

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

（分担）研究報告書

**インテグレーションフリーシステムを利用して樹立したヒト iPS 細胞の
品質変動及び分化に及ぼす影響の解析**

研究分担者 栗崎 晃

**独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 幹細胞制御研究チーム
研究チーム長**

研究要旨：ヒト iPS 細胞は、ヒトの体を構成する多くの細胞を作り出す強力な多分化能から、医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年日進月歩で、様々な細胞の in vitro 分化プロトコルが発表される一方で、同じ結果を再現できないことが非常に多く、文書化されていない様々な重要なポイントが存在することが、実際に実験を行っている研究者の中で示唆されている。その原因の一つは培養技術であるが、それがどのように幹細胞の培養や分化に影響を及ぼすのかについては系統的に解析されておらず、未だ iPS 細胞の培養や分化にはある程度の「名人芸」レベルのテクニックが必要とされる状態にある。本研究では、培養手技の違いや培養条件の違いによる品質変動に加えて、それらが iPS 細胞から特定の細胞への分化に及ぼす影響を検証し、個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証する。これらのトラブルシューティングを系統化することにより、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、わが国の幹細胞制御技術のレベルを引き上げることを最終目的とする。本分担研究では、特にインテグレーションフリーシステムを利用してヒト iPS 細胞を樹立し、レトロウイルス法で樹立した iPS 細胞と比較しながら上記の問題点を検証していく。本年度は平成 26 年度に着手した、最近国内外でも広く使われ出したセンダイウイルスを用いたインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞の樹立実験を継続し、樹立されたヒト iPS 細胞の評価を開始したのでその進捗状況について報告する。

A. 研究目的

本研究の目的は、iPS細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的にiPS細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足がiPS細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明することである。ヒトiPS細胞は医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年、次々と分化プロトコルが発表されている一方、同じiPS細胞株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多い。実験者又は研究施設が変わることによるヒトiPS細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。そこで、iPS細胞の品質変動要因を明確にして培養技術を標準化することにより、創薬研究推進を図ることを本研究の目的とする。

2007年に京都大学山中教授らが当初発表したレトロウイルス[1]やレンチウイルス[2]を用いたヒトiPS細胞の樹立方法の他に、近年、その樹立効率の高さやゲノムへのDNAの取込みがないことから多くの施設でヒトiPS細胞の樹立に利

用されてきているRNAウイルスであるセンダイウイルスを用いた樹立方法[3-5]がポピュラーな方法となりつつある。そこで本研究計画においても、過去にレトロウイルスでヒトiPS細胞が樹立された線維芽細胞と同一患者由来の線維芽細胞からセンダイウイルスを用いてヒトiPS細胞を樹立し、これら2種類の樹立方法の異なるヒトiPS細胞を元に、恒常的にiPS細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足がiPS細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明する。特に本分担研究では、このセンダイウイルスを用いてヒトiPS細胞から樹立を行い、他の研究者に細胞を配布する。また、培養条件や様々な培養技術を合わせて比較し、品質変動の状況を複数機関で検証することでヒトiPS細胞の未分化状態における品質変動の要因の検証を行う。

B. 研究方法

ヒトiPS細胞の培養

昨年度樹立したiPS細胞は、医薬基盤研究所・JCRB細胞バンクから

入手したヒト線維芽細胞 TIG-114 (細胞番号: JCRB0534) にセンダイウイルスを用いて Oct4/Sox2/Klf4/cMyc の 4 因子を導入して作製したものである。TIG-114 細胞は、EMEM に 10%FBS 及びペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で 5%CO₂、37 °C で培養した後、2 種類のセンダイウイルスに感染させて樹立した。

また、ヒト iPS 細胞の培養はゼラチンコートしたディッシュに播種した MMC 処理したマウス線維芽細胞(SNL76/6, 大日本住友製薬)をフィーダーとして用いた。SNL76/6 の培養には DMEM (low glucose) に 10%FBS 及びペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地を使用し、5%CO₂、37 °C で培養した。ヒト iPS 細胞培地は DMEM/F12 (和光) 500mL に Stemsure SR (和光) 125mL、Non-Essential amino acid 5mL、L-Glutamine 6.25mL、Penycillin/ Streptomycin 5mL を加えて調製した。bFGF (Peprotech) は終濃度 5ng/mL となるように毎回培地交換のたびにディッシュに直接添加した。また iPS 細胞の継代にはヒト ES 細胞用解離液 (0.25% Trypsin、1mg/ml Collagenase IV、1 mM CaCl₂、20% KSR を PBS 水

溶液で調製した物を用いた。

免疫蛍光染色

細胞を PBS でリンスした後、3.7%ホルムアルデヒド/PBS で室温 10 分固定し、PBS でリンスした後、50mM NH₄Cl/PBS を加え、室温 10 分放置した。PBS でリンスした後、0.5% NP40/PBS で膜透過処理し、さらに PBS でリンスした後、5%FBS/PBS で室温 1 時間ブロッキング処理をした。抗 SeV NP マウスモノクローナル抗体を 1/1600 に 5%FBS/PBS で希釈し、室温 30 分インキュベートした。その後、細胞を 5%FBS/PBS で 4 回洗った後、AlexaFluro594-anti mouse IgG 抗体を 1/500 に 5%FBS/PBS で希釈し、室温 15 分インキュベートした。その後、細胞を 5%FBS/PBS で 2 回洗浄し、0.1 µg/mL の DAPI/PBS 溶液で室温 10 分インキュベートした後、明視野及び蛍光観察し、画像取得した。なお、画像取得はオリンパス IX70 倒立顕微鏡に設置した Photometrics 社の CoolSNAP HQ² カメラを用い、Molecular Devices 社の MetaMorph ソフトウェアを利用して行った。

定量 RT-PCR 解析

ヒト iPS 細胞は、ISOGEN (Nippon gene) を用いて溶解・回収し、chloroform を加え 15 秒間ボルテックスし、室温で 10 分間放置した後、12,000rpm、4 で 15 分間遠心を行った。その後、水相を新しいチューブにとり、isopropanol を加えて混和後、室温で 10 分間放置し、12,000rpm、4、10 分間遠心した。沈殿に 70% ethanol を加え、室温で 5 分間放置した後、7,500rpm、4 で 5 分間遠心した。沈殿に DEPC 処理水を 20 μ L 加えて吸光度を測定した。その後 PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を合成した。Oligo dT primer を 1 μ L、dNTP mixture 1 μ L 添加したものに、吸光度で測定しておいた 1 μ g の total RNA サンプルを加え、RNase-free dH₂O で 10 μ L にメスアップし、65 で 5 分間保温して氷上で急冷した。さらに、5 \times Prime Script Buffer を 4 μ L、RNase Inhibitor を 0.5 μ L、Prime Script RTase を 1 μ L を混合し、RNase-free dH₂O で 20 μ L にメスアップした。その後、42 で 60 分間反応させた後、70 で 15 分間処理し酵素を不活性化した。次に、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR

Mix (TOYOBO) を 10 μ L、100 μ M Forward Primer、100 μ M Reverse Primer を 0.6 μ L、cDNA サンプルを 2 μ L、DW を 6.8 μ L を混合し、各種特異的プライマーを用いて qPCR を行った。qPCR は CFX96 (Bio RAD) を用いて測定した。

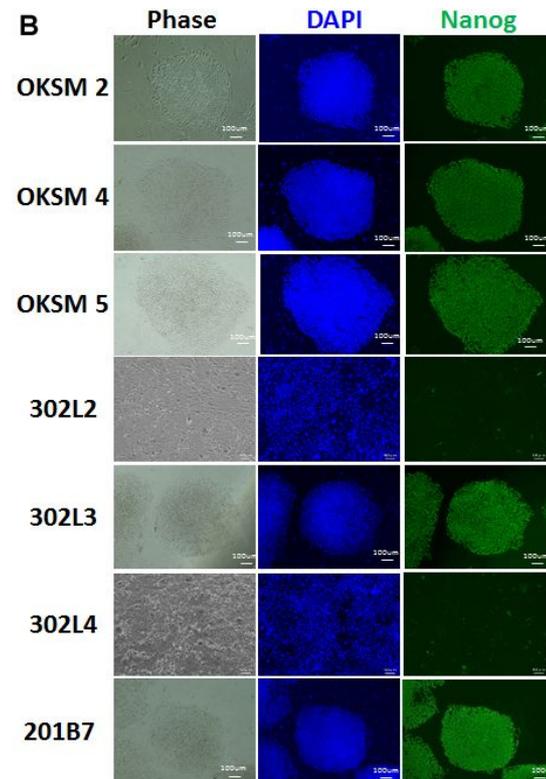
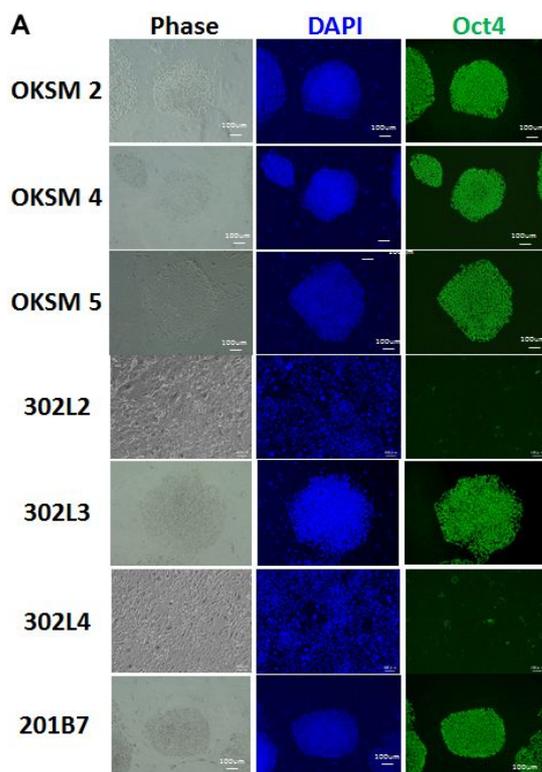
C. 研究結果

平成 26 年度は、昨年度にインテグレーションフリーな方法で樹立したヒト iPS 細胞を安定化するまで 14-15 継代ほど継代培養を続けた後、多能性幹細胞マーカーの発現を検証した。さらに優良な株については浮遊培養条件下で胚葉体を形成させ bFGF 非存在下で培養することで自由分化させ、外肺葉、中胚葉、内胚葉の初期マーカーの発現を定量的 RT-PCR で解析した。さらに核型解析を行い、マクロ的な見地から染色体異常の有無について検討を行うとともに、微生物検査もを行い、ウイルス感染や最近の混入、センダイウイルスの残存などの問題がないことを確認し、医薬基盤研究所と長岡技術大学に細胞を譲渡した。

樹立したヒト iPS 細胞の多能性幹細胞マーカーの発現解析

ヒト線維芽細胞 TIG-114 に、Oct4/Sox2/Klf4/cMyc 4 因子を安定発現させるセンダイウイルスベクター(OSKM-SeVdp ベクター)を用いて染色体 DNA への挿入なく 4 因子を安定発現させることでヒト iPS 細胞株を 7 株樹立した。本研究ではこれらを OSKM 株と呼び、樹立した 7 株を OSKM1 から OSKM7 と命名した。また、RNA ポリメラーゼである L タンパク質をコードする配列部分の後に未分化 iPS 細胞で発現する miR302 のターゲット配列を導入して、iPS 細胞樹立後にセンダイウイルスを除去しやすくした改変版(OSKM-302L-SeVdp ベクター)を利用してさらに 7 株樹立

した。これらのヒト iPS 細胞株は OSKM-302L 株と呼び、OSKM-302L1 から OSKM-302L7 と順に命名した。レトロウイルスで樹立した場合と同様に、センダイウイルスで樹立した当初も iPS 細胞の維持は比較的不安定であり、十数継代維持し続けることで細胞の状態が安定化してきた。これらのヒト iPS 細胞の性状を免疫蛍光染色や定量的 RT-PCR により 201B7 とも比較することにより評価した。



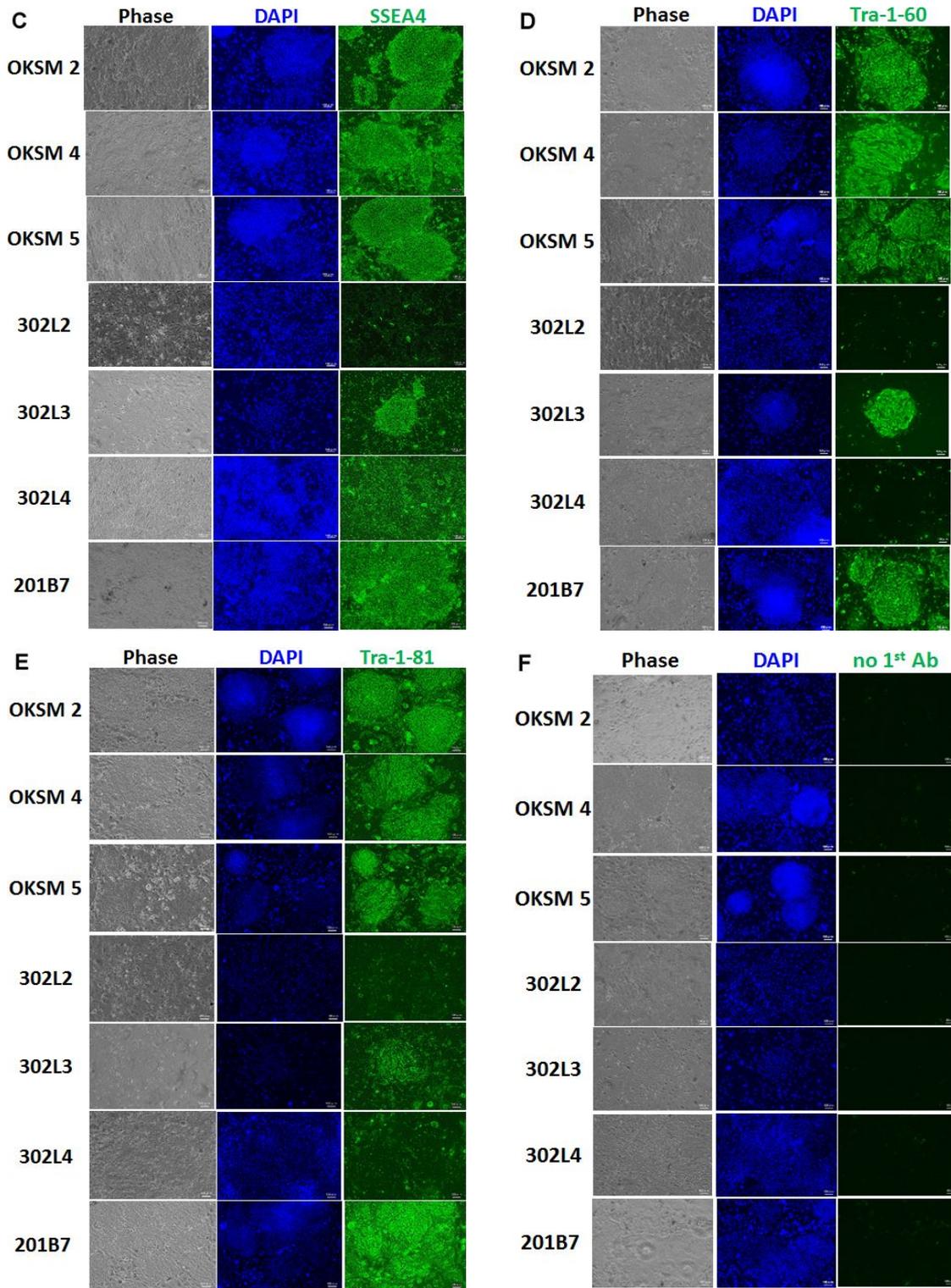


図1. センダイウイルスベクターを用いてTIG-114線維芽細胞から樹立したヒトiPS細胞における未分化マーカーの免疫蛍光染色。2種類のセンダイウイルスで樹立した比較的安定して継代が進んだヒトiPS細胞における多能性幹細胞マーカーの発現を京都大学でレトロウイルスを用いて作製された201B7株をコントロールと比較した。A.Oct4、B.Nanog、C.SSEA4、D.Tra-1-60、E.Tra-1-81、F.1次抗体なしのネガティブコントロール。

その結果、図 1 に示すように 4 因子を安定発現する OSKM-SeVdp ウィルスで樹立したヒト iPS 細胞は比較的安定的に OCT4、NANOG、SSEA4、Tra-1-60、Tra-1-80 等の未分化マーカーを高発現していた。一方、今回の TIG-114 線維芽細胞を用いた iPS 細胞の樹立では、OSKM-302L-SeVdp ベクターを用いた場合には良好なコロニーが安定して維持されにくい傾向があり、特に OSKM-302L2、OSKM-302L4 では上記未分化マーカーの発現が

見られないコロニーが多く見られた。

また、我々は遺伝子レベルでも発現を検証してみたが、図 2 に示したように、ヒト iPS 細胞を樹立する元となった線維芽細胞 TIG-114 では *OCT4*、*NANOG*、*SOX2* は全く発現が観察されないが、センダイウィルスで樹立したヒト iPS 細胞では基本的にレトロウィルスで樹立された TIG-114-4f1 や 201B7 と同等レベルで発現していることが確認された。

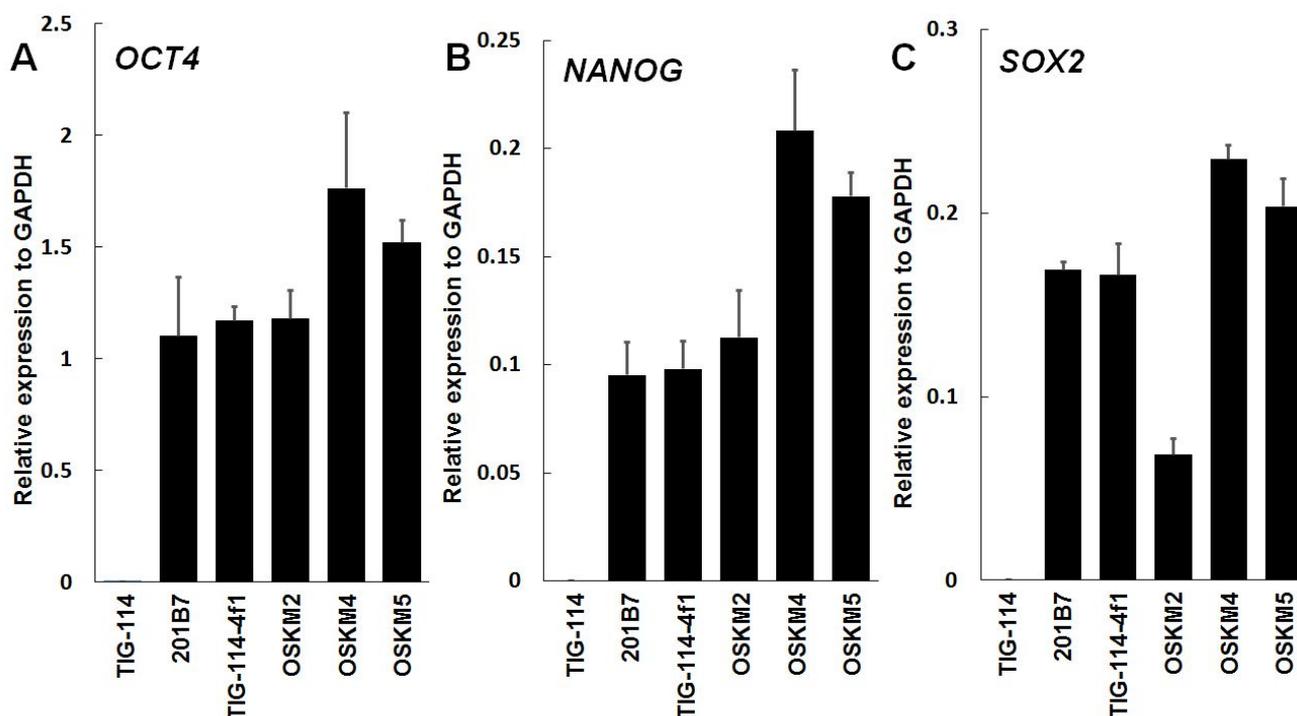


図 2. センダイウィルスベクターを用いて樹立したヒト iPS 細胞の未分化マーカーの定量的 RT-PCR を用いた発現解析。OSKM4 因子を発現するセンダイウィルスで樹立したヒト iPS 細胞における多能性幹細胞マーカーの発現を京都大学でレトロウィルスを用いて同じ TIG-114 線維芽細胞から作製された TIG-114-4f1 株や別の線維芽細胞から樹立された 201B7 株をコントロールに比較した。

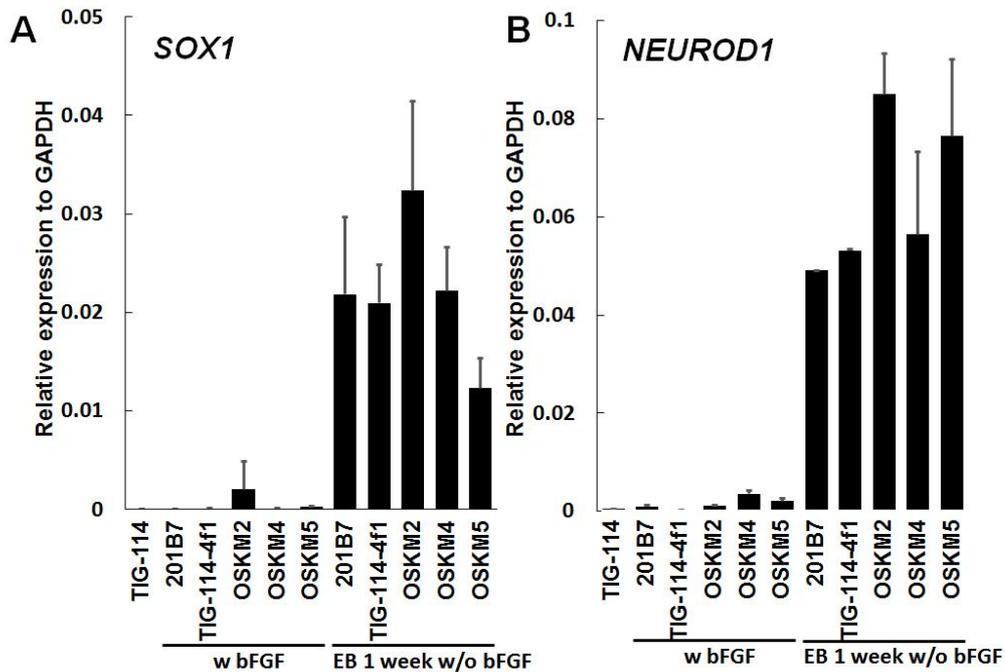


図3．ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期外肺葉マーカーの発現。w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を 1 週間浮遊培養させた分化細胞。

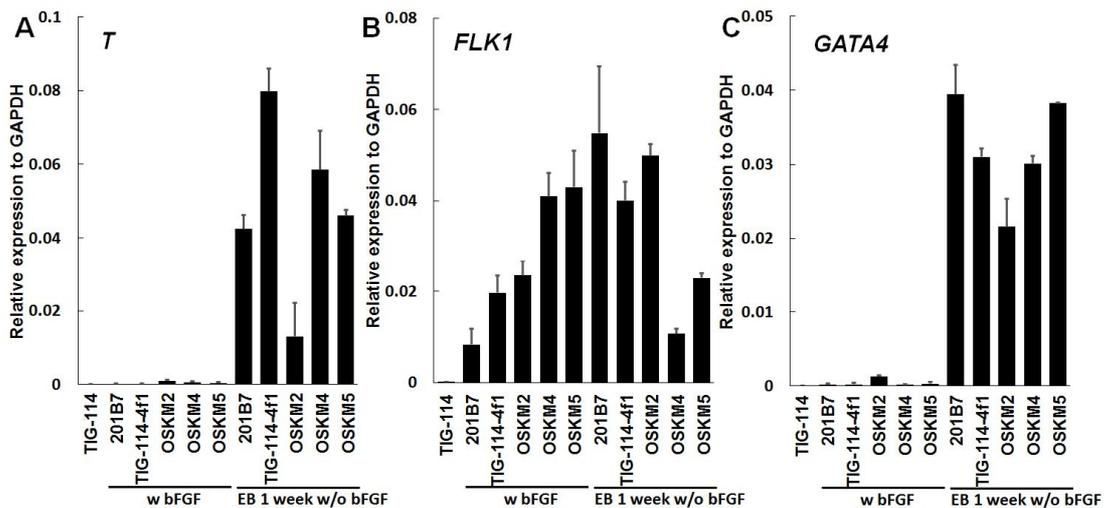


図4．ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期中肺葉マーカーの発現。w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を 1 週間浮遊培養させた分化細胞。

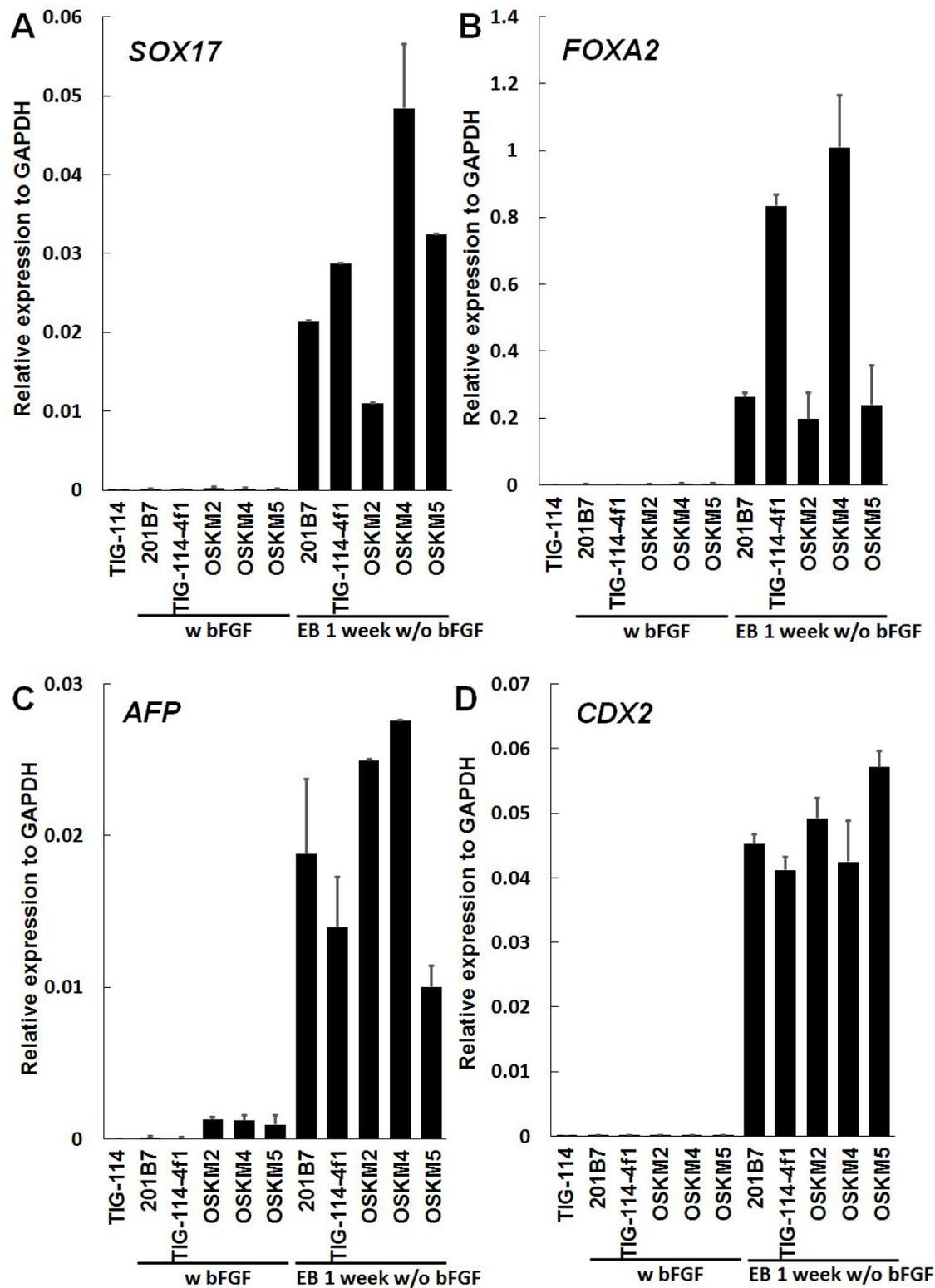


図5 . ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期内肺葉マーカーの発現。 w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。 EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を 1 週間浮遊培養させた分化細胞。

次にセンダイウイルスで樹立した OSKM2, OSKM4, OSKM5 について、胚葉体形成法で 1 週間 bFGF 無の条件で自由分化させた際の各種初期マーカーの発現を検証した。その結果、外胚葉方向については *SOX1* と *NEUROD1* に関しては 201B7 や TIG114-4f1 と同レベルの分化能を示していることが確認された(図 3)。また、初期中胚葉マーカーの *T* や *GATA4* については OSKM2 がやや低めの発現を示す傾向が見られ(図 4)。初期内胚葉マーカーの *SOX17* と *FOXA2* においても OSKM2 が低めの発現を示したが(図 5 AB)、初期肝臓マーカー(*AFP*)や初期腸管マーカー(*CDX2*)の発現は 201B7 や TIG114-4f1 と同レベルの分化能と評価された(図 5 CD)。即ち、多少のばらつきはあるもののセンダイウイルスで樹立したヒト iPS 細胞はレトロウイルス法で樹立した細胞と比べても遜色ない幹細胞が樹立されていたことが確認された。

倫理面の配慮

ヒト iPS 細胞 201B7 及び TIG-114-4f1 は、理研細胞バンク(理化学研究所)と医薬基盤研究所の

JCRB 細胞バンクより、また、TIG-114 細胞も JCRB 細胞バンクよりより所定の手続きを経て入手したものを使用した。また、医薬基盤研究所と長岡技術科学大学への樹立した細胞の譲渡についても、産業技術総合研究所、医薬基盤研究所、長岡技術科学大学の倫理委員会で審査を受けて承認されたのちに譲渡手続きを行っている。

また、文部科学省からの通知(平成 20 年 2 月 21 日付 19 文科振第 852 号)にある禁止事項(着床前のヒト胚へのヒト iPS 細胞の導入、ヒト iPS 細胞から除核卵への核移植などにより個体を発生させる研究、ヒトへのヒト iPS 細胞の移植、ヒト iPS 細胞を導入した着床前の動物胚からの個体産生、生殖細胞の作製)は行っていない。

本研究は、法令及び、独立行政法人 産業技術総合研究所の所内規定を遵守し、外部委員を含む産総研所内のヒト由来試料倫理委員会で審査を経た上で、限られた研究員が利用できる専用の実験室内で行った。また、本研究で使用したセンダイウイルスでヒト iPS 細胞を樹立する実験を行うに当たっては、上記の産総研所内のヒト由来試料倫理委員会でヒト線維芽細胞 TIG-114 細胞

の使用、ヒト iPS 細胞の培養・樹立の計画を申請し承認済みであり、また、産総研所内の組換え DNA 実験委員会でセンダイウイルスを用いてヒト iPS 細胞を樹立する計画は承認済みである。さらに、将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいて有効性及び安全性を確保できるよう厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従い、研究を行った。

D．考察

これまでのところ 2 種類のセンダイウイルス OSKM 及び OSKM-302L のいずれのウイルスで感染させた場合においても、最終的に siRNA でセンダイウイルスを除去した後に、センダイウイルス特異的タンパク質 NP が陰性となったインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞が多数確認された。TIG-114 線維芽細胞を用いた今回の実験結果では、OSKM タイプを用いて樹立した iPS 細胞で十数継代の後に安定して維持しやすい傾向がみられた。この理由は現在のところ明

らかではないが、これまでのところ 302miR を発現する KOSM-302L タイプでもこれまでのところ siRNA のトランスフェクションなしで容易にセンダイウイルスを除去することには成功しておらず、本方式のみでウイルスフリーのヒト iPS 細胞の樹立を簡便に行うには至っていないことから、OSKM-302L タイプはもう少し最適化を必要と考えられる。

一方、未分化マーカーの発現に関しては、増殖とコロニーの形態など、樹立したヒト iPS 細胞の維持が比較的容易であった OSKM 株の 3 株については、十分な発現を示しており、既存の 201B7 株や同一ロットの線維芽細胞 TIG-114 からレトロウイルス法で樹立した TIG-114-4f1 と比較しても、ほぼ差がない状態であることからセンダイウイルス法による樹立に特段の問題はないと思われる。

さらに胚葉体形成法により自由分化させた場合の初期分化マーカーの発現についても上記 OSKM 株の 3 株で比較したところ、もっとも増殖能が高かった OSKM 株の中で OKSM2 が中内肺葉への分化能が低めである傾向が見られた。しかし、今回の評価では胚葉体形成法による 1 週間の分化という 1 点での評価であることから、既に *T*、*SOX17*、*FOXA2* など

のかなり初期の分化マーカーの発現ピークを過ぎてしまっている可能性もある。今後、これらの有望株については個々の特異的分化プロトコルによる、より厳密な評価を行うことにより、正しい能力が評価できると考えられる。

E . 結論

初年度の平成 26 年度は、昨年度樹立を開始したセンダイウイルスによるインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞株の有望株を用いてそれらの未分化マーカーの発現や分化能を比較検討した。本研究に用いた線維芽細胞は、京都大学が以前レトロウイルスにより樹立したヒト iPS 細胞と同一のヒト繊維芽細胞 TIG-114 から、最近世界中の多くの機関で使用されだしているインテグレーションフリー法により樹立した株である。世界的に広く使用されている iPS 細胞がこれらの 2 つの主要な樹立法により作成されていることから、これらの株を代表例にして、種々の品質変動要因による影響を検証する細胞材料が整備できつつある。今後、ゲノム DNA の異常の有無や細胞分化能の詳細な際の有無など iPS

細胞の性状を慎重に解析する必要がある。本年度は、樹立し継代培養の末に安定化させた複数の株について未分化マーカーの発現と分化能の解析、核型解析や微生物検査で異常がないことを確認し、ヒト iPS 細胞としてある程度信用できる株を選択し、医薬基盤研究所と長岡技術科学大学へ譲渡することができた。以上、本分担研究は当初の計画どおり順調に研究が進行している状況にある。

F . 参考文献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**, 861-72.
2. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1720.
3. Nishimura K., et al., *Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming*. J Biol Chem. 2011 **286**, 4760-4771.

4. Nishimura T., et al., *Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. *Cell Stem Cell*. 2013 **12**, 114-126.
5. Wakao H, et al., *Expansion of functional human mucosal-associated invariant T cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. *Cell Stem Cell*. 2013 **12**, 546-558.

G . 研究発表

1 . 原著論文

- 1) Watanabe-Susaki K, Takada H, Enomoto K, Miwata K, Ishimine H, Intoh A, Ohtaka M, Nakanishi M, Sugino H, Asashima M, Kurisaki A. (2014). Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 32(12):3099-3111.

2. 学会発表

1) 栗崎晃、“幹細胞の制御と分化”（招待講演）食品薬品生物構造学研究会(ラフォーレ修善寺、静岡, 2014年10月1日-2日)

2) 柳沢託磨、栗崎晃、“ヒトiPS細胞を用いた肺組織細胞への新規分化方法の検討” 第14回 LS-BT合同研究発表会、(ポスター発表)、産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂、茨城、2015年2月3-4日)

3) 伊藤泰斗、野口隆明、関根麻莉、高田仁実、栗崎晃、“ヒトiPS細胞から分化させた肺前駆細胞における細胞表面マーカーの解析” 第14回 LS-BT 合同研究発表会、(ポスター発表) 産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂、茨城、2015年2月3-4日)

4) 高田仁実、渡邊加奈子、榎本圭、三輪田恭子、石嶺久子、印東厚、大高真奈美、中西真人、杉野弘、浅島誠、栗崎晃、“核小体 rRNAs 合成は幹細胞の多能性と分化を制御する”、(口頭発表) 日本分子生物学会 (パシフィコ横浜、横浜、2015年3月19日-21日)