

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題  
(英語) Projects for Technological Development, Research Center Network for  
Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 再生医療用製品の大量生産に向けたヒト iPS 細胞用培養装置開発  
(英語) Development of scalable culture apparatus for mass production of human  
iPS cell-derived regenerative medicine products

研究開発担当者 (日本語) 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 准教授 松浦勝久  
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's  
Medical University, Associate Professor, Katsuhisa Matsuura

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究開発分担者 (日本語) 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 助教 青木信奈子  
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's  
Medical University, Assistant Professor, Shinako Aoki

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### ・ 研究開発代表者による報告の場合

再生医療における培養手法開発においては、小容量での検討を大容量にシームレスにスケールアップできることが必要であり、これまでに 5 mL 容量多連小型 3 次元浮遊攪拌培養装置および改良 100mL, 500mL ベッセルを開発し、今年度は Ff-iPS 細胞の心筋分化実証試験を実施した。いずれにおいても従来通りの心筋分化誘導が可能であり、特に臨床試験での使用が検討されている 500mL ベッセルでの検討では、分化 14 日目に  $8 \times 10^8$  個の細胞数が得られ、その約 9 割が心筋細胞であり、また Tra-1 60 は検出されなかったことから、十分に臨床用細胞の生産に寄与できるものと考えられた。

多くの移植細胞数を要する再生医療においては、相対的に未分化 iPS 細胞残存に伴う腫瘍化リスク

も高くなるため、分化誘導後の細胞集団から、より効率的に未分化 iPS 細胞を除去する手法の開発が不可欠である。今年度は、主に CDK1/9 を阻害する抗がん剤である Dinaciclib による iPS 細胞除去手法を開発した。Dinaciclib は iPS 細胞のアポトーシスを誘導したが、その機序は使用する濃度によって異なり、低濃度では p53 依存性に MCL-1 の分解を介して、中～高濃度では p53 非依存性に MCL-1 の転写抑制を介した MCL-1 の発現抑制によりアポトーシスを誘導することが明らかとなった。Dinaciclib 処理後も iPS 細胞由来心筋シート作製の可能であり、ヌードラット皮下への移植 7 週間後も心筋細胞の拍動が観察された。また iPS 心筋細胞に対し Dinaciclib を添加しても、MCL-1 の発現は維持され、細胞数の減少も観察されなかったことから、Dinaciclib は心筋細胞への毒性が少なく、iPS 細胞を除去できる点で有用な手法であると考えられ、これまでに報告したメチオンin除去培地（平成 26 年度）、TRPV-1 を活性化する 42°C 培養（平成 27 年度）との最適なコンビネーションにより残存 iPS 細胞数を限りなくゼロに近づけることが可能と考えられる。

これまでに 3 次元浮遊攪拌懸濁培養においてヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞の誘導手法開発を行ってきた。一方で分化誘導にて得られた血管内皮細胞の単培養での限定的な増殖力が、本細胞の実用上の大きな障壁となっており、今年度は iPS 細胞由来血管内皮細胞の増殖力低下の分子機序を明らかにするため、iPS 細胞由来 CD31 陽性細胞と臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC、ヒト臍帯動脈血管内皮細胞 HUAEC における遺伝子発現を比較すべくマイクロアレイ解析を行った。その結果、ヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞において高発現している、細胞増殖抑制に関与しうる 35 個の遺伝子の同定に成功した。次年度はこれらの細胞増殖制御に関与しうる遺伝子に着目して iPS 細胞由来 CD31 陽性細胞の増殖抑制の原因を探り、iPS 細胞由来 CD31 陽性細胞の効果的な増幅法の開発につなげる予定である。

平成 27 年度に実施した 100mL ベッセル用 pH 電極の安全性試験結果を説明し、臨床使用に問題ない旨確認した。それを踏まえ、100mL ベッセル用 pH 電極と同様の仕様でサイズを 500mL ベッセル用に改良した pH 電極を開発し、上記の 500mL ベッセルの心筋分化誘導において評価した。約 2 週間の分化培養期間でドリフトなく安定的に pH の計測が可能であり、また上記の通り分化誘導効率および収量ともに良好な結果が得られていることから、500mL 用 pH 電極使用による弊害はないものと考えられた。

It is necessary to develop the suitable culture strategy in the regenerative medicine using the scalable culture apparatus and we have already developed 5 mL, 100 mL and 500 mL culture vessels for 3D suspension culture of human iPS cells. This year we evaluated the cardiac differentiation efficacy of Ff-iPS cells using such vessels. We observed high cardiac differentiation efficacy in each vessel and in the case of 500 mL vessel experiment, we obtained around  $8 \times 10^8$  cells at the day 14 of cardiac differentiation and over 90 % of cells were positive for cardiac troponin T, but Tra-1 60 positive cells were not observed in FACS analysis, suggesting that the culture vessels that we developed in this project is suitable for producing the enough amount of cardiac cells from human Ff- iPS cells.

As the risk of tumorigenesis associated with the relatively remaining undifferentiated iPS cells remains high in regenerative medicine which requires a large number of transplanted cells, development of a method to eliminate undifferentiated iPS cells from the differentiated cell population more efficiently is indispensable. This year, we have identified that Dinaciclib, a

multi cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor, induces the apoptosis of human iPS cells without affecting the viability of iPS cell-derived cardiac tissues. The treatment with low dose (6 nM) Dinaciclib induced the apoptosis of human iPS cells within 24 hours through CDK-1 inhibition-mediated p53 dependent MCL-1 degradation. On the other hand, the treatment with middle (8 nM) and high dose (20-50 nM) Dinaciclib induced the apoptosis of human iPS cells through CDK9 inhibition-mediated p53 independent suppression of MCL-1 transcription. These findings suggest that Dinaciclib might promote iPS elimination through multidisciplinary mechanisms. When human iPS cells were cultured with human cardiac fibroblasts, one of the essential components of bioengineered cardiac tissues, and cultivated with several doses of Dinaciclib for 6 hours, the significant reduction of remaining iPS cells was observed, suggesting that Dinaciclib might be effective to eliminate iPS cells even in the co-culture environment with other cell types. Finally we elucidated the influence of Dinaciclib for human iPS cell-derived cardiomyocytes. Even after the treatment with high dose Dinaciclib (50 nM), most of cardiomyocytes were still kept in viable. Furthermore when iPS cell-derived cardiomyocytes were cultured on temperature responsive culture dishes with Dinaciclib, cell sheets were fabricated after lowering the culture temperature and the transplanted cardiac cell sheets onto the subcutaneous tissues of nude rats showed the spontaneous beating at 7 weeks after the transplantation. Although Dinaciclib induced the expression of p53 in cardiomyocytes, MCL-1 transcription and protein were maintained, indicating that Dinaciclib might not be toxic for human iPS cell-derived cardiomyocytes. These findings suggest that the difference of MCL-1 expression regulatory machinery through Dinaciclib treatment between iPS cells and iPS cell-derived cardiac cells could be exploited to eliminate remaining iPS cells in bioengineered cell sheet tissues, which will further reduce the risk of tumour formation.

We have already developed the culture strategy to induce endothelial cells from human iPS cells in 3D suspension culture. However the limited growth capacity of iPS cell-derived endothelial cells in the monoculture condition is one of the unresolved issues for the application of that cell for regenerative medicine. Therefore understanding of molecular mechanisms of their limited growth capacity might enable us to develop more suitable strategy to produce iPS cell-derived endothelial cells. This year we analyzed the gene expression of human iPS cell-derived endothelial cells compared with that in HUVEC and HUAEC with microarray method and identified several candidate genes that were upregulated in iPS cell-derived endothelial cells and might be responsible for their growth suppression.

The strategy to monitor the culture environment is also imperative for stable cell production. On the basis of our previous development of disposable pH sensor for 3D suspension 100 mL culture vessel, we have developed the disposable pH sensor for 3D suspension 500 mL culture vessel.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 1 件）

1. Alsayegh K, Matsuura K, Sekine H, Shimizu T. Dinaciclib potently suppresses MCL-1 and selectively induces the cell death in human iPS cells without affecting the viability of cardiac tissue. **Sci Rep.** 2017;7:45577
2. 松浦勝久、iPS 細胞を用いた再生医療の実現に向けた取り組み、未来医学、2017、30、35-42
3. 山崎祐、松浦勝久 心筋シート作成に向けた試み 循環器内科 2016、80、322-327

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Possible future of regenerative medicine using cell sheet engineering and iPS cell technology、口頭(招待講演)、松浦勝久、The 13th International Congress of Human Genetics、2016/04/04、国内
2. Formation of vascular network structures in the co-culture with human inducible pluripotent stem cell-derived CD31+ cells、ポスター、青木信奈子、松浦勝久、14th Stem Cell Research Symposium、2016/05/20、国内
3. iPS 細胞を用いた再生医療の実用化に向けた取り組み、口頭(招待講演)、松浦勝久、第 39 回未来医学研究会大会、2016/05/21、国内
4. バイオリアクターを用いたヒト iPS 細胞由来 CD31 陽性細胞の分化誘導、ポスター、青木信奈子、松浦勝久、第 37 回日本炎症・再生医学会、2016/06/17、国内
5. Dinaciclib treatment efficiently eliminates residual iPS cells in iPS-derived bioengineered cardiac tissue、ポスター、Khaled Alsayegh、松浦勝久、ISSCR2016、2016/06/23、国外
6. Elimination of residual iPS cells in bioengineered cardiac cell sheets by TRPV-1 activation、ポスター、松浦勝久、ISSCR2016、2016/06/24、国外
7. The small scale and multi channel bioreactor for pluripotent stem cell stirred suspension culture、ポスター、和田正憲、松浦勝久、ISSCR2016、2016/06/24、国外
8. 高温培養による組織工学的ヒト iPS 心筋組織内残存未分化 iPS 細胞除去手法開発、口頭、松浦勝久、温熱生理研究会 2016、2016/08/29、国内
9. The difference in tolerance against high temperature between iPS cells and iPS cell-derived cardiac cells is the novel target to eliminate remaining iPS cells in bioengineered cardiac tissues、ポスター、松浦勝久、Molecular Cardiovascular Conference II 2016、2016/09/02、国内
10. 再生医療用心筋組織開発、口頭(招待講演)、松浦勝久、幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム 第一回シンポジウム、2016/10/15、国内
11. Formation of vascular network structures using human inducible pluripotent stem cell-derived CD31+ cells、ポスター、青木信奈子、松浦勝久、第 24 回日本血管生物医学会学術集会、2016/12/09、国内

12. TRPV-1 activation through thermal and agonist treatment in the process of scalable cardiac differentiation and tissue fabrication is the novel strategy to eliminate undifferentiated iPS cells in the bioengineered cardiac tissues、ポスター、松浦勝久、Scale-up and Manufacturing of Cell-based Therapies V、2017/01/16、国外
13. The development of scalable bioreactor series for human induced pluripotent stem cell stirred suspension culture、ポスター、和田正憲、松浦勝久、Scale-up and Manufacturing of Cell-based Therapies V、2017/01/16、国外
14. iPS 細胞の臨床応用に向けた挑戦、口頭(招待講演)、松浦勝久、第 9 回ヘルシイエイジング学会 学術集会シンポジウム、2017/02/25、国内
15. CDK 阻害剤 Dinaciclib は p53 依存性・非依存性に iPS 心筋内未分化 iPS 細胞の細胞死を誘導する、口頭、松浦勝久、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/03/08、国内
16. 再生医療用ヒト心筋組織開発、口頭、松浦勝久、第 16 回日本再生医療学会総会受賞講演、2017/03/08、国内
17. 心臓間質細胞の特性解析を通じた心筋再生医療開発、口頭(招待講演)、松浦勝久、第 16 回日本再生医療学会総会シンポジウム、2017/03/09、国内
18. 共培養系を用いたヒト iPS 細胞由来 CD31 陽性細胞の sprouting 挙動の解析、ポスター、青木信奈子、松浦勝久、第 16 回日本再生医療学会総会シンポジウム、2017/03/08、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞と細胞シート工学による重症心不全への挑戦、松浦勝久、防衛医科大学校、2016/12/22、国内

(4) 特許出願

なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題  
(英語) Projects for Technological Development, Research Center Network for  
Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 再生医療用製品の大量生産に向けたヒト iPS 細胞用培養装置開発  
(英語) Development of human induced pluripotent stem cell culture apparatus  
toward mass manufacturing of regenerative medicine products

研究開発担当者 (日本語) エイブル株式会社 開発部 専任課長 和田昌憲  
所属 役職 氏名： (英語) ABLE Corporation, R and D section, Manager, Masanori Wada

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) バイオリアクターと培養システムおよびモニタリングシステムの開発  
開発課題名： (英語) Development of bioreactor, cell culture and monitoring system

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：東京女子医科大学・先端生命医科学研究所・松浦勝久 総括研究報告を参照。

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌0件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS 細胞培養のためのスケーラブルな培養技術の開発（1），ポスター，和田昌憲，松浦勝久，石川陽一，清水達也，日本再生医療学会，2017/3/8，国内
2. THE SMALL SCALE AND MULCH CHANNEL BIOREACTOR FOR PLURIPOTENT STEM CELL STIRRED SUSPENSION CULTURE, Masanori Wada, Katsuhisa Matsuura, Yoichi Ishikawa, Tatsuya Shimizu, ISSCR, 2016/6/11, 米国

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願