

ヒト心筋細胞移植療法実現へ向けた患者移植用 iPS 細胞株の樹立および選抜法の最適化

関 倫久

慶應義塾大学医学部 循環器内科

【研究の背景】

末期重症心不全は内科的治療に抵抗性であり、心臓移植が唯一の根治的治療となるが、我が国ではドナー不足により移植申請数に対する移植施行件数は大きく下回る現状が続いている。このような状況に対して、近年 iPS 細胞が末期心不全に対する心筋細胞移植療法の細胞ソースとして期待されている。既に動物実験レベルでは iPS 細胞由来心筋細胞の移植により心機能が改善することが報告されており、医療者および患者双方から早急な重症心不全に対する再生治療の実現が求められている。

【目 的】

2014 年 9 月に世界に先駆けて加齢黄斑変性症に対する皮膚線維芽細胞由来の自家 iPS 細胞を用いた移植治療が行われた。同プロジェクトでは iPS 細胞樹立に際し安全な細胞株の選抜および分化誘導後の腫瘍形成性の消失の確認がなされた。心筋細胞移植の分野においても iPS 細胞治療の実現が期待されており、申請者らは当初より心筋細胞移植へ向けた iPS 細胞樹立法の確立へ向けて研究を重ねてきた。申請者らは過去に微量のヒト末梢血 T 細胞からゲノムへの遺伝子配列挿入のない iPS 細胞を樹立するプロトコルを確立し (Seki T, et al, Cell Stem Cell 2010, Seki T, et al, Nature protocols 2010)、患者に対して低侵襲な iPS 細胞樹立を達成した。同樹立法で作成される iPS 細胞は T 細胞受容体遺伝子の再構成がゲノム内に存在するため、これまでの iPS 細胞と異なり自家移植条件によっても移植後に移植細胞とレシピエント細胞が識別可能であることを確認した (論文作成中)。さらにこの T 細胞受容体遺伝子の再構成を有する iPS 細胞が既存の ES 細胞と同等に機能的な心筋細胞へ分化可能であることを既に確認した (Seki T, et al. PLoS One 2014)。また、この iPS 細胞樹立条件から動物血清および動物由来フィーダーを排除することに成功 (Kishino Y, Seki T, et al. PLoS One 2014, Kishino Y, Seki T, et al. J Vis Exp 2015) し、さらにセンダイウイルス溶液を除く試薬に関しては GMP レベルでの培養へ移行可能な樹立系の構築に成功した。当研究では、申請者らが確立した iPS 細胞樹立系を基礎として、GMP レベルでのヒト心筋細胞移植用の iPS 細胞樹立プロトコルの確立、さらに心筋細胞への分化指向性、腫瘍形成性を評価するプロトコルを作成し、将来的なヒト心筋細胞移植へ使用可能な iPS 細胞株の樹立および選抜方法を確立し、実際の患者由来 iPS 細胞作成時のために短期間で行えるよう各プロトコルを最適化することを目的とする。

【方 法】

将来的な移植治療に向けて、GMP レベルの培養条件内で完結可能な心筋細胞分化用 iPS 細胞樹立プロトコルを確立すること、さらに iPS 細胞樹立後の各種の未分化性と安全性の評価プロトコルを最適化し、移植用としてふさわしくない細胞株を排除し、移植に適する iPS 細胞株を短期間で選抜する体制を確立すべく、研究を行った。

具体的には、まず GMP レベルへ移行可能な培養系を確立するため、動物由来成分の含有が最小限であり、かつ生物由来原料基準をクリアできる培養系の確立を試みた。また、iPS 細胞の品質管理に用いる遺伝子マーカーを同定するため、公開データを含めた多数の発現データから核型を推定し統計的に解析を行うことで、臨床用に適さない iPS 細胞株を迅速に見分ける方法の確立を試みた。

【結 果】

センダイウイルスベクターによる山中因子導入、及び StemFitAK02 培地、培養基剤として iMatrix-511 を用いることにより、従来の培養条件よりも高効率な樹立方法の確立に成功した。当該方法は GMP 基準へ移行可能な試薬のみを用いており、ヒトへの移植ができる培養条件内で完結可能である。さらに、樹立後の選抜マーカーとして、700 個のヒト多能性幹細胞のマイクロアレイデータの解析から、ヒト iPS 細胞の最頻度の核型異常である 12トリソミーを簡便に見分けるマーカーとして GTSF1 を同定した。当該マーカーを用いることで、iPS 細胞培養において最頻度の核型異常である 12トリソミーを有する細胞株を遺伝子発現の確認のみで排除することが可能となった。

【考 察】

他家移植を想定し、HLAホモドナーから樹立した iPS 細胞株を備蓄するバンク化プロジェクトが進んでいるが、日本の人口をカバーするにはまだ時間を要する段階であり、また、人口カバー率は 100%に近づいたとしても、完全に 100%にはなることはない。iPS 細胞バンクでカバーできない症例に対する選択肢として、自家 iPS 細胞樹立の体制を確立することは非常に重要である。また、世界で初の iPS 細胞を用いた加齢黄斑変性症に対する移植治療では、自家 iPS 細胞が用いられた。樹立期間や費用の問題点を抱えるものの、他家移植と異なり免疫抑制剤を必要としない利点があり、自家 iPS 細胞の樹立体制の構築は臨床治験開始のためには外すことのできない選択肢である。当研究で確立した iPS 細胞樹立プロトコルは、今後実用化に向け生物由来原料基準を満たしていることを確認し、臨床への応用を進める段階にある。選抜用マーカーに関しては、現在のところ iPS 細胞の樹立における細胞株の選抜方法は非常に限られており、現実でのスクリーニングでの有用性の検証を進めることで有用な方法となると考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

当研究におけるプロトコル確立により、日本の人口をカバーする iPS 細胞由来心筋細胞移植療法の実現が可能となる。現在、iPS 細胞株の細胞株の選抜、品質管理はいまだ確立した方法はない。さらに臨床利用に適した iPS 細胞の選抜は、臨床応用に限らず発生メカニズムの解明に迫る学術的意義を持ち、再生医療領域の発展に大きく寄与する研究である。そして当該方法は実際に iPS 細胞樹立のコスト削減、実用化に向けて有効な方法となると考えられる。

【参考・引用文献】

Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells. *Cell Stem Cell*

Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nat Protoc*; 7:2012:718-728

Kishino Y, Seki T, Fujita J, Yuasa S, Tohyama S, Kunitomi A, Tabei R, Nakajima K, Okada M, Hirano A, Kanazawa H, Fukuda K. Derivation of Transgene-free Human Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral T Cells in Defined Culture Conditions. *PLoS One*. 2014;13;9(5):e97397

Kishino Y, Seki T, Yuasa S, Fujita J, Fukuda K. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral T Cells Using Sendai Virus in Feeder-free Conditions. *J Vis Exp*. 2015 Nov 11; (105). doi: 10.3791/53225