

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06661

研究課題名(和文) コレステロール生合成阻害によるヒトiPS細胞の腫瘍形成リスク除去技術の確立

研究課題名(英文) The technology to eliminate the risk of tumor formation in human iPS cells by inhibiting cholesterol biosynthesis.

研究代表者

岡村 大治 (Okamura, Daiji)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：80393263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を用いた細胞治療を行う際、「残存する未分化細胞による腫瘍形成」が今なお大きな課題として残されている。我々はコレステロール生合成阻害剤が無血清培地という条件の中で、増殖過程にある未分化な多能性幹細胞ならびに未成熟分化細胞のほぼ全てをアポトーシスにより死滅させることを見出した。より重要なことは増殖を止めた成熟分化細胞の生存・機能には全く影響を与えなかった点にある。本成果はiPS細胞を用いた移植医療を行う上でもっとも大きな課題である「腫瘍化の恐れのある未分化細胞を除去」ならびに「成熟分化細胞」を精製/純化するための基盤技術となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該申請技術は未分化iPS細胞の除去作用に加え、分化途上にある未成熟分化細胞も除去可能であり、セルソーティングなどでの物理的な純化や組織・細胞に特化した純化技術を必要とせず、またコレステロールというあらゆる細胞が必要とする構成分子に対する阻害剤であることから、組織・細胞または動物種を問わない極めてユニバーサルな残存する未分化iPS細胞による腫瘍リスク除去技術そして成熟分化細胞の純化技術となる可能性がある。また物理的な純化を必要としないため、目的分化細胞の集合体である既存の「細胞シート(心筋・網膜・角膜など)」に対しても極めて有効に作用する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tumour formation by residual undifferentiated cells is still a major problem in human iPS cell therapy. We found that the cholesterol biosynthesis inhibitor killed almost all undifferentiated pluripotent stem cells and immature differentiated cells by apoptosis in serum-free medium. More importantly, the survival and function of mature differentiated cells that had stopped proliferating were not affected at all. These results are expected to serve as a basic technology for the "elimination of undifferentiated cells that may become tumours" and the "purification and enrichment of mature differentiated cells", which are the most important issues in transplantation medicine using iPS cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 腫瘍原性 コレステロール生合成 アポトーシス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ES細胞やiPS細胞などに代表される多能性幹細胞はさまざまな細胞に分化できる能力を持つため、再生・細胞医療用の細胞原料または創薬プロセスの効率化に寄与するものとして期待されています。しかし多能性幹細胞のもう一つの側面である「無限増殖能」により、未分化のまま免疫不全動物等に移植すると奇形腫(テラトーマ)を形成する造腫瘍性があり、それは今なおES細胞/iPS細胞由来細胞を再生医療に用いる上での品質・安全性上の大きな問題となっている。iPS細胞由来移植細胞には残存未分化iPS細胞による腫瘍形成のリスクが存在するが、そのリスクを最小化するためには、(1)分化させた細胞集団の中で未分化iPS細胞の混在量を評価し、(2)未分化iPS細胞の除去を行う必要がある。未分化iPS細胞の混在量の評価には、「軟寒天コロニー形成試験」「フローサイトメトリー」「qRT-PCR」「in vivo 造腫瘍性試験(テラトーマ形成試験)」などが実際に行われているが、そこには明確な検出限界の壁が存在し、網膜や角膜再生など移植する細胞数が少ない製品では十分な検出感度であっても、 $10^7$ - $10^9$ 個の細胞が必要となる脊髄損傷や心不全治療では依然として大きな問題である。そこで本研究提案では、(2)未分化iPS細胞の除去技術の開発に取り組み、発展的に、移植細胞である最終分化した目的機能細胞の精製/純化をも実現する基盤技術の確立を目指した。

研究開始当初、既に申請者はヒトiPS細胞を含む多くの動物種における多能性幹細胞(マウスES細胞、マウスEpiSC、マウスrsEpiSC、ラットES細胞、カニクイザルES細胞)において、ある特定のコレステロール生合成阻害剤の添加が24時間から72時間以内に活性型カスパーゼ3陽性のアポトーシスによる細胞死を引き起こすことを見出していた。この細胞死は培養液中へのコレステロールの添加によってレスキューされることから、阻害剤のサイドエフェクトではなく、細胞内におけるコレステロール生合成の阻害が細胞死のトリガーとなっていることが確かめられている。またこれに伴い、細胞死を誘導する際に重要な要素が「無血清培地」条件という点にあり、我々は血清培地中の脂質やコレステロールの供給がコレステロール生合成阻害剤による細胞死を強力に抑制することを見出している。

### 2. 研究の目的

ヒトiPS細胞の再生医療での利用を想定し、現在多くのヒトiPS細胞培地が「ゼノフリー(無血清で異種由来成分を含まない培地)」であり、また分化誘導時においても同様の基礎培地を用いている点から、我々は当該コレステロール生合成阻害剤において、ヒトiPS細胞の分化誘導時に必ず生じる「残存する未分化細胞」を除去出来る可能性を検討する。

また、これまでに様々なグループが「ヒトiPS細胞由来の未分化細胞の除去技術」を発表しており、どの技術も未分化ヒトiPS細胞を除去し、成熟分化細胞への影響は軽微であることが示されている。一方、上記発表技術の全てが「未分化細胞の除去」に特化した技術開発であり、当該コレステロール生合成阻害剤のもつ「未成熟分化細胞の除去による成熟分化細胞の純化」という技術特性は、極めて高い優位性を示すことが期待される。

コレステロールは細胞にとって必要不可欠であり、細胞と外部環境との境界である細胞膜を構成する主要な脂質のひとつである。このようにいかなる細胞も持ち合わせている特性を利用した、「腫瘍化の恐れのある未分化iPS細胞の除去」ならびに「目的機能細胞」を精製/純化するための技術は、様々な組織・細胞の移植に適用されることが想定され、また「無血清培養」「コレステロール生合成阻害剤」「増殖性細胞」というシンプルな条件で動くことから、がん細胞への効果も含めて極めてユニバーサルな基幹技術となることが期待される。

### 3. 研究の方法

最終分化した目的細胞の生存のみならず「機能」への影響を検証するために、ヒトiPS細胞から一般的なプロトコルに従い(1)拍動する心筋細胞ならびに(2)ドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導を行ない、様々なタイミングで当該阻害剤を添加する。

提案研究における実験計画としては、上記心筋細胞の分化誘導で示した当該コレステロール生合成阻害剤の「未分化iPS細胞の除去」ならびに「成熟分化細胞の純化」の効果が、心筋も含めたどのような組織・細胞で適用されるかを重点的に検証する。計画としては、移植を伴うiPS治療の臨床研究に既に承認が得られた組織・細胞(今回はドーパミン作動性ニューロン)をターゲットとする。特に心筋などは「シート」として作成された後に移植されることが想定されるため、さらにニューロンは軸索を伸ばしたその細胞サイズのため、ソーティングへの適応性が低く、ソーティングによる未分化・未成熟分化細胞の除去の必要がない本提案技術は極めて優位性が高いものと期待される。

詳細な未分化細胞の除去効果ならびに成熟分化細胞への影響の検証はFACS解析を用いて確認した。また本申請課題にある「腫瘍形成リスク」の評価を行う上で、造腫瘍性の検討は特に必要性が高いと考えられることから、当該阻害剤で処理した成熟分化細胞を免疫不全マウスに移植し、どのような期間・条件で細胞を阻害剤処理することが必要かを検討した。

### 4. 研究成果

心筋誘導におけるコレステロール生合成阻害剤添加の効果を解析した結果、分化誘導の早い段階で当該阻害剤を添加した場合には全ての細胞が死滅したが、一方で分化誘導5日目以降に添加した場合、持続的に「拍動」を示す心筋細胞と思われるコロニーが数多く認められ、当該コレステロール阻害剤が最終分化した心筋細胞の生存ならびにその機能にも一切の影響を与えていないことを確認した。さらに驚くべきことに、薬剤添加なしのコントロールに数多く見られる分化途上にある未成熟分化細胞が、当該阻害剤添加条件では一切認められないことが確認された。このことは無血清条件下において、当該コレステロール阻害剤が増殖性の未分化ヒト iPS 細胞だけでなく、依然として増殖性を維持している未成熟分化細胞にも同時に細胞死を引き起こし、結果として増殖性を失った成熟分化細胞のみが生存・維持される可能性を示している。

続いて、ヒト iPS 細胞からドーパミン作動性ニューロンを分化誘導する際、一定期間に限ってコレステロール生合成害剤を添加することにより、ある特定の細胞集団に細胞死が誘導されたが、その集団が生じるプロセスを詳細に解析したところ、細胞分裂マーカーを有する細胞が特異的に除去されていることが判明した。さらに、未分化マーカー SSEA-4 を発現する iPS 由来細胞が特異的に減少している(細胞死を起こしている)ことが明らかとなった。

ヒト iPS 細胞を用いた細胞治療を行う際、「残存する未分化細胞による腫瘍形成」が今なお大きな課題として残されている。我々はコレステロール生合成阻害剤が無血清培地という条件の中で、増殖過程にある未分化な多能性幹細胞ならびに未成熟分化細胞のほぼ全てをアポトーシスにより死滅させることを見出した。より重要なことは増殖を止めた成熟分化細胞の生存・機能には全く影響を与えなかった点にある。本成果は iPS 細胞を用いた移植医療を行う上でもっとも大きな課題である「腫瘍化の恐れのある未分化細胞を除去」ならびに「成熟分化細胞」を精製/純化するための基盤技術となることが期待される。

#### 【学術論文】(計5本)

1) Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification.

Yu L, Wei Y, Sun HX, Mahdi AK, Pinzon Arteaga CA, Sakurai M, Schmitz DA, Zheng C, Ballard ED, Li J, Tanaka N, Kohara A, Okamura D, Mutto AA, Gu Y, Ross PJ, Wu J.

Cell Stem Cell. 28(3):550-567, 2021 Mar

DOI: 10.1016/j.stem.2020.11.003

2) Cell Competition Constitutes a Barrier for Interspecies Chimerism.

Zheng C, Hu Y, Sakurai M, Pinzon-Arteaga CA, Li J, Wei Yulei, Okamura D, Ravaux B, Barlow HR, Yu Leqian, Sun HX, Chen EH, G Ying, Wu J.

Nature. 592(7853):272-276, 2021 Apr

DOI: 10.1038/s41586-021-03273-0

3) Stepwise conversion methods between ground states pluripotency from naïve to primed.

Okamura D\*, Chikushi M, Chigi Y, Shiogai N, Jafar S, Wu J. (\*Corresponding Author)

Biochem Biophys Res Commun. 574:70-77, 2021 Aug 8

DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.07.097

4) The amount of membrane cholesterol required for robust cell adhesion and proliferation in serum-free condition.

Takii S, Wu J, Okamura D\*.(\*Corresponding Author)

PLOS ONE. 17(7):e0259482, 2022 Jul 20

DOI: 10.1371/journal.pone.0259482

5) The ensured proliferative capacity of myoblast in serum-reduced conditions with Methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

Katayama T, Chigi Y, Okamura D\*.(\*Corresponding Author)

Front. Cell Dev. Biol., 11:1193634., 2023 May 12

DOI: 10.3389/fcell.2023.1193634

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okamura D, Chikushi M, Chigi Y, Shiogai N, Jafar S, Wu J.	4. 巻 574
2. 論文標題 Stepwise conversion methods between ground states pluripotency from naive to primed.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 70-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yu Leqian, Wei Yulei, Sun Hai-Xi, Mahdi Ahmed K., Pinzon Arteaga Carlos A., Sakurai Masahiro, Schmitz Daniel A., Zheng Canbin, Ballard Emily D., Li Jie, Tanaka Noriko, Kohara Aoi, Okamura Daiji, Mutto Adrian A., Gu Ying, Ross Pablo J., Wu Jun	4. 巻 28
2. 論文標題 Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 550 ~ 567.e12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2020.11.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zheng Canbin, Hu Yingying, Sakurai Masahiro, Pinzon-Arteaga Carlos A., Li Jie, Wei Yulei, Okamura Daiji, Ravaux Benjamin, Barlow Haley Rose, Yu Leqian, Sun Hai-Xi, Chen Elizabeth H., Gu Ying, Wu Jun	4. 巻 592
2. 論文標題 Cell competition constitutes a barrier for interspecies chimerism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 272 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-03273-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takii Shino, Wu Jun, Okamura Daiji	4. 巻 17
2. 論文標題 The amount of membrane cholesterol required for robust cell adhesion and proliferation in serum-free condition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0259482	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

1. 著者名 Katayama Tomoka, Chigi Yuta, Okamura Daiji	4. 巻 11
2. 論文標題 The ensured proliferative capacity of myoblast in serum-reduced conditions with Methyl- cyclodextrin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1193634	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 -

[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 滝井詩乃, 岡村大治
2. 発表標題 Development of a universal serum-free medium for cancer cell lines by regulation of cholesterol metabolism.
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片山ともか, 千木雄太, 岡村大治
2. 発表標題 Ensured proliferative potential of myoblast in a serum-reduced condition with methyl- cyclodextrin (M CD).
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片山ともか, 千木雄太, 岡村大治
2. 発表標題 The ensured proliferative potential of myoblast in a serum-reduced condition with methyl- cyclodextrin (M CD).
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------