

令和元年6月12日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05447

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞からのゼノフリー間葉系幹細胞誘導法と維持培養法の開発

研究課題名(英文) Development of a xeno-free induction and maintenance protocol for MSCs from PSCs

研究代表者

池谷 真 (IKEYA, Makoto)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：20442923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：将来の再生医療や創薬研究に資する安全な間葉系幹細胞をiPS細胞から効率的に得る方法を確立するため、異なる3つの細胞系譜(神経堤細胞と神経細胞と中胚葉細胞)を経由して間葉系幹細胞を誘導するゼノフリーの方法の開発を行った。また、同一ロットの細胞を大量に得るため、中間段階の細胞の拡大培養・凍結保存法の開発を試みた。誘導された間葉系幹細胞の品質は、骨・軟骨・脂肪への分化能で比較・評価した。神経堤細胞と中胚葉細胞を経由した分化誘導法の確立に成功し、神経細胞を経由した分化誘導法の確立には一部成功した。拡大培養については神経細胞について成功し、神経堤細胞、中胚葉細胞、間葉系幹細胞については一部成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞は既に細胞移植治療などの臨床応用に使用されている有用な細胞であるにも関わらず、その分子的な実態はあまりよく分かっていない。そもそも現在の間葉系幹細胞の定義は極めて定性的であり、多種多様な細胞が含まれるため、間葉系幹細胞の本質を捉えているとは言い難い。本申請により3種類の間葉系幹細胞のうち、少なくとも神経堤細胞と中胚葉細胞について、間葉系細胞への文化誘導に成功した。最終産物の比較についてはまだ十分ではないが、これらの細胞を分化能、および遺伝子発現などによって分類する、さらに成体由来の間葉系幹細胞とも比較することによって、間葉系幹細胞の本質を明らかにできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aiming to the future regenerative medicine and drug discovery research, we have tried to establish efficient xeno-free induction methods for mesenchymal stem cells from iPS cells through three different cell line lineages; neural crest cells, neural cells and mesodermal cells. In addition, in order to obtain a large amount of cells in the same lot, we have tried to develop expansion culture and cryopreservation methods for neural crest cells, neural cells and mesodermal cells. The quality of the induced mesenchymal stem cells was compared and evaluated in their ability to differentiate into bone, cartilage and fat. We succeeded to establish induction methods via neural crest cells and mesodermal cells, and partially succeeded to establish an induction method via nerve cells. The expansion culture was successful for neurons, and partially successful for neural crest cells, mesodermal cells, and mesenchymal stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞とは、成体の骨髄、脂肪、滑膜、歯髄、臍帯血などに存在し、骨・軟骨・脂肪へと分化する能力のある細胞集団である。最近の研究により、間葉系幹細胞から分泌される因子によって免疫抑制作用や周辺細胞の活性化などが生じることが示されてきており、細胞移植治療の細胞源として有望視されている。

一方で、骨髄中に存在する間葉系幹細胞は新生児においても 1/10<sup>4</sup> 程度と非常に稀であり、また初代培養系での増殖や分化能に個人差があるため、必要に応じて十分な細胞数を迅速に供給することが難しい。また、間葉系幹細胞は「幹」細胞という名称がついているが、現行の培養法では骨・軟骨・脂肪への多分化能を維持したまま継代培養することができず、10 回程度の継代培養後に老化を起こして分裂を停止することが分かっている。

これらの問題を根本的に解決するため、申請者はヒト多能性幹細胞から段階的に間葉系幹細胞へと分化誘導するゼノフリーの方法の確立（図 1 A）、中間段階の細胞や間葉系幹細胞の拡大培養・保存法の開発（図 1 B）、およびそれぞれの分化能の比較（図 1 C）を申請研究として提案した。

これまでの研究により、間葉系幹細胞の起源には神経堤細胞、神経細胞、中胚葉細胞の 3 種類が存在すると考えられている。2014 年に申請者らは、間葉系幹細胞の起源細胞の 1 つである神経堤細胞を、化学合成培地と低分子化合物を組み合わせることで、ヒト多能性幹細胞から約 80% の高効率で誘導する簡便な方法の開発に成功した(Fukuta et al., 2014, PLOS ONE)。誘導された神経堤細胞は、EGF(上皮成長因子)と FGF(線維芽細胞増殖因子)を含む化学合成培地で 20 回以上の継代培養と凍結保存が可能であり、かつこの細胞を間葉系幹細胞培地で培養することにより骨・軟骨細胞へ分化能を持つ間葉系の細胞へと分化誘導することに成功していた。しかし同時に、この間葉系の細胞は、脂肪への分化能が低いという予備的結果が得られていた。これらの結果は、図 1 で示す本申請研究のうち神経堤細胞を誘導し（①A）、拡大培養法の開発に成功し（①B）、骨・軟骨分化能は持つが脂肪への分化能が低いという特徴を持つ間葉系幹細胞（④C）への分化誘導法の開発に成功したことを示していた。

申請者らはさらに、別の小分子化合物と成長因子を化学合成培地に加えることにより、中胚葉組織の 1 つである沿軸中胚葉細胞をヒト iPS 細胞から誘導することに成功し、さらにこの細胞をセルソーターにより選別可能な表面抗原も同定していた（③A）(未発表データ)。また、予備的実験ではあるが、この中胚葉細胞から間葉系の細胞を誘導し、その細胞が骨へと分化する能力を持っていることを示していた（③→④）(未発表データ)。

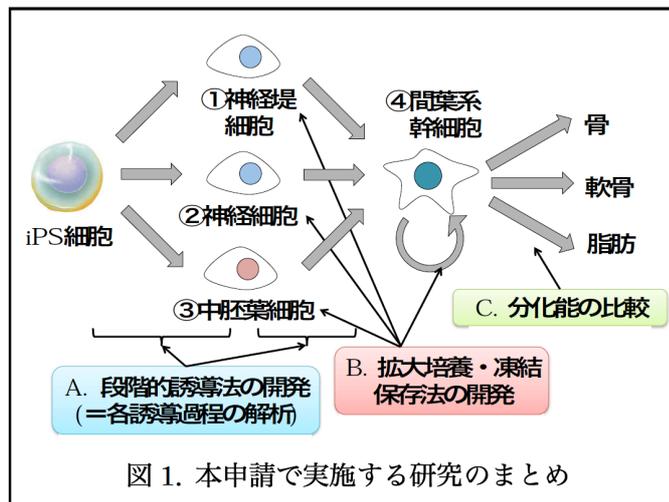


図 1. 本申請で実施する研究のまとめ

2. 研究の目的

本研究では、異なる 3 つの細胞系譜（神経堤細胞と神経細胞と中胚葉細胞）を経由して間葉系幹細胞を誘導するゼノフリーの方法を開発することで、将来の再生医療や創薬研究に資する安全な間葉系幹細胞を iPS 細胞から効率的に得る方法を確立することを第 1 の目的とした。また、中間段階の細胞の拡大培養・凍結保存法を開発することで、同一ロットの細胞の大量取得、および品質評価を可能とすることを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、平成 28~30 年度の 3 年計画で実施した。実施内容としては、

	A	B	C
	分化誘導法の確立	拡大培養・凍結保存法の開発	分化能の比較
① 神経堤細胞	開発済	一部開発済	それぞれの間葉系幹細胞の分化能の相互比較、および成体由来間葉系幹細胞との分化能の比較
② 神経細胞	本申請研究	本申請研究	
③ 中胚葉細胞	開発済	一部開発済	
④ 間葉系幹細胞	一部開発済	本申請研究	

表 1. 本申請で研究対象とする細胞集団

- ①神経堤細胞
- ②神経細胞
- ③中胚葉細胞（特に沿軸中胚葉細胞）
- ④そこから分化誘導される間葉系幹細胞

の4つの細胞種について、

- A. 誘導過程の分子作用機序の解明：mRNA およびタンパク質の網羅的発現解析を行う。
- B. 幹細胞を規定する分子実態の解明：それぞれの細胞種の維持培養条件を、京都大学 iPS 細胞研究所が保持する化合物ライブラリーを用いてスクリーニングする。得られた培養条件で維持培養した細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、幹細胞を規定する分子実態を探る。
- C. 間葉系幹細胞の分化能の比較：間葉系幹細胞の品質を骨・軟骨・脂肪への分化能で評価する。

の3項目の研究をそれぞれ実施した。

#### 4. 研究成果

##### ①神経堤細胞研究：

(A) 誘導過程の分子作用機序の解明を目的とした網羅的遺伝子発現解析として、マイクロアレイおよび RNAseq を実施した。解析の結果、これまでに開発した神経堤細胞誘導法では、まず iPS 細胞から神経外胚葉が誘導され、次に神経堤細胞が誘導されるという、実際の発生段階に沿った過程を経て誘導されることを示唆するデータが得られた。さらに解析の結果から、拡大培養中に神経堤細胞の重要な1つのマーカーである SOX10 遺伝子が減少するという現象が観察された。本件についてはパスイ解析などにより SOX10 発現減少の作用機序の探索を試みたが、有益な情報は得られなかった。しかし、別研究経費で培養皿表面の気質の固さを調整した際に SOX10 遺伝子の減少が一部抑制されるという予備的データが得られており、本申請研究終了後も継続して研究を行う予定である。

(B) 神経堤細胞で特異的に発現する SOX10 の遺伝子座に GFP 遺伝子をノックインした iPS 細胞の作製を行い、成功した。この iPS 細胞から神経堤細胞を誘導し、SOX10 の発現を維持するような拡大培養条件を探索するためにスクリーニングを行った。実際にシグナル分子に焦点を絞り、いくつかの分子についてミニスクリーニングを行ったが、有効な条件の同定には至らなかった。しかし、得られた知見と、さらに別経費での研究により培養方法を根本的に見直すことで、SOX10 遺伝子発現を維持したまま拡大培養する方法の確立に成功したため、本申請による研究は一旦中止とした。

(C) 神経堤由来の間葉系幹細胞の骨、軟骨、脂肪への分化能で検証したところ、申請時にすでに得られていた予備的な実験の通り、脂肪への誘導能は常に低い事が分かった。また、軟骨には最も再現性よく分化したのに対し、骨への分化は使用する誘導培地によっては実験回により再現性にばらつきがある事が判明した。

##### ②神経細胞研究：

(A) 様々な候補化合物の組み合わせによる培養を行うことで、新しい誘導方法を探索し、これまでにない新しい神経細胞への分化誘導法を確立することに成功した。この培養法では特に後脳の神経幹細胞が誘導されていることが遺伝子発現解析から判明した。

(B) また、神経特異的マーカーとして SOX1 遺伝子座に GFP を組み込んだノックイン iPS 細胞を作製し、神経幹細胞としての検出を簡易にした。さらにこの SOX1-iPS 細胞を用い、拡大培養後にも SOX1 が維持されること、また維持培養後も神経への分化能が維持されていること（神経幹細胞としての証明）を明らかにした。

(C) 間葉系幹細胞への分化能については、現在検討中である。

##### ③中胚葉細胞研究：

(A) これまでに確立した誘導法の誘導過程を、マイクロアレイにより網羅的に解析した。解析の結果、4日目に未分節体節中胚葉が、7日目に体節中胚葉が優位に誘導されていることが分かった。また、分化誘導法の際に使用していた動物由来成分の排除（ゼノフリー化）に成功した。

(B) 化合物ライブラリーを使ったミニスクリーニングによる維持培養法の開発を行った。特に中胚葉細胞については発生学的な知見により FGF シグナル、WNT シグナル、BMP シグナルが重要な役割を担っていることがわかっているため、これらのシグナルの複数の組み合わせによる維持培養条件の検討を行った。しかし、維持培養可能な培地条件を見出すことはできなかった。

(C) 血清を使った間葉系幹細胞培地を用いることで、間葉系幹細胞への誘導に成功した。得られた間葉系幹細胞は、神経堤由来間葉系幹細胞と同様に脂肪への分化誘導能が低いことが判明した。

##### ④間葉系幹細胞研究：

(A) 間葉系幹細胞への分化誘導法として、以前の研究で使用していた血清入り培地から、動物由来成分を含まない培地（ゼノフリー培地）への置換を行った。血清代替物などを用いた自作培地と、販売されているゼノフリー培地を数種類検討し、最終的に市販培地の1つが、神経堤細胞および中胚葉細胞から高効率に間葉系幹細胞へと分化誘導可能なことが分かった。

(B) しかし同時に、10 回程度の拡大培養までは可能であるが、それ以上は増殖が停止することが判明した。また網羅的遺伝子発現解析により、神経堤細胞由来間葉系幹細胞のみで発現している特徴的な遺伝子を幾つか同定することに成功した。しかし、それらの遺伝子群がどういった特徴を決定しているのかについては解析に至っておらず、今後の検討課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

① Hino K, Zhao C, Horigome K, Nishio M, Okanishi Y, Nagata S, Komura S, Yamada Y, Toguchida J, Ohta A, **Ikeya M\***. An mTOR Signaling Modulator Suppressed Heterotopic Ossification of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Stem Cell Reports*. 2018 Nov 1. pii: S2213-6711(18)30430-2. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.10.007.

② Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata S, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, **Ikeya M\*** Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells. *Development*. 2018 145: dev165431 doi: 10.1242/dev.165431 Published 23 August 2018.

③ Zhao C and **Ikeya M**. Generation and Applications of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2018 Jul 31; 2018:9601623. doi: 10.1155/2018/9601623. (Review)

④ Chijimatsu R, **Ikeya M**, Yasui Y, Ikeda Y, Ebina K, Moriguchi Y, Shimamura K, Hart DA, Yoshikawa H and Nakamura N. Characterization of Mesenchymal Stem Cell-Like Cells Derived From Human iPSCs via Neural Crest Development and Their Application for Osteochondral Repair. *Stem Cells Int*. 2017;2017:1960965. doi: 10.1155/2017/1960965. Epub 2017 May 10.

⑤ Horikiri T, Ohi H, Shibata M, **Ikeya M**, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S, Sato T. SOX10-Nano-Lantern Reporter Human iPS Cells; A Versatile Tool for Neural Crest Research. *PLoS One*. 2017 Jan 20;12(1):e0170342.

⑥ 中島大輝、**池谷 真** 「iPS 創薬×ドラッグリポジショニング」による進行性骨化性線維異形成症の治療薬開発 ファルマシア 2019 年 3 月 1 日 vol. 55 No. 3, 199- 203, 公益社団法人日本薬学会 (2019)

⑦ **池谷 真** 進行性骨化性線維異形成症の発症機構の解明 日本再生医療学会雑誌 再生医療 vol. 17 No. 4, 77-82, メディカルレビュー社 (2018)

⑧ 日野恭介、戸口田淳也、**池谷 真** FOP 患者由来 iPS 細胞を用いた創薬 医学のあゆみ 2018 年 9 月 8 日 vol. 266 No. 10, 796-797, 医歯薬出版株式会社 (2018)

⑨ 日野恭介、**池谷 真** 患者特異的 iPS 細胞由来間葉系細胞を用いた創薬スクリーニング 創薬のための細胞利用技術の最新動向と市場, 第 II 編 第 1 章 6, 株式会社シーエムシー・リサーチ (2018)

⑩ **池谷 真**、日野恭介、松本佳久、福田誠、戸口田淳也 間葉系幹細胞疾患としての進行性骨化性線維異形成症 実験医学増刊 Vol.34 No.17, 145(2913)-151(2919), 羊土社 (2016)

〔学会発表〕(計 19 件)

【招待講演】

① 上谷 大介、赤星 哲平、竹中 菜々、加治屋 幹人、櫻井 英俊、栗原 英見、**池谷 真** ヒト iPS 細胞を用いた神経堤細胞を介する間葉系幹細胞の分化誘導と特性解析 第 18 回日本再生医療学会 シンポジウム 40 / 新しい生体分子機構から考える恒常性と再生医療 神戸国際会議場 2019/03/21-23

② **池谷 真** 患者由来 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解析と創薬応用 日本動物実験代替法学会 第 31 回大会 シンポジウム 3 「創薬研究におけるヒト iPS 細胞技術の応用」 崇城大学 2018/11/24

③ **池谷 真** 疾患特異的 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症に対する創薬 第 4 回日本筋学会学術集会 シンポジウム 4 「運動器疾患の病態理解から治療法へ ~ iPS 細胞技術の中

④ 池谷 真 患者由来 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解析と創薬応用 第 25 回 HAB 研究機構学術年会 シンポジウム 2「The cell engineering; iPS 由来細胞からオーガノイドまで」 産業技術総合研究所筑波センター共用講堂 2018/05/24

【学会発表】

⑤ 趙 成珠、光澤 定己、淘江 宏文、加治屋 幹人、山田 尚基、田中 麻衣、秋枝 静香、中山 功一、栗原 英見、松田 秀一、青山 朋樹、池口 良輔、池谷 真 iPS 細胞由来間葉系幹細胞から構築した三次元神経導管による末梢神経再生 (ポスター) 第 18 回日本再生医療学会 神戸国際会議場 2019/03/21-23

⑥ 日野 恭介、趙 成珠、堀込 一彦、西尾 恵、岡西 泰永、永田 早苗、河村 真吾、山田 泰広、戸口田 淳也、太田 章、池谷 真 新規 mTOR signaling modulator は FOP における異所性骨化を抑制する (口頭) 第 18 回日本再生医療学会 神戸国際会議場 2019/03/21-23

⑦ 趙 成珠、日野 恭介、堀込 一彦、西尾 恵、岡西 泰永、永田 早苗、河村 真吾、山田 泰広、戸口田 淳也、太田 章、池谷 真 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) における骨化を抑える方法の発見 (口頭) 第 92 回日本薬理学会 大阪国際会議場 2019/03/14-16

⑧ 上谷 大介、赤星 哲平、竹中 菜々、加治屋 幹人、櫻井 英俊、栗原 英見、池谷 真 神経堤細胞を介したヒト iPS 細胞の MSC 細胞への分化誘導と特性解析 第 41 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2018/11/28-30

⑨ Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata S, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. In vitro modeling human somitogenesis with iPSC and the clinical application (poster). 第 41 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 2018/11/28-30

⑩ Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata S, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. In vitro modeling somitogenesis using hPSC (poster). From stem cells to human development. Surrey, England. 2018/09/23-26

⑪ Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata S, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. Enhanced chondrogenesis in FOP-iPSC-derived paraxial mesoderm (poster) 6th Cambridge international stem cell symposium. Cambridge, England. 2018/09/19-21

⑫ Kamiya D, Takenaka N, Kajiya M, Sakurai H, Kurihara H and Ikeya M. Induction of functional human mesenchymal stromal cells from iPSCs in xeno-free condition (poster) ISSCR 2018. Melbourne, Australia. 2018/06/20-23

⑬ Nakajima T, Shibata M, Nishio M, Nagata N, Alev C, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. A new method to recapitulate paraxial mesoderm development and model fibrodysplasia ossificans progressiva with iPSC cells (poster) 第 70 回日本細胞生物学会 第 51 回日本発生生物学会 合同大会 タワーホール船堀 2018/06/6-8

⑭ 中島 大輝、柴田光章、西尾恵、永田早苗、Cantas Alev、櫻井英俊、戸口田淳也、池谷 真 (口頭) ヒト iPS 細胞を用いたヒト体節発生の再現と、進行性骨化性線維異形成症の病態再現 第 17 回日本再生医療学会 パシフィコ横浜 2018/03/21-23

⑮ Nakajima T, Shibata M, Alev C, Fukuta M, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. MODELING OF HUMAN SOMITE PATTERNING USING IPSC. (poster) ISSCR 2016. Boston, MA, USA. 2017/06/14-17

⑯ Nakajima T, Shibata M, Alev C, Fukuta M, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. Modeling of human somite patterning using hiPSCs. (poster) 50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. Funabori, Tokyo 2017/05/10-12

⑰ 中島大輝、柴田光章、Cantas Alev、福田誠、櫻井英俊、戸口田淳也、池谷 真 ヒト iPS 細胞から体節派生細胞分化誘導法の開発 (フラッシュトーク、ポスター) 第 4 回細胞凝集研究会 札幌全日空ホテル (北海道札幌市) 2016/9/9

⑱ Nakajima T, Shibata M, Alev C, Fukuta M, Sakurai H, Toguchida J, Ikeya M. Recapitulation of human somite patterning using hiPSCs. (ポスター) CDB Symposium

⑱ Nakajima T, Shibata M, Alev C, Fukuta M, Sakurai H, Toguchida J, **Ikeya M**. Modeling of human somite patterning using hiPSC (ポスター) JSDB Special Symposium. 東京大学小柴ホール (東京都文京区) 2017/6/2

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 多能性幹細胞から体節細胞、および体節細胞から真皮節細胞、筋節細胞、硬節細胞および靱帯節細胞、並びに間葉系間質細胞の段階的製造方法

発明者: 池谷真、中島大輝

権利者: 国立大学法人京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-048439

出願年: 2018

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等: なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: アレブ ジャンタッシュユ

ローマ字氏名: ALEV, Cantas

所属研究機関名: 京都大学

部局名: iPS 細胞研究所

職名: 特定研究員

研究者番号 (8 桁): 30726477

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 太田 章

ローマ字氏名: OHTA, Akira

研究協力者氏名: 櫻井 英俊

ローマ字氏名: SAKURAI, Hidetoshi

研究協力者氏名: 森実 飛鳥

ローマ字氏名: MORIZANE Asuka

研究協力者氏名: 佐藤 貴彦

ローマ字氏名: SATO, Takahiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。