

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01443

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞のゲノム不安定性誘導機構の解明とその統合的品質評価系構築への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism inducing genome instability in human pluripotent stem cells and development of novel test method to assess genome instability

研究代表者

三浦 巧 (Miura, Takumi)

国立医薬品食品衛生研究所・再生・細胞医療製品部・室長

研究者番号：60405355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞は、継続的な培養や分化誘導などの人工的な刺激により、ゲノム変化(染色体喪失、交叉・転座・欠失等の染色体再編、点突然変異)がもたらされることが知られている。本研究では、臨床応用に使用できるヒト多能性幹細胞の安全性確保のために、「無害なゲノム異常」と「腫瘍を誘発するゲノム異常」との違いを明確にすることを目指し、細胞の増殖優位性の原因となる遺伝子および分子機能を解明し、増殖優位性に寄与する遺伝子変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療への応用が期待されているヒト多能性幹細胞において、そのゲノム不安定性に寄与する遺伝子変異を同定することで、これまで未解明であった「ゲノム変異」と「造腫瘍性」との関連が明白になると期待される。つまり、「無害なゲノム異常」と「腫瘍を誘発するゲノム異常」との違いを明らかにすることは、ヒト多能性幹細胞由来製品の品質管理においても大いに役立ち、また、安全性を担保した培養環境を整備することも可能になる。

研究成果の概要(英文)：It has been known that human pluripotent stem cells undergo genomic instability due to artificial stimuli such as continuous culture and differentiation induction. In this study, in order to ensure the safety of human pluripotent stem cells that can be used for clinical applications, we aimed to clarify the difference between "harmless genetic mutations" and "potentially harmful genetic mutations". We detected the DNA mutations that arose during cell culture and showed that some mutations directly or indirectly might confer a selective growth advantage to the cell.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒト多能性幹細胞 ゲノム不安定性 品質評価 レギュラトリーサイエンス 再生医療 次世代シーケンサー

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、ES 細胞や iPS 細胞と言ったヒト多能性幹細胞が、再生医療・細胞治療のための原材料として使用されており (Alper J., *Nat Biotechnol* (2009)、Schwartz SD et al., *Lancet* (2012)、Realdon S et al., *Nature* (2014))、これらヒト多能性幹細胞由来の細胞をヒトに投与する際には、安全性上の懸念がないかを厳密に確認する必要がある。最も配慮すべき安全性上の懸念事項は、移植された細胞の中にがん細胞になる細胞が含まれていないことを明確にすることである。ヒト多能性幹細胞由来細胞の腫瘍形成能に関しては、以下の 2 つの事項が主に考えられる。ヒト多能性幹細胞は、動物体内に移植された際に腫瘍を形成する能力、いわゆる「造腫瘍性」を本質的な特性として保持している。そのため、多能性幹細胞を原材料とした医薬品・医療機器においては、未分化細胞や造腫瘍性細胞の混入・残留による異所性組織形成や腫瘍形成およびがん化を防止することが求められており、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となっている。ヒト多能性幹細胞は、継続的な培養や分化誘導などの人工的な刺激により、ゲノム変化 (染色体喪失、交叉・転座・欠失等の染色体再編、点突然変異) がもたらされることが知られている (International Stem Cell Initiative et al., *Nat Biotechnol* (2011))、このようなゲノム変化は、細胞治療を実施する際の安全性を脅かす恐れがあるが (図 1)、「ゲノム変化」と「造腫瘍性」とを関連づける明確な証拠は不十分である。そのため、ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療に遅れが生じつつあり、「夢の再生医療」の早期実現に向けての大きな課題となっている。このような状況の中、日本国内で実施されるヒト多能性幹細胞を用いた治療や臨床研究においては、ヒトに移植する細胞の安全性を評価するために、患者に移植する目的で iPS 細胞などから作製した細胞については遺伝子異常を調べることが要求されている。即ち、移植細胞のゲノム異常とがん化との関連を明らかにすることが、ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療を進展させる上でも急務と考えられる。しかしながら、臨床応用に使用できるヒト多能性幹細胞のゲノム変化において、「無害なゲノム異常」と「腫瘍を誘発するゲノム異常」との違いに関しては、未だ明確にされていない。

### 2. 研究の目的

再生医療は、さまざまな臓器、組織が欠損状態や機能障害や機能不全に陥った場合、失われた機能を再生するために、人工的に培養した細胞や組織などを損傷した臓器や組織に移植することにより、臓器や組織機能を再建する新しい医療技術である。細胞ソースとして特に期待されている細胞は、分化多能性の特性をもつ胚性幹細胞 (ES 細胞) および人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) であり、既に数例の疾患に対して、ES/iPS 細胞を用いた臨床試験が国内外で実施されている。しかしながら、「生きた細胞」を製品として扱うこのような再生医療は、これまでの医薬品等とは異なる治療法でもあり、「生きた細胞」を製品化するための品質管理などには標準的な手法は未だ定まっておらず、多くの課題が存在している。このような現状の中、最近、iPS 細胞の品質評価系の指標として、iPS 細胞の特性のひとつである「ゲノム不安定性」に着目し、次世代シーケンサーを用いたゲノム変異の包括的な解析が行われている。そこで本研究では、このゲノム不安定性を惹起する原因遺伝子を同定し、その分子機構を解明することにより、再生医療等製品の品質管理上問題となりうるゲノム不安定性の統合的評価系を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト細胞の培養

ヒト iPS 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。ヒト iPS 細胞の継代によるゲノム変異への影響を観察するために、15 週間、3 継代ごとにヒト iPS 細胞を回収し、ゲノム抽出を行った。また、ゲノム不安定性を呈する細胞株を準備するために、DNA 修復機構に関与する遺伝子に対してゲノム編集技術により変異を導入し、増殖優位性の獲得に関して検証した。

#### (2) 全エクソーム解析

ヒト iPS 細胞からのゲノム抽出は、NucleoSpin Tissue (MACHERY-NAGEL 社) を用いて行った。抽出されたヒト iPS 細胞のゲノム DNA の品質を濃度測定および電気泳動などにより確認した。サンプルを数百 bp に物理的に断片化を行い、二本鎖 DNA の両末端にアダプターを付加したフラグメントライブラリーを作製した。SureSelect Human All Exon V5 (アジレント・テクノロジー社) を用いて Exon (CDS) 領域を濃縮し、タグ配列を有するプライマーを用いて PCR 増幅を行い、シーケンスの鋳型となる DNA ライブラリーを作製した。HiSeq2500 システム (イルミナ社) を用いて、100base 両末端のシーケンスを行い、5Gbase

相当のシーケンスデータを得た。シーケンスデータを参照ゲノム配列 (hg19) に対してマッピングし、ペア検体のマッピング情報から、体細胞変異塩基 (一塩基置換および十数塩基程度までの挿入、欠失) を検出した。さらに遺伝子位置情報ならびに既知変異データベースを用いて、体細胞変異塩基位置をアノテーションした。ゲノム DNA における Exon (CDS) 領域を濃縮し、次世代シーケンサーによるシーケンスを行ったのち、変異塩基を抽出した。

### (3) 体細胞変異塩基の解析

体細胞変異検出ソフトには、Strelka、Virmid、MuTect を用いた。継代前および継代後の iPS 細胞におけるマッピング結果および参照配列を体細胞変異検出ソフトに入力し、参照配列上で継代後サンプルのリードが継代前サンプルのリードと異なる箇所 (一塩基置換、短い挿入・欠失配列) を体細胞変異塩基候補として検出した。さらに、フィルタリングにより確度の高い体細胞変異塩基候補を絞り込んだ。

## 4. 研究成果

### (1) 培養中においてゲノム変化が起こりやすいモデル細胞の樹立

ゲノム編集技術を用いて、DNA ミスマッチ修復 (Mismatch Repair : MMR) 遺伝子である MLH1, MSH2, MSH6 などの遺伝子の標的破壊 (ノックアウト) を試みた。その結果、標的遺伝子のエクソン領域において、塩基欠損の導入、または、挿入変異の導入をもつ細胞株を取得することができ、標的遺伝子のタンパク質の機能が破綻していると予想された。また、ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide Excision Repair : NER) 機構に異常をもつ iPS 細胞において増殖速度について検討を行ったところ、正常な iPS 細胞との顕著な差は認められなかった。

### (2) ヒト iPS 細胞の長期培養過程で生じたゲノム変異の機能解析

ヒト iPS 細胞の長期培養過程で生じたゲノム変異の存在について、以下の解析に基づいて評価した。「増殖速度の評価」に関しては、培養期間 (継代数) および培養液の組成を一致させた iPS 細胞を数株準備し、増殖速度を評価した結果、増殖優位性を獲得した細胞の出現を観察することはできなかった。次に、細胞集団中に僅かに潜む増殖優位性を獲得した細胞の存在を確認するために、「増殖優位性に関与するゲノム変異の解析」を実施した。iPS 細胞の培養期に生じた変異 (一塩基変異、挿入、欠失) を検出するために、次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析を実施し、継代ごとにおける変異の蓄積を検証した。その結果、染色体 3 番、15 番、19 番に位置する遺伝子において、継代に伴った変異の蓄積が観察された。この結果は、細胞集団中に増殖優位性を獲得した細胞が僅かに存在することを意味し、これら変異に位置する遺伝子の機能が、増殖優位性と深く関わりがあることも示唆している。

### (3) 培養過程で生じた体細胞変異の蓄積パターンの解析

ヒト iPS 細胞の長期培養中における体細胞変異の蓄積パターンをより詳細に解析するために、様々な DNA 変異解析アルゴリズムを用いて、培養期に生じた変異の変動をモニターし、ヒト iPS 細胞の継代中における体細胞変異の蓄積パターンを評価した。3 継代ごと (15 継代まで) に収集されたエキソーム解析データを、3 つの体細胞 SNV 解析アルゴリズム (Strelka、Virmid、GATK) により解析した結果、低アリル頻度 (<5%) の 1 塩基多型 (SNV : Single Nucleotide Variant) でさえも高精度で検出できることが確認された。次に、染色体ごとで DNA 変異数の比率を解析した結果、著しく変異が集積している染色体の存在は観察されなかった。但し、12 番染色体上に位置する変異のアリル頻度に関しては、25% 付近または 75% 付近で一定している変異が多く集積していたことから、12 番染色体がトリソミーになっていることが予想された。そこで、核型解析 (G-band 解析) により染色体異常を確認したところ、12 番染色体のみがトリソミーになっていることが判明し、SNV の変異変動パターンを経時的に解析することにより、トリソミーの存在を予測できることが可能であると示唆された。また、メチル化関連の遺伝子発現や変異について解析したところ、培養にともなった変化が認められなかったことから、継代によるメチル化異常は生じていないことが示唆された。

### (4) 増殖優位性の原因となる遺伝子および分子機能の解明

エクソン領域以外 (イントロン領域、遺伝子間領域) にも、細胞の増殖優位性に寄与する遺伝子変異が存在することが予想されたため、全ゲノムにまで解析範囲を広げ、高密度なゲノム変異解析を試みた。その結果、染色体 1 番、2 番、4 番、6 番、7 番、9 番、10 番、15 番、19 番、X のイントロン上に位置する遺伝子において、継代に伴った変異の蓄積が観察された。特に、4 番染色体のイントロン上においては複数箇所の変異の蓄積が認められた。この

ことは、これらイントロン上の変異によって近傍遺伝子の転写制御異常が発動され、細胞増殖の引き金になった可能性が示唆された。一方で、染色体4番、11番、14番、15番、17番、18番、19番のイントロン上に位置する遺伝子において、継代に伴った変異蓄積の減少が観察されたことから、これら変異に関しては細胞死や増殖抑制に関与している可能性が高いと思われた。興味深いことに、19番染色体に存在する補体第3成分(C3)遺伝子のイントロン上の4箇所の変異については、dbSNPに収載されている一塩基多型(SNP)であった。従って、これらSNPによるC3の機能獲得異常、及び、その制御因子の機能喪失異常が間接的に細胞増殖抑制に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kuroda Takuya, Yasuda Satoshi, Tachi Shiori, Matsuyama Satoko, Kusakawa Shinji, Tano Keiko, Miura Takumi, Matsuyama Akifumi, Sato Yoji	4. 巻 10
2. 論文標題 SALL3 expression balance underlies lineage biases in human induced pluripotent stem cell differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09511-4	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 Yasuda S, Kusakawa S, Kuroda T, Miura T, Tano K, Takada N, Matsuyama S, Matsuyama A, Nasu M, Umezawa A, Hayakawa T, Tsutsumi H, Sato Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Tumorigenicity-associated characteristics of human iPS cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0205022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0205022	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 三浦 巧	4. 巻 8
2. 論文標題 米国における再生医療の規制の動向とヒトES細胞の医療応用の現状	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 再生医療と医事法（医事法講座第8巻）	6. 最初と最後の頁 121-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Miura Takumi, Yasuda Satoshi, Sato Yoji	4. 巻 22
2. 論文標題 A simple method to estimate the in-house limit of detection for genetic mutations with low allele frequencies in whole-exome sequencing analysis by next-generation sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Genomic Data	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12863-020-00956-x	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 黒田拓也, 安田智, 城しおり, 松山さと子, 草川森士, 田埜慶子, 三浦巧, 松山晃文, 佐藤陽治
2. 発表標題 ヒトiPS細胞分化傾向予測マーカーSALL3の機能解析
3. 学会等名 日本再生医療学会 第1回秋季科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuroda T, Yasuda S, Tachi S, Matsuyama S, Kusakawa S, Tano K, Miura T, Matsuyama A, Sato Y
2. 発表標題 SALL3 expression balance underlies lineage biases in human iPS cell differentiation
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohashi F, Miyagawa S, Yasuda S, Miura T, Kuroda T, Itoh M, Kawaji H, Ito E, Yoshida S, Saito A, Oyama K, Matsuda I, Sameshima T, Kawai J, Sawa Y, Sato Y
2. 発表標題 Searching for a predictive biomarker to select human induced pluripotent stem cells with high cardiac differentiation potential
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋文哉、宮川繁、安田 智、三浦 巧、黒田拓也、伊藤昌可、川路英哉、伊東絵望子、吉田昇平、齋藤充弘、大山賢二、松田 勇、鮫島正、河合 純、澤 芳樹、佐藤陽治
2. 発表標題 心筋細胞に分化指向性を有するiPS細胞株を選択するためのバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miura T, Yasuda S, Okamura K, Kusakawa S, Umezawa A, Sato Y.
2. 発表標題 ASSESSMENT OF THE APPEARANCE OF SPONTANEOUS GENOMIC MUTATIONS IN HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦 巧、佐藤陽治
2. 発表標題 医療応用を目指したゲノム編集技術における品質・安全性評価の考え方
3. 学会等名 第17回 日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦 巧
2. 発表標題 多能性幹細胞加工製品中に混在する未分化性/造腫瘍性細胞の検出法の開発
3. 学会等名 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田 拓也, 安田 智, 松山 さと子, 三浦 巧, 松山 晃文, 川路 英哉, 伊藤 昌可, 河合 純, 佐藤 陽治
2. 発表標題 ヒトiPS細胞における神経分化予測マーカーの同定
3. 学会等名 第20回再生医療学会総会 (Web開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kuroda T, Yasuda S, Miura T, Itoh M, Kawaji H, Kawai J, Sato Y
2. 発表標題 A transcriptomic approach for predictive markers to select human induced pluripotent stem cells with high neural progenitor cell differentiation potential
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2020 Annual Meeting Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------