

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：iPS細胞を用いた再生心筋細胞移植による重症心不全治療法の確立
2. 研究開発代表者：福田 恵一（慶應義塾大学 医学部）
3. 研究開発の成果

様々な臓器再生の臨床応用が期待されている iPS 細胞だが、iPS 細胞の樹立効率は低く、分化能力などの幹細胞の性質も不均一であることが iPS 細胞の臨床応用における重大な問題点となっている。そこで、卵母細胞特異的に発現しているリンカーヒストン H1foo をコードしている遺伝子である *H1foo* を上記転写因子とともに導入することで、より質の高い iPS 細胞を効率良く作製する方法を確立し、高効率の心筋分化を実現することで再生医療の発展に貢献することを目的として研究を行った。

癌遺伝子である *c-Myc* を除き、レトロウイルスベクターを用いて *Oct4*、*Sox2*、*Klf4* の 3 因子と共に *H1foo* を分化細胞に導入して iPS 細胞を作製し（以下 OSKH と記載）、従来の 3 因子のみ（以下 OSK と記載）を導入する方法と比較してより高効率で質の高い iPS 細胞が樹立できるかを究明した。

iPS 細胞の樹立効率について、*Nanog*-GFP-IRES-Puromycin 耐性トランスジェニックマウス由来成体マウス尾部線維芽細胞を用いて、*Nanog*-GFP 陽性コロニー数による比較を行った。OSKH 群は OSK 群と比較して、*Nanog*-GFP 陽性コロニー数が最大で約 8 倍まで増加した。また全 ES 細胞様コロニーに占める *Nanog*-GFP 陽性コロニー数の割合を比較したところ、OSK 群は平均 55%程度であるのに対し、OSKH 群では平均 91%と著明に改善を認めており、*H1foo* は不完全にリプログラミングされたコロニーの発生を抑制し、*Nanog*-GFP 陽性の iPS 細胞を対照群よりも有意に効率良く樹立させていることが判明した。

胚様体形成能を比較したところ、OSKH-iPS 細胞は OSK-iPS 細胞よりも有意に大きい胚様体をより多く形成し、かつクローン間における胚様体のバラつきも少ない傾向を示した。またアグリゲーション法により ICR マウス由来 8 細胞期受精卵と B6J マウス由来の樹立 iPS 細胞を融合させてキメラマウス作製を行い、キメラ寄与率と生殖細胞系列への移行を調べたところ、OSKH-iPS 細胞群は対照群と比較してキメラ寄与率が高い傾向があり、特にクローンによっては ES 細胞を凌駕する数の 100%キメラマウスが得られた。また生殖細胞系列への寄与も対照群と比較すると良好であった。(Stem Cell Reports in press.) これらの結果をふまえ、*H1foo* をより高品質なヒト iPS 細胞の樹立へと応用する予定である。

心筋細胞移植による細胞治療を安全に成功させるには、心筋細胞のみを純化精製しなくてはならない。そこで、臨床研究用に大量のヒト iPS 細胞由来心筋細胞を純化精製する方法を開発した。

多能性幹細胞に必須な栄養因子を検索するためにアミノ酸に着目し、培養液中で消費が活発なアミノ酸をスクリーニングすることでグルタミンが iPS 細胞の生存に重要なアミノ酸であることを同定した。ブドウ糖とグルタミン除去によって未分化 iPS 細胞は 48 時間以内に死滅することが明らかとなったが、心筋細胞は乳酸を添加することによって効率的に TCA サイクルをまわし ATP を生産することが可能であることがあきらかとなった。

このヒト iPS 細胞と心筋細胞の代謝の違いを利用したブドウ糖、グルタミン除去、乳酸添加培地を用いることによって未分化幹細胞の混入率を測定した。HEK 細胞に未分化 iPS 細胞を混入させて未分化 iPS 細胞の残存率を計算するスパイク法を用いることにより、心筋細胞中に残存する未分化 iPS 細胞の残存率は 0.001%以下であることが明らかとなった。本研究結果は Cell Metabolism に掲載された (Cell Metabolism Volume 23, Issue 4, 12 April 2016, Pages 663-674)。