

平成30年6月6日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07094

研究課題名（和文）分化細胞に含まれる未分化ヒトiPS細胞の除去方法の確立

研究課題名（英文）Establishment of removal method of undifferentiated human iPS cells contained in differentiated cells.

研究代表者

中島 義基（NAKASHIMA, YOSHIKI）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：30593082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：再生医療はこれまで治すことの出来なかった病気を治せる新しい治療方法として期待されている。再生医療の中でも山中伸弥教授によって発明されたiPS細胞を用いた再生医療は全身の多くの病気に対して治療が出来ると期待されている。しかし、iPS細胞には体の中で腫瘍を作る危険性があった。その危険性は、治療用の細胞からiPS細胞をほとんど除去することで防ぐことが出来る。この研究では、治療用細胞からiPS細胞をほとんど除去できる薬剤を発見する成果が得られた。そして、その薬剤は体の細胞には毒性が無いことも分かった。この研究成果を世の中に役立てることで、iPS細胞を使った新しい治療を安全に行うことが出来る様になる。

研究成果の概要（英文）：Regenerative medicine is expected as a new treatment method that can cure disease that could not be cured so far. Regenerative medicine using iPS cells invented by Professor Shinya Yamanaka in regenerative medicine is expected to be able to treat many diseases of the whole body. However, iPS cells had a risk of developing tumors in the body. The risk can be prevented by removing most of the iPS cells from the therapeutic cells. In this study, we were able to discover drugs that can almost remove iPS cells from therapeutic cells. And it was also found that the drug is not toxic to body cells. By using this research result to the world, it becomes possible to safely perform new treatments using iPS cells.

研究分野：再生医学

キーワード：移植・再生医療 発生・分化 細胞・組織 バイオリクター

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景・着想にいたった経緯
ヒト iPS 細胞から各種の臓器細胞を分化誘導する技術開発が進み、現在、iPS 細胞を用いた臨床応用の準備が進められている。その一方で、iPS 細胞樹立の当初から懸念されていた腫瘍形成のリスクに関する研究は、画期的な技術革新が無いままである。iPS 細胞を 100% 分化誘導させることは極めて難しいことから、iPS 細胞を用いた再生医療を今後、実現させる上で、腫瘍化の可能性を持つ未分化ヒト iPS 細胞を分化誘導済みの組織内から確実に除去できる手法の開発が必要である。

これまでに報告されているヒト iPS 細胞の除去技術 (代表的な国際特許 3 件を示す)

1、糖質を用いた高浸透圧培地を用いることで心筋細胞以外の細胞を細胞死へ導く方法 (国際特許 WO2010114136A1)

2、特異的な抗体を用いて未分化細胞をフローサイトメトリーで除去する方法 (国際特許 WO2013128914A1)

3、細胞表面の糖鎖に特異的に結合する毒性を持つタンパク質を使いヒト iPS 細胞を殺す方法 (国際特許 WO2014126146A1)

申請者はこれまでに、ヒト iPS 細胞の培養培地開発に携わり、培地の成分や足場材料の成分がヒト iPS 細胞の生存へどのような影響を与えるのかを、細胞内シグナル伝達に着目して研究を進めて来た (Nakashima et al. *BioResearch Open Access*. 2016. 5(1). 84-93)。そして、ヒト iPS 細胞の培養に古くから用いられてきたマトリゲルと呼ばれるマウス由来の細胞外基底膜に由来する足場材料を用いた環境下においても、ヒト iPS 細胞を除去できる技術を開発した (Molecular Therapy [IF 6.8], in press)。

その一方で、ヒト iPS 細胞は足場材料や培地成分により細胞内に分岐するシグナル伝達経路のアクティビティーが大きく変わる。特に、増殖因子受容体、細胞接着因子はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K)/AKT 経路を活性化させるが、PI3K/AKT 経路はヒト iPS 細胞の生存維持に必須のシグナルである。

申請者は、内分泌ホルモンやそのリガンドが組織に特異的な発現を示すことを明らかにしてきたことから (Nakashima et al. *Ann N Y Acad Sci*. 2010. 1200. 104)、ヒト iPS 細胞も分化誘導を受けることによって、各目的の組織特異的な成分の分泌を開始し、組織構造にも特異的な結合組織構成を形成すると考えている。このことは、未分化 iPS 細胞のみを培養している条件と、分化組織の混在した未分化 iPS 細胞の培養条件とでは、iPS 細胞に関するレスポンスが培地成分、並びに足場材料の違いにより影響を受け、大きく異なる

ことを意味する。

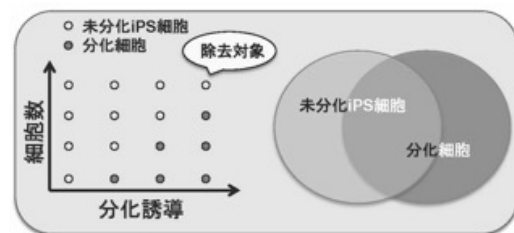
② 研究期間内の取り組み

本研究では、分化組織に混在する未分化 iPS 細胞の除去を目的とした。始めに、未分化 iPS 細胞のみで培養を行い iPS 細胞の除去効果を確認した手法と同じ方法を用いて、分化組織に混在する未分化 iPS 細胞の除去を試みた。除去効果が低下したため、分化組織の分泌する成分を分析し、除去効果に対する阻害作用の有無を調べた。

③ 本研究の目的と有用性

ヒト iPS 細胞の生存維持に関わるシグナル伝達経路に関して、分化組織由来成分の与える影響を調べた。本研究では、未分化ヒト iPS 細胞の腫瘍化能に特異的な阻害剤を開発し分化組織に含まれる未分化 iPS 細胞を除去することを目的とした。最適な除去方法によって、分化組織に障害を与えることなく、未分化ヒト iPS 細胞の除去が可能となる。

2. 研究の目的



ヒト iPS 細胞に由来する細胞医薬品を患者へ投与した場合、併発症として腫瘍の発症が予測されるが、そのリスクを回避する為には、分化細胞からの未分化細胞の確実な除去が必要となる。申請者は、ヒト iPS 細胞の生存にタンパク質 X の働きが必要不可欠であり、タンパク質 X の阻害剤が未分化ヒト iPS 細胞を除去することを明らかにした (Molecular Therapy [IF 6.8], in press)。

しかし、分化細胞からの未分化細胞の確実な除去を行うためには、心筋細胞や、神経細胞、肝臓細胞、脂肪細胞、膵臓細胞などの分化細胞中に含まれる未分化ヒト iPS 細胞の除去について調べる必要があるため、本研究では、分化細胞と未分化細胞の混在する環境下において、未分化ヒト iPS 細胞を除去できる技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

分化誘導は再現性を必要とするため、市販のキットを用いる。分化組織に残存する未分化 iPS 細胞の含有量を評価するために、本研究計画では以下の研究項目を検討した。

- 1) 分化組織に含まれる未分化マーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて調べる。
- 2) 分化細胞へタンパク質 X 阻害剤を投与し、未分化マーカー発現量の変化を調べる。
- 3) LC/MS/MS を用いて分化細胞の分泌物を

網羅的にリストアップする。

4) 分泌物とタンパク質 X 阻害剤を投与し、未分化ヒト iPS 細胞の生存率の変化を調べ、阻害物質を検討する。

<平成 28 年度計画>

1) 分化組織に含まれる未分化マーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて調べる

iPS 細胞はすでに当研究室にて、理化学研究所セルバンクを通して購入した京都大学 iPS 細胞研究所 山中伸弥教授樹立ヒト iPS 細胞 (201B7 株) を使用する。細胞の分化誘導には、心筋細胞 (PSdif-Cardio Cardiomyocyte Differentiation Kit: StemRD)、神経細胞 (DOPA KIT: VERITAS)、肝臓細胞 (Cellartis Hepatocyte Differentiation Kit: Takara)、脂肪細胞 (PSdif-BA Brown Adipocyte Differentiation Kit: StemRD)、臍臓細胞 (Cellartis Definitive Endoderm Differentiation Kit: Takara) を用いる。RT-PCR 法では、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて mRNA 抽出後、RT kit for qPCR (TOYOBO) を用いて cDNA を合成。Quick Taq HS DyeMix (TOYOBO) を用いて、リアルタイム PCR 法で測定する。未分化マーカーとして、Oct3/4、Nanog、Sox2、Klf4 を用いる。分化細胞の評価には組織特異的発現マーカー遺伝子 (各 2 種類) を用いる。内部標準には β -actin を用いる。

2) 分化細胞へタンパク質 X 阻害剤を投与し、未分化マーカー発現量の変化を調べる

ヒト iPS 細胞を 96well プレートへ播種後、各種分化誘導試薬を用いて、目的の分化細胞を得る。タンパク質 X 阻害剤を 10-40 μ M 含む培地を用いて 2-4 日間培養する。培地交換は 1 回/2 日行う。2-4 日目に、上記の方法によりリアルタイム PCR 法を行い、薬剤の影響を調べるために未分化マーカー遺伝子の発現量の変化を測定する。また、分化細胞を評価するために、組織特異的発現マーカー遺伝子 (各 2 種類) についても定量を行う。分化細胞に対するタンパク質 X 阻害剤の影響を調べるために、セルカウンティングキット 8 (同仁化学)、MTT 細胞数測定キット (ナカライ)、生細胞数測定試薬 SF (ナカライ) を用いて生細胞の活性を調べる。また、サイトトキシティ LDH アッセイキット WST (同仁化学) を用いて死細胞の増減率を調べる。

<平成 29 年度計画>

3) LC/MS/MS を用いて分化細胞の分泌物を網羅的にリストアップする

ヒト iPS 細胞を 6well プレートへ播種後、各種分化誘導試薬を用いて、目的の分化細胞を得る。分化細胞の培養上清は測定結果へのアーティファクトを除くためタンパク質不含有の DMEM を用いる。次に、アミコンウルトラ (ミリポア) 等のタンパク質濃縮メッシ

ュを用いタンパク質を濃縮した後に ZipTip μ -C18 処理によりタンパク質を精製し、LC/MS/MS によるショットガン分析を行う。分化組織より分泌された全てのタンパク質がリストアップされるのでリストを作成する。

4) 分泌物とタンパク質 X 阻害剤を投与し、未分化ヒト iPS 細胞の生存率の変化を調べる

ヒト iPS 細胞を 96well プレートへ播種後、分化細胞の培養上清と共に、タンパク質 X 阻害剤を 10-40 μ M 含む培地を用いて 2-4 日間培養する。培地交換は 1 回/2 日行う。2-4 日目に、上記の方法によりリアルタイム PCR 法を行い、薬剤の影響を調べるために未分化マーカー遺伝子の発現量の変化を測定する。ヒト iPS 細胞に対するタンパク質 X 阻害剤の影響を調べるために、セルカウンティングキット 8 (同仁化学)、MTT 細胞数測定キット (ナカライ)、生細胞数測定試薬 SF (ナカライ) を用いて生細胞の活性を調べる。また、サイトトキシティ LDH アッセイキット WST (同仁化学) を用いて死細胞の増減率を調べる。

以上、本研究では未分化ヒト iPS 細胞を用いた臨床応用に関わる抗腫瘍効果について調べる。様々な種類の分化組織に含まれる未分化 iPS 細胞を除去することが出来れば、研究成果は幅広い臨床分野にて応用が可能である。

4. 研究成果

本研究では、分化組織に混在するヒト未分化 iPS 細胞の除去を目的とした。始めに、未分化 iPS 細胞のみで培養を行い iPS 細胞の除去効果を確認した手法と同じ方法を用いて、分化組織に混在する未分化 iPS 細胞の除去を試みた。

(1) タンパク質 X 阻害剤の効果を調べた。タンパク質 X 阻害剤は、ヒト iPS 細胞の除去効果を持つ。ヒト iPS 細胞専用培地へタンパク質 X 阻害剤を添加 4 8 時間後に未分化 iPS 細胞のコロニー面積は有意に減少した。ヒト iPS 細胞に対する除去効果を持つ化合物 (タンパク質 X 阻害剤) を発見した。

(2) タンパク質 X 阻害剤の作用を分化細胞に最適な培養条件下に調べた。ヒト角膜上皮細胞とヒト iPS 細胞を混ぜて培養し、タンパク質 X 阻害剤の効果を調べた。ヒト iPS 細胞単独と比べて約 4 倍の培地添加濃度にて、タンパク質 X 阻害剤がヒト iPS 細胞に対する除去効果を持つことが分かった (通常の細胞培養培地である FBS10% 含有 DMEM 培地に、ヒト角膜上皮細胞とヒト iPS 細胞を混合培養し、タンパク質 X 阻害剤を添加した。培養 4 8 時間後に未分化 iPS 細胞のコロニー面積は有意に減少した)。タンパク質 X 阻害剤はヒト角膜上皮細胞に最適な培養条件下においてもヒト iPS 細胞に対する除去効果を持つことが

分かった。

(3) 角膜上皮細胞を用いて細胞毒性を評価した。ヒト角膜上皮細胞に対するタンパク質 X 阻害剤の細胞毒性を調べた(通常の細胞培養培地である FBS10%含有 DMEM 培地に、タンパク質 X 阻害剤を任意の濃度で添加しヒト角膜上皮細胞を培養した。培養 48 時間後に生細胞活性測定法である WST-8 アッセイを行うと、タンパク質 X 阻害剤には高濃度でも生細胞活性の低下は無く、細胞毒性はみられなかった。→タンパク質 X 阻害剤に、ヒト角膜上皮細胞に対する細胞毒性は無いと考えられた)。

<1 年度目の研究成果>

(1) ヒト iPS 細胞に対して除去効果を持つ化合物(タンパク質 X 阻害剤)を発見した。(2) タンパク質 X 阻害剤は胎児ウシ血清(FBS)含有培養条件下ではヒト iPS 細胞に対する除去効果が 1/4 に減弱した。(3) タンパク質 X 阻害剤は分化細胞に対する細胞毒性は無かった。

<2 年度目の研究成果>

(1) ヒト iPS 細胞由来分化組織(心筋細胞)に残存するヒト iPS 細胞の生存量を調べるために未分化マーカー遺伝子(Oct3/4)の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて調べた。分化心筋細胞中に未分化マーカー発現量は約 1-10%残存していることが明らかとなった。(2) タンパク質 X 阻害剤はヒト iPS 細胞の未分化マーカー Oct3/4 のみならず、C-MYC を除く、SOX2、FLI4、NANOG、GDF3、REX1、DNMT3b、LIN28 の発現量を有意に抑制した。このタンパク質 X 阻害剤の効果は、再生医療で代表的に使われる血清代替品(KSR)の含有培養条件下でも認められた。一方、培養上清を用いた生体の細胞(ヒト角膜上皮細胞など)の分泌物スクリーニング(ヒト iPS 細胞の未分化維持因子の探索)では、同様の効果を持つ因子は同定されなかった。しかし、マウス胎児線維芽細胞(MEF)や FBS では効果を減弱する作用が認められた。この結果は、胎児細胞にヒト iPS 細胞に対する未分化維持因子が発現していることを示す。(3) LC/MS/MS タンパク質発現解析を基に実験を進めると、タンパク質 Y がヒト iPS 細胞に対して、生存維持に働くことが明らかとなった。さらに、我々の行ったヒト脂肪由来間葉系幹細胞の分泌物を用いた網羅的タンパク質発現解析においてもタンパク質 Y は同定された(Cell Transplantation [IF 3.0]、リバイス中)。

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)

Yoshiki Nakashima, Chika Miyagi-Shiohira, Hirofumi Noguchi, and Takeshi Omasa,

Molecular Therapy (in press)

Yoshiki Nakashima, Saifun Nahar, Chika Miyagi-Shiohira, Takao Kinjo, Zensei Toyoda, Naoya Kobayashi, Issei Saitoh, Masami Watanabe, Jiro Fujita, and Hirofumi Noguchi, Cell Transplantation (査読中)

[雑誌論文] (計 2 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 分化コントロール化合物を用いて造腫瘍性をもつおそれのある未分化 iPS 細胞等の混入を除去する方法

発明者: 中島義基、大政健史、野口洋文、潮平知佳

権利者: 琉球大学

種類: 特許

番号: 特願 2018-064199

出願年月日: 平成 30 年 3 月 29 日

国内外の別: 国内(PCT 出願準備中)

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 義基 (NAKASHIMA, YOSHIKI)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30593082

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

- ()
1. 研究開始当初の背景
 2. 研究の目的
 3. 研究の方法
 4. 研究成果
 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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()