

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300143

研究課題名（和文） MHC ホモ接合体カニクイザル由来 iPS 細胞の癌化細胞株を使用したサル癌モデル作成

研究課題名（英文） Establishment of a macaque cancer model using cancer cells derived from MHC homozygous macaque iPS cells

研究代表者

小笠原 一誠（OGASAWARA KAZUMASA）

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169163

研究成果の概要（和文）：

特定の MHC haplotype である Mafa-HT1 を homozygous に有するカニクイザル由来 iPS 細胞の分化誘導を試みた後に、種々の癌遺伝子を導入し癌細胞株（胎児性癌 PTY、膠芽腫 NPC#5PR2）を作製した。これらは免疫不全マウスである NOG マウスに移植すると腫瘍を形成した。PTY を Mafa HT-1 heterozygous カニクイザルの皮下、卵巣、肝臓、腹腔内に移植したところ、いずれも 4 週間後に拒絶が確認された。一方、NPC#5PR2 については、カニクイザルの免疫学的特権部位である脳内に移植する準備を現在進めている。

研究成果の概要（英文）：

We made somatic cells from iPS cells derived from cynomolgus macaque, which homozygously had a certain haplotype of major histocompatibility complex (Mafa-HT1). And then, we transduced oncogenes to the differentiated cells resulting in establishment of malignant cells, an embryonal carcinoma PTY and a glioblastoma NPC#5PR2. These two cancer cell lines could make tumors in NOG mouse. We transplanted PTY cells into subcutaneous, ovary and abdominal cavity of a cynomolgus macaque with heterozygous MHC. However, all PTY cells were rejected after 4 weeks post transplantation. On the other hand, we are transplanting NPC#5PR2 cells into an immune privilege site, brain, of a Mafa HT-1 heterozygous monkey.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	10,300,000	3,090,000	13,390,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：iPS 細胞、カニクイザル、癌、MHC

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

担癌マウスモデルを用いた癌研究は古くから行われているが、その結果が直接臨床患者に応用する事が出来ない場合が多い。これはマウスとヒトの遺伝学的相同性（平均して85%程、カニクイザルとヒトの遺伝学的相同性は95%）によると推定される。

癌治療・抗癌剤のより効率的な効果の検討や革新的な癌治療の開発の為には、ヒトに近い実験動物であるカニクイザルを用いた担癌モデルでの実験的検討が必要不可欠と考えられる。

当大学では主要組織適合遺伝子複合体(MHC)の特定のハプロタイプ(Mafa-HT1)の homozygous カニクイザルを飼育維持している。理論上、Mafa-HT1 homozygous サル iPS 由来細胞は、Mafa-HT1 heterozygous サルに拒絶反応を起こす事なく移植可能である。この iPS 細胞を用いて様々な体細胞を分化誘導し、それを癌化させる事で移植可能な癌細胞株を作製出来る。またこの癌細胞株をカニクイザルに移植する事で、効率よく担癌カニクイザルモデルを作製できると考えられる。

2. 研究の目的

解剖学的にも、遺伝学的にもヒトにより近いとされるカニクイザルを用いて担癌モデルを作製し、癌の新規治療の開発に役立てる。

3. 研究の方法

レトロウイルスもしくはセンダイウイルスを用いて山中4因子(cMYC, OCT3/4, KLF4, SOX2)を導入し作成した Mafa-HT1 homozygous のカニクイザル由来 iPS 細胞を用いて実験を行なった。

(1) Mafa-HT1 homozygous カニクイザル由来 iPS 細胞を用いて、造血幹細胞と神経前駆細胞を誘導した。造血幹細胞の誘導は、胚葉体(embryonic body, EB)を作製した後に、ゼラチンコートシャーレにマウスの間葉系幹細胞である C3H10T_{1/2} とともに VEGF, SCF を加えて共培養し 14 日間培養分化させた。神経前駆細胞の誘導は、EB を作製後、マトリゲルをコートしたシャーレに移し、ウシ血性含有培地に dorsomorphin と SB431542, bFGF を加えた培地で 14 日間培養分化させた。

(2) これらの誘導した細胞にテロメラーゼ活性を維持する hTERT 遺伝子、細胞周期を進める CDK4 遺伝子、そして癌抑制遺伝子である p53 を dominant negative に抑制する p53CT 遺伝子を、レトロウイルスを用いて遺伝子導入し不死化細胞株を作製した。これらの遺伝子導入の際には、薬剤耐性遺伝子も同時に発現するようにしており、不死化細胞は薬剤にて選択できた。また不死化した細胞は、PCR で遺伝子の発現を確かめ、FACS と蛍光免疫染色を用いて表面マーカーを確かめた。

(3) 誘導した不死化細胞株に癌遺伝子である RasV12, PI3CAmutant, cMYC を更に遺伝子導入し、癌細胞株を作製した。未分化間葉系細胞由来の癌細胞株を PTY、神経前駆細胞由来の癌細胞株を NPC#5PR2 とそれぞれ名付けた。また、これらの癌細胞の、*in vitro* での腫瘍形成能、*in vivo* での腫瘍形成能をそれぞれ、寒天培地(soft-agar assay)と免疫不全マウス(NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null} mouse、NOG マウス)を用いて確認した。

(4) NOG マウスから腫瘍を単離し、その組織型を、HE 染色標本と免疫組織化学染色、

FACS を用いて決定した。また採取した腫瘍からもう一度細胞を単離し、in vitro に戻して培養した。

(5) Mafa HT-1 heterozugous カニクイザル 2頭の皮下、卵巣、肝臓にそれぞれ 2×10^7 個の PTY 細胞をマトリゲルと共に移植した。2頭のうち1頭は、移植4週間前からシクロスポリンAを筋肉注射することで、免疫抑制を行った。さらに別の1頭のサルには、マトリゲルを用いず、それぞれ 2×10^7 個と 1×10^7 個の PTY 細胞を皮下と腹腔内に移植した。合計3頭のカニクイザルに移植した。

4. 研究成果

造血幹細胞の誘導では、14日目には造血幹細胞と考えられる浮遊系細胞が見られ、またiPS由来と考えられる付着系細胞も見られた。神経前駆細胞の誘導でも、14日目には細長い足を伸ばす星芒状の神経様細胞が誘導された。

これらの誘導された細胞に、レトロウイルスを用いて、hTERT と p53CT、CDK4 遺伝子を導入し、不死化を試みた。

造血幹細胞に遺伝子を導入した細胞は、予想に反して付着系の細胞が増殖して来た。これらの細胞はFACSによる解析で、CD90、CD44、CD29等の幹細胞マーカーを有しており、蛍光免疫染色でvimentin陽性であり、未分化間葉系細胞(図1)と考えられた。

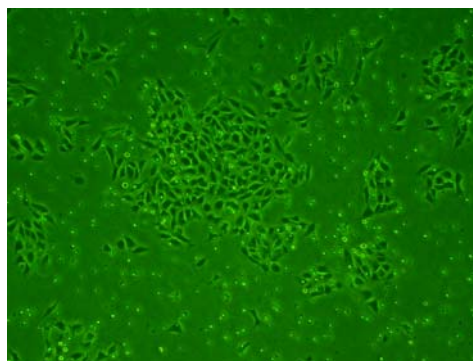


図1；未分化間葉系幹細胞

神経前駆細胞に遺伝子を導入した群では、5つの不死化細胞株を得る事が出来た(図2)。これらは、神経幹細胞マーカーであるNestinや β -3-tubulinが陽性であった。またPCRにより、Musashi1やNeurofilament Mの発現も確かめられた(図3)。



図2；神経前駆細胞

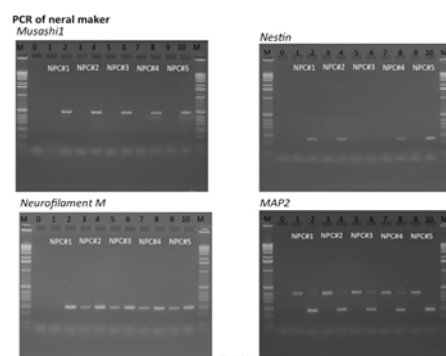


図3；#1～#5の5株に於けるNeural markerのPCR結果。

未分化間葉系細胞には当初、RasV12 と PI3CAmutant を導入したが、Soft agar assay にてコロニーの形成が見られず、腫瘍原性が無いと考えられた。そこで cMYC を遺伝子導入したところコロニーの形成が見られた。そこで、免疫不全マウスである NOD/Shi-*scid*, IL-2R γ ^{null} mouse (NOG マウス) に移植したところ、腫瘍形成が認められた。しかしこれらの腫瘍は小さく、成長も遅かった為、腫瘍から単離し培養した細胞にもう一度 PI3CAmutant を遺伝子導入したところ、Soft agar assay にて多数のコロニー形成が見られた (図 4)、NOG マウスでも巨大な腫瘍を形成した (図 5)。

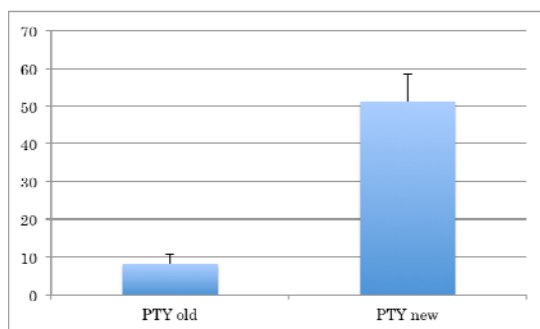


図 4 ; PTY の Soft agar assay。PTY old が当初誘導出来た癌細胞株。PTY new が PI3CAmutant を再度導入した細胞株。



図 5 ; PTY の NOG マウスでの腫瘍の形成。左は当初誘導出来た癌細胞株。右が PI3CAmutant を再度導入した細胞株。

神経前駆細胞は実際の脳神経腫瘍に見られる PI3CAmutant と cMYC を遺伝子導入し、癌化を試みたが、soft agar assay でコロニーを形成出来なかった。そこで RasV12 を追

加したところ、soft agar assay でコロニー形成がみられた。しかし、この細胞を NOG マウスの皮下に移植したが、腫瘍の形成は見られなかった。そこで、もう一度 PI3CAmutant と RasV12 を遺伝子導入したところ、soft agar assay で著明なコロニー形成の増強が見られ (図 6)、NOG マウスでも腫瘍の形成が見られた (図 7)。

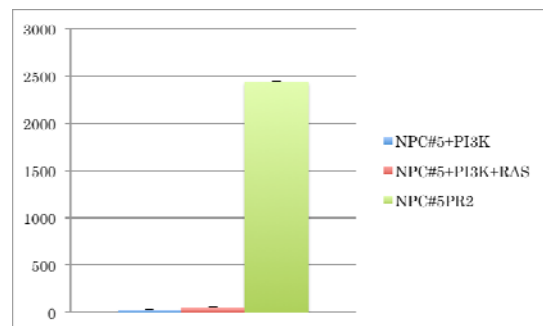


図 6 ; NPC#5PR2 の Soft agar assay。PI3CAmutant と RasV12 を再度導入した細胞株では著明なコロニー数の増加が見られた。



図 7 ; NPC#5PR2 の NOG マウスでの腫瘍形成。

PTY と NPC#5PR2 が NOG マウスに形成した腫瘍を回収し、その組織型を決定した。PTY は未熟な上皮様細胞がシート状に増生しており、一部は管腔様構造を示した。また間質にも腫瘍細胞と考えられる小型の異型細胞が増生しており、これらがなだらかに移行している部分も見られた (図 8)。免

疫組織化学染色では、CD30 陽性、PLAP 陽性、OCT3/4 陽性、AFP 陽性であった (図 9)。HE 染色とあわせて、胎児性癌で矛盾しない所見と考えられた。

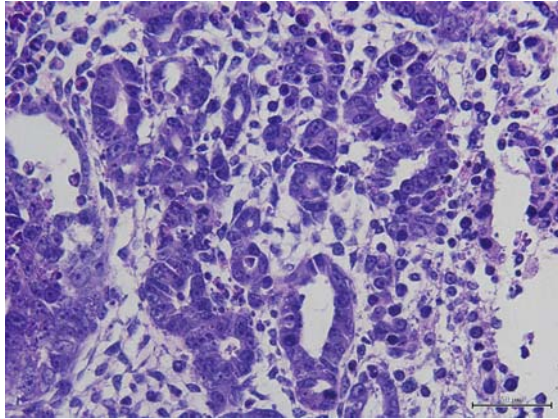


図 8 ; PTY の HE 染色標本

抗体名	染色の有無	抗体名	染色の有無
AE1/AE3	positive	CD99	negative
Vimentin	positive	calretinin	negative
CK5/6	negative	D2-40	Partly positive
S-100	Partly positive	EMA	negative
HLA-I	Low positive	AFP	Partly positive
NCAM	Partly positive	OCT3/4	Partly positive
CD34	negative	CD44v6	negative
CD68	negative	PLAP	Slightly positive
CD30	Positive (FACS)		

図 9 ; PTY の免疫組織化学染色の結果のまとめ。

NPC#5PR2 は NOG マウスの皮下で腫瘍形成が見られたものの、その組織型は神経系の腫瘍とはほど遠かった (図 10)。そのため、今度は NOG マウスの脳に移植したところ、約 40 日後にマウスが死亡した。

死亡したマウスの脳を摘出し HE 染色標本の作製と、免疫組織化学での解析を行った。その結果、移植した NPC#5PR2 は脳内で増生しており、典型的ではないが、膠芽腫を疑う所見であった (図 11)。また免疫組織化学染色で、GFAP 陽性 (図 12) であり、膠芽腫に矛盾しないと考えられた。

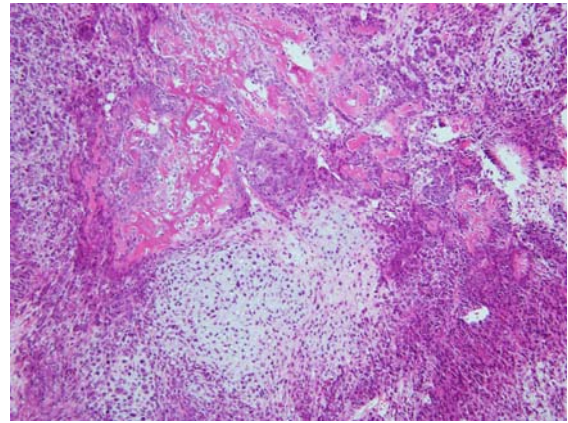


図 10 ; NPC#5PR2 の NOG マウスに皮下移植した際にできた腫瘍の HE 染色標本。異型を伴う軟骨や骨の形成が見られ、神経系の腫瘍よりは、骨肉腫が疑われた。

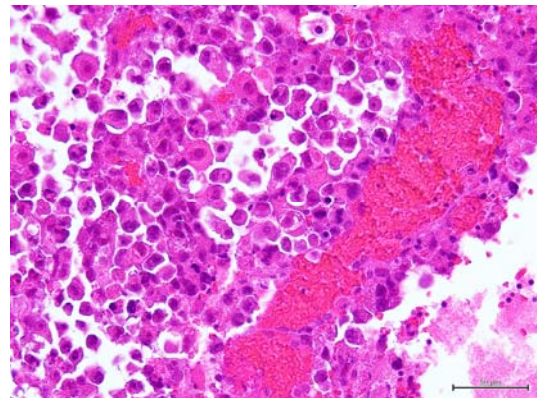


図 11 ; NPC#5PR2 の NOG マウスに脳内に移植した際の HE 染色標本。脳内で小型異型細胞が増生していた。

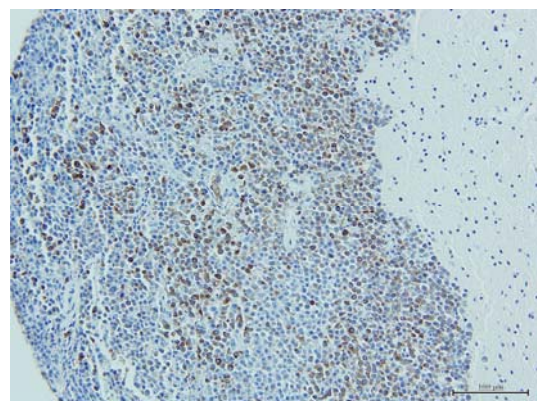


図 12 ; NPC#5PR2 の NOG マウスに脳内に移植した際の GFAP の免疫組織化学染色。

NOG から採取した PTY 腫瘍をもう一度 vitro で培養し増殖させた後、Mafa HT-1

heterozugous カニクイザルの皮下、卵巣、肝臓にマトリゲルと共に移植したところ、いずれの場所についても2週間までは腫瘍の増大が確認出来たが、4週間後に拒絶が確認された。免疫抑制剤であるシクロスポリンを投与後したサルにも同様に移植したところ5週間で拒絶された。

拒絶の原因にマトリゲルによる免疫反応の惹起を考え、別のカニクイザルにマトリゲルを用いずに同様に皮と腹腔内に移植した。しかし結果は同様であった(図13)。

宿主の免疫反応に伴うPTYの拒絶を考え、これらのカニクイザルの血漿を用いて、PTY腫瘍を染色しFACSにて解析した。移植前の血漿ではPTYは染色されなかったが、移植後4週目の血漿ではPTYの染色が確認された(図14)。移植後のカニクイザルの血液中に、抗PTY抗体が誘導されていたと考えられた。更にMafa HT1 homozygous カニクイザル由来線維芽細胞を同様に染色したが、移植前、移植後の血漿のいずれでも染色が確認出来なかった(図15)。そこで、その線維芽細胞にPTYを作製した際に用いたのと同様の方法で、hTERT、CDK4、p53CTの遺伝子を導入したところ、移植前の血漿ではPTYは染色されなかったが、移植後4週目の血漿ではPTYの染色が確認された(図16)。これらの遺伝子発現に伴う変化が、抗原性を誘導したため、PTYの拒絶につながったと考えられた。

この手法を用いた癌細胞株の移植にはより強力な免疫抑制が必要であると考えられ、臓器移植に準じた免疫抑制法を使った移植を現在準備中である。また、NPC#5PR2については、カニクイザルの脳内に移植する準備を現在進めている。脳内は免疫学的特権部位であり、免疫抑制は必要ないと考えている。



図13;PTYのカニクイザル皮下移植部位。上段が移植後1週後、下段が移植後4週後。4週目には退縮した。

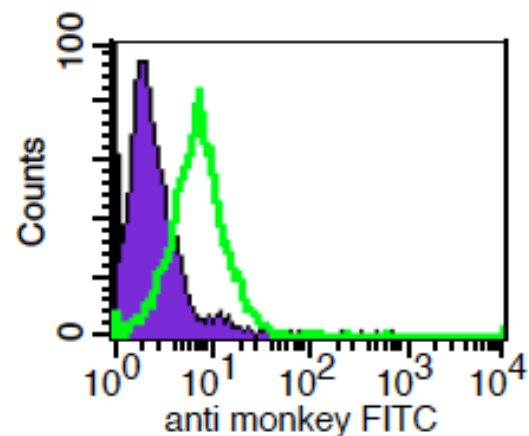


図14;カニクイザルの血漿を用いたPTYの染色。紫が移植前の血漿。緑が移植後4週目の血漿。移植後4週目でPTYに対する抗体が存在していた。

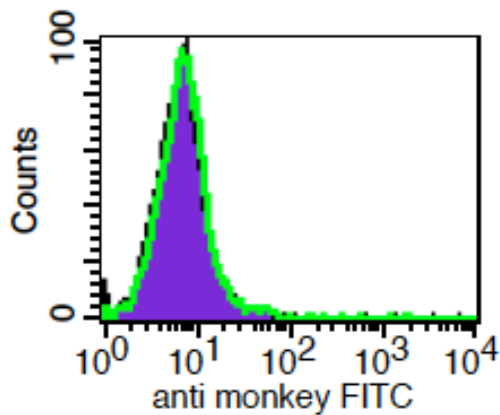


図 15; カニクイザルの血漿を用いた Mafa HT1 homozygous カニクイザル由来線維芽細胞の染色。紫が移植前の血漿。緑が移植後 4 週目の血漿。線維芽細胞に対する抗体は存在しなかった。

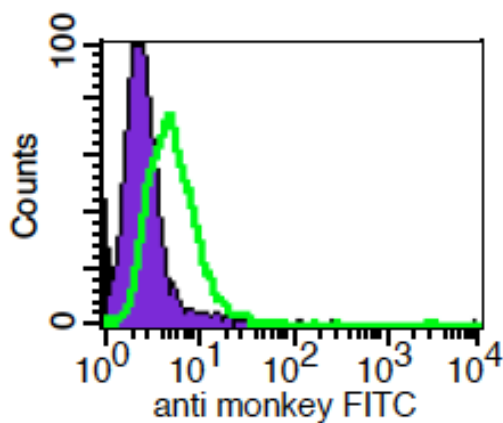


図 16 ; カニクイザルの血漿を用いた不死化 Mafa HT1 homozygous カニクイザル由来線維芽細胞の染色。紫が移植前の血漿。緑が移植後 4 週目の血漿。線維芽細胞を不死化する事で、PTY と同様の染色性が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Nakamura S, Tsuchiya H, Okahara N, Nakagawa T, Ohara N, Yamamoto H, Li T-C, Takeda N, Ogasawara K, Torii R.

Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. J. Vet. Med. Sci. 74, 279-283, 2012. DOI: 10.1292/jvms.11-0394 (査読有り)

(2) Arikata M, Itoh Y, Okamatsu M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K. Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A*052:02. PLoS ONE 7, e37220, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0037220 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 石垣宏仁、仲山美沙子、伊藤靖、小笠原一誠 : カニクイザル iPS 細胞由来癌細胞株を用いた、担癌カニクイザルモデルの作製、第 102 回病理学会総会、2013 年 6 月 (札幌)

(2) 椎名隆、小笠原一誠、鳥居隆三等 : カニクイザル MHC ホモ接合体の特定、第 19 回日本組織適合性学会、2010 年 9 月 (東京)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：カニクイザル MHC 全遺伝子ホモ接合体
を作成するためのキット及び方法

発明者：小笠原一誠、鳥居隆三、椎名隆

権利者：滋賀医科大学

種類：特願

番号：2010-105956

出願年月日：平成 22 年 4 月 30 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqpatho2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 一誠 (OGASAWARA KAZUMASA)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169163

(2) 研究分担者

伊藤 靖 (ITO YASUSHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

石垣 宏仁 (ISHIGAKI HIROHITO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90432301

鳥居 隆三 (TORII RYUZO)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・
教授

研究者番号：50106647

(3) 連携研究者

椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：00317744