

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19010

研究課題名（和文）新奇な細胞応答性の違いを利用した細胞分離法の開発とそのメカニズム解明

研究課題名（英文）Development of a cell separation method using medium with high concentration of amino acids

研究代表者

清水 一憲（Shimizu, Kazunori）

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：70402500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高濃度アミノ酸添加溶液を用いた未分化iPS細胞の選択的除去手法の開発と細胞応答メカニズムの解明を行った。複数の未分化iPSCsや分化細胞としてヒト初代細胞、iPSC由来分化細胞を用いた。濃度や曝露時間を変えて実験を行った結果、1.2 mol/lのL-アラニンを追加した培地に2時間曝露することで効率よく、未分化iPS細胞を選択的に除去可能なことを見出した。様々な培地成分やL-アラニンの異性体、温度、エンドサイトーシスの阻害剤を用いた実験を行い、細胞応答メカニズムの仮説を提案するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞由来分化細胞を用いた再生医療の実用化が期待されている。現在の分化誘導技術では、移植用iPS由来分化細胞群に未分化iPS細胞が一部残存する。未分化iPS細胞を移植するとテラトーマを形成する可能性があるため、残存する未分化iPS細胞を効率よく選択的に除去する必要がある。本研究で開発した技術を用いると、未分化iPS細胞を安価に迅速に効率よく除去することができることから、本技術はiPS細胞を用いた再生医療の実現に寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a selective removal method for undifferentiated iPSCs using a high-concentration amino acid-added solution and clarify the cell response mechanism. Undifferentiated iPSCs and differentiated cells including human primary cells and iPSC-derived cells were used. As a result of conducting experiments by changing the concentration and the exposure time, it was found that the undifferentiated iPSC cells can be efficiently and selectively removed by exposing to a medium containing 1.2 mol / l L-alanine for 2 hours. We conducted experiments using various media components, L-alanine isomers, temperature, and inhibitors of endocytosis, and proposed a hypothesis of a cell response mechanism.

研究分野：生物工学

キーワード：再生医療 バイオテクノロジー 生物・生体工学 生体機能利用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞は非常に有望な再生医療用材料である。しかし現在の iPS 細胞分化誘導法では、分化誘導した細胞群の中に未分化 iPS 細胞がある割合で残存することが問題である。残存未分化 iPS 細胞を移植すると腫瘍形成の恐れがあり、移植前に未分化 iPS 細胞を完全に除去する必要がある(1)。現行のセルソーターを用いた細胞分離法(細胞表面抗原に対し蛍光標識抗体を作用させ光学的に分別する方法)は、精度は非常に高い。しかし、再生医療に必要な大量の細胞を分離するためには、時間とコスト面で問題である。このようなことから、大量の細胞を効率的かつ低コストに一気に分離できる新たな技術の開発が必要である(2)。

我々はこれまでに未分化 iPS 細胞分離技術の探索を行い、培養液を常温大気圧プラズマで処理したプラズマ活性化培地を用いると、未分化 iPS 細胞を選択的に死滅させることができることを見出してきた(3)。さらに最近になり、高濃度アミノ酸溶液入り培地を用いて未分化 iPS 細胞を選択的に死滅させることができる可能性を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、我々が発見した高濃度アミノ酸入り細胞培養液に対する細胞応答の違いを、1.残存未分化 iPS 細胞分離技術に応用すること、さらに 2.その細胞応答メカニズムの解明を行うことの 2 点を目的とする。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の培養 未分化 iPS 細胞として 201B7 およびエピソードベクターを用いて作製された iPS 細胞(以下 eiPS 細胞)を使用し、37°C、5% CO₂、95% Air 下の CO₂ インキュベーター内にて培養した。培地は Stem Fit(AK02N)を使用した。継代は次のように行った。サブコンフルエント状態となった iPS 細胞の培養容器から培地を除き、トリプシン溶液を 1 ml 加え、PBS 4 ml で一度洗浄し、Stem Fit 2.5 ml を加えてセルスクレーパーで細胞を剥がし、懸濁した。得られた細胞懸濁液は 10 μM Y-27632 を含む Stem Fit に懸濁した。懸濁液に iMatrix-511 を加え、T25 フラスコへ播種した。24 h 後に培地交換を行い、Y-27632 を除去した。その後は 48 h ごとに培地交換を行った。

(2) 分化細胞の培養 分化細胞のモデルとして Normal Human Dermal Fibroblast(以下 hFBs) および Human Umbilical Vein Endothelial cells(以下 HUVEC)を使用し、37°C、5% CO₂、95% Air 下の CO₂ インキュベーター内にて培養した。培地は hFBs には Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose(以下 DMEM)に FBS 10% および抗生物質を混合したものを、HUVEC には HuMedia を用いた。継代は次のように行った。サブコンフルエント状態となった細胞の培養容器から培地を除き、PBS で 2 度洗浄した後、トリプシン溶液を加えてインキュベートし、細胞が底面より剥離した後に、培地を加えて細胞懸濁液を回収し、新たな培養基板に播種した。培地交換は 24 h 毎に行なった。

(3) 高濃度アミノ酸溶液の調製 Stem Fit 10 ml にアミノ酸を 1.2 mol/L となるように溶解した。この溶解液を Stem Fit で希釈することで種々の濃度の溶液を調製した。

(4) WST-8 assay 細胞を 1.0×10⁵ cells/ml となるように Stem Fit に懸濁し、Y-27632 を 10 μM、iMatrix-511 を懸濁液 6 ml に対して 12 μl 加えた後に 1.0×10⁴ cells/well 播種した。一定期間培養後、Cell Counting Kit-8 と Stem Fit を 1:10 となるように混合した溶液を 100 μl/well で添加した。1 h インキュベート後、420 nm の吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。

(5) 共培養 Cell Tracker Orange で染色した hFBs を 201B7 を培養している 35 mm dish に 1.0×10⁵ cells/dish で播種し、24 h 培養した。培地を除き、高張液を加え、任意の時間インキュベートした。その後、高張液を除いて PBS で洗浄し、Stem Fit を加えた。

(6) iPS 細胞の分化誘導 レチノイン酸を用いた分化誘導は次のように行った。6 well plate に 201B7 を 1.2×10⁴ cells/well で播種し、培養した。その後、5 μl All-trans-Retinoic Acid を含む Stem Fit に交換した。以後、8 日間にわたって(播種から 9 日目まで)、48 h 毎に Retinoic Acid 入りの培地に交換した。細胞凝集塊を用いた分化誘導は次のように行った。201B7 を 1.0×10⁵ cells/ml となるように 10% FBS 入り DMEM に懸濁し、細胞非

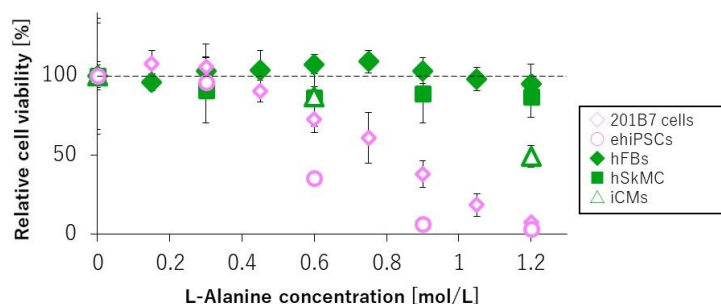


図1 L-アラニン濃度の影響

接着性 dish に加えた。2 日おきに培地交換しながら 2 週間培養した。作製した細胞塊を細胞接着性 dish に移し、接着培養を行った。1 週間おきに細胞をトリプシンで剥がし、剥がした細胞の半量を新しい細胞接着性 dish に継代した。

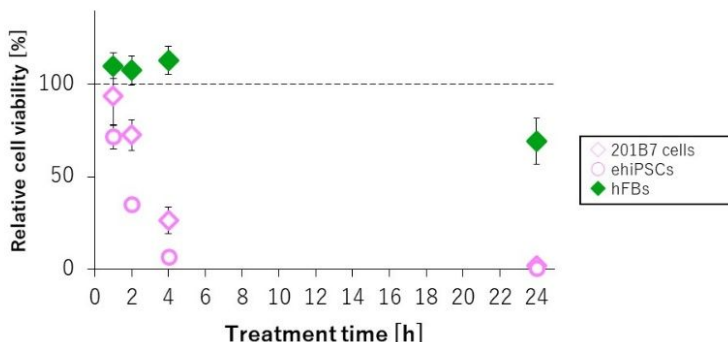


図2 処理時間の影響

(7) フローサイトメトリ

5 μ M Cell Tracker

Green で染色した iPSC 細胞

を 6 well plate に 5.0×10^5 ,

2.5×10^5 , 1.2×10^5 cells/well となるよう播種し、12 時間培養した。その後、hFBs を 5.0×10^5 cells/well

となるように播種した。hFBs の播種から 12 時間後に 1.2 mol/L L-アラニン添加培地に交換し、2 時間培養した。その後、通常の培地に交換し 12 時間培養し、再び 1.2 mol/L L-アラニン添加培地に交換し、2 時間培養した。通常の培地に交換し、12 時間培養した後、フローサイトメーターを用いて緑色蛍光を発する細胞と発さない細胞の比率を測定した。

を 6 well plate に 5.0×10^5 ,

2.5×10^5 , 1.2×10^5 cells/well となるよう播種し、12 時間培養した。その後、hFBs を 5.0×10^5 cells/well

となるように播種した。hFBs の播種から 12 時間後に 1.2 mol/L L-アラニン添加培地に交換し、2 時間培養した。その後、通常の培地に交換し 12 時間培養し、再び 1.2 mol/L L-アラニン添加培地に交換し、2 時間培養した。通常の培地に交換し、12 時間培養した後、フローサイトメーターを用いて緑色蛍光を発する細胞と発さない細胞の比率を測定した。

(8) 阻害剤アッセイ

細胞内へのアミノ酸の取り込み機構を解明するため、クラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤である PitStop2、脂質ラフト依存型エンドサイトーシス阻害剤である Filipin、マクロピノサイトーシス阻害剤である Ethylisopropyl amiloride (EIPA) を用いた。

4. 研究成果

(1) 高濃度 L-アラニン添加培地に対する未分化および分化細胞の感受性の違い

高濃度 L-アラニン添加培地を用いて分化細胞群から未分化 hiPSCs を選択的に除去可能か調べるため、2 種類の hiPSC と 3 種類の分化細胞を用いて感受性の違いを明らかにした。用いた未分化 hiPSCs は、201B7 と ehiPSC であり、用いた分化細胞はヒト皮膚線維芽細胞 (hFB) ヒト骨格筋細胞 (hSkMC) および hiPSC 由来心筋細胞 (iCM) である。細胞を様々な濃度 (0–1.2 mol/L) または処理時間 (1–24 h) で高濃度 L-アラニン添加培地に曝露し、通常の培地に交換して 24 時間後の細胞生存率を測定した。

様々な濃度の L-アラニンを含む培地に 2 時間曝露させた結果 (図 1) 201B7、ehiPSC の両方の生存率は、L-アラニン濃度の増加とともに減少し、1.2 mol/L 濃度でそれぞれ $7.5 \pm 1.3\%$ および $3.7 \pm 0.7\%$ となった。一方、hFBs と hSkMCs の生存率の低下は観察されなかった (hFBs は $94.9 \pm 12.5\%$ 、hSkMCs は $87.0 \pm 13.1\%$)。iCMs の生存率はわずかに減少したが、L-アラニン濃度 1.2 mol/L で $49.4 \pm 6.9\%$ となり、201B7 と ehiPSC の生存率よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。また 1.2 mol/L の L-アラニン入り培地で 2 時間処理した 201B7 は、通常の培地に再び曝露した際に、ヨウ化プロピジウム (PI) により染色された。

さらに、0.6 mol/L L-アラニン添加培地で 1、2、4、および 24 時間培養した場合の影響を調べた (図 2) 201B7、ehiPSC の生存率は、2 時間または 4 時間の処理することで劇的に減少した。対照的に、hFB の生存率は 1、2、および 4 時間で減少せず、24 時間の処理でも、わずかな減少にとどまった ($69.3 \pm 1.3\%$)。

また、浮遊培養および平面培養で、感度の違いが観察されるかどうかを明らかにした。浮遊培養した 201B7 の生存率は、1.2 mol/L L-アラニン入り培地に 2 時間処理した結果、 $11.8 \pm 6.0\%$ に減少した。一方で、hFBs の生存率は $72.9 \pm 14.2\%$ であった (図 3)。

(2) 高濃度 L-アラニン添加培地による未分化細胞の選択的除去

分化細胞と共培養した未分化 iPSCs を選択的に除去可能かどうか調べた。まず、201B7 を分化誘導した hiPSC 由来の線維芽細胞様細胞 (iFLC) を使用した。蛍光標識した 201B7 と iFLC を共培養し、1.2 mol/L L-アラニン添加培地で 2 時間処理した。その結果、処理により、201B7 はその大半が培養基板から除去された。一方で、iFLC はそのほとんどが基板に接着したままであった (図 4)。

次に、hFBs と 201B7 を共培養した場合の選択性

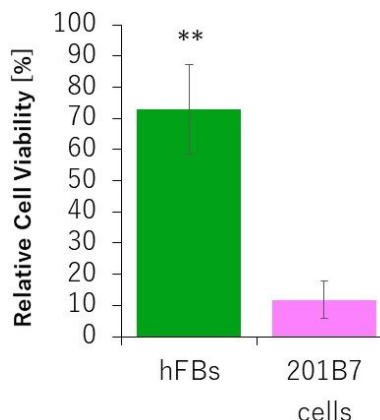


図3 浮遊培養の影響

を定量的に調べた。蛍光標識した 201B7 (緑) と hFB を異なる比率で播種し (201B7 : hFB が、1 : 1、1 : 2 および 1 : 4)、1.2 mol/L L-アラニン入り培地で 2 時間処理した。その結果、何も処理しなかった場合、201B7 細胞の 57.4%、36.5%、17.1% がそれぞれ 1 : 1、1 : 2、1 : 4 の状態で観察されたが、処理したことで、201B7 細胞の数がそれぞれ 10.8%、4.8%、および 1.4% に減少した。さらに処理を繰り返したところ、0.9%、0.5%、0.1% に低下した。これらの結果より、高濃度アミノ酸処理により、残存未分化 iPSCs の選択的な除去が可能であることがわかった。

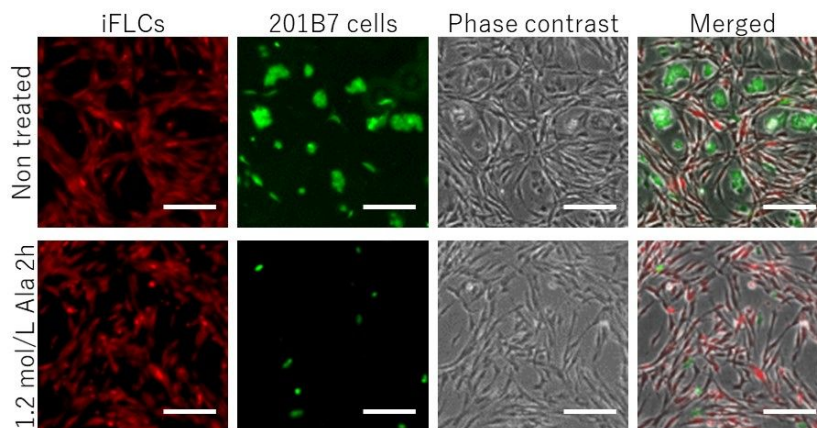


図4 共培養への効果

(3) 細胞応答メカニズムの検証 浸透圧の急激な変化が未分化細胞の選択的排除の理由の一つであると推測し、次の実験を行った。培地に含まれるイオンと糖である NaCl、KCl、および D-グルコースが hiPSC と hFB の生存率に及ぼす影響を調べた。その結果、高濃度の NaCl、KCl または D-グルコース添加培地による曝露により、未分化 hiPSCs、hFBs の両方が死滅した。この結果から、高濃度 L-アラニン添加培地による未分化 iPSCs

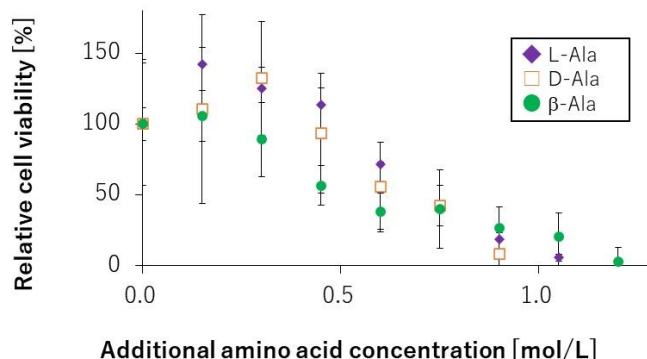


図5 異性体による処理

の選択的除去は浸透圧の影響ではないことが示唆された。

次に、L-アラニンの異性体である D-アラニンと β-アラニンの影響を調べた。その結果、D-アラニンまたは β-アラニンでも L-アラニンをういた場合と同様の選択的除去が達成された (図 5)。そこで次に、基質非特異的にアミノ酸を取り込む機構としてエンドサイトーシスに注目し、実験を行った。エンドサイトーシスは低温で阻害されることが知られているため、4°C で実験を行ったところ、201B7 の細胞死が抑制された。さらにクラスリン依存型エンドサイトーシスの阻害剤 PitStop2、クラスリン非依存型エンドサイトーシスの阻害剤 Filipin、マクロピノサイトーシスの阻害剤 EIPA を作用させ、細胞死が抑制されるか調べた。その結果、いずれの阻害剤も 201B7 の細胞生存率を回復することがなかった。

上述したように様々な実験を行ったが、高濃度アミノ酸添加培地に対する細胞応答メカニズムを完全に明らかにするには至らなかったが、これまでの結果をまとめて図 6 に示す仮説を立てるに至った。すなわち、L-アラニンの濃度が高いと、細胞から水が外向きに移動する。高濃度 L-アラニン添加培地での 2 時間のインキュベーション中に、iPSC は細胞内エネルギーを使用する

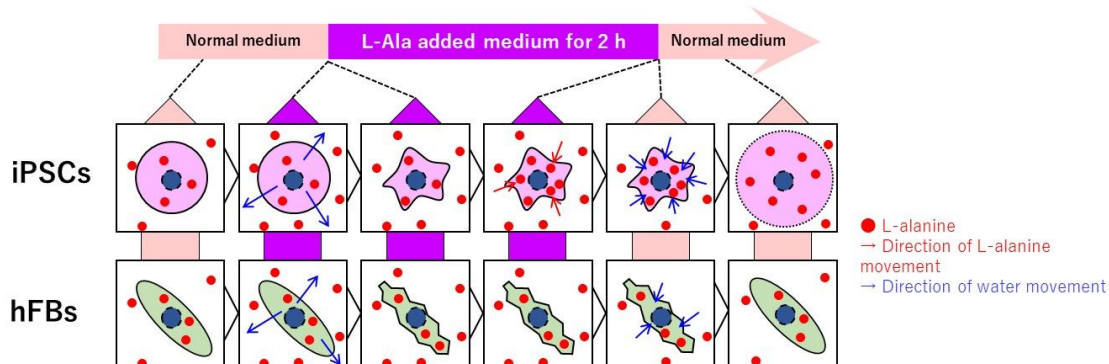


図6 仮説

メカニズムによってL-アラニンが内部に移行し、高張状態になる。通常培地に置換すると、hiPSCは水を吸収して膨潤し、その結果としての原形質膜の破裂を引き起こす。一方、分化した細胞は、L-アラニンの過剰な取り込みを回避するメカニズム、または細胞内の過剰なL-アラニンを培地にエクスポートするメカニズムを備えている可能性がある。これにより、通常培地に置換した際に過剰な水の内向きへの移動を抑制し、原形質膜の膨張を防ぐ。今後、グリシン、セリン、バリン、システイン、フェニルアラニンなどの他のアミノ酸を使用した実験、あるいはアミノ酸だけでなくペプチドを用いた実験を行うことで、細胞応答メカニズムの解明につながると期待される。

1. **Ben-David, U. and Benvenisty, N.:** The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells, *Nat Rev Cancer*, **11**, 268-277 (2011).
2. **Rodrigues, G. M., Rodrigues, C. A., Fernandes, T. G., Diogo, M. M., and Cabral, J. M.:** Clinical-scale purification of pluripotent stem cell derivatives for cell-based therapies, *Biotechnol J*, **10**, 1103-1114 (2015).
3. **Matsumoto, R., Shimizu, K., Nagashima, T., Tanaka, H., Mizuno, M., Kikkawa, F., Hori, M., and Honda, H.:** Plasma-activated medium selectively eliminates undifferentiated human induced pluripotent stem cells, *Regenerative Therapy*, **5**, 55-63 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagashima Takunori, Shimizu Kazunori, Matsumoto Ryo, Honda Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Selective Elimination of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Medium with High Concentration of L-Alanine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-018-30936-2	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 長島拓則、清水一憲、松本凌、本多裕之
2. 発表標題 高濃度アミノ酸入り培地を用いた未分化ヒトiPS細胞の選択的細胞死
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長島拓則、清水一憲、松本凌、本多裕之
2. 発表標題 高濃度アミノ酸添加培地への耐性差による未分化ヒトiPSの選択的除去
3. 学会等名 化学工学会第83年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長島拓則、清水一憲、松本凌、本多裕之
2. 発表標題 アミノ酸高濃度添加培地による未分化iPS細胞除去
3. 学会等名 第17回再生医療学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 未分化多能性幹細胞の選択的な除去	発明者 清水一憲、本多裕之、長島拓則	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-149479	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名古屋大学工学研究科本多研究室ホームページ https://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/life2/index.html
--

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