった。摘出された腫瘍の断面を観察したところ、形成された腫瘍は充実性であった (Fig. 2)。

未分化細胞を含む胚様体から形成された腫瘍の HE 染色標本を組織学的に解析したところ、未熟組織が腫瘍の大部分を占拠し (Fig. 3, 4)、一部に表皮 (外胚葉) (Fig. 5)、神経組織 (外胚葉) (Fig. 6, 7)、軟骨組織 (中胚葉) (Fig. 8)、脂肪組織 (中胚葉) (Fig. 9)、筋組織 (中胚葉) (Fig. 10)、円柱上皮 (内胚葉) (Fig. 11)、粘液腺 (内胚葉) (Fig. 12)、線毛円柱上皮 (内胚葉) (Fig. 13) が観察され、Norris らの分類に従うと組織型は未熟奇形腫 Grade 3 であった。

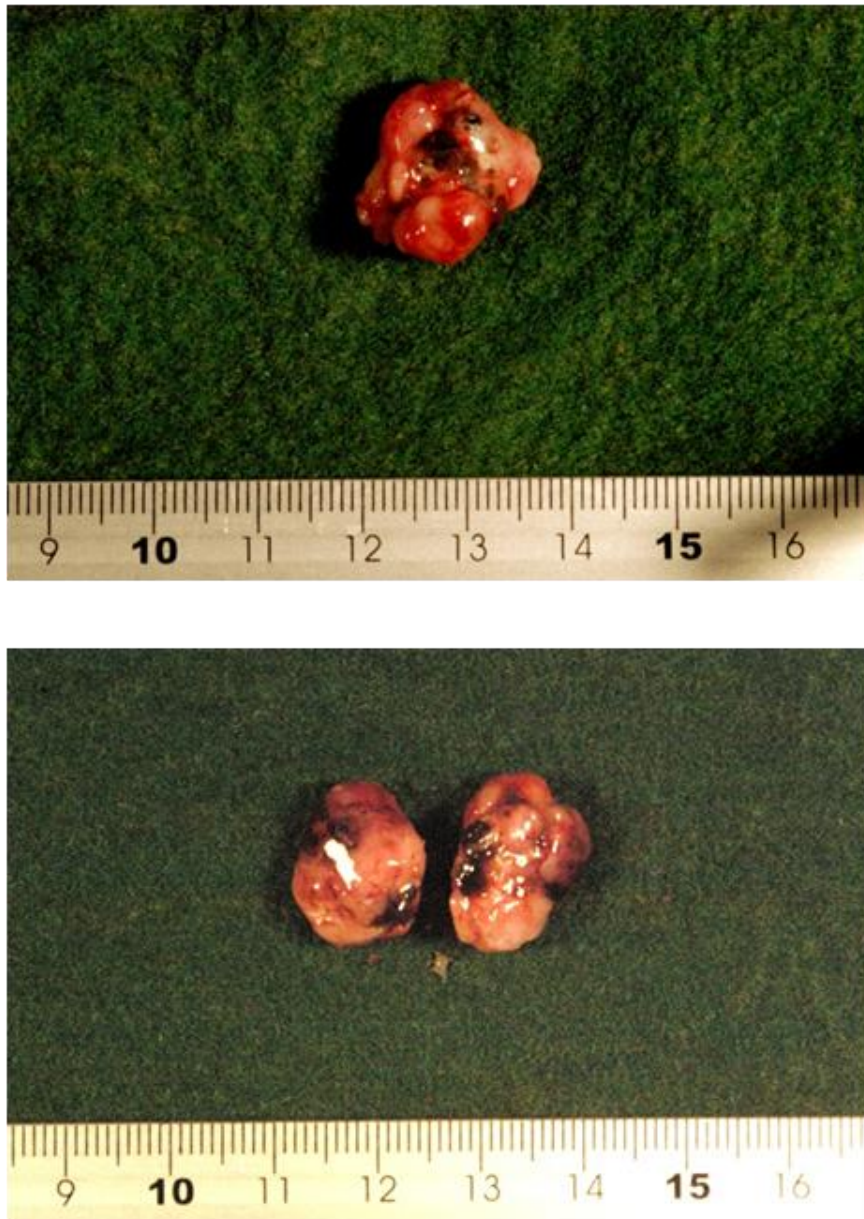
神経細胞への分化は神経細胞マーカーである  $\beta$ III tubulin に対する抗体を用いて免疫組織化学的に確認した (Fig. 7)。

捺印標本では、小型で核細胞質比の高い未分化な異型細胞が多数観察された (Fig. 14)。

Table 1. 未分化細胞を含む胚様体および分化細胞のみで構成される胚様体の造腫瘍能

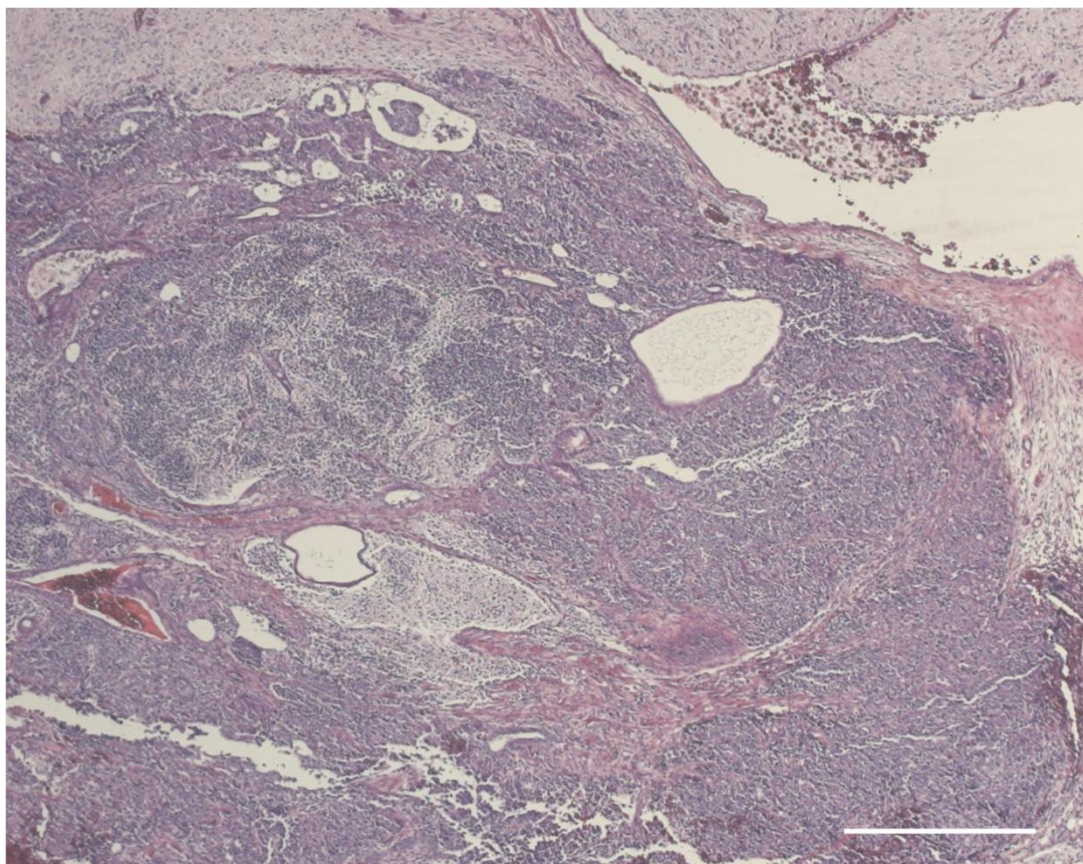
	造腫瘍能
未分化細胞を含む胚様体	5/5
分化細胞のみで構成される胚様体	0/4





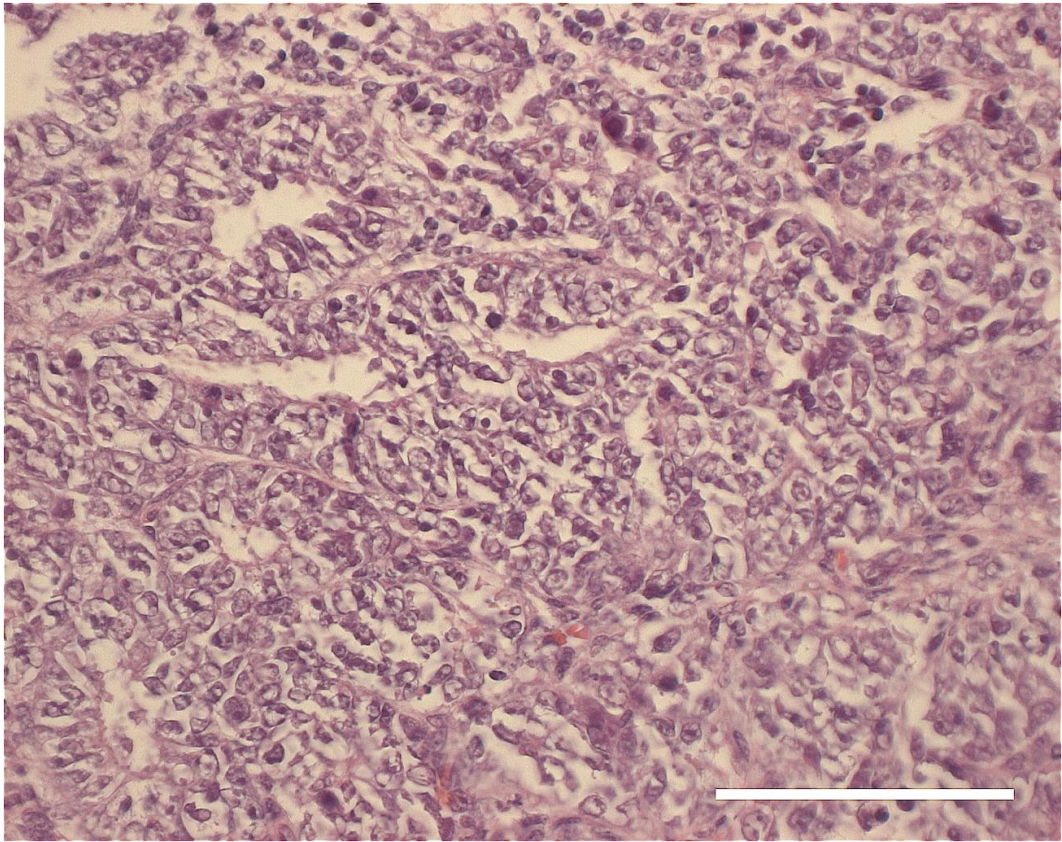
**Fig. 2 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍**

未分化細胞を含む胚様体を移植後 6 週目に摘出された腫瘍の写真 (上)。腫瘍の断面の写真 (下)。腫瘍は充実性であった。



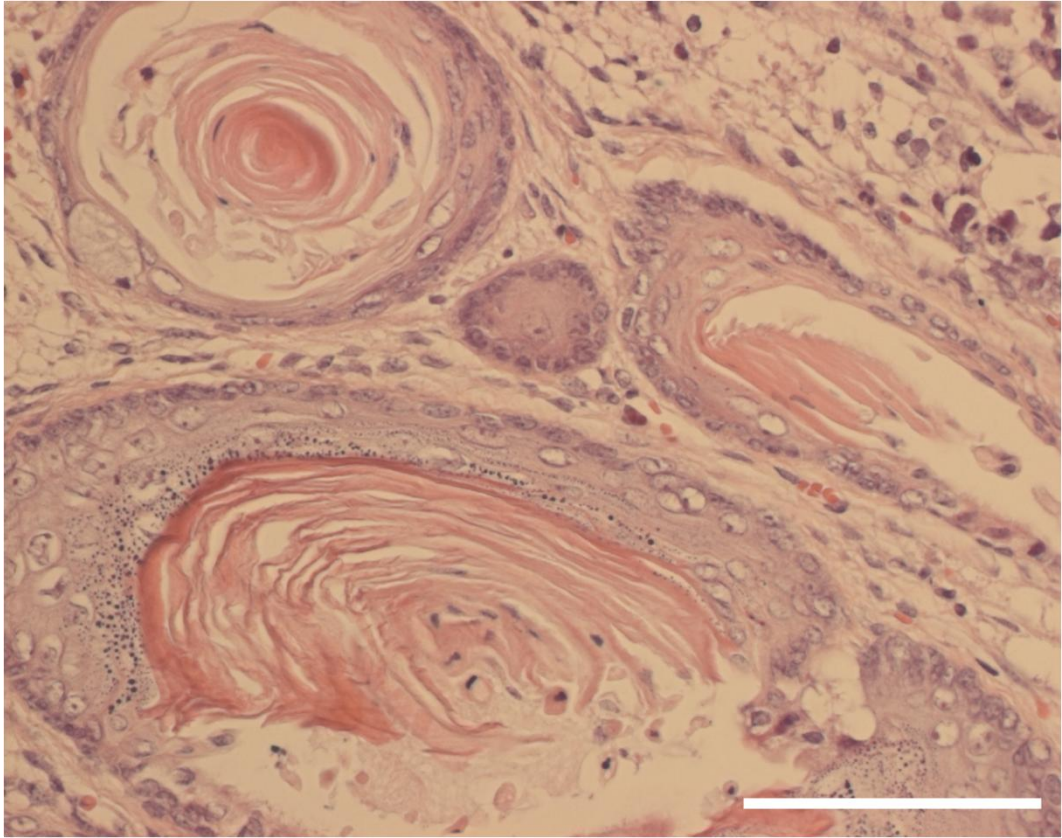
**Fig. 3 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の組織像 (HE 染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の大部分は未熟組織で構成されていた。これは検討した全ての例で認められた。(対物 4 倍、キャリブレーション = 500  $\mu\text{m}$ )



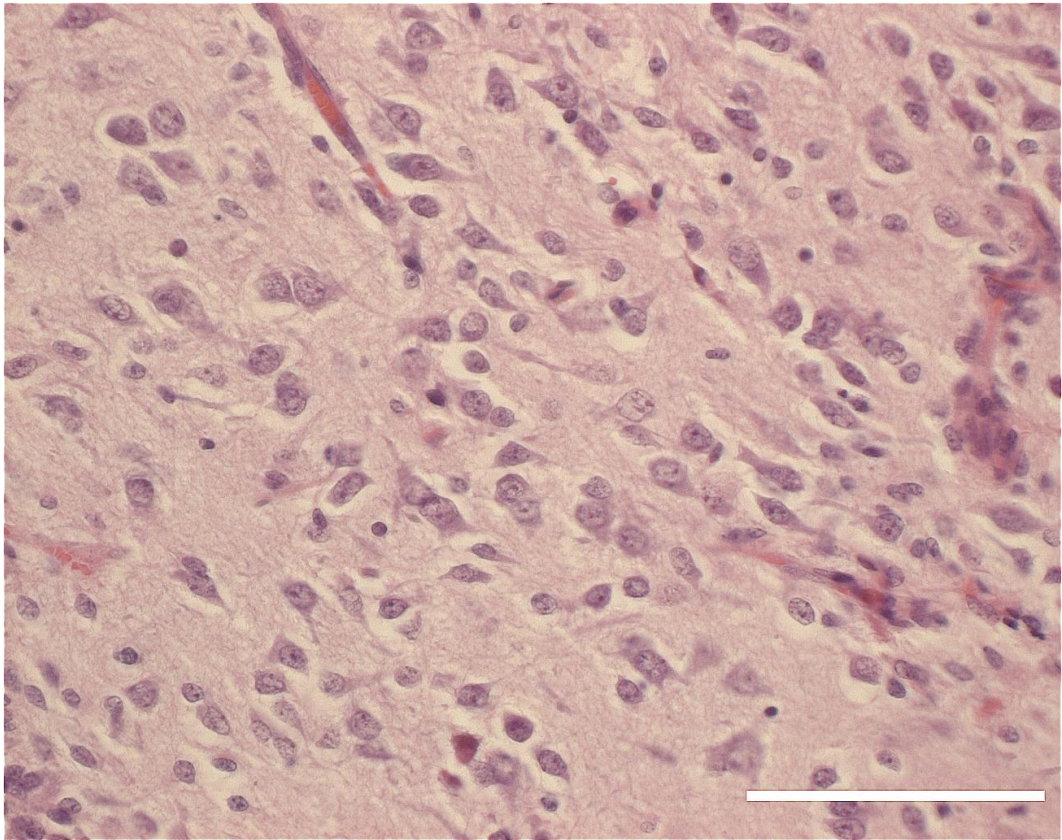
**Fig. 4 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた未熟組織の組織像 (HE 染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の大部分に未熟組織が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



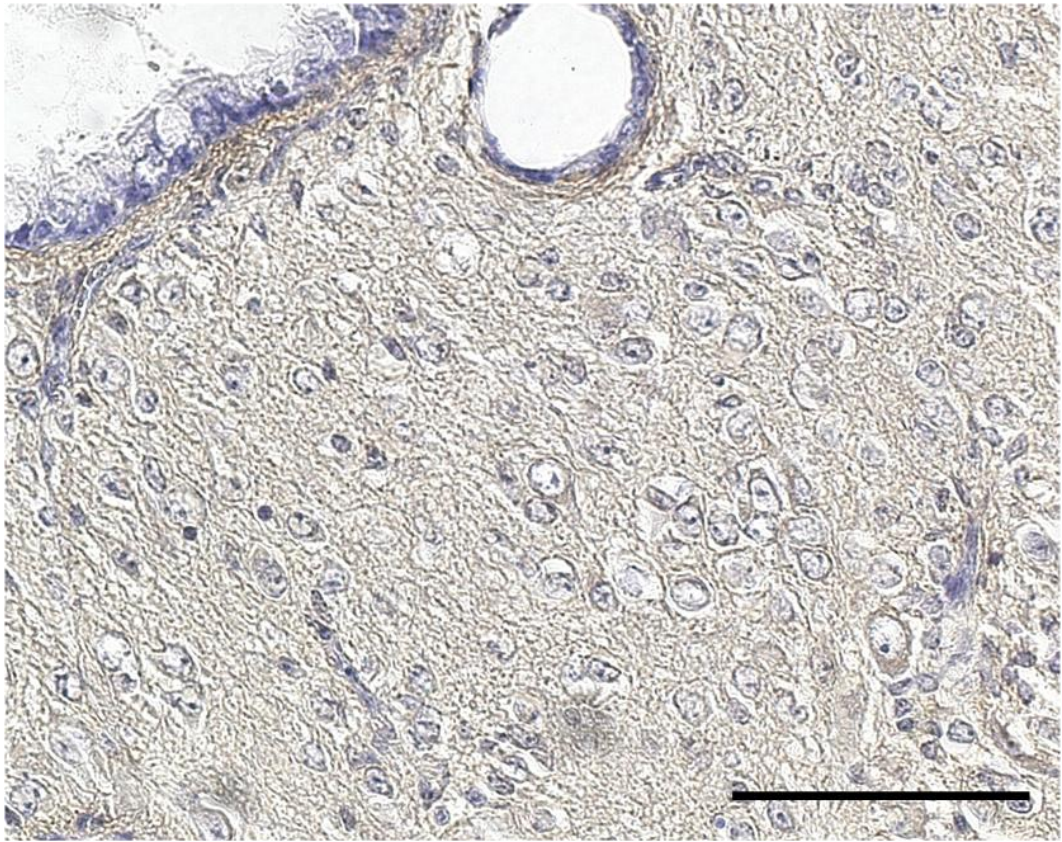
**Fig. 5 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた表皮の組織像  
(HE 染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に表皮が認められた。  
(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 6 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた神経組織の組織像 (HE 染色)**

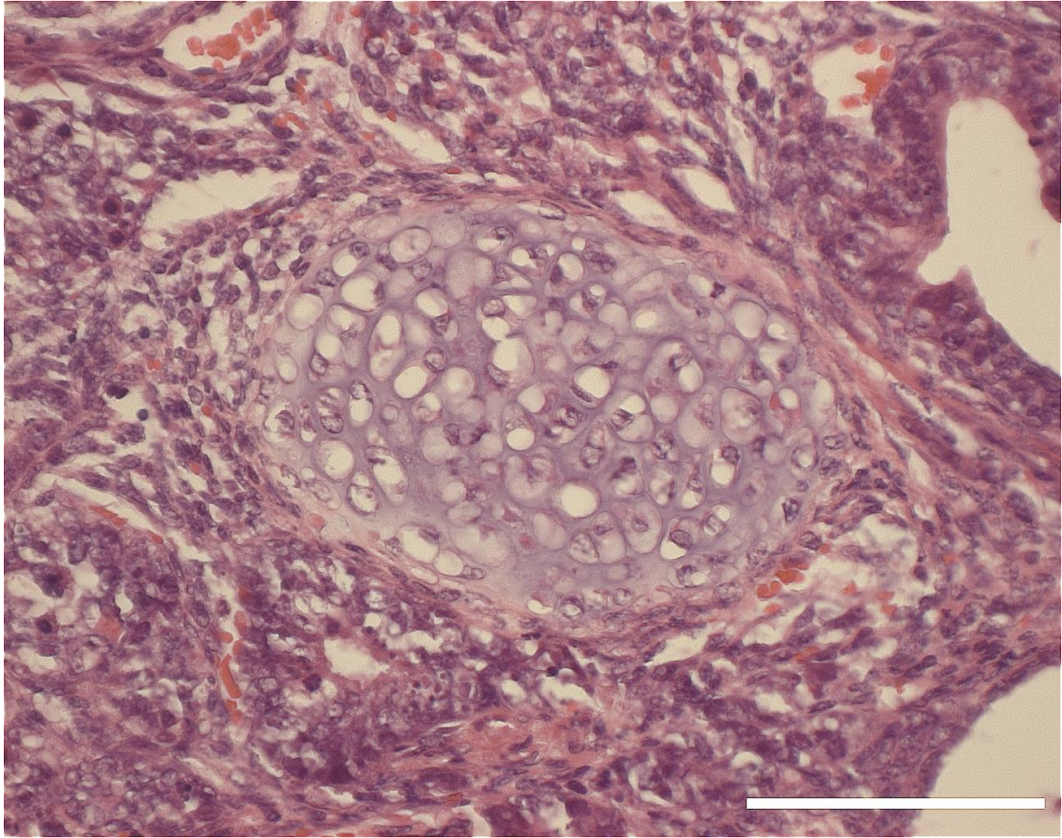
未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に神経組織が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 7 Fig. 6 の  $\beta$ III tubulin 染色**

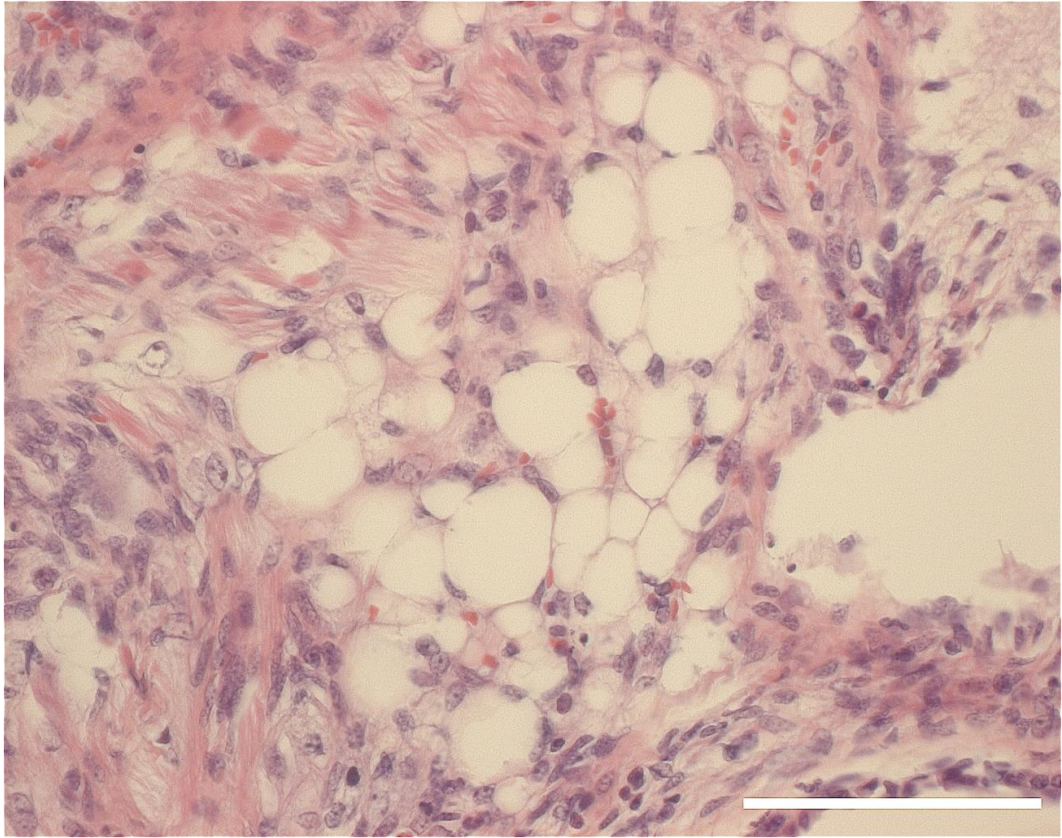
神経細胞マーカーである  $\beta$ III tubulin (褐色) 染色で陽性を示した。

(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu$ m)



**Fig. 8 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた軟骨組織の組織像 (HE 染色)**

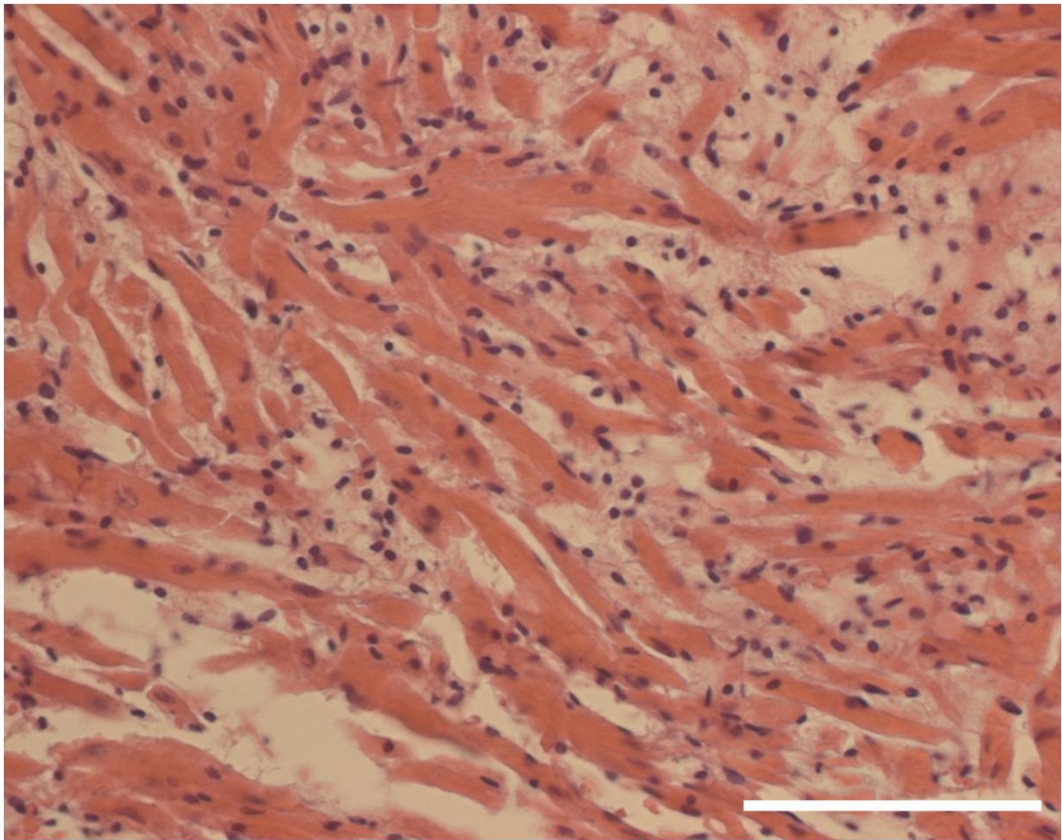
未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に軟骨組織が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 9 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた脂肪組織の組織像 (HE 染色)**

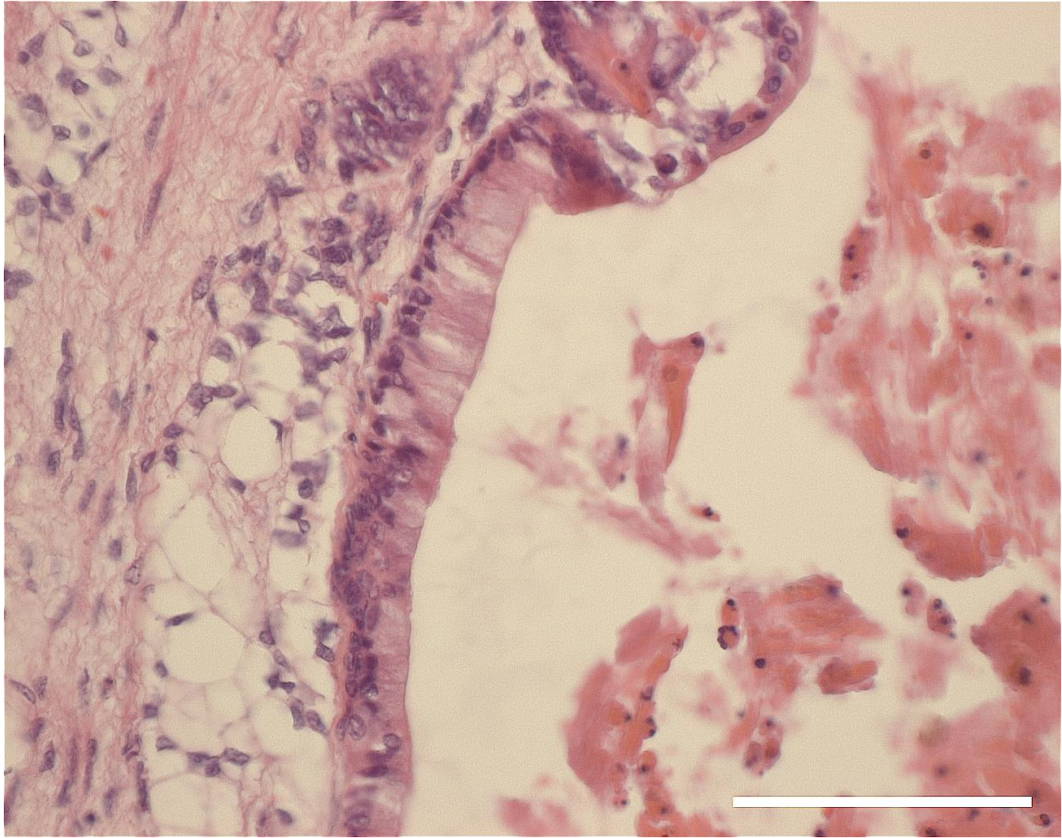
未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に脂肪組織が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )





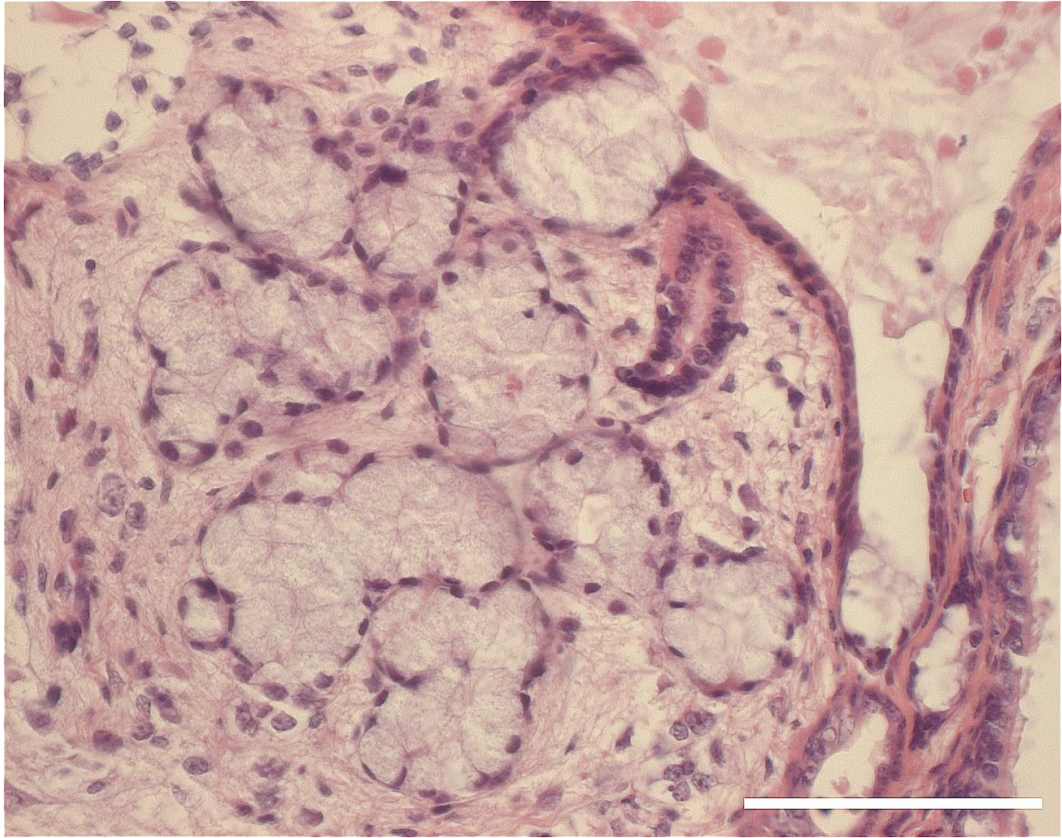
**Fig. 10 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた筋組織の組織像 (HE 染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に筋組織が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



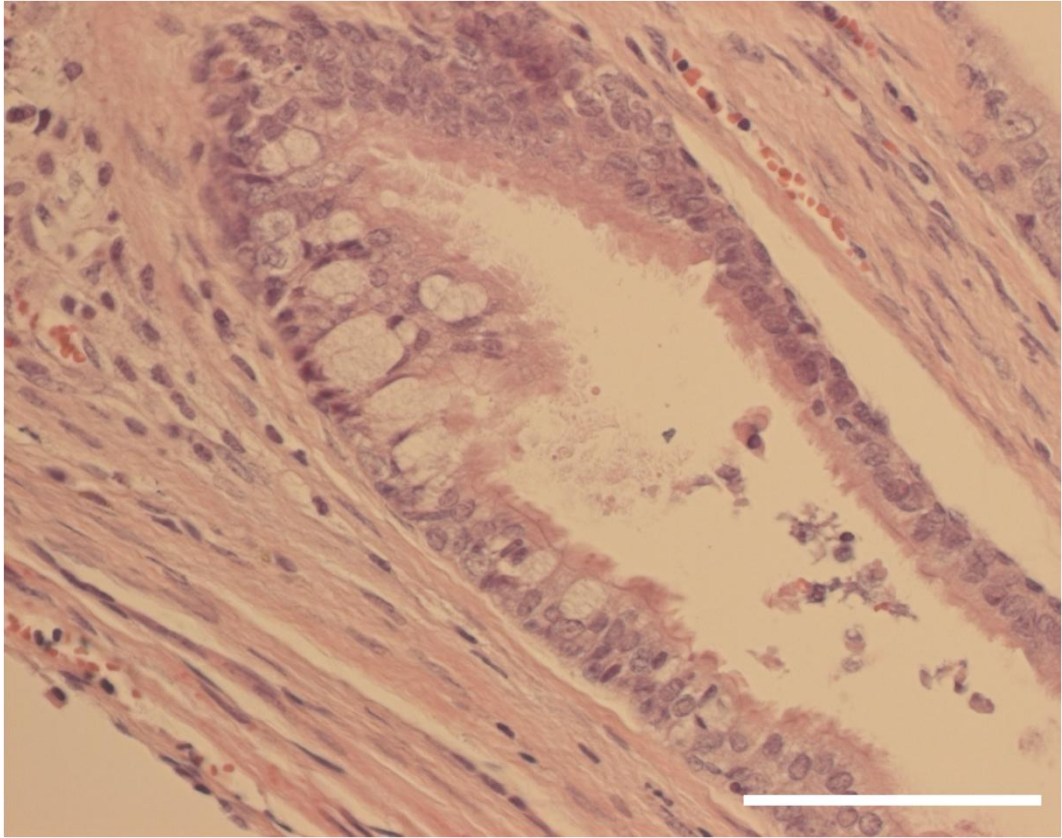
**Fig. 11 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた円柱上皮の組織像 (HE 染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に円柱上皮が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション= 100  $\mu\text{m}$ )



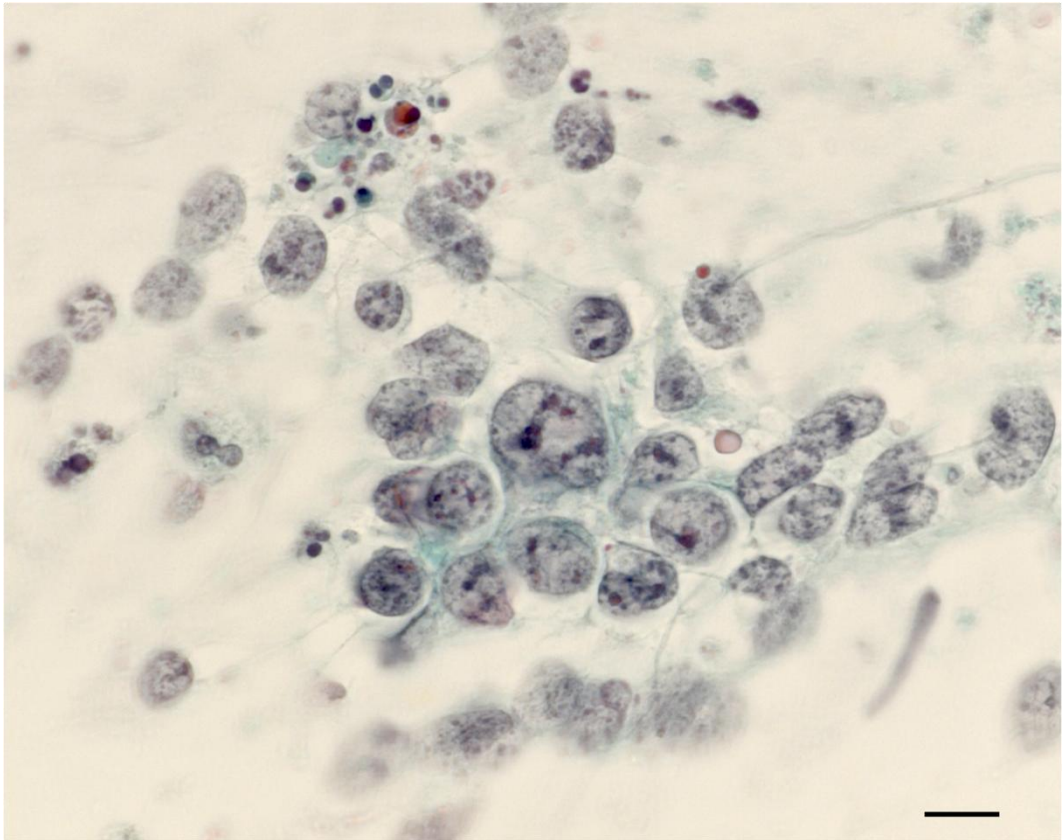
**Fig. 12 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた粘液腺の組織像 (HE 染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に粘液腺が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 13 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍に認められた線毛円柱上皮の組織像 (HE 染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の一部に線毛円柱上皮が認められた。(対物 40 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 14 未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の細胞像 (パパニコロウ染色)**

未分化細胞を含む胚様体に由来する腫瘍の断面をスライドガラスに捺印し、パパニコロウ染色を施した。小型で核細胞質比の高い未分化な異型細胞が多数認められた。(対物 100 倍、キャリブレーション = 10  $\mu\text{m}$ )

### 3-4 考察

分化誘導を施した iPS 細胞の移植後に腫瘍が形成される原因は、分化誘導後に未分化細胞が残存することと示唆されている。この仮説を実験的に検証するため、未分化細胞に特異的に活性化する Nanog プロモーターにて GFP を発現するマウス iPS 細胞株を用いてヌードマウス皮下への移植実験を行ったところ、未分化細胞を含む胚様体では移植箇所すべてにおいて腫瘍形成を認めたが、分化細胞のみで構成される胚様体の移植例では腫瘍形成を認めなかった。この結果から、分化を誘導した iPS 細胞の移植における腫瘍形成の原因は、胚様体中に残存する Nanog を発現する未分化細胞であることが判明した。未分化細胞が動物への移植後に腫瘍を形成する現象は、これまでも報告されており、本研究の結果はこれを支持するものである<sup>6)</sup>。Nanog の発現および腫瘍形成能を有する多能性幹細胞には ES 細胞、iPS 細胞の他に、胚性生殖細胞や多能性生殖幹細胞がある<sup>8-11)</sup>。今回、腫瘍形成の原因と示唆された胚様体中の Nanog-GFP を発現する未分化細胞は分化に抵抗性の iPS 細胞ではなくこれらの細胞である可能性もある。

分化誘導を施さない iPS 細胞および分化誘導を施した iPS 細胞由来細胞を移植した後に形成される腫瘍は奇形腫と報告されているが、病理学的に卵巣の奇形腫は成熟奇形腫、未熟奇形腫 Grade 1~3 に分類されている<sup>12)</sup>。さらに、成熟奇形腫は良性腫瘍、未熟奇形腫の Grade 1

および **Grade 2** は境界悪性腫瘍、**Grade 3** は悪性腫瘍に分類される<sup>12)</sup>。本研究で未分化細胞が形成した腫瘍を病理組織学的・細胞学的に解析したところ 3 胚葉成分に加え、未熟成分が 4 視野以上観察されたため、組織型は未熟奇形腫 **Grade 3** であった。また、分化誘導後に残存する未分化細胞は 3 胚葉への分化能を有することが組織学的に認められた。これまで、iPS 細胞に由来する細胞が形成する腫瘍について病理学的に詳細に解析したとの報告はない。本研究では、iPS 細胞由来細胞が形成する腫瘍は悪性腫瘍であることを明らかにした。

この研究で用いられた iPS 細胞はレトロウイルスベクターにより 4 種類の初期化因子を体細胞に導入することで樹立された。現在、iPS 細胞株の樹立効率または安全性の向上のために、体細胞の初期化に用いる遺伝子の組み合わせを変えることや、初期化に DNA を用いない（タンパク質や miRNA などを用いる）こと、染色体に組み込まないベクター（プラスミドベクターやセンダイウイルスベクターなど）を用いるなどの様々な工夫がなされており、多様な iPS 細胞株の作製法が存在する<sup>13-26)</sup>。その各々についても本研究で行われた検討を行い、株間において分化誘導・移植後に形成される腫瘍の組織型の相違を検討する必要があると考えられる。

本研究の一部は以下にて公表済みである。

- Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hum Cell* 27: 29-35, 2014.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における Nanog 発現と造腫瘍能の解析. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における分化抵抗性細胞の形態解析. 第 30 回日本ヒト細胞学会学術集会 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Morphological analysis of Nanog-positive and Nanog-negative cells in iPS cell-derived embryoid bodies. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.
- 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞に由来する Nanog 発現細胞の形態解析. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.



### 3-5 引用文献

- 1) Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hum Cell* 27: 29-35, 2014.
- 2) 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における Nanog 発現と造腫瘍能の解析. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 要旨集 365, 2012.
- 3) 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における分化抵抗性細胞の形態解析. 第 30 回日本ヒト細胞学会学術集会要旨集 68, 2012.
- 4) 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Morphological analysis of Nanog-positive and Nanog-negative cells in iPS cell-derived embryoid bodies. 第 71 回日本癌学会学術総会要旨集 341, 2012.
- 5) 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞に由来する Nanog 発現

細胞の形態解析. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会要旨集  
167, 2013.

- 6) 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. *Nature Biotechnology* 27: 743-745, 2009.
- 7) Sancho-Martinez I, Nivet E, Izpisua Belmonte JC. Purging and isolating pluripotent cells, "sweet" dreams become true?. *Cell Res* 21: 1526-1527, 2011.
- 8) Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.
- 9) Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* 5: 639-646, 2005.
- 10) Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655, 2003.
- 11) Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T.

- Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119: 1001-1012, 2004.
- 12) Norris HJ, Zirkin HJ, Benson WL. Immature (malignant) teratoma of the ovary: a clinical and pathologic study of 58 cases. *Cancer* 37: 2359-2372, 1976.
  - 13) kita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* 322: 949-953, 2008.
  - 14) 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* 26: 101-106, 2008.
  - 15) Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14152-14157, 2010.
  - 16) Zhou W, Freed CR. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 27: 2667-2674, 2009.
  - 17) Shao L, Feng W, Sun Y, Bai H, Liu J, Currie C, Kim J, Gama R, Wang Z, Qian Z, Liaw L, Wu WS. Generation of iPS cells using defined

- factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. *Cell Res* 19: 296-306, 2009.
- 18) Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN, Mostoslavsky G. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* 28: 64-74, 2010.
  - 19) Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, Ying L, Sommer AG, Jean JM, Smith BW, Lafyatis R, Demierre MF, Weiss DJ, French DL, Gadue P, Murphy GJ, Mostoslavsky G, Kotton DN. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28: 1728-1740, 2010.
  - 20) Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 348-362, 2009.
  - 21) Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N,

- Hasegawa M, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7: 11-14, 2010.
- 22) Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* 286: 4760-4771, 2011.
- 23) Li Z, Yang CS, Nakashima K, Rana TM. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 30: 823-834, 2011.
- 24) Nagamatsu G, Kosaka T, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, Suda T. A germ cell-specific gene, *Prmt5*, works in somatic cell reprogramming. *J Biol Chem* 286: 10641-10648, 2011.
- 25) Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384, 2009.

- 26) Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4: 472-476, 2009.

## 第 4 章

### iPS 細胞の分化誘導後に残存した未分化細胞の形態学的解析

#### 4-1 研究の背景および目的

第 3 章で iPS 細胞の分化誘導後に残存する Nanog を発現する未分化細胞が悪性腫瘍を形成することを明らかにした。従って、iPS 細胞から分化誘導した後の移植用細胞の中に未分化細胞が存在してはならない<sup>1-6)</sup>。移植後の腫瘍化を防ぐには未分化細胞が残存しないように分化させることや、分化誘導後の移植用細胞に混在している未分化細胞を除去すること、未分化細胞が存在しないことを確認してから使うことが有効であると考えられる。マウス iPS 細胞の場合においては、Nanog を発現する未分化細胞は GFP 発現により Nanog を発現しない分化細胞と区別できるが、ヒト iPS 細胞の場合は倫理的に遺伝子操作が不可能であるため Nanog-GFP に依存した鑑別は困難である。そのため、腫瘍の原因である Nanog を発現する未分化細胞と非腫瘍性の細胞である Nanog を発現しない分化細胞を識別するための指標が必要になる。iPS 細胞に由来する細胞において移植後の腫瘍化を防ぐために未分化細胞を完全に除去・分化させる研究が行われているが、これらは遺伝子操作が必要であり、抗体などの費用が掛かる問題がある<sup>7,8)</sup>。そこで胚様体に混在している未分化細胞を形態学的に特徴付けることを

目的に、胚様体から Nanog-GFP 発現を指標に未分化細胞と分化細胞を分離後、形態学的解析を行った。



## 4-2 研究の方法

細胞株、細胞培養、iPS 細胞の分化誘導は第 2 章に準ずる。

### 胚様体中の未分化細胞と分化細胞の細胞標本作製

胚様体形成 7 日後、胚様体をゼラチンコートされた培養皿に移し、3 日間培養した。培養皿に付着した胚様体をトリプシン処理により分散後、2% FBS 加 PBS に  $1 \times 10^6$  個/mL になるように浮遊させた。死細胞を染色するために  $2 \mu\text{g/mL}$  propidium iodide (PI, Sigma, USA) をサンプルに添加し、氷上にて 10 分間染色した。PI 染色後、FACSAria (fluorescence-activated cell sorter, Becton Dickinson, USA) を用いて解析を行い、PI 陽性細胞は死細胞として除外し、Nanog-GFP 発現を指標に未分化細胞および分化細胞を分取した。分取した細胞と iPS 細胞をオートスメアで塗抹し 95% エタノールで固定し、パパニコロウ染色を施し、形態解析に用いた。分化前の iPS 細胞は分化誘導後に残存する未分化細胞と分化細胞と比較するために準備した。

### 胚様体中の未分化細胞と分化細胞の形態学的解析

パパニコロウ染色後の iPS 細胞、胚様体中の未分化細胞、分化細胞の画像を画像解析ソフトである ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; online at: <http://rsb.info.nih.gov/ij>) を用いて

核面積、細胞面積、核細胞質比をそれぞれ 100 個ずつ測定した。面積は平均±標準偏差 (SD) として表した。

#### 統計学的解析

得られた結果の解析には Mann-Whitney *U*-test を用い、*p* 値が 0.01 未満の群間に統計学的に有意差があるものとした。

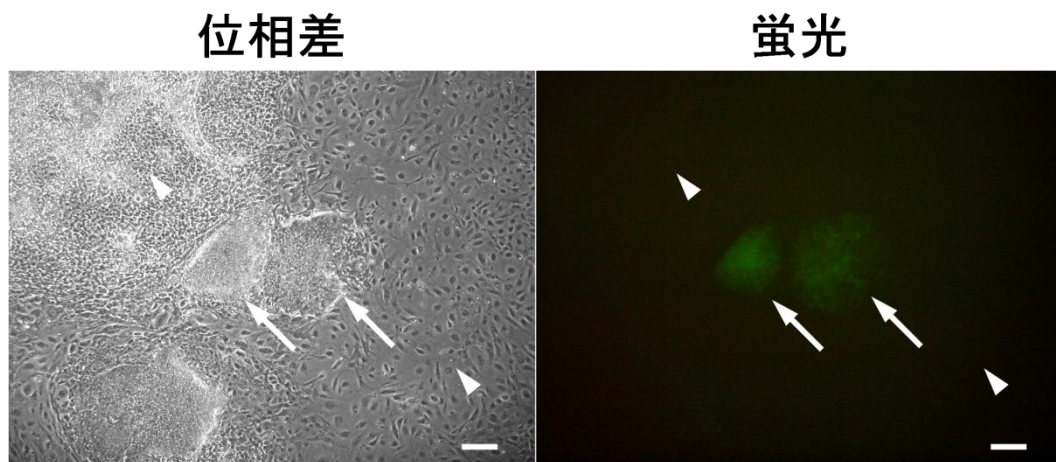
### 4-3 研究結果

#### 胚様体中の未分化細胞と分化細胞の形態学的解析

胚様体形成 7 日後、ゼラチンコートディッシュ上で 3 日間接着培養させた胚様体を観察したところ、Nanog-GFP を発現する未分化細胞と発現しない分化細胞が混在していた (Fig. 1)。この集塊を酵素処理で個々の細胞に分散し蛍光観察したところ、未分化細胞と分化細胞が混在していた (Fig. 2)。これらの細胞の浮遊液を FACS に掛け、Nanog-GFP の蛍光を指標に未分化細胞集団と分化細胞集団として分取した。分取した細胞を蛍光観察したところ、未分化細胞集団では、観察した全ての細胞が GFP を発現していた。分化細胞集団では、未分化細胞は認められなかった (Fig. 3)。このことから、FACS により未分化細胞および分化細胞のみを分取可能であることが示された。

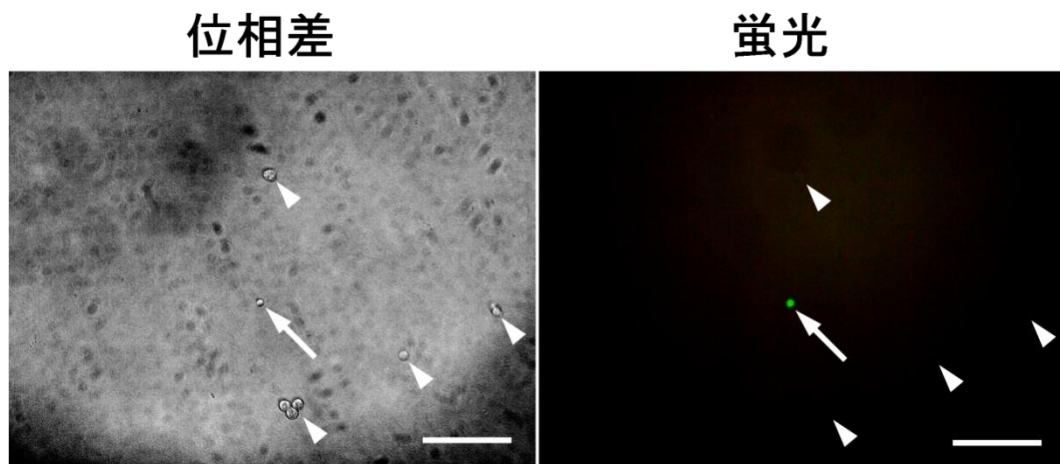
分取した細胞のパパニコロウ染色標本を観察した。胚様体中の未分化細胞は iPS 細胞と類似した形態を示し、分化細胞と異なっていた (Fig. 4)。次にパパニコロウ染色後の画像を画像解析ソフトを用い核面積、細胞面積、核細胞質比について測定した。核面積は iPS 細胞 ( $1.00 \pm 0.27$ ) を基準とすると、胚様体中の未分化細胞は  $0.96$  倍  $\pm$   $0.33$  倍、分化細胞は  $1.16$  倍  $\pm$   $0.53$  倍であった。3 群の細胞間に、有意差は認められなかった (Fig. 5)。細胞面積 (核を含む) は iPS 細胞 ( $1.00 \pm 0.24$ ) を基準とすると胚様体中の未分化細胞において  $0.99$  倍  $\pm$   $0.33$

倍、分化細胞において  $2.66 \pm 3.16$  倍となった。iPS 細胞と分化細胞間、および胚様体中の未分化細胞と分化細胞間に有意差が認められた (Fig. 6,  $p < 0.01$ )。さらに、核細胞質比を算出した。iPS 細胞においては  $0.72 \pm 0.11$ 、胚様体中の未分化細胞においては  $0.70 \pm 0.14$ 、分化細胞においては  $0.39 \pm 0.15$  の値が得られた。iPS 細胞と分化細胞間、および胚様体中の未分化細胞と分化細胞間に有意差が認められた (Fig. 7,  $p < 0.01$ )。



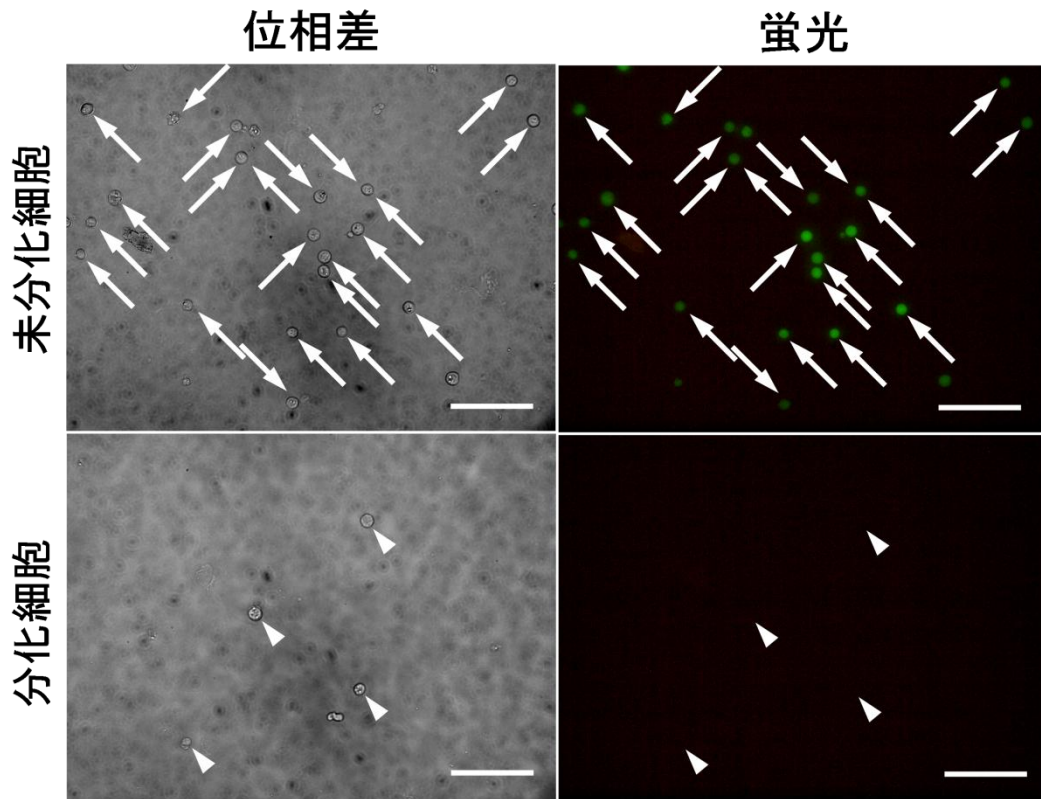
**Fig. 1 胚様体形成7日後、ゼラチンコートディッシュ上で3日間接着培養した胚様体**

培養皿に接着させた胚様体を蛍光観察したところ、GFP 蛍光を放つ細胞（矢印）と放たない細胞（矢頭）が認められたことから、胚様体中に未分化細胞と分化細胞が混在していることが明らかとなった。左に位相差像、右に蛍光像を示す。(対物4倍、キャリブレーション=200 μm)



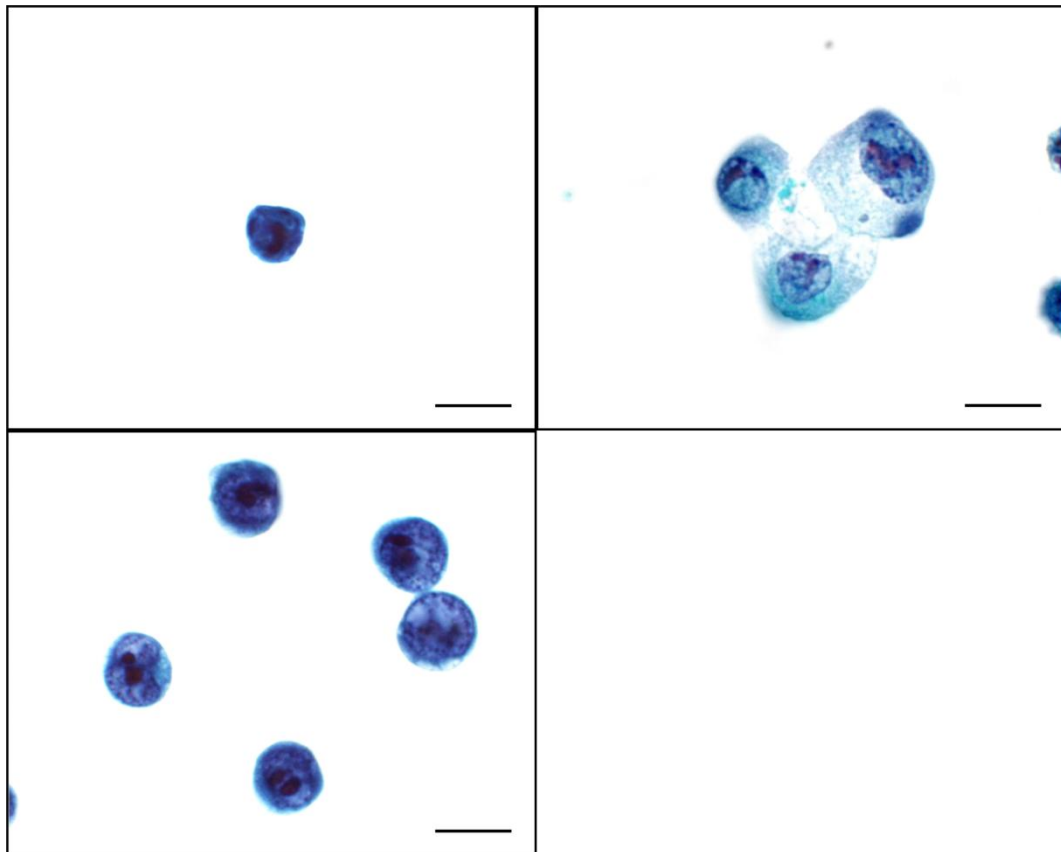
**Fig. 2 FACS による解析の前に分散した胚様体**

胚様体を酵素処理により個々の細胞に分散後、蛍光観察したところ、Nanog-GFP を発現する未分化細胞（矢印）と発現しない分化細胞（矢頭）が混在していた。左に位相差像、右に蛍光像を示す。（対物 20 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ ）



**Fig. 3 FACS により胚様体から分取した未分化細胞と分化細胞**

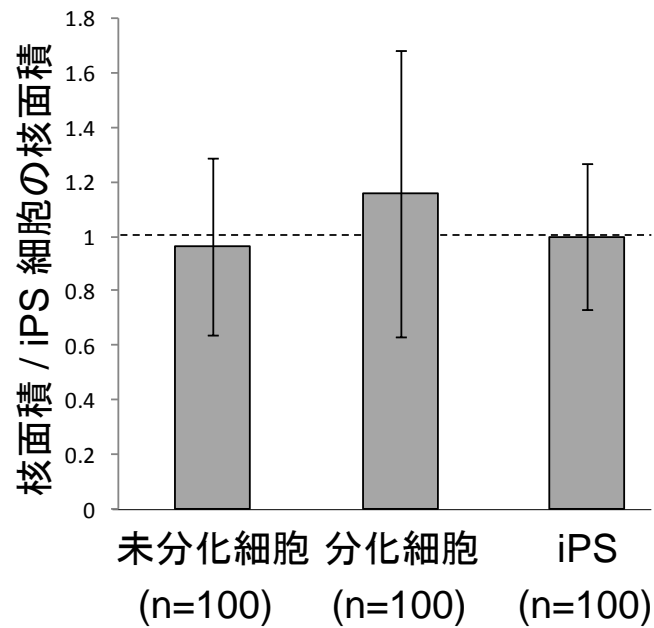
FACS を用いて胚様体から FITC の強弱により未分化細胞集団と分化細胞集団を分取した。未分化細胞集団を蛍光観察したところ、全ての細胞に GFP 蛍光が認められた (矢印)。分化細胞集団を蛍光観察したところ、全ての細胞に GFP 蛍光が認められなかった (矢頭)。このことから、未分化細胞および分化細胞のみを分取可能であることが示された。左に位相差像、右に蛍光像を示す。(対物 20 倍、キャリブレーション = 100  $\mu\text{m}$ )



**Fig. 4 胚様体中の未分化細胞（左上）、分化細胞（右上）および iPS 細胞（下）(パパニコロウ染色)**

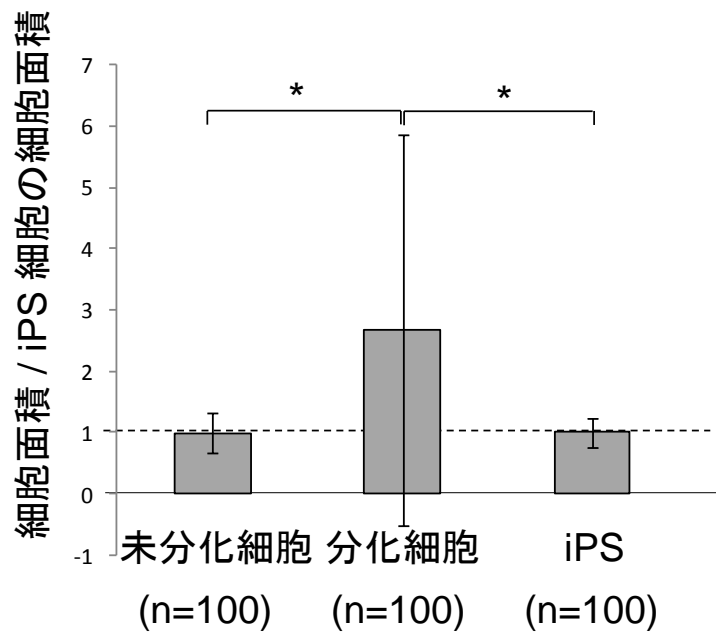
FACS により胚様体から分取した未分化細胞および分化細胞にパパニコロウ染色を施した。胚様体中の未分化細胞は小型で核細胞質比が高い。胚様体中の分化細胞は大きな細胞質を持ち、核細胞質比が低い。未分化細胞は iPS 細胞の形態と類似していた。(対物 100 倍、キャリブレーション = 10  $\mu\text{m}$ )





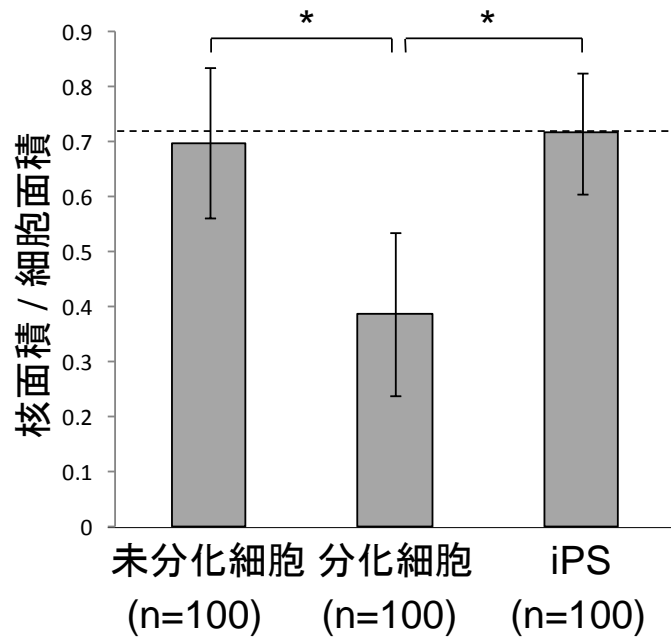
**Fig. 5 胚様体中の未分化細胞と分化細胞の核面積の比較**

パパニコロウ染色後の胚様体中の未分化細胞および分化細胞、iPS 細胞の核面積を測定した。核面積については 3 群の細胞間に有意な差は認められなかった。値は平均値 ± 標準偏差である。Mann-Whitney *U*-test (\* $p < 0.05$ )



**Fig. 6 胚様体中の未分化細胞と分化細胞の細胞面積の比較**

パパニコロウ染色後の胚様体中の未分化細胞および分化細胞、iPS 細胞の細胞面積を測定した。細胞面積については、分化細胞は iPS 細胞および胚様体中の未分化細胞に比し、有意に高値を示した。値は平均値±標準偏差である。Mann-Whitney *U*-test ( $*p < 0.05$ )



**Fig. 7 胚様体中の未分化細胞と分化細胞の核細胞質比の比較**

パパニコロウ染色後の胚様体中の未分化細胞および分化細胞、iPS 細胞の核細胞質比を測定した。核細胞質比については、分化細胞は iPS 細胞および胚様体中の未分化細胞に比し、有意に低値を示した。値は平均値 ± 標準偏差である。Mann-Whitney *U*-test (\* $p < 0.05$ )

#### 4-4 考察

分化誘導により iPS 細胞から形成された胚様体中に存在する未分化細胞および分化細胞の核面積、細胞面積、核細胞質比を測定したところ、分化細胞の細胞面積は比較的大きくばらついていた。この結果は胚様体形成による無秩序な分化誘導により iPS 細胞が様々な細胞種に分化したことを反映しているものと思われる。

また、胚様体中に観察される分化細胞の形態は核面積、細胞面積、核細胞質比において iPS 細胞と類似していた。未分化細胞は Nanog を発現し、造腫瘍能と多能性を有しており、形態学的にも iPS 細胞と類似していたことから、未分化細胞は分化しなかった iPS 細胞であることが示唆された。ところが、Nanog を発現する細胞は ES 細胞や iPS 細胞の他にも存在する<sup>9-20)</sup>。今回は複数の胚様体から未分化細胞の集団を分取したが、この中にも複数の種類の Nanog 発現細胞が混在していることが予想される。

第 2 章でも述べたように、iPS 細胞株の樹立効率や安全性を高めるために、iPS 細胞株には様々な樹立法が開発されている<sup>21-34)</sup>。樹立法の異なる iPS 細胞間で形態が異なる可能性があるため、それらの細胞の形態についても比較検討する必要があると考えられる。

iPS 細胞移植時の悪性腫瘍形成は幹細胞治療への応用において最大の障壁となる<sup>35)</sup>。胚様体中の未分化細胞の細胞形態を解析したところ、

未分化細胞は分化細胞に比べ小型で核細胞質比が高かった。マウス iPS 細胞の場合、未分化細胞は Nanog-GFP の発現により分化細胞と区別できるがヒト iPS 細胞では、Nanog-GFP 発現を指標として未分化細胞と分化細胞を識別することは困難である。しかし本研究の結果により、細胞径の差は未分化細胞と分化細胞を区別するために役に立つ指標であり、それらの指標を用いた形態学的解析はヒト iPS 細胞へ適応できる可能性が示唆された。

本研究の一部は以下にて公表済みである。

- Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hum Cell* 27: 29-35, 2014.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 福留伸幸, 坂口卓也, 荒武八起, 大野英治. iPS 細胞由来細胞の腫瘍化に関する研究. 第 51 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2010.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における Nanog 発現と造腫瘍能の解析. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における分化抵抗性細胞の形態解析. 第 30 回日本ヒト細胞学会学術集会 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Morphological analysis of Nanog-positive and Nanog-negative cells in iPS cell-derived embryoid bodies. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.
- 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞に由来する Nanog 発現細胞の形態解析. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.

#### 4-5 引用文献

1. Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. *Hum Cell* 27: 29-35, 2014.
2. 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 福留伸幸, 坂口卓也, 荒武八起, 大野英治. iPS 細胞由来細胞の腫瘍化に関する研究. 第 51 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 要旨集 333, 2010.
3. 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における Nanog 発現と造腫瘍能の解析. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 要旨集 365, 2012.
4. 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における分化抵抗性細胞の形態解析. 第 30 回日本ヒト細胞学会学術集会要旨集 68, 2012.
5. 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Morphological analysis of Nanog-positive and Nanog-negative cells in iPS cell-derived embryoid bodies. 第 71 回日

本癌学会学術総会要旨集 341, 2012.

6. 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞に由来する Nanog 発現細胞の形態解析. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会要旨集 167, 2013.
7. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 5856-5861, 2008.
8. Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, Hayashi H, Morizane A, Koyanagi M, Sasai Y, Hashimoto N. Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells* 24: 763-771, 2006.
9. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655, 2003.
10. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O,



- Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119: 1001-1012, 2004.
11. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191-195, 2007.
  12. Chou YF, Chen HH, Eijpe M, Yabuuchi A, Chenoweth JG, Tesar P, Lu J, McKay RD, Geijsen N. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135: 449-461, 2008.
  13. Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359: 550-551, 1992.
  14. Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development* 120: 3197-3204, 1994.
  15. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:

- 841-847, 1992.
16. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655, 2003.
  17. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119: 1001-1012, 2004.
  18. Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ikawa M, Nakamura T, Ogura A, Shinohara T. Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod* 78: 681-687, 2008.
  19. Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns* 5: 639-646, 2005.
  20. Chou YF, Chen HH, Eijpe M, Yabuuchi A, Chenoweth JG, Tesar P, Lu J, McKay RD, Geijsen N. The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135: 449-461, 2008.
  21. kita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S.

- Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* 322: 949-953, 2008.
22. 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* 26: 101-106, 2008.
  23. Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 14152-14157, 2010.
  24. Zhou W, Freed CR. Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* 27: 2667-2674, 2009.
  25. Shao L, Feng W, Sun Y, Bai H, Liu J, Currie C, Kim J, Gama R, Wang Z, Qian Z, Liaw L, Wu WS. Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. *Cell Res* 19: 296-306, 2009.
  26. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN, Mostoslavsky G. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem*

- Cells 28: 64-74, 2010.
27. Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, Ying L, Sommer AG, Jean JM, Smith BW, Lafyatis R, Demierre MF, Weiss DJ, French DL, Gadue P, Murphy GJ, Mostoslavsky G, Kotton DN. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28: 1728-1740, 2010.
  28. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 348-362, 2009.
  29. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7: 11-14, 2010.
  30. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi

- T, Nakanishi M. Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem* 286: 4760-4771, 2011.
31. Li Z, Yang CS, Nakashima K, Rana TM. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 30: 823-834, 2011.
32. Nagamatsu G, Kosaka T, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, Suda T. A germ cell-specific gene, *Prmt5*, works in somatic cell reprogramming. *J Biol Chem* 286: 10641-10648, 2011.
33. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384, 2009.
34. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4: 472-476, 2009.
35. 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 USA 107: 12704-12709, 2010.

## 第 5 章

### 結論

iPS 細胞の再生医療への応用が期待されている。これを実現する際の最大の課題は iPS 細胞から分化誘導した細胞の生体移植後の癌化である。本研究で、癌化の原因は分化誘導後に残存する Nanog を発現する未分化細胞であることを明らかにした。

マウス iPS 細胞の場合、Nanog-GFP 発現を指標に未分化細胞を同定できるが、ヒト iPS 細胞については倫理的に Nanog-GFP 発現を指標とする未分化細胞の同定が困難である。本研究の結果から、細胞面積と核細胞質比を指標にすることで分化誘導した iPS 細胞から腫瘍を形成する未分化細胞を検出することが可能であると示唆された。

## 業績リスト

### 学術論文

- Nishimori M, Yakushiji H, Mori M, Miyamoto T, Yaguchi T, Ohno S, Miyake Y, Sakaguchi T, Ueda M, Ohno E. Tumorigenesis in cells derived from induced pluripotent stem cells. Hum Cell 27: 29-35, 2014.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 荒武八起, 大野英治. Notch signal 阻害による子宮内膜癌治療の基礎研究. 日本臨床細胞学会岡山支部会誌, 日本臨床細胞学会岡山支部出版 28: 25-26, 2009.
- 森 康浩, 宮本朋幸, 西森 誠, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. 子宮内膜細胞診における endometrial glandular and stromal breakdown (EGBD)と子宮内膜癌の鑑別診断での Notch -1 免疫染色の有用性. 日本臨床細胞学会岡山支部会誌, 日本臨床細胞学会岡山支部出版 30: 17-20, 2011.

### 学会発表

#### 国内学会

- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 畠 榮, 坂口卓也, 荒武八起, 大野英治. Notch signal 阻害による子宮内膜癌治療の基礎研究. 第 29 回日本臨床細胞学会岡山支部会



2009.

- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 福留伸幸, 坂口卓也, 荒武八起, 大野英治. iPS 細胞由来細胞の腫瘍化に関する研究. 第 51 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2010.
- 薬師寺宏匡, 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 大野節代, 三宅康之, 福留伸幸, 坂口卓也, 荒武八起, 大野英治. iPS 細胞の分化と胚様体に残存する未分化細胞との関連性. 第 51 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2010.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における Nanog 発現と造腫瘍能の解析. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2012.
- 安村奈緒子, 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. ES 細胞と iPS 細胞が形成する腫瘍の細胞病理学的比較. 第 53 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞由来胚様体における分化抵抗性細胞の形態解析. 第 30 回日本ヒト細胞学会学術集会 2012.
- 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Morphological analysis of Nanog-positive and

Nanog-negative cells in iPS cell-derived embryoid bodies. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.

- 西森 誠, 安村奈緒子, 森 康浩, 宮本朋幸, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. ヒト iPS 細胞の作製方法の違いによる生体内での分化傾向についての検討. 第 54 回日本臨床細胞学会総会 (春期大会) 2013.
- 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. iPS 細胞に由来する Nanog 発現細胞の形態解析. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.
- 古本玲奈, 西森 誠, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 薬師寺宏匡, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. ES 細胞と iPS 細胞が形成する腫瘍の細胞病理学的検討. 第 8 回日本臨床検査学教育学会学術大会 2013.
- 西森 誠, 薬師寺宏匡, 森 康浩, 宮本朋幸, 矢口貴博, 大野節代, 三宅康之, 坂口卓也, 大野英治. Cytopathologic analysis of tumor derived from iPS cells and ES cells. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導とご鞭撻を頂きました倉敷芸術科学大学大学院 産業科学技術研究科 機能物質化学専攻 分子細胞病理学系および同大学生命医科学科の先生方、並びに副査の先生方に心から感謝申し上げます。