

201406024A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を
保持した保存体制の確立

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を
保持した保存体制の確立

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成27(2015)年 3月

目 次

I. 平成 26 年度研究班名簿	-----	3
II. 総括研究報告		
臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立		
江良 択実	-----	4
III. 分担研究報告		
1. 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した		
保存体制の確立		
桑 昭苑	-----	8
2. 画像定量解析による iPS 細胞の品質評価の確立		
斉藤 典子	-----	11
3. 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した		
保存体制の確立		
白木 伸明	-----	13
4. 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した		
保存体制の確立		
松本 志郎	-----	16
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	21
V. 研究成果の刊行物・別刷	-----	22

平成 26 年度 厚生労働省
再生医療実用化研究事業

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

	氏名	所属等	職名
研究代表者	江良 択実	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野	教授
研究分担者	桑 昭苑	熊本大学 発生医学研究所 多能性幹細胞分野	教授
	斉藤 典子	熊本大学 発生医学研究所 細胞医学分野	准教授
	白木 伸明	熊本大学 発生医学研究所 多能性幹細胞分野	准教授
	松本 志郎	熊本大学 医学部附属病院 総合周産期母子医療センター	講師

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究代表者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

iPS 細胞は多分化能を持ち、試験管内増幅が可能で、長期保存にも耐えうることから、必要な細胞を誘導して移植医療へ応用する研究が進んでいる。本研究では、1) 臨床に用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。平成 26 年度は、ヒト iPS 細胞を使った臨床研究を開始した理化学研究所と協議を行ない細胞提供と保存に必要な書類を整えた。iPS 細胞に、継代方法、細胞源や樹立方法が与える影響について、コロニー形成能と奇形腫形成能を中心に解析した。その結果、コロニー形成能力が高い iPS 細胞株は腫瘍形成能力が高い傾向が見られた。一方、細胞内に外来因子が残らない安全性が高くかつ効率よく iPS 細胞作製を行うために新しいセンダイウイルス・ベクターを開発した。ヒト線維芽細胞と血液細胞を使った実験より、この新型ベクターが従来型より作成効率が高く、容易にベクターを iPS 細胞から除去できることが示された。

研究分担者

桑 昭苑

熊本大学発生医学研究所 教授

斉藤 典子

熊本大学発生医学研究所 准教授

白木 伸明

熊本大学発生医学研究所 准教授

松本 志郎

熊本大学医学部附属病院 講師

A. 研究目的

私達の体の発生、維持、修復に関わる体性幹細胞は医学的にも重要な治療ツールである。しかし、採取が困難であったり、数が少なかったり、試験管内増幅法が確立していなかったり等の理由から医療への応用は限られた幹細胞に留まっている。

iPS 細胞は、すべての体細胞になれる優れた分化能力を持っている。試験管内での無制限な増幅が可能であり、長期保存にも耐えうる。こ

の利点を生かし、多能性幹細胞から必要な細胞を誘導し、移植医療へ応用する研究が進んでいる。しかし、誘導した細胞の持つ機能や治療効果については未だ不明な部分も多く、加えて、未分化細胞の混入による腫瘍形成の問題も存在する。実際の臨床現場でこれらの問題が起こった時や予期せぬトラブルが生じた場合、用いた細胞と同じロットの細胞を使って、様々な方向からトラブルの原因を検証できる体制の構築は必須である。本研究では、1) 臨床に実際に用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。

平成 26 年度は、臨床研究を開始した理化学研究所より、臨床研究に用いた iPS 細胞の提供体制を整えると共に iPS 細胞の安全性、特に腫瘍能力についての解析を進める。また、安全性の高い新しい iPS 細胞作製用のベクター開発を行う。

B. 研究方法

1. 臨床研究に用いる iPS 細胞の収集と保存

平成 26 年度に臨床研究を開始した理化学研究所、高橋政代先生のグループと協議を行い、臨床研究に使用した iPS 細胞の提供体制を整える。

2. iPS 細胞の腫瘍化能力に関わる分子の解明

プレート上でのコロニー形成能力が異なる iPS 細胞株を免疫不全マウスに移植し腫瘍形成能力（奇形腫形成能力）の違いについて解析する。さらに、腫瘍形成能力が高い iPS 細胞と低い iPS 細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて網羅的発現遺伝子解析を行う。

3. 安全性が高く効率よく iPS 細胞を作製できる新たなセンダイウイルス・ベクターの開発

染色体に取り込まれずに遺伝子発現を行うセンダイウイルス・ベクターを使って、体細胞から iPS 細胞の誘導効率を向上させ、樹立早期にウイルス除去を可能とするベクターを開発する。この目的を達成するために、Sox2、KLF4、Oct3/4 の初期化因子が 1 つのウイルスベクター上にタンデムに並んだベクターを作成する。このベクターを用いて、ヒト線維芽細胞や血液細胞からの iPS 細胞の誘導効率やウイルスの除去率等を調べる。

(倫理面への配慮)

1) 倫理審査等

本研究は、申請者らが所属する機関の倫理審査委員会の承認を得て行う。申請者らは、正常および疾患由来 iPS 細胞を樹立し研究することについてはすでに所属機関の倫理委員会にて承認済であり、利益相反自己申告書も提出済である。他機関からの iPS 細胞の受け入れは、他機関の倫理委員会の承認後、細胞由来の個人の同意のもと作製されたことを確認して受け入れる。

2) 人権擁護上の配慮

また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、細胞提供者が特定される個人情報公表されることない。本研究のために特別に用意した番号（記号）によって

管理し、年齢・性別・培養条件の付帯情報については、申請者の所属機関にて管理を行う。iPS 細胞は熊本大学発生医学研究所内にあるヒト幹細胞培養室に設置する超低温フリーザーと液体窒素タンクにて管理する。この部屋へは許可された研究者のみ暗証番号キーにて入室できる。また発生医学研究所に隣接する共用棟には平成 24 年度に新たにヒト ES/iPS 細胞培養室を新設した。ここでは、培養ができるほか、同様に液体窒素タンクにて iPS 細胞を保存できる。ここへの入室は、許可を受けた研究者が渡されるカードキーによってのみ可能である。iPS 細胞の培養と細胞ストックの作製は記録を義務づける。細胞ストックチューブにはバーコードを取り付け、コンピューターにて管理を行う。細胞は由来の個人が特定できない記号によって再標識される。以上より、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取については、研究目的・予想される成果、情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、研究担当者からの十分な説明の後、同意（インフォームド・コンセント）を得て行う。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、細胞提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。iPS 細胞等を提供していただく研究者との間では MTA（必要に応じて共同研究契約）を締結するが、その際に個別に知的財産権について話し合うこととする。

4) 利益相反

本研究での利益相反関連事項はない。

C. 研究結果

1. 臨床研究に用いる iPS 細胞の収集と保存

臨床研究に使われた iPS 細胞（神戸理研、高橋政代先生）を収集・保存について関係者らと協議を重ねた後、契約書類を作成し双方の合意が成立した。今後すみやかに保存を進める。また、京都大学 iPS 細胞研究所で進んでいる iPS

細胞バンク（金子新先生）と細胞保存での連携について話し合い、バンク予定細胞の収集準備を行うことで合意した。必要書類の作成を進める。

2. iPS細胞のコロニー形成能力と腫瘍形成能力についての解析

平成25年度にセンダイウイルス・ベクターにて作成されたiPS細胞株N1-12は、レトロウイルスベクターを用いて作成した201B7と比較して、形成されたコロニー数が少ないことを報告した。この研究を進めた結果、レトロウイルスにて樹立された201B7はコロニー形成能が高く、センダイウイルスにて作成した株では低い傾向があることが判明した。コロニーの形成能力は試験管内のがん化の指標としても使われる。そこで、この2つiPS細胞株、201B7とN1-12を中心にコロニー形成能力と腫瘍化形成能力について解析した(図1)。免疫不全マウスにiPS細胞を移植後、約3か月で形成させる腫瘍(奇形腫)の大きさを測定し、大きいほど腫瘍化能力が高いと判断した。その結果、腫瘍能は、201B7が高く、センダイウイルスにて作成した株N1-12を含む株では低かった。腫瘍化に関わる原因遺伝子が同定されれば、iPS細胞の安全性に大きく寄与できることから、この差がどのような因子で規定されるかを解析することは重

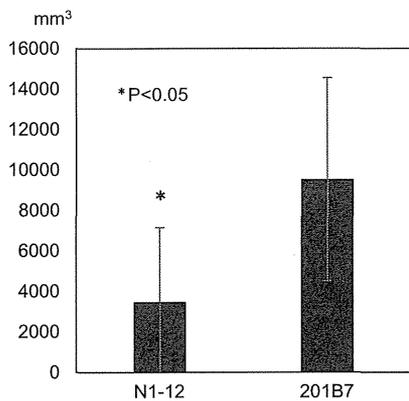


図1 ヒトiPS細胞由来腫瘍の大きさ

ヒトiPS細胞を免疫不全マウスに移植し腫瘍(奇形腫)を形成させ、その大きさを測定。センダイウイルスベクターにて樹立したN1-12がレトロウイルスにて樹立した201B7より腫瘍形成能は低い

要である。そこで、この差に関わる遺伝子を同定するために、201B7、N1-12の両方からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイを用いて網羅的

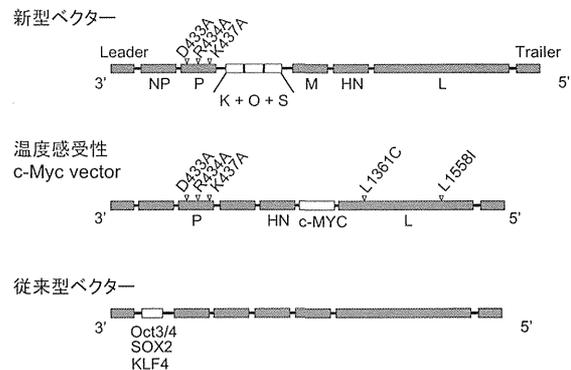
な遺伝子発現解析を行った。この中で、51個の発現が異なる分子を同定した。現在これらの分子について解析を進めている。

一方、保存・維持については、保存時の細胞数を検討し、融解時の生存率が最も高くなる条件を確立した。さらに、継代時におけるRock inhibitorの役割について、再散布時での添加が最も生存率を上げることを明らかとした。

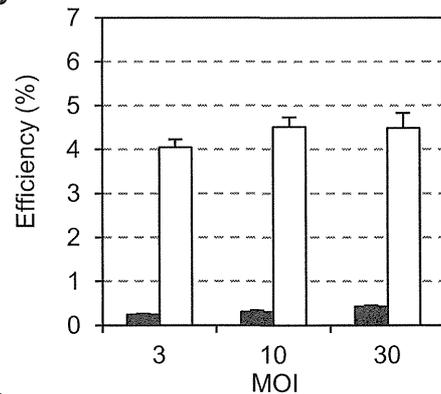
3. 新型ベクターの開発

Sox2、KLF4、Oct3/4の3つの初期化因子をタンデムにつないだセンダイウイルス・ベクターを新たに作成した(図2A)。

A



B



C

	Time of temperature shift	
	Passage 1	Passage 2
Conventional vector	0/22 (0%)	0/22 (0%)
TS12KOS vector	19/23 (84.7%)	15/23 (65.2%)

図2 新型センダイウイルスベクター

- A. ベクターの構造
- B. ヒト線維芽細胞からのiPS細胞の樹立効率
- C. センダイウイルスベクターの除去率

このベクターを使って正常ヒト線維芽細胞から iPS 細胞を作製すると 4% という高効率で作成することができた (図 2 B)。このベクターは温度感受性があるミュータントで 38 度では増殖できない。そこでコロニーを分離後すぐに培養温度を 37 度から 38 度に変更し、5 日間培養し、ウイルス除去率を調べた (図 2 C)。これまでのベクターではほとんど除去できない場合でも、80% 以上の高い割合でウイルスを除去することができた。

D. 考察と結論

1. 平成 26 年度は理化学研究所の高橋政代先生のグループと協議を行い、彼女らが行った臨床研究に用いた iPS 細胞を私たちのところへ提供していただくことで合意、さらに契約書等の書類も作成が終了した。今後、すみやかに細胞を提供していただき、保存を行う。また他の研究施設からの提供も進めていく予定である。
2. がん細胞株の研究では、試験管内でのコロニー形成能力はがん化能力を測定する指標として使われる。したがってコロニー形成能力が高い iPS 細胞株は安全性について注意深くその発ガン性を検討する必要がある。今回の結果にて、このコロニー形成能力と腫瘍形成能力に関連性が認められたことから、iPS 細胞においてもがん細胞株と同様にコロニー形成能ががん化能力の指標として使える。コロニー形成能力を既存の iPS 細胞と比較するだけで簡便に腫瘍形成能力を測ることが可能となる。
3. 腫瘍化能力が違う iPS 細胞株の遺伝子発現を網羅的に調べ比較することで腫瘍化に関わる分子の同定を試みた。今後は、候補分子としてピックアップした分子について腫瘍化能との関連について解析を進めて行く予定である。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M,

Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H and Era T. New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. *PLoS One*. 9 :e113052, 2014.

2. 学会発表

1. Soga M, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo M, Irie T, Endo F and Era T. Establishment of disease model using induced pluripotent stem cells derived from Niemann-Pick disease type C INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESERCH 12th annual meeting. Vancouver, June 18th, 2014.

2. 江良 択実 骨・代謝性疾患由来 iPS 細胞を使った疾患モデルと治療薬開発 第 35 回日本炎症・再生医学会年会 教育講演 2014 年 7 月 2 日、沖縄

3. 江良 択実 iPS 細胞研究の進展 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム疾患 iPS 細胞 2014 年 10 月 15 日 京都

4. 江良 択実 iPS 細胞を使った難病研究 第 27 回 日本動物実験代替法学会大会 シンポジウムヒト iPS 細胞を用いた創薬研究の新たな展開 2014 年 12 月 7 日 横浜

G. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究分担者 糸昭苑 熊本大学・発生医学研究所・多能性幹細胞分野・教授

研究要旨

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。研究分担者である糸は、平成 26 年度においては iPS 細胞の特性解析に利用する膵臓分化誘導について検討した。検討の結果、動物生物を含まない培養液および培養プレートを利用した新規な膵臓分化誘導系の構築に成功した。

A. 研究目的

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。研究分担者である糸は、平成 26 年度においては iPS 細胞の特性解析に利用する簡便で効率的な膵臓分化誘導について検討した。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞株は標準株として 201B7 株および Toe 株を用いて検討を行った。膵臓分化に利用する培養基材としてはヒト ES/iPS 細胞の未分化維持培養において実績のあるゼノフリー合成基質 Synthemax (Corning 社)を利用した。分化培養液については、通常の膵臓分化誘導で栄養因子として利用している B27 の替りにゼノフリー B27(B27XF)を用いた。分化状態に関しては RT-PCR 解析、免疫染色、フローサイトメトリー解析を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

5ステップの方法で分化誘導したヒト iPS 細胞

由来の膵臓 β 細胞は糖濃度に応答したインスリン分泌を示し、異種成分の指標である非ヒト型シアル酸の量が顕著に減少した (Shahjalal et al., *J. Mol. Cell Biol.* 2014)。本研究において、BMP シグナルの強力な阻害がその後の膵臓分化を促進することも見出した。また、前年度に構築した凍結培養液を用いる分化誘導方法をこの膵臓分化にも応用することができた。具体的には、あらかじめ大量に作成し、使用する分ごとに個分注して -80°C に保存した各種分化誘導培地を用いて再現性良い膵臓分化に成功した。

D. 考察

実際の臨床応用を見据えた研究では、動物由来の病原体や患者の免疫拒絶反応のリスクを回避するためにゼノフリーの培養システムの構築が望まれる。ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持培養に関しては、動物成分を含まない培養液や細胞外マトリックスといったゼノフリー培養を行うための製品や既に市販されている。我々は、ヒト iPS 細胞から膵臓 β 細胞への分化誘導方法のゼノフリー化を検討した。構築した方法では、成熟した膵臓 β 細胞を分化誘導することができ、ヒト iPS 細胞の特性解析に十分に利用できると考える。

E. 結論

ヒト iPS 細胞から成熟した膵臓 β 細胞への分化誘導方法を構築した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

論文発表

1. Shiraki N, Ogaki S, Kume S*. Profiling of embryonic stem cell differentiation. **Rev Diabet Stud.** 11(1):102-14, 2014.
2. Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa H, Ogaki S, Baba H, Kume K., Kume S. Generation of insulin-producing beta-like cells from human iPS cells in a defined and completely Xeno-free culture system. **J. Mol. Cell Biol.** 6, 394-408, 2014.
3. Nakashima R, Yano T, Ogawa J, Tanaka N, Toda N, Yoshida M, Takano R, Inoue M, Honda T, Kume S and Matsumoto K. Potentiation of insulin secretion and improvement of glucose intolerance by combining a novel G protein-coupled receptor 40 agonist DS-1558 with glucagon-like peptide-1 receptor agonists. **Eur. J. Pharmacol.** 737, 194-201, 2014.
4. Shiraki N., Shiraki Y., Tsuyama T., Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H., Kume K, Endo F, Kume S*. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. **Cell Metab.** 19, 780-794, 2014.
5. Kikawa K, Sakano D, Shiraki N, Kume K, Endo F, Kume S*. The beneficial effect of insulin treatment on the outcome of islet transplantation in Akita mice. **PLoS ONE** 9(4): e95451, 2014.
6. 坂野大介 糸昭苑 「VMAT2 と β 細胞分化」(科学評論社)内分泌・糖尿病・代謝内科 39, 153-159, 2014.
7. 坂野大介 糸昭苑 「ES 細胞を用いた発生分化の研究と再生医学への応用」『特集 器官の発生と再生の基礎』生体の科学 65. 197-202, 2014.

書籍

8. Sakano D, Shiraki N, Kume S. 'Pancreatic differentiation from murine ES cells' in "Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition" (Springer's Protocols On Line series) (Edited by Kursad Turksen), *in press*
9. Tsuyama T, Shiraki N, Kume S. "Definitive endoderm differentiation of human embryonic stem cells combined with selective elimination of undifferentiated cells by methionine deprivation", Human Embryonic Stem Cells, 3rd Edition (Springer's Protocols On Line series) (Edited by Kursad Turksen), *in press*
10. Umeda K, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from human iPS cells using M15 cells, in "iPS Cells: Generation Characterization and Differentiation -Methods and Protocols" Methods Mol Biol. 2014 [Epub ahead of print] (Edited by Andras Nagy and Kursad Turksen).
11. Yamazoe T, Shiraki N, Kume S, Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds, Methods Mol Biol. 2014 Nov 20. Epub. in "ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition" [Epub ahead of print] (Edited by Andras Nagy and Kursad Turksen).

学会発表

12. 坂野大介、崔 成翼、片岡正光、糸昭苑「膵 β 細胞の複製を促進する低分子化合物の探索」第 37 回日本分子生物学会 (横浜) 平成 26 年 11 月 26 日
13. 津山 友徳、白木 伸明、白木 恭子、小幡 史明、三浦 正幸、糸昭苑、遠藤文夫、糸昭苑、「ヒト多能性幹細胞における S-アデノシルメチオニンの重要性」"S-adenosylmethionine is crucial for maintaining human pluripotent stem cells" 第 37 回日本分子生物学会 (横浜) 平成 26 年 11 月 26 日
14. 糸昭苑 熊本県眼科医学会研修会「iPS 細胞

- を用いた再生医療研究」平成 26 年 11 月 8 日
15. Shoen Kume, “Signals that control differentiation of ES/iPS cells into pancreatic beta cells” The 8th International Conference on Cell Therapy (held and organized by the Seoul National University Hospital, Innovative Research Institute for Cell Therapy (IRICT) supported by the Korea Ministry of Health and Welfare) Seoul, South Korea, Oct 23, 2014.
 16. 糸昭苑 「多能性幹細胞モデルを用いた膵臓の発生分化研究 Pluripotent stem cells as a model for developmental biology of the pancreas」『細胞可塑性：膵内分泌細胞の可塑性を制御するシグナルネットワーク』シンポジウム (菊池裕・糸昭苑 オーガナイザー) 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 16 日 (京都)
 17. 糸昭苑 「再生医療-2, iPS 技術を用いた膵β細胞の分化誘導研究」『糖尿病合併症を克服する新戦略』シンポジウム第 29 回日本糖尿病合併症学会 2014 年 10 月 4 日 (東京)
 18. 糸昭苑 「多能性幹細胞から消化器官を創る」 New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders 平成 26 年 7 月 12 日 (東京)
 19. Sakano, D., Shiraki, N., Kikawa K., Yamazoe T, Kataoka, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsmoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F., M., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S. VMAT2 identified as a regulator of late-stage pancreatic beta-cell differentiation. ISSCR, 2014, June 19 (Vancouver)
 20. Shoen Kume Chemical genetic identification of signals that control late-stage pancreatic beta cell differentiation. “Diabetes” session. ISSCR, 2014, June 20. Oral presentation (Vancouver)
 21. Shoen Kume “Signals that control differentiation of pluripotent stem cells into pancreatic beta cells” (Organizer, Erdal Karaoz) Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2014; Genova, June 10-13,2014)

22. 糸昭苑 第 57 回糖尿病学会シンポジウム 『糖尿病研究はおもしろいー最先端糖尿病研究テクノロジーへのいざない』(座長:清野進、荒木栄一) 2014 年 5 月 22-24 日 (大阪)
23. 糸昭苑 「再生医療を用いた糖尿病治療の今後の展望」クリニカルアワー6 『新しい視点から見た糖尿病診療の今後の展望』日本内分泌学会学術総会 2014 年 4 月 25 日 (福岡)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- | | |
|-----------|------|
| 1. 特許取得 | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他 | 該当なし |

画像定量解析による iPS 細胞の品質評価の確立

研究分担者 齊藤 典子 熊本大学発生医学研究所 准教授

研究要旨

臨床に用いる iPS 細胞は安全かつ安定に保持されることが重要で、適切な品質管理技術の確立が必要である。本研究では、細胞のリプログラムの状態を細胞の形態から高精度に推定できる、画像解析技術の開発をめざす。様々な iPS 細胞株について遺伝子の発現様式、未分化性、多分化能などの性格づけを行い、それとともに細胞形態データを多数収集し、相関を見いだす。本研究の成果は、安全性の高い iPS 細胞の維持、保存、誘導方法など検討する際に、信頼性の高い評価基準として、貢献できる。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、多分化能を持ち、増殖可能であることから、再生医療への応用が期待されている。しかし、未分化細胞の混入による腫瘍形成などの可能性があることが課題のひとつである。本研究では、iPS 細胞を安全に維持・保存する方法を開発するために、画像解析技術を中心に、正常な iPS と非 iPS を非侵襲性に区別する方法を確立することと、その背景にある分子機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

近年画像解析アルゴリズムの開発により、生物画像は従来に比べて客観的に評価することが可能となってきた。特に、特定の細胞や細胞器官をターゲットにして自動認識させ、それらの形態特徴を測定し、統計学的に評価するモデルベースの手法は頻繁に使用され、基礎生物学分野で一定の成果をあげている。一方で、機械学習を用いたパターン認識を用いて、多量の画像集団を対象に膨大な演算を適用して、細胞の種類を分類、推定する、モデルフリーの手法も開発されてきている。本研究では両方の技術を組み合わせながら、

ヒト iPS 細胞の標準株、独自に確率した正常 iPS 細胞株と、不完全にリモデルされた細胞 (非 iPS 細胞) について、発現遺伝子の解析などを行って未分化性や多能性を評価した後、コロニー画像を多量に準備し、画像解析を施行した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

正常 iPS 細胞株と非 iPS 細胞株のコロニー画像を、多目的パターン認識ソフトウェア `wndchrm` (`weighted neighbor distances using a compound hierarchy of algorithms representing morphology`) に適用することにより、高い精度で細胞のリプログラミングの状態を評価することが可能であることがわかった。また、そのための最適な解析条件を見だし、論文報告した (**Sci. Rep.**, 2014)。

D. 考察

本研究より、細胞コロニーの形態は、リプログラミングの状態と相関し、反映することが示された。正常 iPS と非 iPS を区別する形態特徴を抽出・統計解析することにより iPS 細胞状態の客観的評価が可能であった。また、細胞核内構造をターゲットとした画像解析 (モデルベース法) により、細胞リプログラムの過程で、核構造がダイナミックかつ特徴的に変動することが定量化された。本手法は、iPS 細胞の分化抵抗性の評価などにも応用可能であると期待される。

E. 結論

本研究により、正常な iPS 細胞と非 iPS 細胞が

形成するコロニーは、特徴的に異なることが明らかになり、それを指標に細胞状態を非侵襲性に分類することが可能であることが示された。臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性の維持に貢献できる道筋をつけた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Tokunaga K, Saitoh N, Goldberg IG, Sakamoto C, Yasuda Y, Yoshida Y, Yamanaka S, and Nakao M. Computational image analysis of colony and nuclear morphology to evaluate human induced pluripotent stem cells. **Sci. Rep.** 4: 6996, 2014.

安田洋子、斉藤典子、藤原沙織、Mohamed O. Abdalla、松森はるか、坂本智代美、中尾光善. クロマチン構造と核異型. 病理と臨床、文光堂、32: 789-795, 2014.

斉藤典子、坂本智代美、松森はるか、中尾光善、Ilya G. Goldberg. 機械学習による細胞形態の分類と推定、羊土社 「バイオ画像解析 手とり足とりガイド」 小林徹也・青木一洋 編 195-207, 2014.

2. 学会発表

Saitoh, N., Tomita, S., Abdalla, M. O., Fujiwara, S and Nakao, M. Multiple non-coding RNAs *Eleanors*, create a large active chromatin domain of the *ESR1* locus during breast cancer cell adaptation. (The 4D Nucleome 2014) December 19, 2014, Hiroshima, Japan.

Saitoh, N., Tomita, S., Abdalla, M. O. and Nakao, M. Novel non-coding RNAs *Eleanors*, activate the *ESR1* locus during breast cancer cell adaptation. (Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Nuclear Organization and Function) August 21, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA.

斉藤典子、富田さおり、モハメドオサマアブダ

ラ、藤原沙織、松森はるか、中尾光善. 乳がん細胞における非コード RNA クラウドを介した *ESR1* 遺伝子座の活性化 第 37 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 平成 26 年 11 月 27 日 (横浜市)

松森はるか、徳永和明、中尾光善、斉藤典子. ハイコンテントスクリーニングによる核小体制御因子の同定とその分子機構の解明. 第 37 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ) 平成 26 年 11 月 26 日 (横浜市)

斉藤典子、徳永和明、松森はるか、安田洋子、Ilya G Goldberg、中尾光善 機械学習を用いた細胞核形態の定量化と細胞状態の評価 第 87 回日本生化学会大会 (シンポジウム) 平成 26 年 10 月 15 日 (京都市)

斉藤典子、松森はるか、モハメド オサマ アブダラ、藤原沙織、安田洋子、中尾光善 核内構造体の形成機序と機能 第 66 回日本細胞生物学会大会 (シンポジウム S2 「細胞核の構造・機能と生命現象」 (オーガナイザー: 斉藤典子、安原徳子) 2014 年 6 月 11 日 (奈良市)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 該当なし。
- 2.実用新案登録 該当なし。
- 3.その他 該当なし。

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究分担者 白木伸明 熊本大学・発生医学研究所・多能性幹細胞分野・准教授

研究要旨

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。研究分担者である白木は、これまでに必須アミノ酸であるメチオニンがヒト iPS 細胞の未分化性維持および分化を制御することを明らかにしており、平成 26 年度ではその分子メカニズムの解明および分化誘導方法への応用研究を行った結果、iPS 細胞においてメチオニン代謝は未分化維持および分化に重要な役割を担っていることを明らかにした。

A. 研究目的

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。

研究分担者である白木は、培養液組成に着目して研究を行っており、これまでに必須アミノ酸であるメチオニンがヒト iPS 細胞の未分化性維持および分化を制御することを明らかにしていた。本年度は、本研究では、その詳細なメカニズムについて検討し、iPS 細胞の未分化維持機構および分化におけるメチオニン代謝の役割解明を目的とした。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞株の標準株である 201B7 および 253G1 株を用いて検討を行った。未分化維持培地からメチオニンを除去した特注培地（細胞科学研究所）を用いて、メチオニンが未分化維持に与える影響について網羅的遺伝子発現解析で評価した。また、処理後に分化シグナルを与えることによる影響を評価した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

未分化 iPS 細胞をメチオニン除去培養することによりメチオニン代謝経路に関する各種遺伝子の発現が抑制された。また、代謝物解析の結果から、生体内でメチル供与体として働く S-アデノシルメチオニン(SAM)の細胞内濃度で除去 5 時間の時点で顕著に低下することを見出した。これに関連してヒストンの H3K4Me3 が顕著に低下することを確認した。また、未分化マーカーである Nanog の発現低下が見られ、その状態で分化シグナルを与えることにより分化が促進することがわかった。この分化促進効果は、内胚葉・中胚葉・外胚葉へのそれぞれの分化誘導に対して同様に認められた(白木、*Cell Metabolism*, 2014)。

D. 考察

ヒト iPS 細胞においてメチオニンが SAM を介してエピジェネティック制御に重要な役割を果たしていることがわかった。また、その特性を利用して、効率的な分化誘導方法が構築できた。

E. 結論

メチオニンはメチル供与体である SAM を介してヒト iPS 細胞の未分化維持および分化を制御している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

Shahjalal HM, Shiraki N, Sakano D, Kikawa K, Ogaki S, Baba H, Kume K, Kume S. Generation of insulin-producing β -like cells from human iPS cells in a defined and completely xeno-free culture system. *J Mol Cell Biol*. 2014 Oct;6(5):394-408.

Shiraki N, Ogaki S, Kume S. Profiling of embryonic stem cell differentiation. *Rev Diabet Stud*. 2014 Spring;11(1):102-14. doi: 10.1900/RDS.2014.11.102. Epub 2014 May 10.

Shiraki N, Shiraki Y, Tsuyama T, Obata F, Miura M, Nagae G, Aburatani H, Kume K, Endo F, Kume S. Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab*. 2014 May 6;19(5):780-94.

Kikawa K, Sakano D, Shiraki N, Tsuyama T, Kume K, Endo F, Kume S. Beneficial effect of insulin treatment on islet transplantation outcomes in Akita mice. *PLoS One*. 2014 Apr 17;9(4):e95451.

白木伸明・糸昭苑、糖尿病の再生医療、医学のあゆみ、252(5) 647-653, 2015

白木伸明・糸昭苑、ES/iPS 細胞を用いた内胚葉細胞（膵、肝、小腸）への分化誘導、医学のあゆみ、251(12,13) 1153-1159, 2014

白木伸明 ES/iPS 細胞分化制御におけるアミノ酸代謝、アミノ酸研究、日本アミノ酸学会、8(1) 5-10 2014

白木伸明・糸昭苑、メチオニンの代謝はヒト

の ES 細胞および iPS 細胞の未分化な状態の維持および分化を制御している、ライフサイエンス新着論文レビュー、2014 年 5 月 2 日、<http://first.lifesciencedb.jp/archives/8655>

2. 学会発表

白木伸明、師岡 茉由、白濱理絵、山下智大、糸昭苑、ヒト iPS 細胞由来膵臓細胞を用いた膵臓 β 細胞分化を促進する化合物の探索、日本薬学会 135 年会シンポジウム、2015 年 3 月 26 日（神戸学院大学）（招待講演）

白木伸明、ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持と分化におけるメチオニン代謝、第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 21 日（パシフィコ横浜）（招待講演）

白木伸明、ヒト iPS 細胞から効率的かつ安定的に肝臓を分化誘導する方法の開発、第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム、2014 年 12 月 9 日（東京、長井記念館ホール）（招待講演）

白木伸明、ヒト ES/iPS 細胞の内胚葉分化における細胞外環境の役割、第 2 回細胞凝集研究会、2014 年 12 月 6 日（アクロス福岡）（招待講演）

白木伸明、白木 恭子、津山 友徳、小幡 史明、三浦 正幸、永江 玄太、油谷 浩幸、糸 和彦、遠藤 文夫、糸昭苑、ヒト多能性幹細胞の未分化維持および分化におけるメチオニン代謝の役割、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日（パシフィコ横浜）（口頭発表）

白木伸明、白木 恭子、津山 友徳、小幡 史明、三浦 正幸、永江 玄太、油谷 浩幸、糸 和彦、遠藤 文夫、糸昭苑、多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割、日本アミノ酸学会 第 8 回学術大会、2014 年 10 月 9 日、（東京農業大学世田谷キャンパス）（ポスター発表）

Nobuaki Shiraki and Shoen Kume, Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells, Key Forum: From Stem Cells to Organs,

2014-9-4 (Kumamoto City Medical Association Hall) (招待講演)

白木伸明、ヒト多能性幹細胞におけるメチオニン代謝の役割、第18回アミノ酸セミナー 2014年7月4日 (東京) (招待講演)

Nobuaki Shiraki, Yasuko Shiraki., Tomonori Tsuyama, Fumiaki Obata, Masayuki Miura, Genta Nagae, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Kume, Fumio Endo, and Shoen Kume, Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells, 第12回幹細胞シンポジウム. 2014年5月31日. (九州大学医学部 百年講堂) (口頭発表)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究分担者 松本 志郎 熊本大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター 講師

研究要旨

本研究では、1) 臨床に用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、を主たる目的としている。本分担研究者の研究室では、希少難病である先天代謝異常症を対象とした調査・研究・治療ガイドライン作成などを厚生労働省研究班の一員として実施してきた。当分担研究室が対象としている疾患（小児希少難病）の特徴から、昨年度は新生児への安全な検体採取方法の確立をおこなった。本年度は、引き続き希少難病の iPS 細胞を樹立するとともに、検体収集システムの構築を試みた。希少難病の研究には、患者数が限られており、研究が進んでこなかった歴史がある。また、実際に患者検体を収集しようとしても、所在が不明であることも多く経験される。iPS 細胞の保存体制の確立には、サンプル採取から保存までの一連のシステムが重要となることを鑑み、我々は、厚生労働省難治性疾患克服事業の一環として、小児希少難病を対象とした患者登録制度（奥山班）を分担研究者（尿素サイクル異常症ならびに有機酸代謝異常担当）として確立し、この情報バンクを用いることで患者数の少ない希少難病の検体採取、iPS 細胞の元となる患者サンプルの収集、臨床試験の協力まで体制の基盤構築を試みた。得られた細胞を用いて、iPS 細胞を樹立し、安全かつ安定的な採取法の実施、分離・培養・保管・搬送の検討・改良を行った。

A. 研究目的

本分担研究では、患者から iPS 細胞の起源となる臨床サンプルを安全かつ安定的に採取し、保存運搬する方法の確立・改良を目的として実施した。本研究の対象とする疾患は、日本に数例～数百名という小児希少難病を対象としており、患者登録制度は必須の条件である。本年度は、これまでの臨床研究に活用するための iPS 細胞の樹立を進め、安全性・安定性の確認を引き続き行うとともに、全国からの患者サンプルの採取システムの確立を実施した。

B. 研究方法

検体採取および同意書の取得は、熊本大学医学部附属病院小児科外来もしくは小児科病棟で実施した。対象が小児であることから、説明はご両親を対象に行い、倫理委員会の承諾を得た説明文

書および同意書を提示し、同意を得た。同意が得られたのちに処置を行った。対象が高校生以上（15歳以上）の場合は、本人にも同意説明を行い、同意を得た。また、本年度は全国からの患者サンプル採取のためのシステム構築を行った。これには、日本先天代謝異常学会ならびに先天代謝異常症患者登録制度事務局 JaSMIn and MC-Bank(事務局：国立成育医療センター臨床検査部)の協力を得て、各患者会代表へ iPS 細胞研究への協力を要請した。要請した場所は、年に3回開催される患者会フォーラムで口演形式で行った。

1). iPS 細胞維持培養

iPS 細胞の培養方法は、京都大学 iPS 研究所（山中ら）および理化学研究所が発行している以下の培養マニュアルにしたがって行った。

1. 80%コンフルエントの iPS 細胞培養を確認する。
 2. 培地を除去する。
 3. PBS 1 mL を加えて洗浄し、PBS を除去する。
 4. 0.5X TrypLE Select を 300 μ L/well ずつ加えよくなじませる。
 5. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで 1 min 反応させる。
 6. 1 min 後インキュベーターから取り出し、再び well 全体によく行き渡らせる。
 7. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターでさらに 3 min 反応させる(4分)。
 8. インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する（細胞間接着が破壊され細胞 1 個 1 個が丸くなっている様子を確認する）。
 9. 0.5X TrypLE Select を除去する。
 10. 2 mL/well の PBS(-)で洗浄し、PBS(-)を除去する。
 11. 維持培養培地を 1 mL/well 加える。
 12. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
 13. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
 14. 10 回ピペッティングを行い新しいチューブに回収する。
 15. トリパンブルー染色を行いセルカウントを行う。
 16. 13,000 個の生細胞を laminin コーティングした 6-well プレート 1 well に播種する。
 17. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで培養する。
 18. 翌日、Y-27632 の入っていない維持培養培地に交換する。
- 2) 凍結方法
 1. 位相差顕微鏡で細胞を観察し写真撮影を行う。
 2. 培地を除去する。
 3. PBS(-) 1 mL を加えて洗浄し、PBS(-)を除去する。
 4. 0.5X TrypLE Select を 300 μ L/well ずつ加えよくなじませる。
 5. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターで 1 min 反応させる。
 6. 1 min 後インキュベーターから取り出し、再び well 全体によく行き渡らせる。
 7. 37°C、CO₂ 5%インキュベーターでさらに 3 min 反応させる（合計 4 min）。
 8. インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する。
 9. 0.5X TrypLE Select を除去する。
 10. 2 mL/well の PBS(-)で wash する。
 11. 維持培養培地を 1 mL/well 加える。
 12. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
 13. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
 14. 10 回ピペッティングを行う。
 15. トリパンブルー染色を行いカウンス自動セルカウンターにてセルカウントを行う
 16. 必要細胞懸濁液量をチューブに移し、800 rpm, 22°C, 5 min 遠心を行う。
 17. 上清を除き、ペレットをタッピングで崩す。
 18. 1×10^6 cells/mL となるように STEM-CELLBANKER で懸濁する。
 19. 200 μ L (=2 $\times 10^5$ cells)を 1 本のクライオチューブに分注する。
 20. バイセルなどに入れて-80°C、3 時間以上保存。
 21. 数日中に液体窒素に移して保存する。
- 3) 分化誘導方法
 - 肝臓への分化誘導方法
 1. 維持培養中の iPS 細胞は、0.5 mg/ml albumin fraction V (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) および 100 ng/ml Activin A (Peprotech)を添加した RPMI 1640 medium (Invitrogen/Gibco, Rockville, MD, USA)を用いて 24 時間培養を行う。
 2. 上記 1 培養液に insulin-transferrin-selenium (Invitrogen/Gibco) を 1 x 濃度になるよう添加し、48 時間培養を行う。
 3. Hepatocyte Culture Medium(HCM)

(Cambrex, Baltimore, MD, USA) に 30 ng/mlFGF4 および 20 ng/ml BMP2 (both from Peprotech)を添加した培養液にて4~5日間培養を行う。

4. HCM に 20 ng/ml HGF および 20 ng/ml KGF (both from Peprotech) を添加した培養液にて6~7日間培養を行う。

5. HCM に 10 ng/ml oncostatin-M (R&D, Minneapolis, MN, USA)および 0.1 μM dexamethasone (Sigma-Aldrich) を加えた培養液にて5日間培養を行う。

6. DMEM に N2,および B27 を 1 x 濃度添加し、1 mM/l glutamax および 1% nonessential amino acids および 0.1 mM β-mercaptoethanol (all from Invitrogen/Gibco) を添加した培養液で3日間培養を行う。

7. 得られた細胞について分化誘導効率を免疫蛍光染色法ならびに RT-PCR 法を用いて比較検討を行う。

神経細胞誘導法

神経細胞への分化誘導は、VERITAS 社の神経分化誘導プロトコルに従い分化誘導を行った。

具体的には、

1. フィーダーフリーの iPS 細胞 70%コンフルエントを用意する。
2. STEMdiff™ Neural Induction Medium にて6~9日間培養する。
3. 得られた細胞は nestin 陽性神経幹細胞であることが確認されており、これらの培養液からGFを除去し、1%FBSを加えて分化能を比較検討した(免疫蛍光抗体法ならびに RT-PCR 法)

(倫理面への配慮)

患者情報の管理ならびに患者サンプルを用いた iPS 細胞の研究については、熊本大学倫理委員会の承認を得ている。また、各患者家族もしくは本人より倫理委員会の許可を得た同意書を用いて同意を得たうえで研究を行っている。収集された患者サンプルは熊本大学医学部附属病院臨床

研究棟内のセキュリティーキーによりコントロールされているオートロック式の鍵により施錠されている研究室内のディープフリーザに保存される。ディープフリーザにも施錠が施されている。また、患者情報については、インターネットに接続されていない独立したデスクトップコンピュータ内に保存され、IDとパスワードによるロックを必要とする。さらに、患者情報は当施設でのみ連結可能な暗号化処理を施し、共同研究施設へ提供される。また、患者登録制度については、事務局である成育医療センターの倫理委員会で承認が得られており、更に、日本先天代謝異常学会においても倫理委員会の承認が得られている。

C. 研究結果

1. iPS 細胞の樹立方法

研究代表者である江良教授らの検討から皮膚繊維芽細胞以外に、末梢血リンパ球から安定的に iPS 細胞を樹立することが可能となった。よって、本年度は、通常の臨床で実施されている採血方法を用いて、末梢血リンパ球を採取した。新生児の場合、末梢血 3ml を採取し、単核球分離用のキット (BD Vacutainer CPT) を用いて単核球の分離を行った。その結果、従来のフィコール法と比較して、単核球の収量は約 15%増加し、分離時間は1時間以上短縮され、細胞の生存率は変わらなかった。このように無菌的に単核球分離し、-150°C 保存した。これを、江良教室へ搬送し、センダイウイルスを用いた iPS 細胞誘導を行い、樹立した。採取された疾患は、メチルマロン酸血症、プロピオン酸血症、メープルシロップ尿症、シトリン異常症、糖原病、磯吉草酸尿症、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、カルバミルリン酸合成酵素欠損症、MAT1/III 欠損症、国内数十例程度の症例数の希少難病が採取された。

2. 皮膚サンプルからの繊維芽細胞分離

上記のように皮膚生検より安全性の高い採血方法を用いたが、一部の疾患では診断に皮膚生検が必要なものがあり、皮膚繊維芽細胞の採取も行

った。ヒト皮膚繊維芽細胞の分離には、昨年の検討から最も採取効率のよい方法を採用した。0.2%トリプシンと0.02%EDTAの混液で、37℃の温度にて新生児では10分、乳児期以降では30分間攪拌して分離し、遠心・洗浄後に10%FBS含有DMEMを用いた培養法を用いる条件が最も多くの繊維芽細胞をえることができた。

3. 肝臓および神経への誘導効率

先天代謝異常症を想定した場合、主な標的臓器は肝臓細胞ならびに神経細胞と考えられる。これまでげっ歯類での標的臓器評価は行われてきたが、ヒトの組織を用いた評価はほとんどなされていない。本年度は、疾患特異的iPS細胞の分化誘導効率を比較検討した。

	肝臓誘導効率		神経誘導効率		
	アルブミン陽性細胞	神経幹細胞	ニューロン	アストロサイト	オリゴデンドロサイト
メチルマロン酸血症	60%-80%	90-100%	5-10%	80-90%	1-5%
プロピオン酸血症	70%-90%	90-100%	1-5%	80-90%	0-5%
糖原病	Step 1 60% Step 2 0%	90-100%	10-20%	70-80%	5-10%

肝臓細胞への分化誘導効率は、メチルマロン酸血症で60%から80%、プロピオン酸血症で70%から90%であった。また、神経細胞への分化誘導効率は、神経幹細胞への誘導効率に差は認めず、いずれも90%の誘導効率であったが、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの誘導には差が認められた（上記表）。

4. 保存方法

iPS細胞の保存には、昨年度までの研究にて4種類の入手可能なiPS細胞保存液を比較検討した結果から、もっとも保存能力の高いiPS/ES細胞用保存液(25ml)を用いて比較検討を行った。その結果、いずれの細胞においても解凍後の生存率には差はなく、疾患別による影響は認められなかった。

5. 腫瘍発生率

Rag-/rag-マウスに対し、プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症由来のiPS細胞を肝臓細胞に分化誘導した細胞を皮下に移植し、現在、観察を行っている観察期間中である。

D. 考察

昨年に引き続き、小児希少難病である先天代謝

異常症のiPS細胞の樹立を江良教室と共同で実施した。保存効率については、昨年度までの比較検討で得られたデータより1社の保存液が比較的保存効率が高いため、本年度は1社の保存液で比較検討を行い、疾患別の生存率の差は認めなかった。また、得られた細胞の臨床研究に用いるデバイスとしての有用性を評価する目的で、標的臓器である肝臓細胞と神経細胞への誘導を行った。プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症のいずれの疾患由来iPS細胞も神経細胞ならびに肝臓細胞への分化誘導は可能であり、研究デバイスとして使用できることが確認された。また、成熟分化細胞への分化誘導では、疾患別に差が認められた。これは、ドナー側の要因が大きいことが示されているが、疾患の標的臓器でもあるため、今後、疾患による誘導効率への影響を調べていく予定である。

E. 結論

本（分担）研究では、小児希少難病である先天代謝異常症の臨床研究に用いるiPS細胞の分離、保存、安全性の評価をおこなう目的で、本年度は、江良研究室の協力の下、メチルマロン酸血症およびプロピオン酸血症のiSP細胞を樹立した。更に、これらの疾患の標的障害臓器である神経細胞ならびに肝臓細胞への分化誘導を行い、臨床研究に有効なデバイスとしてのiPS細胞の性質を確認した。安全性については、研究期間中、引き続き観察を行う。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Early intervention for late-onset ornithine transcarbamylase deficiency. Fujisawa D, Mitsubuchi H, Matsumoto S, Iwai M, Nakamura K, Hoshide R, Harada N, Yoshino M, Endo F. *Pediatr Int.* 2015 Feb;57(1):e1-3.