

P-01-02

多能性幹細胞培養における 増殖優位性の獲得抑制の試み

公益財団法人

京都大学iPS細胞研究財団

細胞調製施設(FIT) 研究開発部

加藤 智朗、大野 毛二力、高須 直子、塚原 正義



公益財団法人

京都大学iPS細胞研究財団

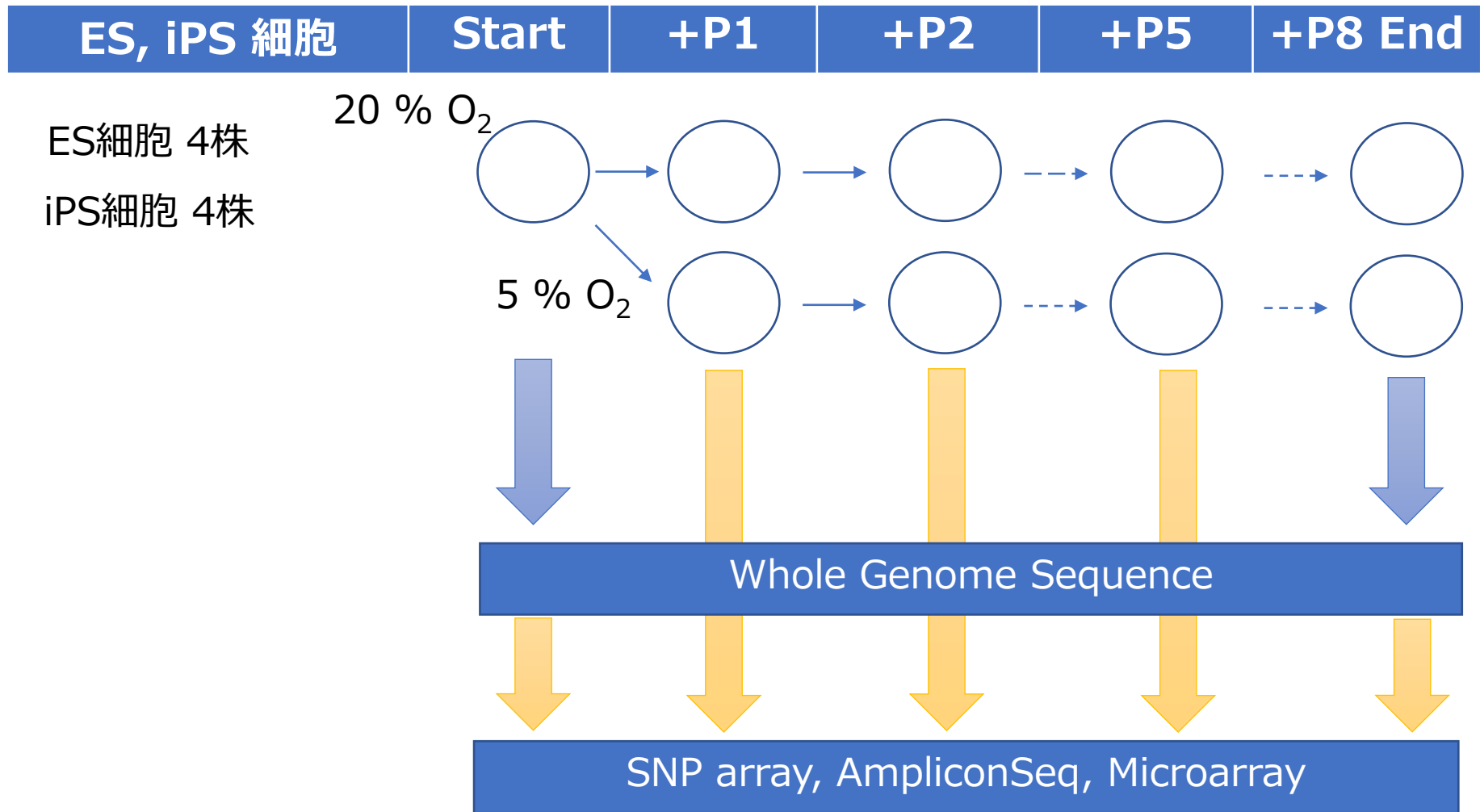
ES細胞やiPS細胞等の多能性幹細胞に限らず、細胞が増殖(分裂)する度に遺伝子変異が生じ、癌化のリスクにもなり得る。生体内で起こる体細胞変異は加齢によって蓄積し、健常人においても各組織癌発症に関わる既知のドライバー変異が優先的に蓄積されやすい傾向がある事が報告されている^{*1}。このような現象は、体細胞変異を持つ細胞の生存・増殖が環境において許容されるか否か、という選択圧により決められていると考えられる。

一方で、培養細胞においては、生体内とは異なり、比較的均質で一貫した環境下で細胞の増殖を維持していても、元々わずかにしか存在しない変異を持った細胞集団が増殖優位になり、細胞集団の大部分を占める事が起こり得る。このような変異保有細胞の細胞集団変動は再生医療を目的とした多能性幹細胞の品質制御を困難にし、延いては移植後の腫瘍形成のリスクともなり得る。

本研究では、ES細胞の培養において、5%酸素濃度での低酸素培養が変異の出現頻度抑制に効果があったという報告^{*2}を参考にし、低酸素培養が多能性幹細胞培養における増殖優位性獲得抑制に効果があるかを検証した。

*1 Garcia-Nieto PE. *et al.* Genome Biology (2019)

*2 Thompson O. *et al.* Nature Communications (2019)



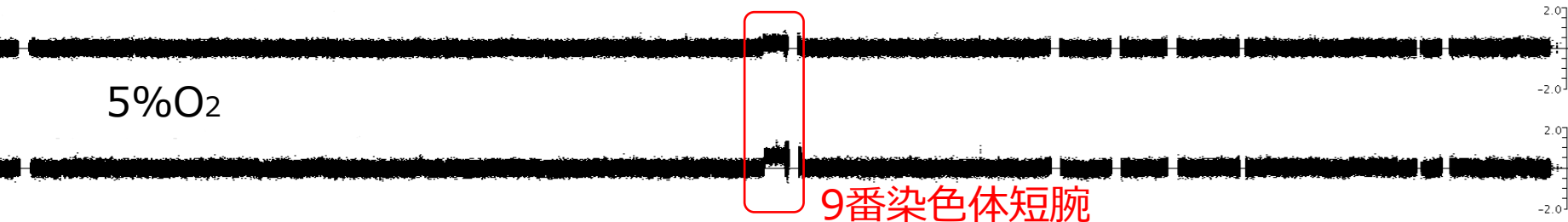
全ゲノムシーケンスによるCNV解析

培養によるコピー数変化 (+P8/Start)

ES1 20%O₂



ES3 20%O₂

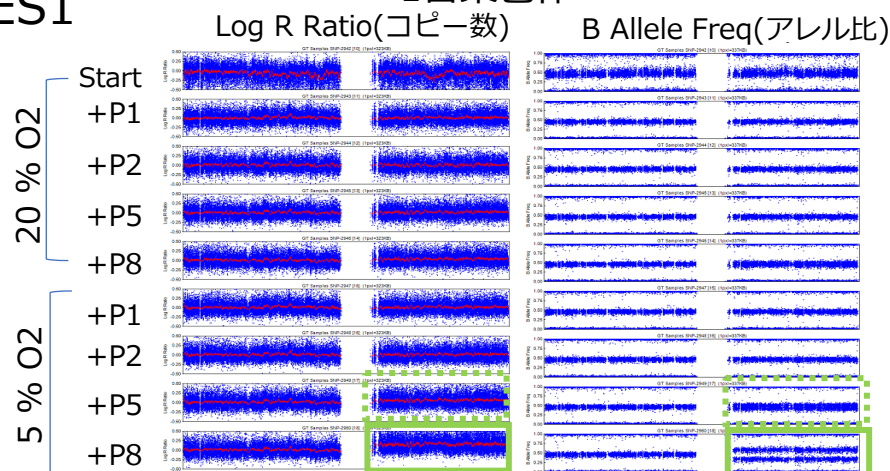


chr1:1 chr2:1 chr3:1 chr4:1 chr5:1 chr6:1 chr7:1 chr8:1 chr9:1 chr10:1 chr11:1 chr12:1 chr13:1 chr14:1 chr15:1 chr16:1 chr17:1 chr18:1 chr19:1 chr20:1 chr21:1 chr22:1 chrX:1 chrY:1

SNPアレイによるCNV解析

ES1

1番染色体



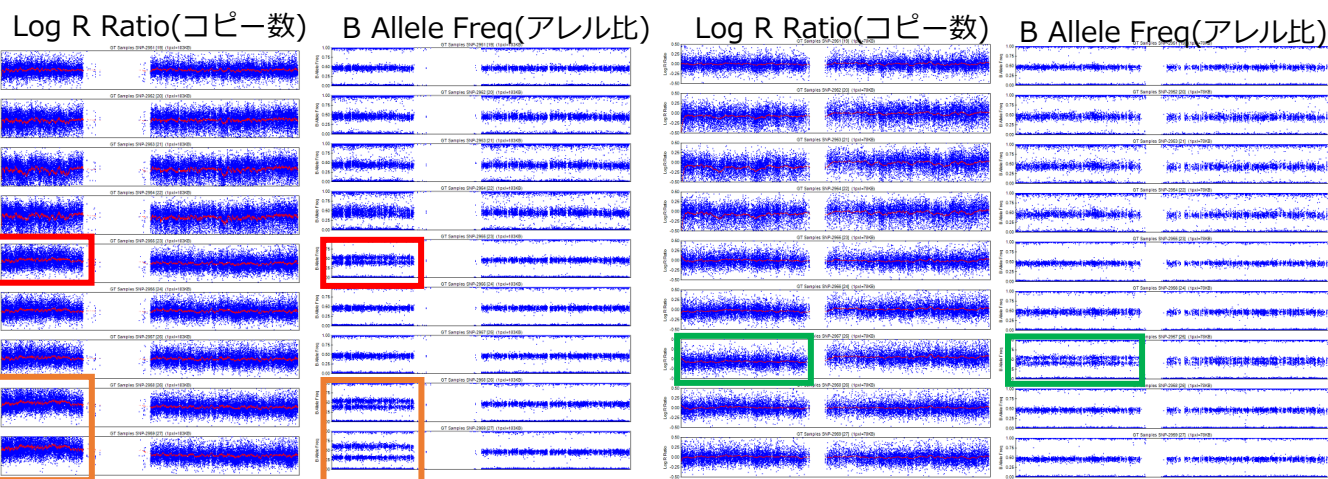
ES1 : 5%O2培養では5継代目で1番染色体CNV保有細胞の増殖の兆候があり、8継代目までに優位増殖した。

ES3 : 5%O2培養では5継代目で9番染色体CNV保有細胞の増殖の兆候があり、8継代目までに優位増殖した。20%O2培養では5%O2培養でのCNV保有細胞の増殖に比べ、ゆるやかな傾向であった。5%O2培養では20番染色体CNV保有細胞が2継代目でやや増殖するが、その後減少した。

ES3

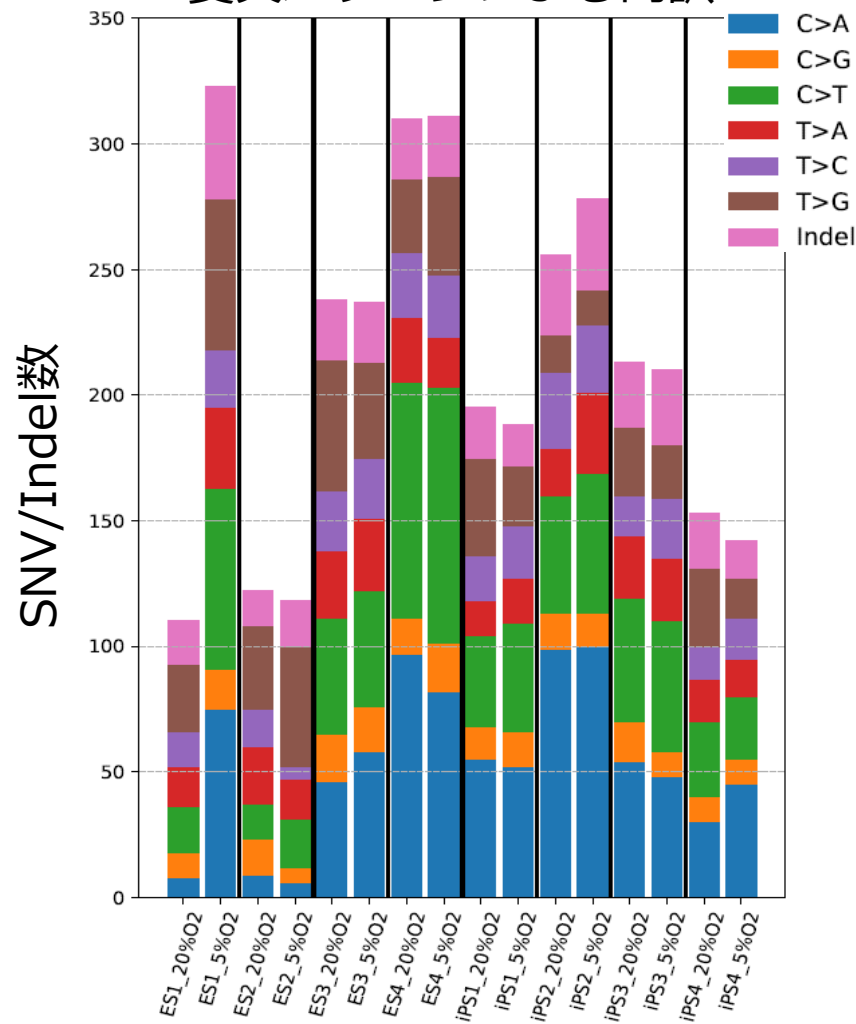
9番染色体

20番染色体



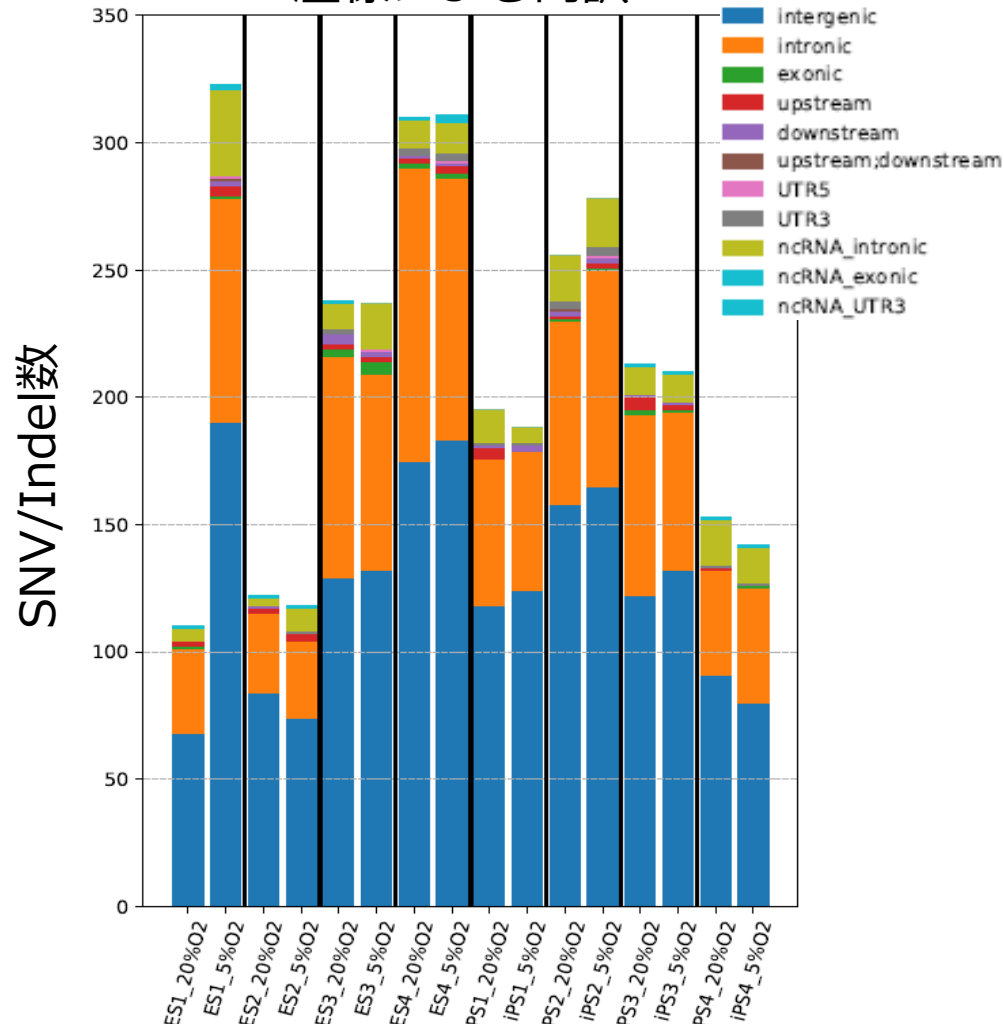
全ゲノムシーケンスによるSNV/Indel解析

変異パターンによる内訳



C>A及びC>T変異が多い

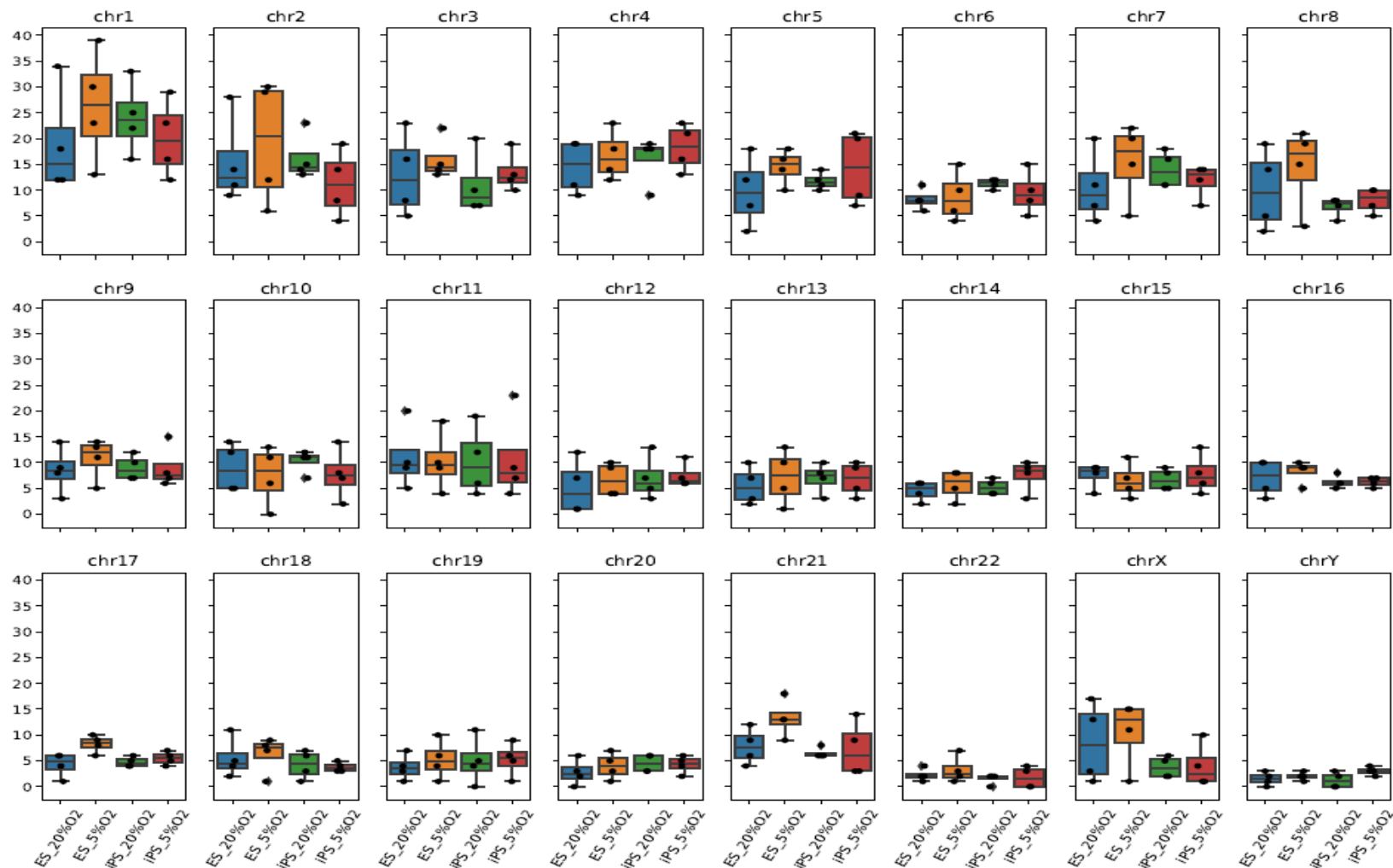
座標による内訳



Intergenic, intronicが大部分を占める

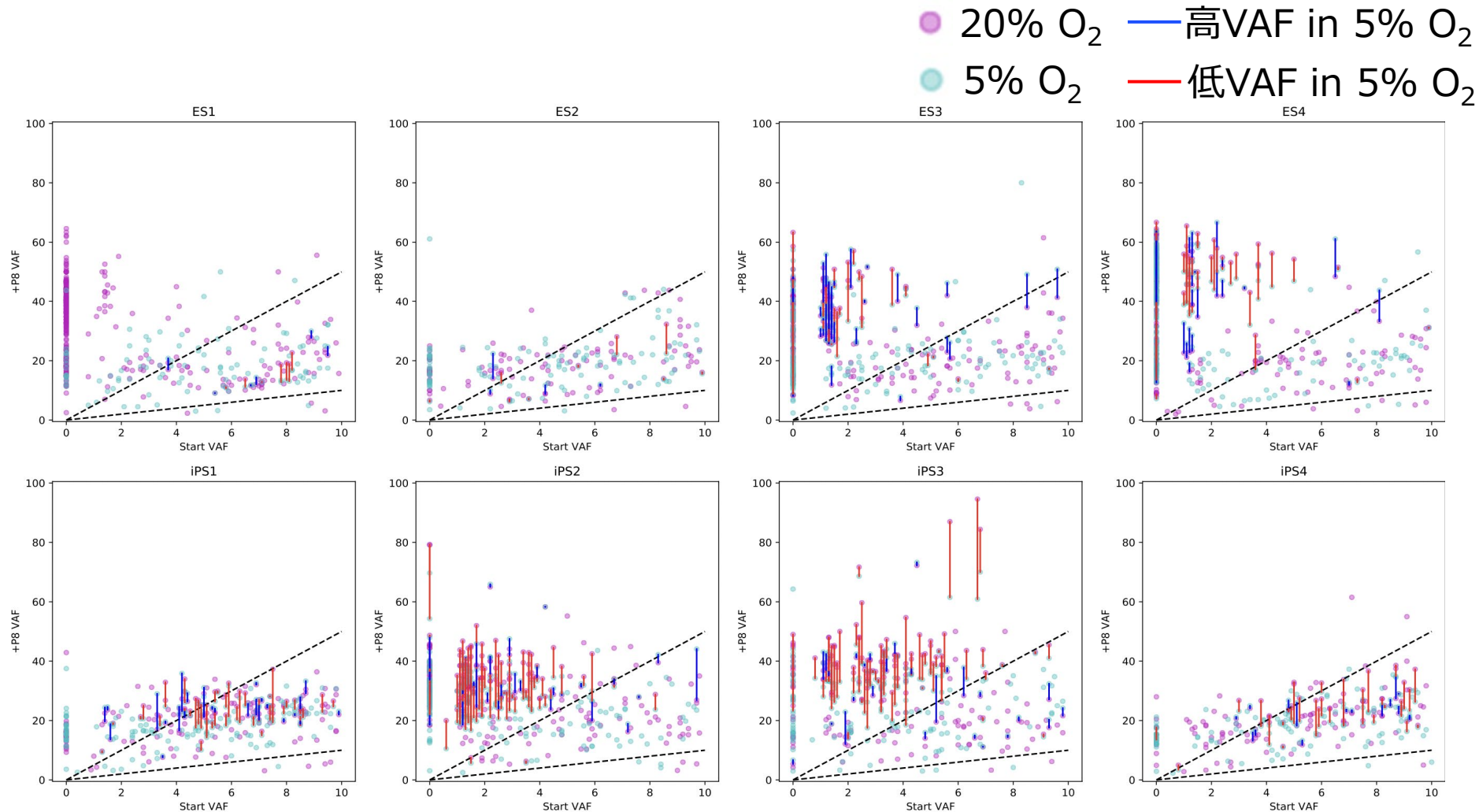
各染色体上のSNV/Indel数

SNV/Indel数



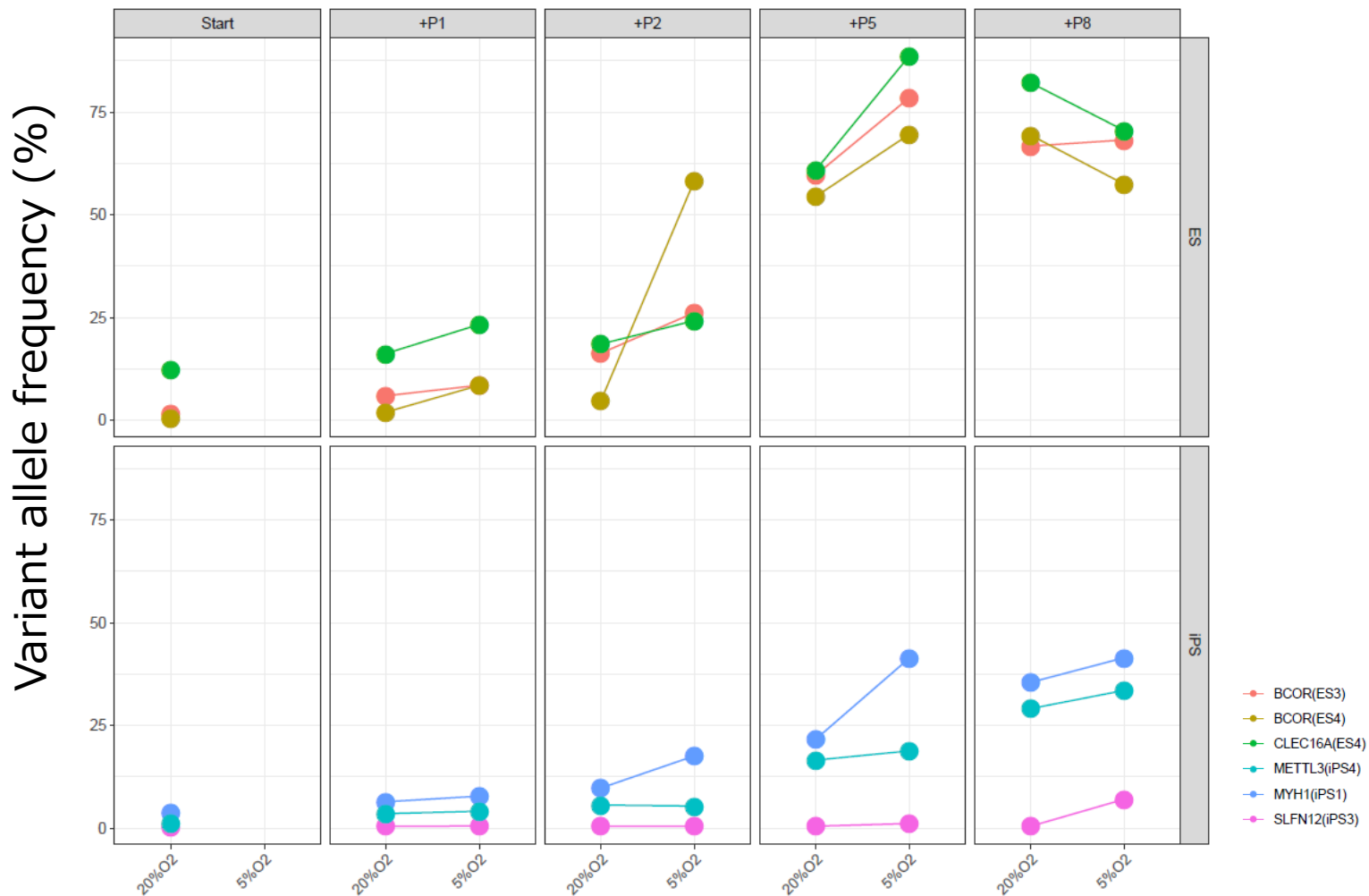
ES細胞の5%O2培養が一部の染色体でSNV/Indelが多い傾向があるが
どの染色体も有意な差はなかった。

変異アリルの比率(VAF)



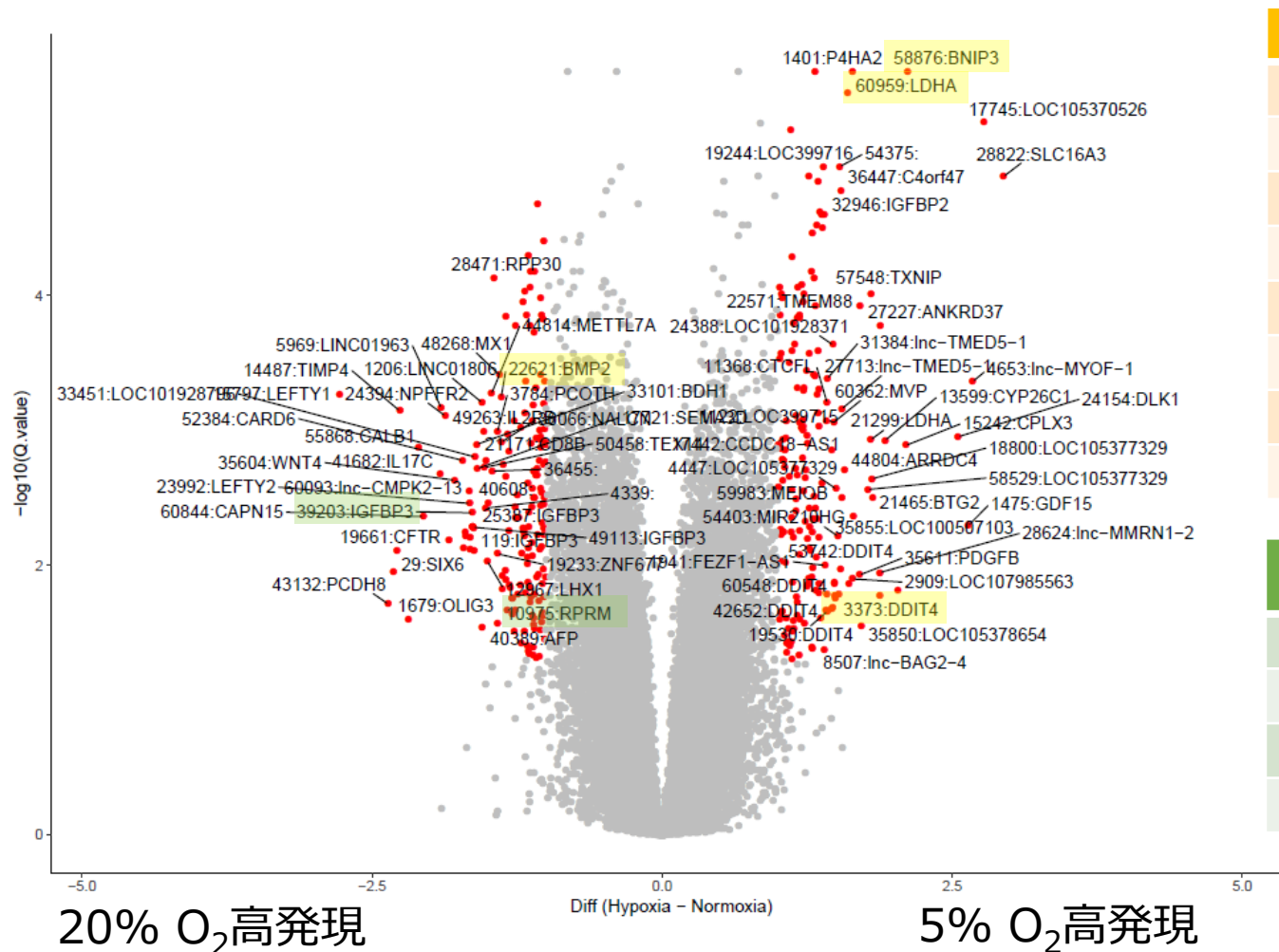
変異アリルの比率が5%O₂培養で高い傾向を示す株(ES3,ES4)もあれば
5%O₂培養で低い傾向を示す株(iPS2,iPS3)もあった

SNV/IndelのVAFの変動(AmpliconSeq)



変異を持った細胞が継代過程で徐々に増えていた

低酸素培養による遺伝子発現変化



5%O₂で培養した細胞(1継代目)では低酸素応答関連遺伝子やP53シグナルパスウェイに関連する遺伝子発現変化がみられた

- ・ 8継代の培養期間に低頻度にしか存在しなかったCNVやSNV/Indel変異を保有する細胞が、増殖優位になり主要な細胞集団を形成する事が確認された。
- ・ 低酸素(5%)下での培養は、増殖優位性の抑制にはあまり寄与しなかった。
- ・ 低酸素培養では低酸素関連遺伝子の発現変動に加え、p53関連遺伝子の発現も変化している事が示唆された。

培養工程において新規の変異が細胞に入る事と変異を持った細胞集団が変動し得る事は、それぞれにおいて対応策や改善方法が求められるが、これまでにあまり有効な方法は開発されていない。特に、多能性幹細胞培養における増殖優位性の獲得に関しては、その詳細なメカニズムもほぼ未解明である。適切な選択圧によってリスクのある変異を持った細胞集団の増殖を抑制する事ができないか引き続き検討したい。

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
末盛 博文

公益財団法人京都大学iPS細胞研究財団
細胞調製施設(FiT) 品質部

野村 真樹
赤星 智寛
金子 孝一
小川 晴菜

(敬称略)

多能性幹細胞培養における 増殖優位性の獲得抑制の試み

公益財団法人
京都大学iPS細胞研究財団
細胞調製施設(FiT) 研究開発部
加藤 智朗

筆頭演者は、過去1年間（1月～12月）において、
本演題の発表に関して開示すべきCOIはありません。