

ヒト iPS 細胞による漿尿膜テラトーマ試験の妥当性検証

山口大学共同獣医学部・助教（テニュアトラック） 今井 啓之

■ 緒 言

胚性幹細胞(ESCs)や誘導多能生幹細胞(iPSCs)は、基礎研究から臨床応用まで幅広く活用される。この多能性幹細胞の活用にあたっては、それぞれの研究目的に応じた品質管理が重要であり、これまでに遺伝子発現やゲノム修飾などさまざまな指標が報告された^{1,2)}。しかしながら細胞の分化の実態を把握するためには、実際に分化させることが必須であり、特に *in vivo* においては多大なコストと時間を要する。

我々は 2022 年度において本財団特別助成「発育鶏卵を用いたテラトーマ形成試験のバリデーション評価」にて支援を受け、マウス多能性幹細胞のテラトーマ形成試験の代替法開発を行った。その結果、発育鶏卵接種法の 1 つである漿尿膜上接種法を応用することで従来のマウスを用いたテラトーマ形成試験を代替できることを見出した。これにより、テラトーマ形成試験に要する試験期間、単価と維持費、設備を大幅に短縮することに成功した³⁾。

これらの成果に基づいて今回、対象動物種の拡大しヒト iPS 細胞を用いて新規テラトーマ形成試験の実証試験の完遂を目的として、各種試験に取り組んだ。

■ 方 法

1. 一般細胞株での腫瘍形成試験

一般細胞株としてヒトメラノーマ由来の G-361 細胞株を用いた。EMEM 培地(Wako)にウシ胎子血清(ThermoFisher Scientific)と抗生物質を添加したものをを用いて培養し、Trypsin-EDTA(Wako)を用いて適宜継代した。細胞の接種溶媒として HBSS(Wako)にウシ胎子血清を加えたものをを用い、1 接種あたり $10^5 \sim 10^6$ 細胞を含む 100 μ L を注入した。

マウスを用いた腫瘍形成実験は、免疫不全マウスとして C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid 系統(SCID マウス)を用いて SPF 環境下で飼育した。上述の細胞懸濁液を皮下へ接種して、注意深く経過観察しつつ採材を行なった。

発育鶏卵は 2022 年度に構築したプロトコルに倣い、10 日齢卵を用いた。漿尿膜上に上述の細胞懸濁液を接種して、転卵せず 6 日間孵卵器にてインキュベートして採材を行なった。

採材は滅菌シャーレ内で行い、観察後、組織化学解析や核酸解析に供した。観察にあたり、腫瘍の大きさを確認し、長径が 1 cm 以上のものを ++、1cm 未満のものを +、膜の肥厚に留まるものや斑状のものを ±、観察できないものを - に分類した。組織化学解析にあたり、中性緩衝ホルマリンまたはブアンにより固定を行い、定法に従ってパラフィン包埋、薄切、染色を行った。核酸解析にあたり、ISOGENII(ニッポンジーン)および ReverTra Ace(Toyobo)、Gotaq(Promega)を用いた。

2. ヒト iPS 細胞での腫瘍形成試験

ヒト iPS 細胞株は樹立方法の異なる細胞株を 2 株ずつ用いた。京都大学 iPS 細胞研究財団の Fit プロトコルを参照して培養と継代を行なった⁴⁾。細胞の接種溶媒としてマトリゲル(Corning)に ROCK 阻害剤の Y-27632(Wako)を加えたものをを用いた。接種後の解析は上述の方法と同様にして行なった。

3. 接種細胞数と接種後の溶媒動態

漿尿膜上への接種細胞数の確認実験として、2022 年度での使用実績のあるメラノーマ細胞株(B16F10 細胞)およびテラトカルシノーマ細胞株(F9 細胞)を用いた。RPMI 培地(Wako)にウシ胎子血清と抗生物質を添加したものをを用いて培養し、Trypsin-EDTA を用いて適宜継代した。細胞の接種は上述の方法に倣い、接種あたりの細胞数は $10^3 \sim 10^6$ 細胞に調整した。解析は上述の通り行なった。

接種後の溶媒動態の確認として漿尿膜上に接種した鶏卵を CT 撮像した。上述の方法にて造影剤(オイパロミン 300 注)を注入し、microCT(RIGAKU)にて撮像を行った。

4. 動物使用について

動物の使用について、山口大学山口地区動物使用委員会の許可を受けた上で実験を行なった(承認番号: 612)。発育鶏卵の使用について、本実験での取り扱い範囲内では SCAW 分類のカテゴリー A に該当し、動物実験に該当しないが、人道的な取り扱いを心がけた。また、試験内容についてはあら

はじめ山口大学山口地区動物使用委員会の許可を受けた上で実験を行なった(承認番号:612)。

■ 結 果

1. ヒト一般細胞株を用いたプロトコルの検証実験

ヒトの一般細胞株として G-361 細胞株を用いて行った(図 1A)。免疫不全マウスの皮下へ細胞を接種したところ、乳白色の腫瘍塊の形成が確認された(図 1B)。組織化学解析を行ったところ、エオジン好性の細胞質に富む細胞の房状の増殖像が認められた(図 1C)。同細胞株はメラノーマの細胞株ではあるものの、*in vitro* および *in vivo* のどちらにおいても肉眼的にメラニンの産生は認められなかった。

構築済みプロトコル(2022 年度成果)に従って漿尿膜上接種を行ったところ、接種 6 日後において接種箇所の漿尿膜内において乳白色の腫瘍様組織の形成が確認された(図 1D)。しかしながら腫瘍の形成率および形成された腫瘍サイズは 2022 年度で用いた細胞株(B16F10 細胞株および F9 細胞株)と比較して低く、小さかった。組織化学解析を行ったところ、漿尿膜内にエオジン好性の細胞質に富む細胞が房状のコンパートメントに分かれて増殖する様子が確認された(図 1E)。また、腫瘍組織内において、ホストのニワトリの赤血球も多数観察された。

この G-361 細胞の *in vitro*(CTL)、皮下接種による腫瘍(SCID)、漿尿膜上接種による腫瘍(CAM)の別でマーカー遺伝子の発現を解析したところ、TYR、MELANA、MTIF の発現が確認された(図 1F)。

以上からヒトの一般細胞株である G-361 細胞でのプロトコルの検証を行い、外挿可能であることを実証した。

2. ヒト iPS 細胞での腫瘍形成試験の実証への取り組み

ヒト iPS 細胞での腫瘍形成試験の実証へ取り組んだ。エピソーマルベクターとセンダイウイルスベクターの 2 種類の方法で樹立したヒト iPS 細胞を用いた(図 2A)。

このヒト iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下へ接種したところ、乳白色の腫瘍塊の形成が確認された(図 2B)。形成された腫瘍塊は小型のものと大型のものの 2 種類に分けられた。組織化学的解析を行ったところ、小型の腫瘍塊は中心部と辺縁部とで構造が異なり、中心部は紡錘形の細胞が密集し、辺縁部は細胞が疎であった(図 2C)。いずれの部位からも典型的な分化した組織像は観察されなかった。一方で、大型の腫瘍塊においては各胚葉に由来する典型的な分化した組織像を含むテラトーマであった。具体的には外胚葉由来として神経ロゼッタ様構造と角化上皮、中胚葉由来として軟骨組織と骨組織、内胚葉由来として腸管様粘膜上皮が観察された。本実験について腫瘍形成までの日数とエンドポイントまでの日数をまとめ、マウス胚性幹細胞との比較を表 1 に示す。マウス ES 細胞は接種 2～7 週後より腫瘍化が確認でき、その後 1～2 週間でエンドポイントまで達するのに対して、ヒト iPS 細胞では接種した一部において 12 週間後に腫瘍形成が確認できるものがある程度であり、腫瘍形成能と増殖の低さが示唆された。

このヒト iPS 細胞を用いて漿尿膜上接種を行ったところ、顕著な腫瘍の形成は確認できず、接種部位の漿尿膜の肥厚が観察されるに留まった(図 2D)。肥厚部位を中心に組織化学的解析を行ったところ、細胞が密集した小結節の形成や部分的な脂肪組織様構造が観察された(図 2E)。

以上、ヒト iPS 細胞でも発育鶏卵の漿尿膜上接種により細胞が生着し、分化した細胞を含む組織を構築することがわかったものの、その形成率はマウスの幹細胞と比較して低かった。

3. 接種細胞数と細胞接種後の動態の確認

ヒト iPS 細胞での腫瘍低形成の結果を受けて、接種細胞数と細胞接種後の動態の解析を行った。接種あたりの細胞数は $10^3 \sim 10^6$ 細胞に調整して漿尿膜上に接種し、形成される腫瘍塊のサイズを肉眼観察により評価した(表 2)。その結果、マウスの腫瘍細胞株の B16F10 細胞や F9 細胞においては接種あたり 10^4 細胞で腫瘍塊の出現が観察されはじめ、 10^5 細胞ではほとんどの漿尿膜で腫瘍が確認でき、 10^6 細胞ではほとんどの漿尿膜で大きな腫瘍塊が確認できることがわかった。一方でヒト iPS 細胞を用いた場合、 10^6 細胞の接種においても漿尿膜の肥厚に留まった。

また接種した溶媒の鶏卵内での分布を CT により撮像したところ、気室の中央部と辺縁部に局在することがわかった(図 3)。これは本研究の G-361 細胞での小結節形成部位と hiPS 細胞での漿尿膜肥厚部と一致した。

■ 考 察

本研究では 2022 年度の助成により確立したマウス胚性幹細胞を用いた漿尿膜上接種法によるテラトーマ形成試験の代替法の新展開として、ヒト誘導多能性幹(iPS)細胞への外挿可能性の探索を行っ

た。

まずヒトの一般細胞株である G-361 細胞を用いてプロトコルの再検証を行い、ヒトの細胞株においても外挿可能であることを確認した。この細胞株はヒトのメラノーマに由来するとされているものの、他のヒトメラノーマ細胞株と比較して腫瘍の増殖や転移能力が低いことが報告されている^{5,6)}。本研究でも 2022 年度に使用実績のある B16F10 細胞や F9 細胞と比較して *in vivo* での腫瘍形成の速度が低いことが観測された。これは本プロトコルが細胞株の *in vivo* での増殖能力を反映していることを示唆している。

次にヒト iPS 細胞を用いた実証試験を行ったところ、免疫不全マウスと漿尿膜上接種のどちらにおいても非常に低い腫瘍形成率を呈したものの、分化細胞の存在を組織化学的手法で確認した。またこれは PCR によるゲノム検出でも支持する結果を得ている(データ示さず)。2022 年度での実績のマウス幹細胞との違いを鑑みたところ、ヒト iPS 細胞の増殖速度が比較的緩徐である点と細胞の懸濁分散時に使用する阻害剤の 2 点が挙げられた。増殖が緩徐である点については上述の G-361 でも腫瘍を形成しづらい傾向になると考察し、ヒト iPS 細胞でも同様であろうと考えた。阻害剤について、分散時の細胞死を抑制する目的で使用したが、接種後にホスト側へ拡散して懸濁液中の濃度が低下したと考えられる。これにより接種した細胞のごく一部のみが生着し、腫瘍形成ではなく漿尿膜の肥厚にとどまったと考えられる。これらの課題を克服するために、接種後の阻害剤などの低分子化合物の拡散動態の解明や分化タイミングの違いによる細胞生着について解明が必要であると考え。一方で、腫瘍形成率については総じて免疫不全マウスと漿尿膜上接種とで一定の相関があることが明らかとなった。

■ 要 約

我々は 2022 年度での助成課題「発育鶏卵を用いたテラトーマ形成試験のバリデーション評価」でマウス胚性幹細胞を用いてテラトーマの代替法の開発を行なった。本研究では確立したプロトコルをさらに発展させてヒト誘導多能性幹(iPS)細胞への外挿可能性を探索した。ヒト iPS 細胞自体の腫瘍形成率が低いため、本プロトコルにおいても腫瘍形成には至らないものの細胞の生着や結節の形成を確認できた。

■ 文 献

- 1) Koyanagi Aoi M., Ohnuki M., Takahashi K., Okita K., Noma H., Sawamura Y., Teramoto I, Narita M., Sato Y., Ichisaka T., Amano N., Watanabe A., Morizane A., Yamada Y., Sato T., Takahashi J., Yamanaka S.(2013) Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110(51), 20569-20574.
- 2) Liu LP., Zheng YW.(2019) Predicting differentiation potential of human pluripotent stem cells : Possibilities and challenges. World J Stem Cells. 11(7) : 375-382.
- 3) 今井啓之(2023)発育鶏卵を用いたテラトーマ形成試験のバリデーション評価、2022 年度研究報告概要集、一般財団法人旗影会、56-62
- 4) Nakagawa M., Taniguchi Y., Senda S., Takizawa N., Ichisaka T., Asano K., Morizane A., Doi D., Takahashi J., Nishizawa M., Yoshida Y., Toyoda T., Osafune K., Sekiguchi K., Yamanaka S.(2014) A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Sci. Rep. 4 : 3594.
- 5) Thies A., Mauer S., Fodstad O., Schumacher U.(2007) Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. Br. J. Cancer. 96(4) : 609-616.
- 6) Vasudevan S., Flashner-Abramson E., Alkhatib F., Chowdhury SR., Adejumobi IA., Vilenski D., Rubinstein AM., Kravchenko-Balasha N.(2021) Overcoming resistance to BRAFV600E inhibition in melanoma by deciphering and targeting personalized protein network alterations. NPJ Precis. Oncol. 5 (1) : 50.

表 1 腫瘍形成とエンドポイントまでの日数

Cell Line	Tumor Formation (Days)	Endpoint (Days)
mES	14	20.8
	26.3	46.3
	45.5	56.0
hiPS	84	100
	-	100
	-	100
	-	100

表 2 接種細胞数ごとの漿尿膜上での腫瘍形成

Cell Line	Injected Cell Number	Tumor Size				Total
		++	+	±	-	
B16F10	10^6	8	2	0	0	10
	10^5	0	14	1	0	15
	10^4	0	2	3	9	14
	10^3	0	0	1	13	14
F9	10^6	8	0	0	0	8
	10^5	4	8	1	0	14
	10^4	0	3	5	5	14
	10^3	0	1	2	11	14
hiPS	10^6	0	0	8	11	19

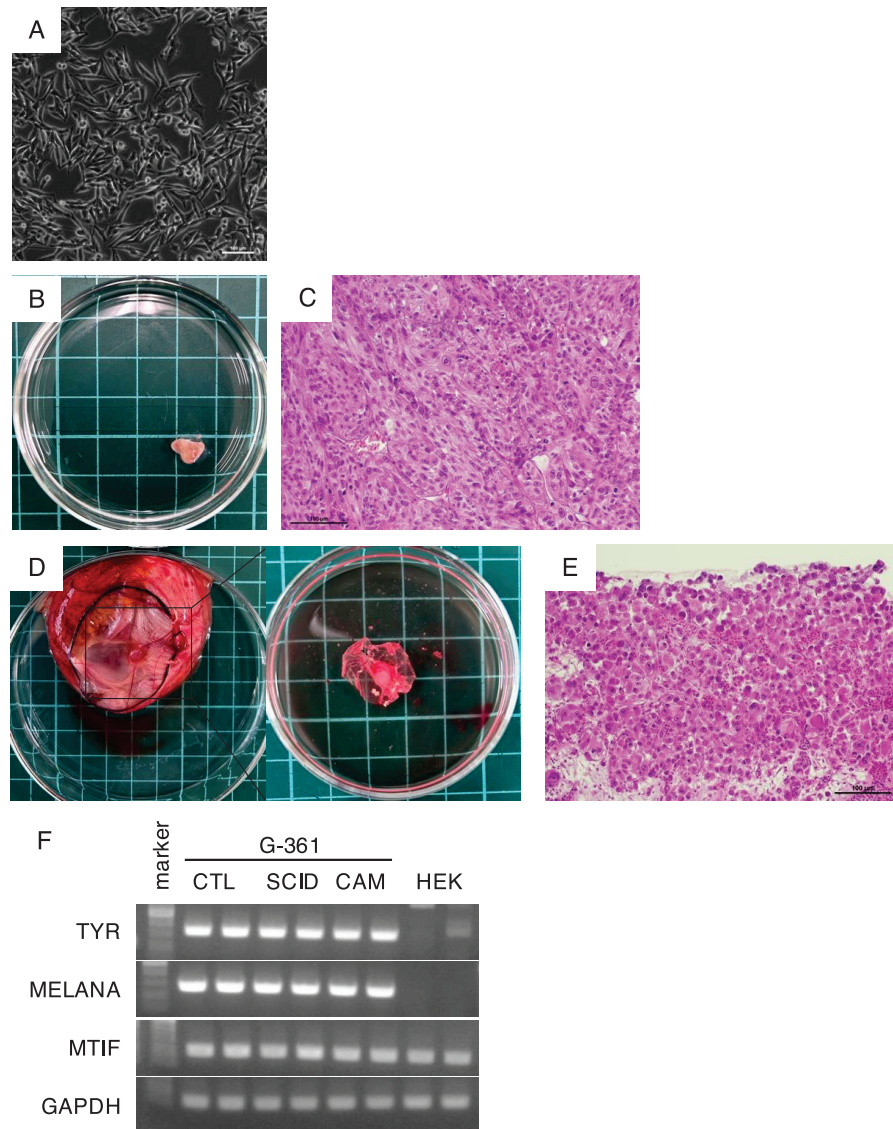


図1 G-361 細胞による腫瘍形成実験

A: 本実験に用いた G-361 細胞の明視野像を示す。

B: 免疫不全マウスの皮下接種により得られた腫瘍塊を示す。

C: 腫瘍塊(皮下接種)の HE 染色像を示す。

D: 漿尿膜上接種により得られた腫瘍塊を示す。

E: 腫瘍塊(漿尿膜上接種)の HE 染色像を示す。

F: マーカー遺伝子の発現解析結果を示す。

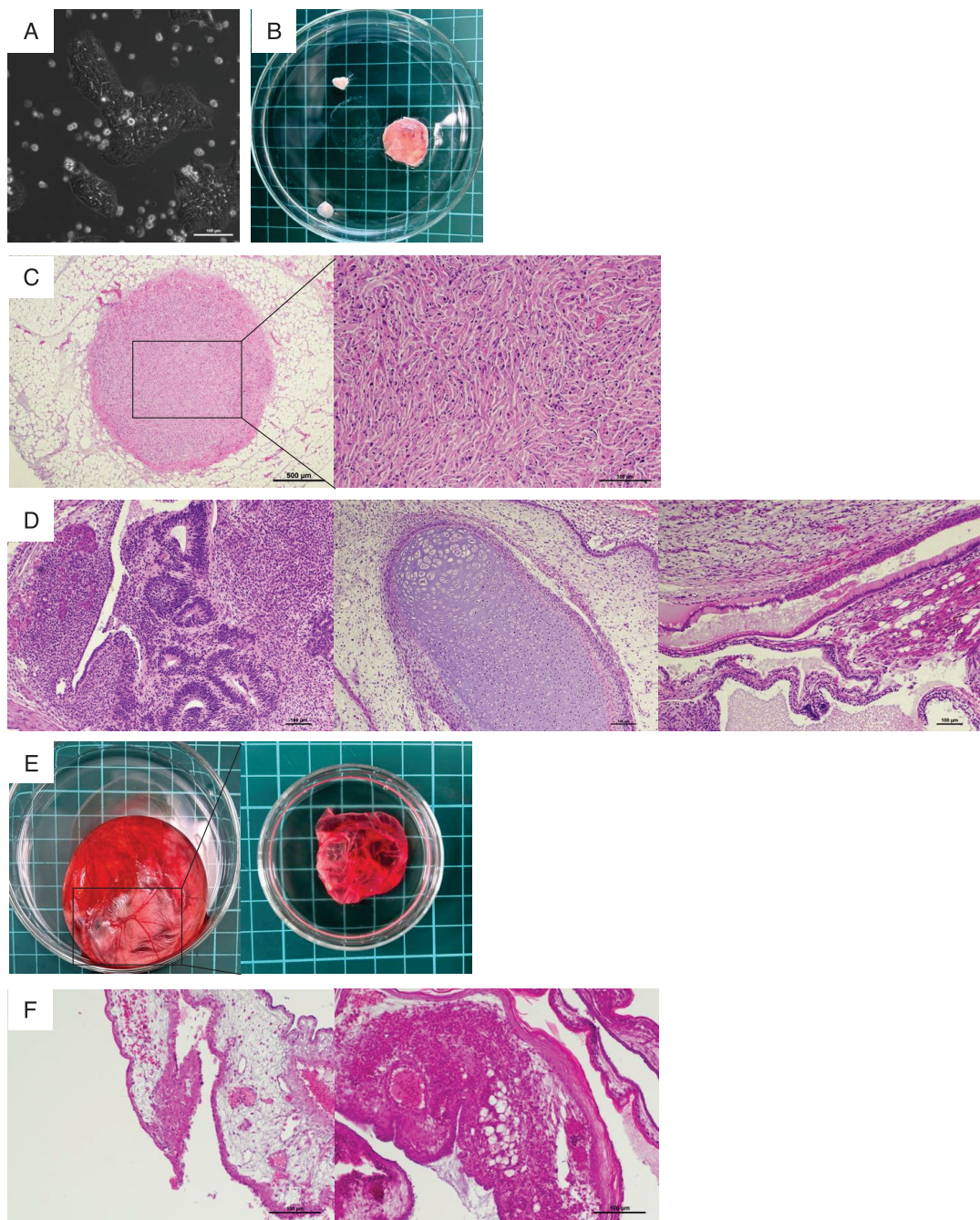


図2 ヒト iPS 細胞による腫瘍形成実験

- A：本実験に用いたヒト iPS 細胞の明視野像を示す。
 B：免疫不全マウスの皮下接種により得られた腫瘍塊を示す。
 C：小型腫瘍塊(皮下接種)の HE 染色像を示す。
 D：大型腫瘍塊(皮下接種)の HE 染色像を示す。
 E：漿尿膜上接種により得られた腫瘍塊を示す。
 F：漿尿膜肥厚部の HE 染色像を示す。

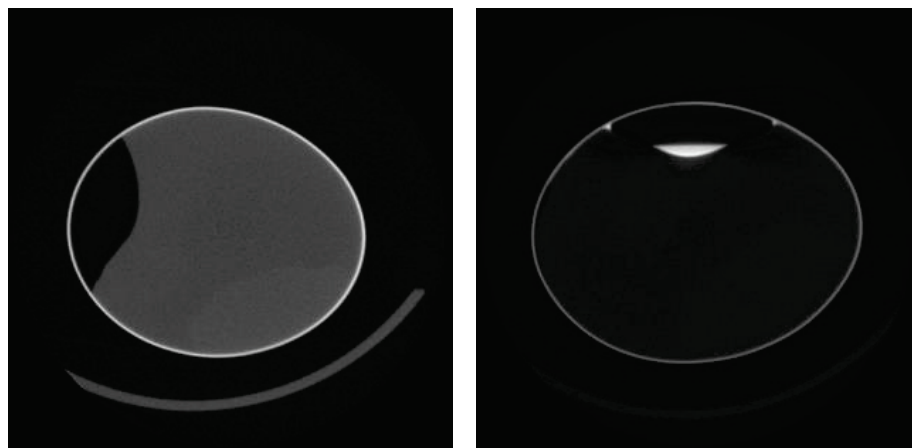


図3 漿尿膜接種モデルのCT撮像
コントロール(左)と漿尿膜接種(右)の鶏卵のCT撮影像を示す。