

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12755

研究課題名（和文）製造工程で利用可能なヒト多能性幹細胞における新規バイオマーカー技術の構築

研究課題名（英文）Development of novel biomarker technology in human pluripotent stem cells toward quality control

研究代表者

川瀬 栄八郎（Kawase, Eihachiro）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：70402790

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトES細胞、ヒトiPS細胞などのヒト多能性幹細胞(以下、ヒトES細胞と略する)を用いた再生医療の実現化・実用化にはヒトES細胞の大量培養とその品質管理が不可欠である。現在までにヒトES細胞の品質評価は最終製品であるヒトES細胞の一部をサンプルとして取り出し、評価する破壊検査が一般的である。しかしながら、現在は製造工程というプロセスの中でヒトES細胞の品質をモニタリングし、効率よく製造することが求められている。本研究では製造工程でのヒトES細胞をモニタリングできるバイオマーカーの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトES細胞を用いた再生医療の実現化・実用化にはヒトES細胞の大量培養が不可欠である。大量培養を効率的に行うためには、製造工程の中でも品質を確認しながら進めていくということが重要であるが、従来のヒトES細胞の特性評価は製造工程で使うにはあまり適していなかった。本研究成果ではヒトES細胞の製造工程で用いる新しいバイオマーカーの同定に成功した。このバイオマーカーを用いることで製造工程を効率的に進めるだけでなく、本研究をさらに発展させていくことでヒトES細胞の持つ新しい特性とその分子制御機構を理解していくことが可能となる。

研究成果の概要（英文）：Mass culture and quality control of human pluripotent cells (hPSCs) are essential for regenerative medicine's realization and practical use using hPSCs. Destructive testing is generally performed by taking a sample of the hPSCs as the final product for the quality controls. However, it is now required to monitor the quality of human ES cells in the manufacturing process to ensure efficient production. In this study, we identified a biomarker for monitoring hPSCs during manufacturing.

研究分野：細胞工学 幹細胞

キーワード：幹細胞 バイオマーカー ヒトES細胞 ヒト多能性幹細胞 大量培養

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞などのヒト多能性幹細胞(以下、ヒト ES 細胞と略する)を用いた臨床研究が始まり、再生医療の発展が大きく期待されているが、そのためにはヒト ES 細胞の大量培養は不可欠であり、同時にその品質管理も行う必要がある。

現在はヒト ES 細胞の品質管理として、その最終産物の一部を抽出し評価を行うのが一般的である。例えば、大量培養したヒト ES 細胞が未分化状態であることを確認するためにその一部をサンプルとして抽出し、OCT4 や NANOG などの未分化状態を特徴づける転写因子の発現、あるいは TRA-1-60 などの表面抗原の発現を免疫抗体染色やフローサイトメトリーなどを用いて評価を行っている。しかしながら、このやり方では、製造工程がうまくいっていないケースでも培養し続け、最終産物の評価によってはじめて製造工程の失敗がわかるという問題が生じる可能性がある。もちろん製造工程の途中で定期的にサンプル抽出し、評価していくことは不可能ではないが、手間がかかる。

培養工程の妥当性を確認する方法自体は今までも開発、利用されている。例えば、製造工程で生じる廃棄培地を使い細胞培地環境装置などで pH、 pO_2 、 pCO_2 、グルコース、乳酸などのモニタリングが行われている。しかし、これらは細胞培養自体がうまくいっているかを知るには重要因子となるが、ヒト ES 細胞のもつ特性面を考慮したものではない。

このようにヒト ES 細胞の大量培養では、培養細胞としての品質管理は可能だが、ヒト ES 細胞としては品質評価であっても品質管理とはなっていない。製造工程の中で利用可能なヒト ES 細胞の特性に関する品質管理法の開発がその重要性にも関わらず、まだほとんど行われていないのが実情である。

2. 研究の目的

再生医療の実現化にはヒト ES 細胞の大量培養に向けての技術開発が必要であるが、同時に品質管理も重要である。ヒト ES 細胞の品質評価に関する研究・開発は世界中で活発に行われているが、研究開始当初の背景で述べたように以下の様な問題点がある。

- (1) 最終産物で評価を行い、製造工程でのモニタリングを考慮していない(品質評価ではあるが品質管理のレベルとなっていない)。
- (2) 従来の培地分析装置などを用いたモニタリングでは、細胞培養自体がうまくいっているかどうかには利用可能だが、一方でヒト ES 細胞として特性を考慮していない。

ヒト ES 細胞における最も基本的な特性の一つとして、未分化状態で自己増殖すると同時に多様な細胞に分化しうる(多能性を有する)ことである。ヒト ES 細胞の大量培養には未分化状態を保持しているという品質管理を満たす必要があり、本研究ではその品質管理法の開発を目指した。

通常、研究室で用いられている接着培養では、ES 細胞の未分化状態と分化状態は図 1 のように形態的に容易に判別することが可能である。ヒト ES 細胞の大量培養には、3次元培養(浮遊培養とも呼ばれている)で行うのが適していると考えられているが、3次元の集合体での未分化状態の評価を行う有効な指標は未だ見いだされていない。

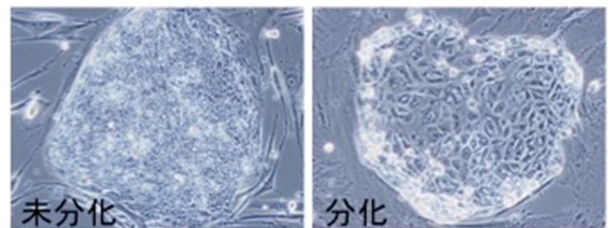


図1 ヒトES細胞の未分化状態とその形態

そこで私は細胞培養では定期的に培地交換を行う必要があること、そして廃棄する培地成分に着目し、ヒト ES 細胞の未分化状態の評価が可能となるバイオマーカーの開発を目指した。また同定したバイオマーカーが、なぜそのような特

性を有するのかを細胞生物学的あるいは分子生物学的に解明していくことで、ヒト ES 細胞をより深く理解することが可能になると考えた。

3. 研究の方法

ヒト ES 細胞での遺伝子発現やタンパク質発現のプロファイルは既に先行論文がいくつもあり、これらを有効活用した。私の場合、細胞自体を回収することなく培地中の成分を解析することで、評価系を構築することを目指しており、例えば成長因子などの分泌する物質には着目した一方で、OCT4、NANOG などの転写因子などは除外した。候補分子としては 100 位を選定対象とした。

未分化ヒト ES 細胞と分化細胞での遺伝子発現を自ら確認し調べることで候補分子を絞ることにした。ヒト ES 細胞と神経細胞や肝細胞などと比較しても細胞の未分化・分化状態が大きく違いすぎるので、未分化状態のヒト ES 細胞をレチノイン酸で初期分化誘導し、未分化状態では遺伝子発現が高いが、分化が進むにつれて発現が低下するものを選定した。

さらにその後の研究展開を考え、以下のような選定条件を加えた。

(1) 選定分子の分子作用機序がある程度同定されているもの

(2) 選定分子の抗体が入手可能なもの

(1)に関してはヒト ES 細胞への作用機序を考える上で大きな利点を与えてくれるものであり、また(2)は本研究では培地上清を用い ELISA で評価に使える可能性があるからである。

最終的には研究期間を踏まえ 1 つの分子を選定し、ELISA による評価系の構築を目指した。本研究期間では、ELISA でのスコアから未分化細胞数を特定できるようにすることを到達目標とした。

4. 研究成果

要旨：ヒト ES 細胞の未分化状態のバイオマーカーとなる分子の同定に成功した。このバイオマーカーをモニタリングすることで品質管理への道が開けた。この分子はまだ未発表であり現時点では選定分子として以下研究成果を述べる。

選定分子は未分化状態では高発現しており、分化状態ではその遺伝子発現は 90%以上減少していた。選定分子のリセプターに関しても同様な発現パターンを示していた。

次にウエスタンブロットを用い選定分子のタンパク質発現を調べたが、同様に 90%以上減少していることを見出した。この際、ELISA 法への展開を考え、数種類の利用可能な抗体を探索し同定した。

培地中の評価法として、解析コストも考え ELISA による評価系の構築を行った。しかしながら、直接 ELISA や間接 ELISA では十分な感度が得られなかったこともあり、サンドイッチ法による ELISA 法の開発を行った。サンドイッチ法では高い特異性を持ち、同一抗原上の異なる部位を認識する Capture 抗体と Detector 抗体が必要となるが、先のウエスタンブロットの結果を活用することで適切な抗体の組み合わせを見出すことに成功した。最終的にサンドイッチ法を用いることで検出可能になった。細胞由来の抽出タンパク質を用いた ELISA の結果はウエスタンブロットの結果とも一致していることも確認した。尚、分化状態の培地上清では ELISA の検出感度以下となってしまう、実際のどの程度含まれているかは不明である。より感度の高い方法の探索を目指したが適切な方法を見出すことはできなかった。ProQuantum イムノアッセイや Luminex アッセイなど、より感度の高いイムノアッセイシステムはあるが、非常に高価になるあるいは特別な測定装置が必要なこともあり、本研究では検討しなかった。

本研究課題で開発した ELISA システムを用い、細胞数と ELISA の数値を調べたが、非常に良い相関性が見られ、ELISA の測定値からおおよその細胞数を特定することが可能であることを見出した。

今回の結果を closed の場で発表を行い、コメントをもらうことにした。興味をもらった一方で、なぜ未分化状態のバイオマーカーとなるのかその分子制御機構に関する質問もあった。次の研究期間では、その部分を進め論文掲載まで進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawase, E., Takada, K., Nakatani, R., Yamazaki, S., Suemori, H.	4. 巻 54
2. 論文標題 Generation of clinical-grade human embryonic stem cell line KthES11 according to Japanese regulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2021.102383	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawase, E., Takada K., Suemori, H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Kyoto hESC cell resource for regenerative medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.102020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi K., Ikeda T., Hosokawa M., Nakatsuji N., Kawase E., Chuma S., Hasegawa K., Suemori H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Overexpression of Nuclear Receptor 5A1 Induces and Maintains an Intermediate State of Conversion between Primed and Naive Pluripotency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 506-519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2020.01.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kim J.H., Alderton A., Crook J.M., Benvenisty N., Brandsten C, Firpo M., Harrison P.W., Kawamata S., Kawase E., Kurtz A., Loring J.F., Ludwig T., Man J., Mountford J.C., Turner M.L., Oh S., da Veiga Pereira L., Pranke P., Sheldon M., Steeg R., Sullivan S., Yaffe M., Zhou Q., Stacey G.N.	4. 巻 37
2. 論文標題 A report from a workshop of the International Stem Cell Banking Initiative, held in collaboration GAIT and the Harvard Stem Cell Institute, Boston 2017	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 1130-1135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田圭、川瀬栄八郎、末盛博文
2. 発表標題 ヒトES細胞樹立作業におけるベンチ内細胞操作と培養の試み
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川瀬栄八郎、高田圭、末盛博文
2. 発表標題 京都大学における臨床用ヒトES細胞株の樹立、バンキングと品質検査におけるワークフローの構築
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川瀬栄八郎、高田圭、中谷良子、森部江美子、末盛博文
2. 発表標題 京都大学ウイルス・再生医科学研究所における臨床用ヒトES細胞株の樹立、ストック作製とその評価系の構築
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学医生物学研究所ホームページ 「日本の再生医療新法に遵守した臨床用ヒトES細胞株KthES11の樹立に成功、臨床用ストックとしての重要特性を保持」 https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/post-1060/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------