

短 報

皮膚線維芽細胞からのヒト iPS 細胞の樹立と培養

中西 徹*, 山崎 勤

就実大学薬学部分子臨床診断学研究室

Establishment of human iPS cells from dermal fibroblasts

Tohru Nakanishi*, Tsutomu Yamasaki

Department of Clinical Diagnosis, School of Pharmacy, Shujitsu University

(Received 29 October 2015; accepted 17 November 2015)

Abstract: Inducible pluripotent stem cells (iPS cells) were originally established from human fibroblasts in 2007. This paper brought large impact on cell biology and regeneration research resulting clinical research for treatment of age-related macular degeneration (ARMD) on 2014. We have acquired this technology at Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University, and have established human iPS cell from human dermal fibroblasts. Unexpectedly, novel types of cells like osteoblasts were also established in the same way. These cells form a culture sheet structure observed when MC-3T3 were cultured. Further analysis of these novel cells is in progress.

Keywords: iPS cell; dermal fibroblast; osteoblast

緒言

人工多能性幹細胞 (inducible pluripotent stem cell: iPS cell) は, 山中らによってマウス線維芽細胞から¹⁾, さらにヒト線維芽細胞から²⁾樹立された. Oct3/4, Sox2 という2つの初期化遺伝子, そして c-myc, klf-4 という2つの癌関連遺伝子を体細胞である線維芽細胞に導入するだけで, あたかも時間を巻き戻したように細胞が初期化してほぼすべての細胞に分化可能な幹細胞となるというこの魔法のような技術は, 細胞生物学や再生医療に大きなインパクトをもたらした. その医療への貢献の期待度も合わせて, この技術は

2012年度のノーベル医学賞 (医学・生理学賞) を受賞した. その最初の発見 (2006年) からわずか6年後というスピード受賞であったことも, その期待の大きさを物語っている. また2013年には, 理化学研究所と先端医療センター病院による加齢黄斑変性の臨床研究がスタートした. 2014年には, 実際に患者由来 iPS 細胞から分化誘導した網膜シートが本人に移植された. 移植1年後の本年9月に経過報告が行われた³⁾が, 経過は良好で視力は安定し, 癌化も起こらなかった. この手法は, 今後さらに多くの治療に応用されるであろう. 一方で, 難病の患者から iPS 細胞を樹立し分化誘

導を行うことで、新規治療薬の開発にも貢献することが期待されている。

本研究室では、既にマウス iPS 細胞を京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)から分与を受けて、培養研究や理科のキャリア教育への展開⁴⁾を行ってきた。今回、さらに iPS 細胞作製技術を習得して、研究室で線維芽細胞からのヒト iPS 細胞の樹立とその培養を実施した。また、その作製過程で新しい細胞を作製することにも成功したので報告したい。

材料及び方法

細胞

ヒト線維芽細胞は市販の細胞を使用した。細胞は4種類入手した(ヒト皮膚線維芽細胞 幼若と成体 (KURABO), ヒト皮膚線維芽細胞 幼若と成体 (TAKARA))。

iPS 細胞作製

iPS 細胞の作製は、CiRA のヒト iPS 細胞樹立・維持培養実技トレーニングプロトコール集(エピソード編)に従った。導入遺伝子としては、human iPS cell generation episomal vector mix を使用した(TAKARA より市販)。この vector mix は、初期の山中の方法をさらに改良して癌化の可能性を低減したもので、ゲノムに挿入されないエピソードベクターを使用している。さらに c-myc の代わりに L-myc を使用し、4つの基本遺伝子に加えて第5と第6の遺伝子として初期化遺伝子 lin28 と p53 機能阻害因子 p53DD を追加して導入する。この vector mix 3 μ l を 3 $\times 10^5$ の線維芽細胞と 110 μ l の遺伝子導入溶液中で混合し、専用チップでそのうち 100 μ l を吸い上げて、NEON electroporation system(Invitrogen)にて電氣的に遺伝子導入を行う方法をプロトコールで推奨しているが、今回は、準備できた専用チップが 10 μ l 用のものであったので、100 μ l スケールでなく 10 μ l スケールで、10回に分けて遺伝子導入を行った。導入条件は、1,650 V を中心に前後 100 V 変化させた。導入後すぐに 6 well plate に播種した。

今回は導入 10 回分を 1 well にまとめて播種するようにした。

iPS 細胞維持培養

遺伝子導入した後の細胞は 6 well plate にて 10% FBS-DMEM 培地中、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下一週間培養した。培養液は一日おきに交換した。1週間後、この細胞をトリプシンではがして細胞数を計測し、培地 10ml の、フィーダー細胞をプレシードした直径 10cm dish に 2.0 $\times 10^4$ /ml でリシードした。この段階から、培養液には ES/iPS 細胞用培地を用いた。また、培地交換はこれ以降毎日行った。フィーダー細胞としては、今回はマウス胚線維芽細胞を用い、これをあらかじめマイトマイシン C(MMC)処理して増殖を止めて、ゼラチン処理した直径 10cm dish に播種した。

リシードした細胞を 2-3 週間培養すると、線維芽細胞の中から iPS 細胞様のコロニーが出現した。これらのコロニーが拡大して混合しないうちにクローニングを行った。実体顕微鏡下でコロニーを培養皿の下からマークし、これを指標に顕微鏡下でコロニーを無菌的にピペットにより吸い上げた。周辺組織と癒着している場合が多いので、ピペットのチップにて周囲の細胞を剥がしながらコロニーを吸い上げる必要がある。吸い上げたコロニーは、フィーダー細胞をプレシードした 6 well plate に 1 well に 1 個ずつ播種した。クローニング後、さらに ES/iPS 細胞用培地で毎日培地交換を行ってコロニーを拡大した。なお、今回の実験では ES/iPS 細胞用培地として、2 μ g の bFGF を 500ml の ReproCELL (ReproCELL 社)に溶かしたものを使用した。

結果・考察

今回、ヒト iPS 細胞樹立と維持培養法の習得のため、2015年6月10日から12日にかけて CiRA で実施されたヒト iPS 細胞樹立・維持培養実技トレーニングに参加し、ヒト iPS 細胞樹立から培養・維持、さらに凍結法まで至る実技講習を受けた(本講習には、細胞培養経験があることと ES

細胞あるいは iPS 細胞の培養経験があることが参加の必要条件とされている)。

今回の実験では、上記の講習でも用いたエピソームベクターによるヒト iPS 細胞の作製を試みた。エピソームベクターは、細胞の成育と共に希釈されて細胞には残らず、またゲノムに挿入もされないため、クリーンな iPS 細胞が樹立できる長所がある⁵⁾。今回、1,650 V の基本条件から 100 V の電圧を上下させて 3 種の条件で遺伝子導入を行ったが、各条件で遺伝子導入を行った後に播種した細胞の生存率は、それぞれかなり異なっていた。2日後の様子を図1に示すが、強い電圧をかける程、細胞数は減少するが導入効率は高くなると考えられる。今回の結果からも、細胞によって導入条件を何点か変化させて実験をする必要があると思われた。

また今回の実験では、リシードする細胞の数について、所定の 10 倍多い条件も行って見た。その結果、リシードした後、上記の遺伝子導入基本条件(1,650 V)と+100 V の条件(1,750 V)において、所定の細胞数である $2.0 \times 10^4/\text{ml}$ より 10 倍多い $2.0 \times 10^5/\text{ml}$ でリシードした条件でのみ、iPS 細胞様コロニーが出現した。出現したコロニー数は、1,650 V で well あたり 1 個、1,750 V で well あたり 3 個であった。iPS 細胞の出現効率は、プロトコールに従うと、最良で 0.1%程度という講習会での話であったので(20,000 個の細胞を播種して最良で 20 個)、今回の実験における効率は、この 100 分の 1 かそれ以下であったと判断された。原因はいろいろ考えられるが、遺伝子導入において、プロトコールでは 100 μl のスケールを推奨されているのに対して、今回は、専用チップの都合で 10 μl スケールの導入実験を 10 回行うことができず、これをまとめて 1well に播種することで 100 μl 分の細胞数を用意したことが、出現効率が低かった一因と考えられた。

リシードで出現した iPS 細胞をクローニングしたものが図2の細胞である、現在、これらの細胞を継代培養しているが、培養における問題点

としては、他の細胞培養と比較して手間とコストがかかり、特に培養液のコストが非常に高いことが挙げられる。500 ml 当たり約 30,000 円という価格は、750 ml あたりにすると約 50,000 円という高級ワイン並みの値段であり、これを毎日投入



図1 遺伝子導入を行って2日目のヒト線維芽細胞 上：電圧 1,550 V、中：1,650 V、下 1,750 V

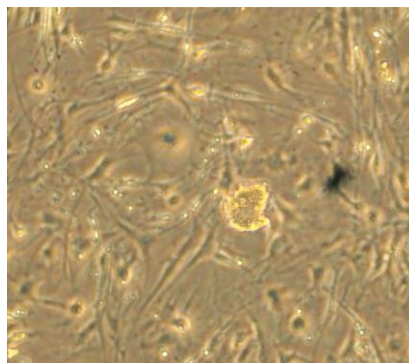


図2 クローニングしたヒト iPS 細胞 (中央の光る細胞)

して維持・培養することが iPS 細胞培養には必要である。

さらに今回、この iPS 細胞を樹立する過程で重要な発見があった。それは、iPS 細胞以外の細胞が成育・樹立されたことである。この細胞はリシードの過程で iPS 細胞とは別に出現したもので、iPS 細胞とは明らかに形態が異なっていた(図3)。

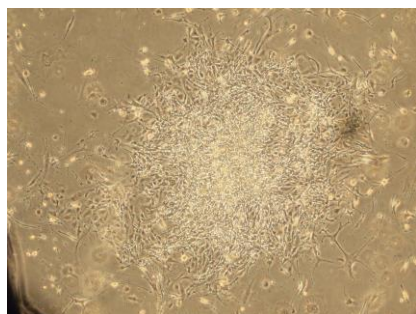


図3 今回、新たに樹立した中胚葉系幹細胞

フィーダー細胞は MMC 処理をしているので増殖する可能性はなく、またこの細胞は、形態的にもこのフィーダー細胞や遺伝子導入に用いた細長いヒト皮膚線維芽細胞とは異なっていた。形態的にみて骨髄細胞の中の付着性細胞に近い細胞ではないかと推測されるが、実際、線維芽細胞は骨、軟骨等と同じ中胚葉から分化する細胞で、おそらく遺伝子導入が不完全であったため、線維芽細胞が iPS 細胞まで初期化されることがなく、組織幹細胞である中胚葉系の幹細胞まで遡ったような細胞であろうと考えられる。事実、この細胞を培養してそのまま維持すると、基質を産生してシート状の構造物を作ることにもわかった。似た細胞としては、マウス頭蓋冠由来細胞の骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞が挙げられる⁶⁾。この細胞は、骨基質を産生して白いシート状の構造物へと変化することで知られていて、骨形成のモデル細胞として用いられている。今回見いだした細胞が、線維芽細胞から少し分化能を有する細胞へバックした細胞であると考えれば、この細胞は中胚葉由来の細胞には分化できると考えられるので、このシートが骨基質であ

る可能性は考えられる。現在、今回見いだした細胞の詳細な性状(遺伝子発現やマーカータンパク質の発現等)や分化能力、さらに形成されたシート状構造物の解析(免疫染色等)について検討を行っている。最近、iPS 細胞を一旦経ることなく、線維芽細胞等から様々な組織の細胞を直接的に作出する試み(directed reprogramming)が、遺伝子導入あるいは化合物の添加により試みられている。例えば、妻木らは、マウス皮膚線維芽細胞培養に2つのリプログラミング因子(c-Myc, Klf4)と1つの軟骨因子(Sox9)を導入して培養すると、軟骨細胞様細胞が誘導されることを明らかにした⁷⁾。今回の細胞のように、iPS 細胞を経ることなく特定の分化能を持った細胞が出現する可能性があることは、再生医療の今後の展開において重要な示唆を与える結果であり、その意味で、今回見つかった新しい細胞は、再生医療における重要な発見の一つであると考えられる。

謝辞

ヒト iPS 細胞樹立・維持培養実技トレーニングにてお世話になりました、CiRA の浅香勲先生はじめスタッフの皆様には感謝いたします。また、本研究を支援いただきました(株)桃谷順天館に感謝いたします。

引用文献

- 1) Takahashi K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676 (2006)
- 2) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131 861-872 (2007)
- 3) 高橋政代: 滲出型加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植に関する臨床研究」における第一症例目の移植手術の経過について 理化学研究所 HP, 2015.10.2

- 4)中西 徹: iPS 細胞を用いた体験学習による中高理系志望人材の発掘と科学リテラシーの向上
(公財) 福武教育文化振興財団 平成 26 年度教育研究助成成果報告書, 58-59 (2015)
- 5) Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., Nakagawa M., Tanabe K., Tezuka K., Shibata T., Kunisada T., Takahashi M., Takahashi J., Saji H., Yamanaka S.: A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Meth.*, 8 409-412 (2011)
- 6) Kodama H., Amagai Y., Sudo H., Kasai S., Yamamoto S.: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jap. J. Oral Biol.*, 23 899-901 (1981)
- 7) Tsumaki N.: Cartilage regeneration using cell reprogramming technologies. *Clin. Calcium*, 23 1641-1648 (2013)