

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06245

研究課題名(和文) ヒト心筋細胞移植療法実現へ向けた患者移植用iPS細胞株の樹立および選抜法の最適化

研究課題名(英文) Optimization of protocol of iPSC-generation for human regenerative cardiomyocyte transplantation therapy

研究代表者

関 倫久 (Seki, Tomohisa)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30528873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,100,000円

研究成果の概要(和文)：生物由来原料基準をクリアできる培養系の確立を試み、センダイウイルスベクターによる山中因子導入、及びStemFitAK02培地、培養基剤としてiMatrix-511を用いることにより、従来の培養条件よりも高効率な樹立方法の確立に成功した。また、700個のヒト多能性幹細胞のマイクロアレイデータの解析から、ヒトiPS細胞の最頻度の核型異常である12トリソミーを簡便に見分けるマーカー、12トリソミーに限定せず核型異常の存在を示唆するマーカーを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞を利用した将来的な移植治療に向けて、GMPレベルの培養条件内で完結可能な心筋細胞分化用iPS細胞樹立プロトコルを確立すること、さらにiPS細胞樹立後の各種の未分化性と安全性の評価プロトコルを最適化し、移植用としてふさわしくない細胞株を排除し、移植に適するiPS細胞株を短期間で選抜する体制を確立することは必須である。しかし細胞株の選抜に多大な時間と費用を要している現状があったことから、本研究成果はiPS細胞の臨床利用を進めるための重要な成果をもたらしたと言える。

研究成果の概要(英文)：To develop culture systems for generating iPSCs for clinical use, we generate protocol for iPSC-generation that minimize the use of animal-derived products with potential and unpredictable risks to patients. As a result, the combination of StemFitAK02, iMatrix-511, and Sendai virus vector achieved iPSC-generation with high efficiency. Furthermore, with analyzing 700 microarray data of human pluripotent stem cells, we detected genetic marker for identifying cell lines with 12 trisomy and another abnormal karyotype.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 iPS細胞 核型異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 末期重症心不全は内科的治療に抵抗性であり、心臓移植が唯一の根治的治療となるが、我が国ではドナー不足により移植申請数に対する移植施行件数は大きく下回る現状が続いており、既に動物実験レベルでは iPS 細胞由来心筋細胞の移植により心機能が改善することが報告されていたことから、医療者および患者双方から早急な重症心不全に対する再生治療の実現が求められていた。

(2) 当初のヒト iPS 細胞樹立法は培養系に動物血清や動物由来フィーダー細胞を含み、皮膚生検によって得られたヒト皮膚線維芽細胞にレトロウイルスを用いたゲノムへの遺伝子導入により樹立された(Takahashi K, et al. Cell 2007)。従来の方法ではゲノムへの遺伝子配列導入に伴う近傍遺伝子配列の破壊や挿入遺伝子発現の再活性化による腫瘍化の問題が存在し、さらに培養環境内の動物由来成分による iPS 細胞への病原体の混入の可能性を完全に排除することが困難であったことから、iPS 細胞株の臨床利用へ向けてこれらの問題を解決する必要があった。

(3) iPS 細胞を移植細胞ソースとして利用する場合、iPS 細胞の樹立過程の時間的、費用的な負担が非常に大きく、これを改善する技術の確立が急務であった。特に将来的に免疫拒絶の回避という利点を有する自家移植のプロトコルを確立するためには、iPS 細胞の樹立過程における時間的、費用的問題をいかに軽減するかというのは大きな課題であった。

### 2. 研究の目的

(1) 将来的な移植治療に向けて、GMP レベルの培養条件内で完結可能な心筋細胞分化用 iPS 細胞樹立プロトコルを確立する。

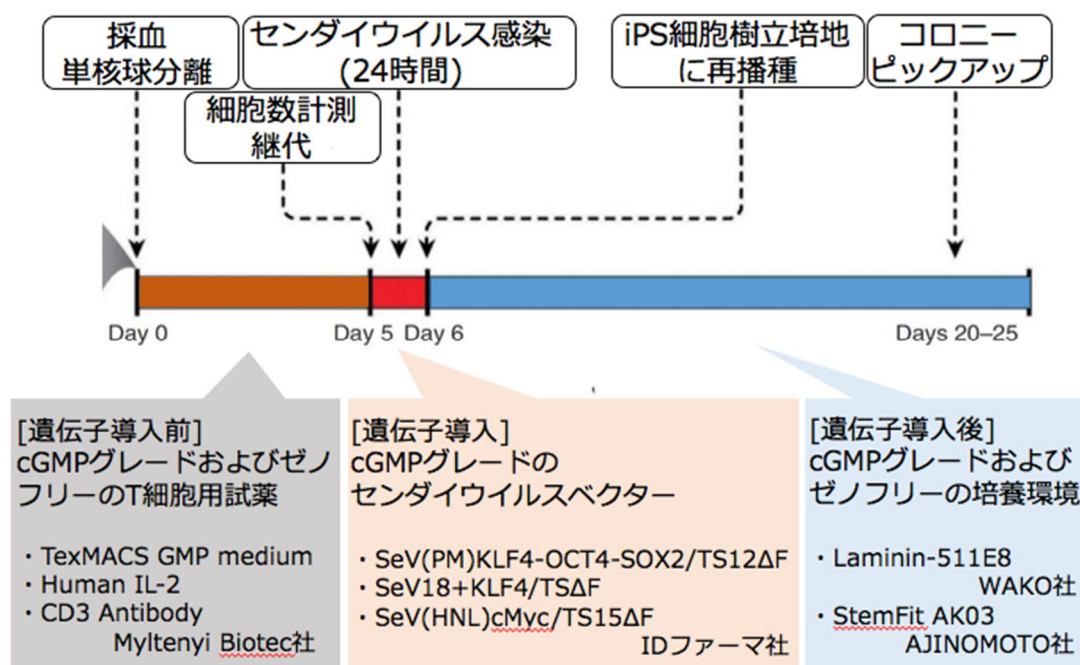
(2) iPS 細胞樹立後の各種の未分化性と安全性の評価プロトコルを最適化し、移植用としてふさわしくない細胞株を排除し、移植に適する iPS 細胞株を短期間で選抜する技術を開発し iPS 細胞の臨床利用を推し進める。

### 3. 研究の方法

(1) 過去に研究代表者らが確立した微量のヒト末梢血 T 細胞からゲノムへの遺伝子配列挿入のない iPS 細胞を樹立するプロトコル (Seki T, et al, Cell Stem Cell 2010, Seki T, et al, Nature protocols 2012)を発展させ、実際の臨床での iPS 細胞の使用を目的とし、培養条件をすべて GMP 基準へ移行可能な試薬、製品に置き換えた上で、ヒト末梢血細胞を用いて iPS 細胞樹立の条件検討を行う。

(2) iPS 細胞の樹立から細胞株選抜の過程において、臨床利用に適さない細胞株を判別できる遺伝子マーカーを同定するため、バイオインフォマティクス技術を用いて多数の細胞株のマイクロアレイデータに対する解析を行う。臨床利用に適さない細胞株を簡便に取り除く手法を確立し、臨床利用時の時間経過を想定した現実的な樹立・選抜プロトコルを検証する。

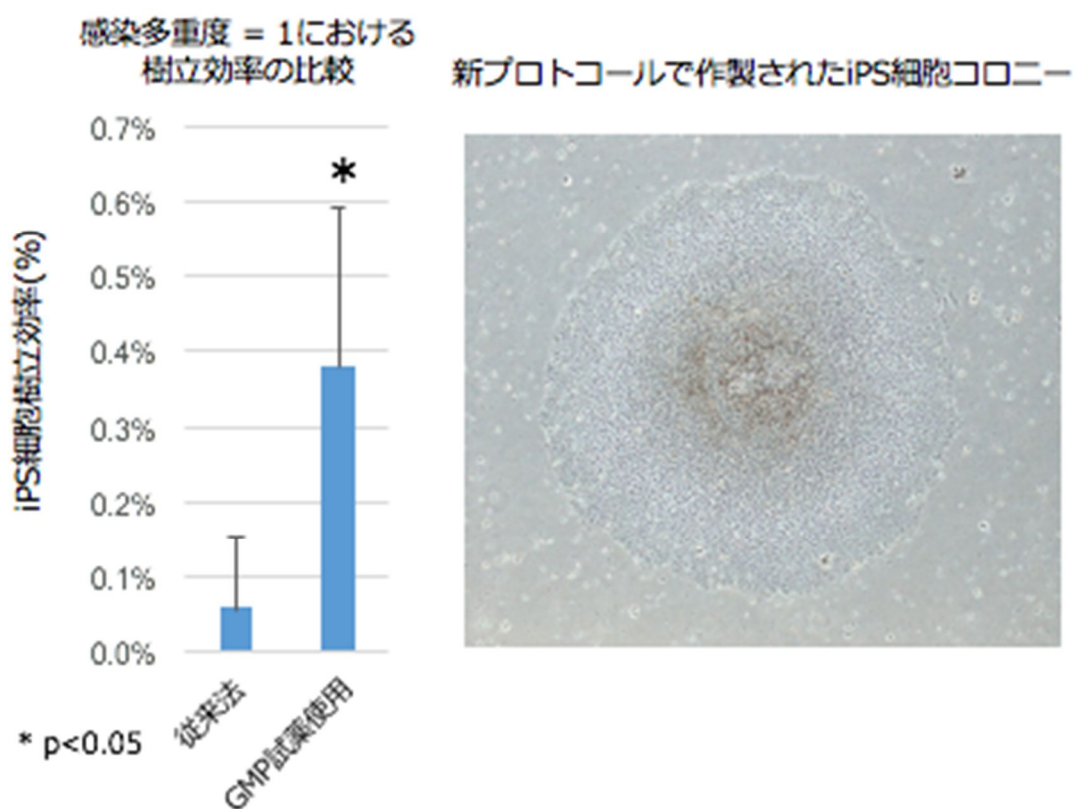
図 1: 申請者らが確立した cGMP 基準を満たす iPS 細胞樹立プロトコル



#### 4. 研究成果

(1) 臨床利用へ向けた iPS 細胞樹立プロトコルを確立するにあたり、過去に研究代表者らが確立した実験用 iPS 細胞株樹立のプロトコル(Seki T, et al, Cell Stem Cell 2010, Seki T, et al, Nature protocols 2012)を cGMP 基準を満たすよう各種試薬を検討した。本プロトコルは大きく分けて、採血から得られた末梢血単核球を CD3 抗体及び IL-2 で刺激する前段階、遺伝子導入を行う段階、未分化維持条件で培養を行う段階の 3 つから成るため、それぞれの段階で用いる各試薬を cGMP グレードのものに置き換えて iPS 細胞樹立が再現可能かを検討した。センダイウイルスベクターのみ cGMP グレードを開発中の段階であり、それ以外のものを全て置き換え、既存のプロトコルより優れた安定性を有し、計算上 20ml の末梢血があれば 30000~80000 個のコロニーが得られる誘導系を確立した(図 1, 2)。

図 2: 樹立効率と実際に樹立した iPS 細胞



(2) 実際に樹立した細胞株に加え、公開データを含むヒト多能性幹細胞株 712 株分のマイクロアレイデータを収集し、これらのデータに E-karyotyping 解析(Ben-David U et al. Nat Protoc. 2013)を行い、核型異常の有無を判定した。全サンプル中、核型異常を有する細胞株として 48 サンプルが同定された。最多の核型異常はこれまでの既存の報告と同様に 12 トリソミーであったが、17 トリソミーなども含めて多彩な核型異常が検出された。臨床利用を想定した場合、核型異常を有する細胞株はその時点で破棄されるべきであり、現時点で再生医療への利用は不適とされている。そのため、核型異常が起きた時点でその細胞株を簡便に検出できれば有用となるため、核型異常に伴って変動する遺伝子の検索を行った。具体的には、E-karyotyping によって核型異常が検出された細胞株と検出されなかった細胞株の間での発現変動遺伝子の抽出を行った。得られた遺伝子群を発現変動と FDR に沿って 500 遺伝子に絞り、Ingenuity Pathway Analysis で解析を行ったところ、その多くががんに関連したものであることが判明した(図 3)。

(3) これらの発現変動遺伝子群の中から核型異常の選抜に有用か否かについて、核型異常の有無の判定に対する AUC 値をマイクロアレイの各プラットフォームごとに算出し、最頻度の 12 トリソミーの検出用の遺伝子マーカーを同定した(図 4)。また、それに加え 12 トリソミーに限定せず核型異常を検出する遺伝子マーカー-ETV5 および WDR72 (図 5)を同定した。

(4) iPS 細胞樹立時には、継代によって核型異常が出現することが知られている一方で、その品質を確保するために定期的に培養細胞ごとに核型検査をすることは大きな負担となる。そのため、特定の遺伝子の発現を RT-PCR などの確立された手法で確認するだけで、核型異常を呈する可能性の高い細胞株を検出することができ、本技術は iPS 細胞の臨床利用に向けて有用となると考えられた。

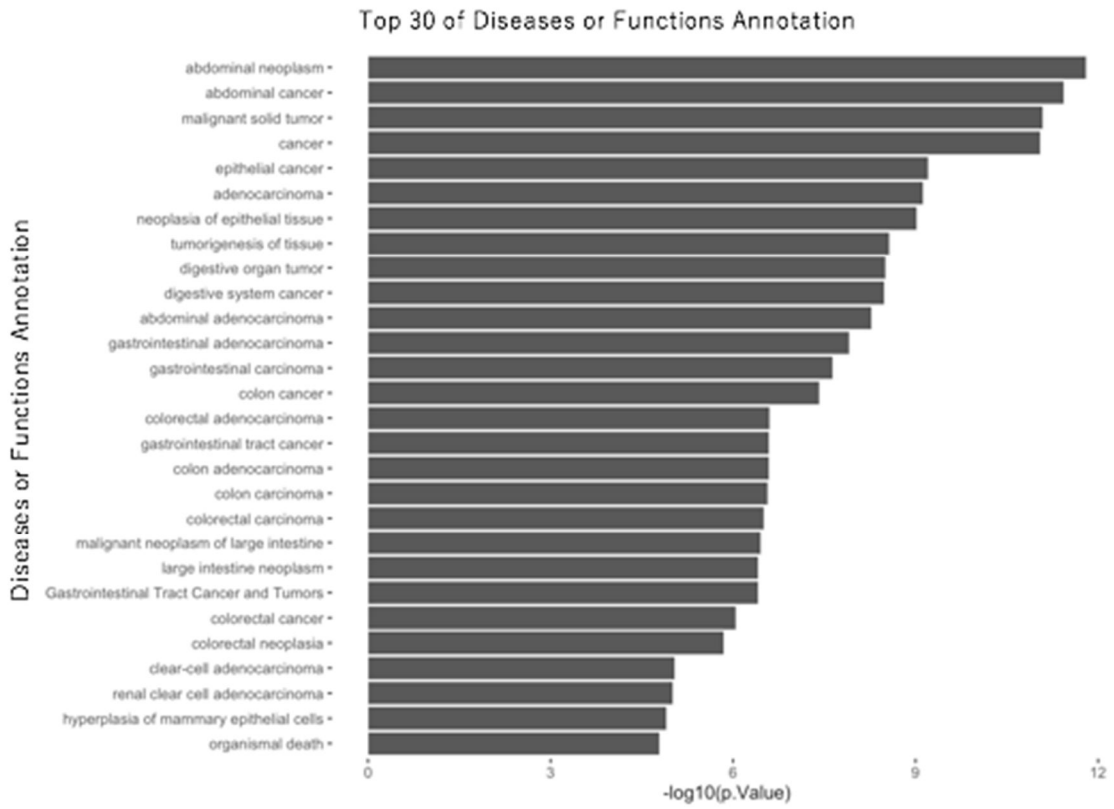


図 3: 核型異常関連発現変動遺伝子の IPA 解析結果

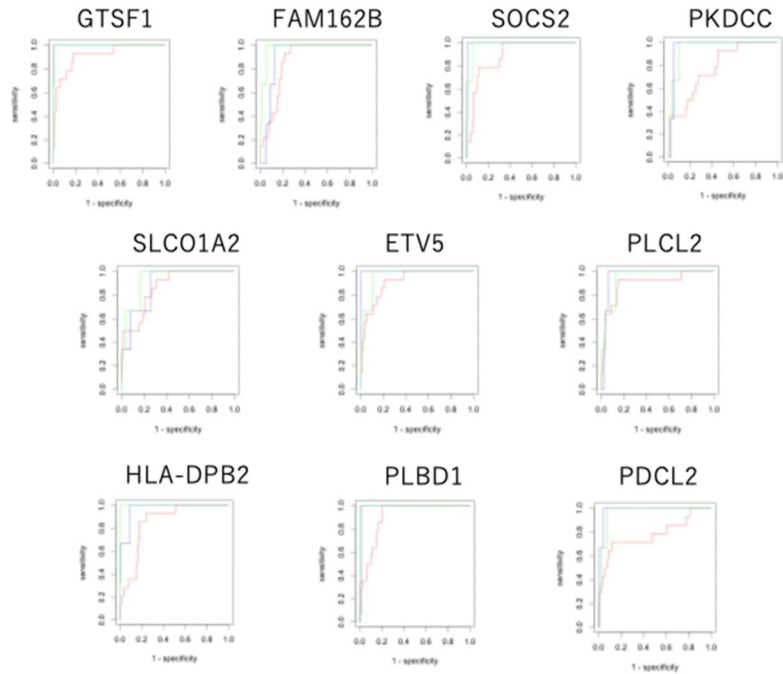


図 4: 同定したマーカーによる 12 トリソミー有無の判定

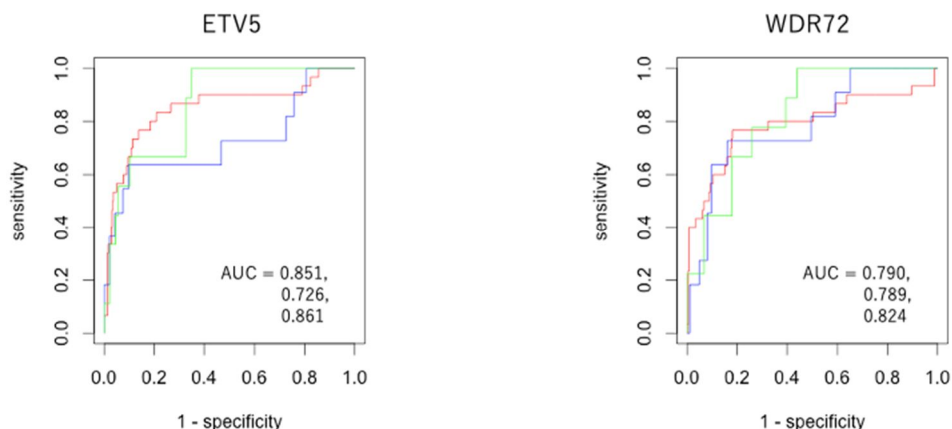


図 5: 同定したマーカーによる核型異常有無の判定

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Fukuda K, Tohyama S, **Seki T**, Yuasa S, Shimoji K, Fujita J. Regenerative Therapy of the Cardiovascular Area Using iPS Cells Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2016 Jul;105(7):1287-95.

### 〔学会発表〕(計 4 件)

1. 福田恵一、遠山周吾、**関倫久**、中嶋一晶、湯浅慎介、金澤英明、藤田淳、臨床応用前夜となった iPS 細胞による心筋再生医療の今後の展開、第 21 回日本心不全学会学術集会、2017 年
2. 福田恵一、遠山周吾、金澤英明、**関倫久**、中嶋一晶、藤田淳、湯浅慎介、臨床応用前夜となった iPS 細胞による心筋再生医療の今後の展開、第 65 回日本心臓病学会学術集会、2017 年
3. **Seki T**, Yuasa S, Egashira T, Fukuda K. Analysis of cardiomyocytes differentiated from ips cell from patients with familial ASD/VSD patients. 2016 Keystone Symposia Conference, Snowbird, Utah. 2016.4.6
4. Kishino Y, **Seki T**, Fujita J, Fukuda K. Novel Pathological Detection System of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Using T-cell Receptor Gene Locus for Cell Transplantation Therapy. 2016 Keystone Symposia Conference, Snowbird, Utah. 2016.4.5

### 〔図書〕(計 1 件)

1. **Seki T**, Fukuda K. Induced Pluripotent Stem Cells for Clinical Use. Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic 2016:Chapter 9:175-191 DOI: 10.5772/62505

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。