

網羅的単一細胞遺伝子発現解析を用いた iPS細胞樹立プロセスの検討

出口勝彰¹、加藤智朗⁴、坂野香穂⁴、櫻井康雄¹、古賀章浩²、
奈部谷章³、塚原正義⁴

1.キヤノンメディカルシステムズ株式会社 研究開発センター

2.キヤノンメディカルシステムズ株式会社 研究開発企画室

3.キヤノン株式会社 R & D本部

4.京都大学iPS細胞研究財団 研究開発部

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。

目次

- 序論
- 解決したい課題
- 課題解決のアプローチ
 - 実験フロー
- 結論・サマリ
 - 単核球培養有無によるCD34陽性細胞及びiPS細胞の比較
 - iPS細胞樹立後の継代有無でのiPS細胞形状
 - iPS細胞樹立後の継代有無iPS細胞の比較
 - Single cell RNA sequence 結果(1)
 - Single cell RNA sequence 結果(2)
- まとめ・今後の課題

序論

➤ 分化多能性をもつiPS細胞のさらなる応用に向けて

	コスト	免疫拒絶
現在	開放系作業による品質担保の環境維持	他家iPS細胞のため多種多様のHLA型が必要
将来(ゴール)	低コストの高品質	拒絶反応のない自家iPS細胞

➤ キヤノングループとしての再生医療への貢献

- 開放系から閉鎖系→コストダウン
- ロバスト(ドナー由来の影響を受けない)なプロセス→自家iPS細胞



上記を実現するためキヤノングループが保有している下記技術を活用

- ・画像解析技術
- ・製造プロセス設計技術
- ・最先端計測技術
- ・医療機器の開発・量産技術

解決したい課題

➤ 他家臨床用iPS細胞作製プロセスの課題

- 安定した品質とコストダウンの両立

	コスト	免疫拒絶
現在	開放系作業による品質担保の環境維持	他家iPS細胞のため多種多様のHLA型が必要
将来(ゴール)	低コストで高品質	拒絶反応のない自家iPS細胞

解決策

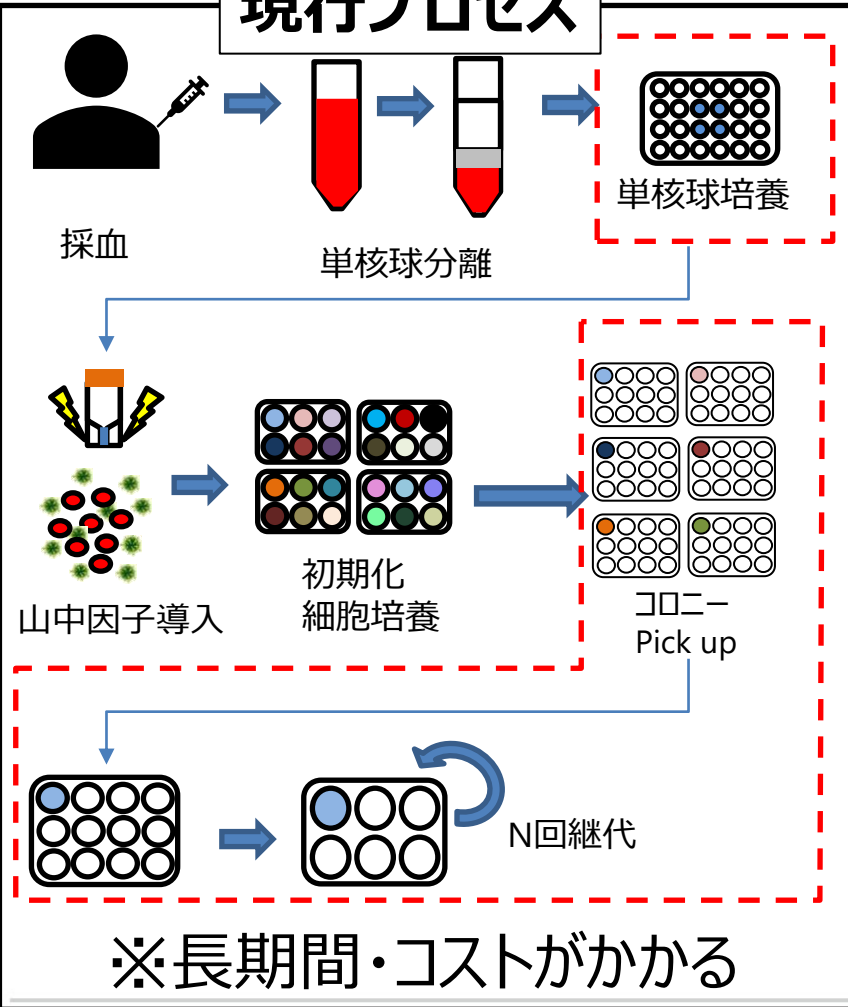
- ・閉鎖系による環境維持等コスト削減
- ・樹立の各工程によるばらつき低減
- ・ドナー遺伝的背景に影響を受けにくいプロセス

→今回、iPS細胞樹立プロセス中の複数の工程に着目し簡略化による影響をSingle cell RNA sequence解析を行った

課題解決アプローチ

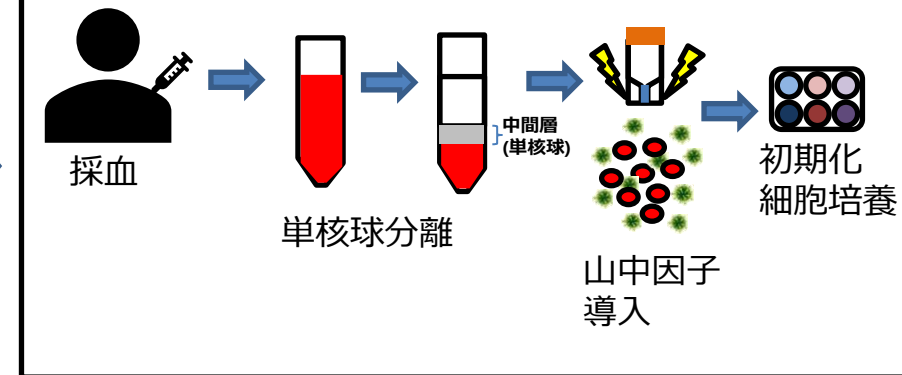
- 単核球培養と樹立後の継代の簡素化によるプロセスを検討

現行プロセス



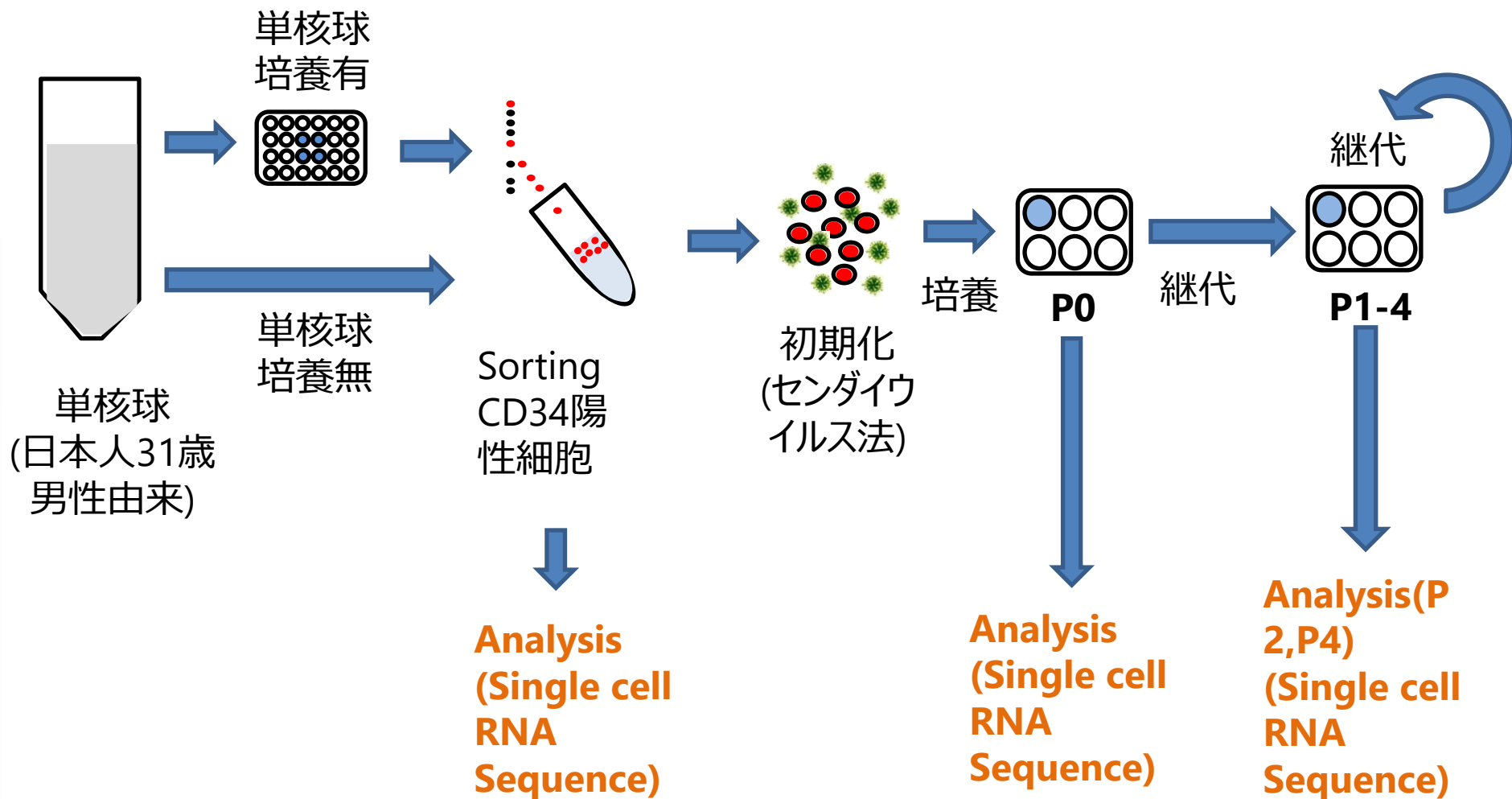
簡素化プロセス

※左図の赤線枠部削除



簡素化によるコスト低減、プロセス誤差削減による品質安定を狙う

実験フロー



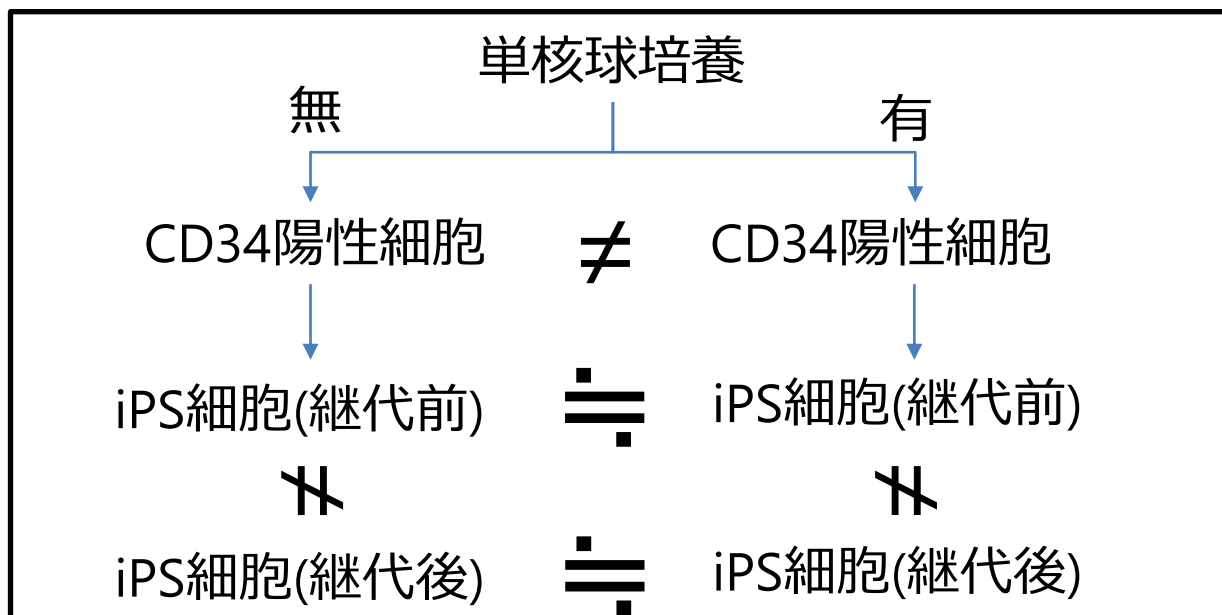
結論/サマリ

➤ 単核球培養の有無による影響

- 単核球培養の有無によりCD34陽性細胞の発現パターンは異なる
- 単核球培養有無それぞれのCD34陽性細胞から樹立されたiPS細胞の遺伝子発現パターンは相似している

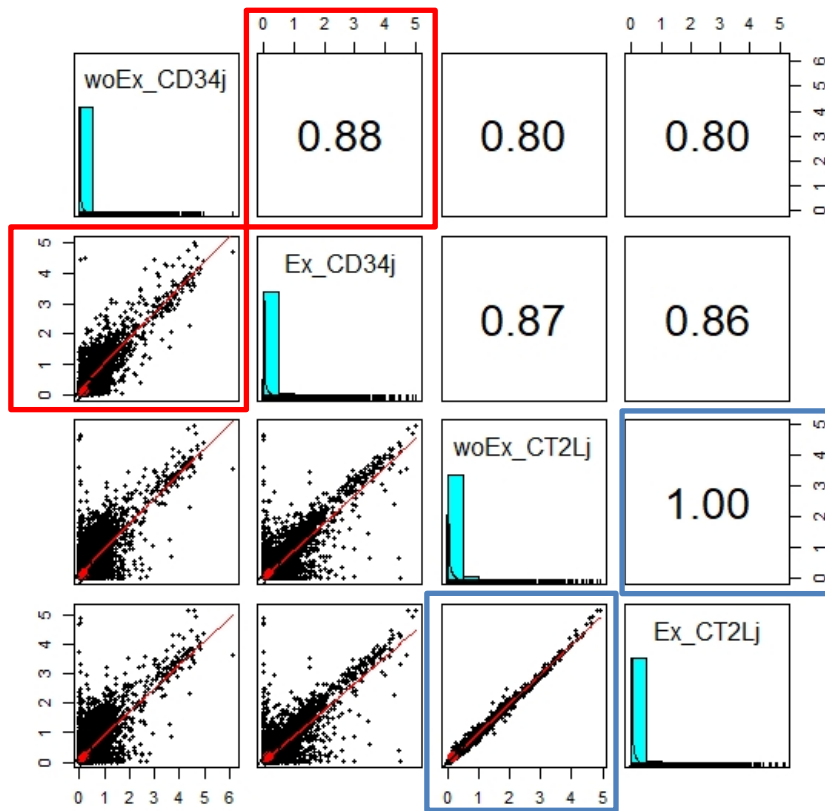
➤ 継代有無による影響

- 継代無と有では発現している遺伝子の種類が異なる傾向がある
- 継代数が2回目では一部の細胞が継代無しの細胞と同じ遺伝子発現をしている



単核球培養有無によるCD34陽性細胞及びiPS細胞の比較

- 単核球培養有無でCD34陽性細胞の遺伝子発現に差がある(赤枠)
- 上記細胞由来のiPS細胞の遺伝子発現に差はほとんどない(青枠)



左図

単核球培養有無CD34陽性細胞集団およびそれぞれの細胞由来iPS細胞の遺伝子発現散布図他

woEx_CD34j:単核球培養無のCD34陽性細胞

Ex_CD34j:単核球培養有のCD34陽性細胞

woEx_CT2Lj:単核球培養無のCD34陽性細胞由来iPS細胞

Ex_CT2Lj:単核球培養有のCD34陽性細胞由来iPS細胞

棒グラフ：サンプルの各遺伝子発現量

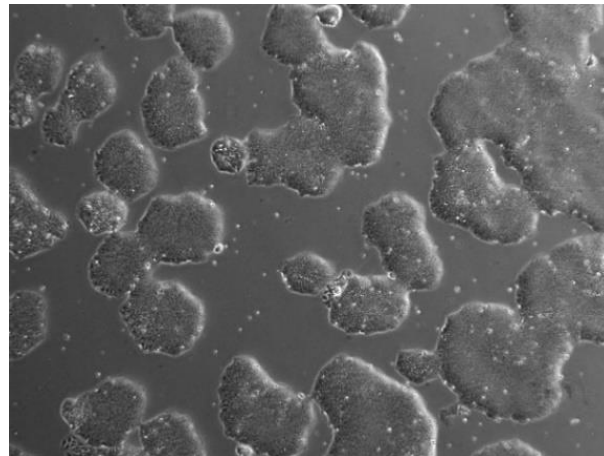
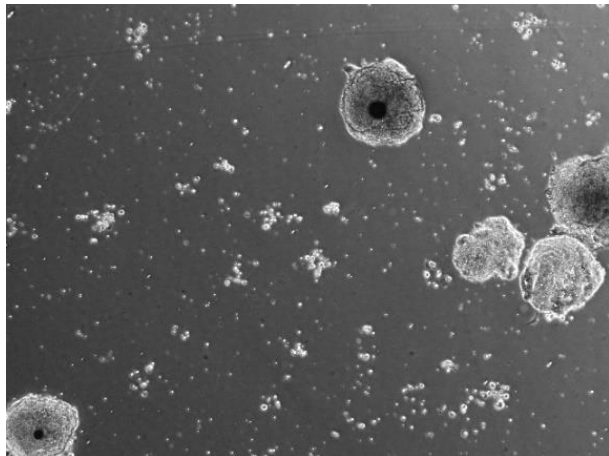
散布図：2サンプル間の比較(赤線は回帰直線)

数値：散布図の二乗値を示す

iPS細胞樹立後の継代有無でのiPS細胞形状

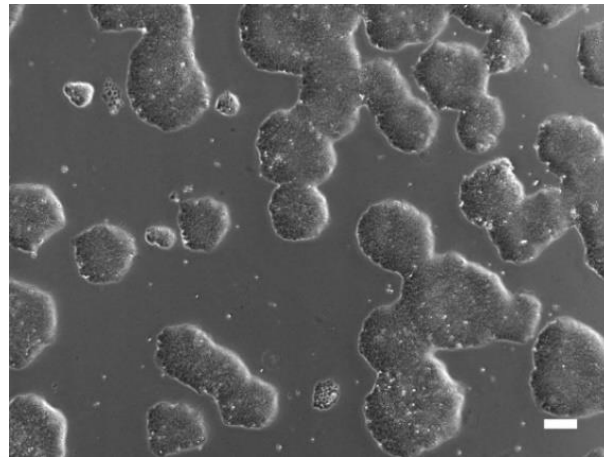
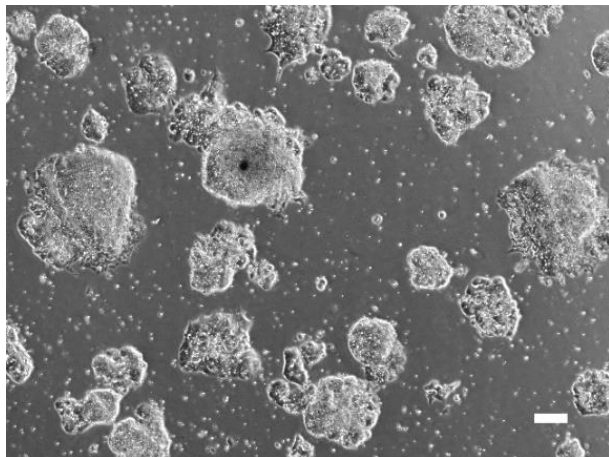
- 単核球培養の有無によるiPS細胞コロニー形状について大きな差は見られない
- 継代をすることで、コロニーがヒトiPS細胞特有の扁平状に変化する

単核球培養無
CD34+由来iPS細胞



左写真
→初期化15日目
右写真
→2継代後7日目

単核球培養有
CD34+由来iPS細胞

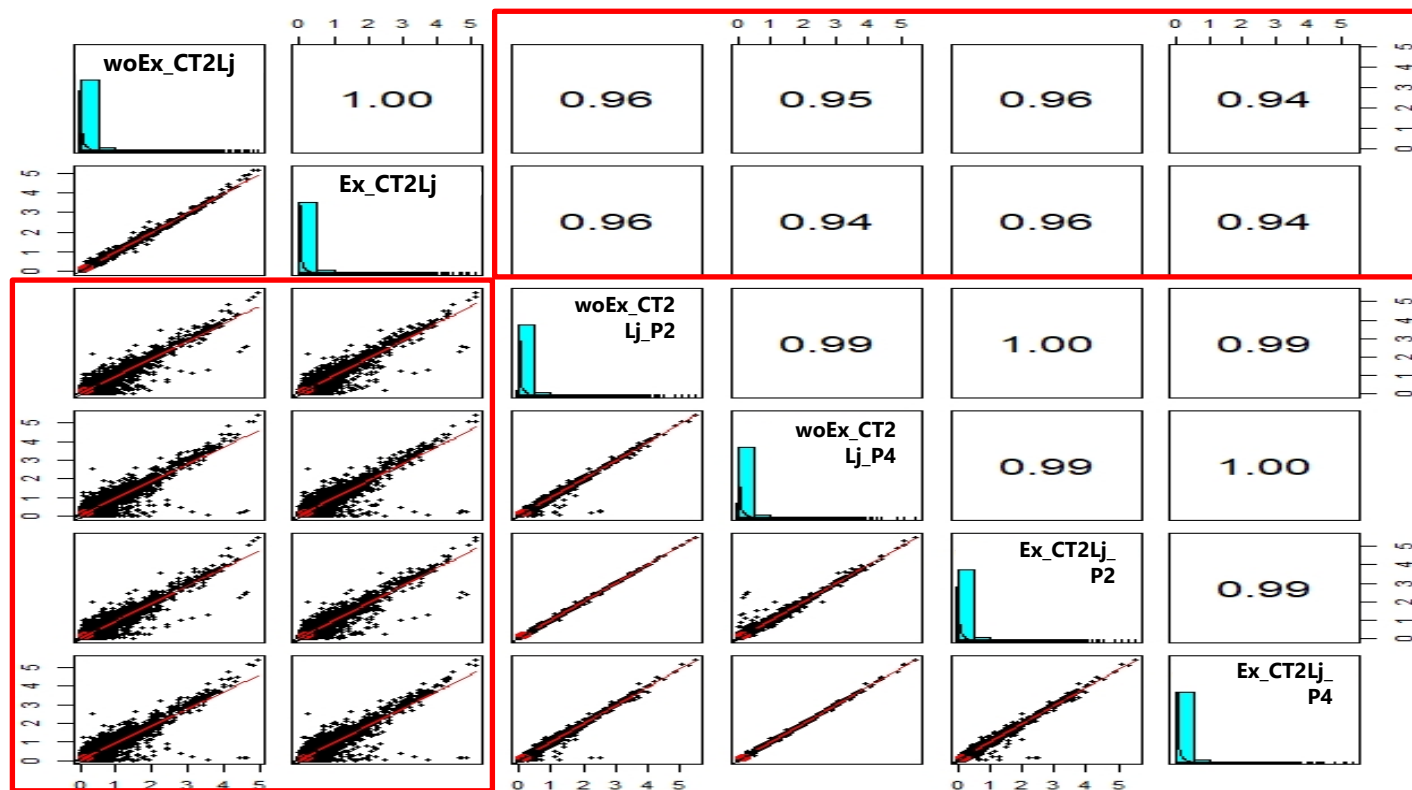


左写真
→初期化14日目
右写真
→2継代後7日目

※スケールバー:200um

iPS細胞樹立後の継代有無iPS細胞の比較

- 継代の有無でiPS細胞は異なった遺伝子発現をする(赤枠)



上図：単核球培養有無CD34陽性細胞集団およびそれぞれの細胞由来iPS細胞の遺伝子発現散布図他

woEx_CT2Lj:単核球培養無のCD34陽性細胞由来iPS細胞

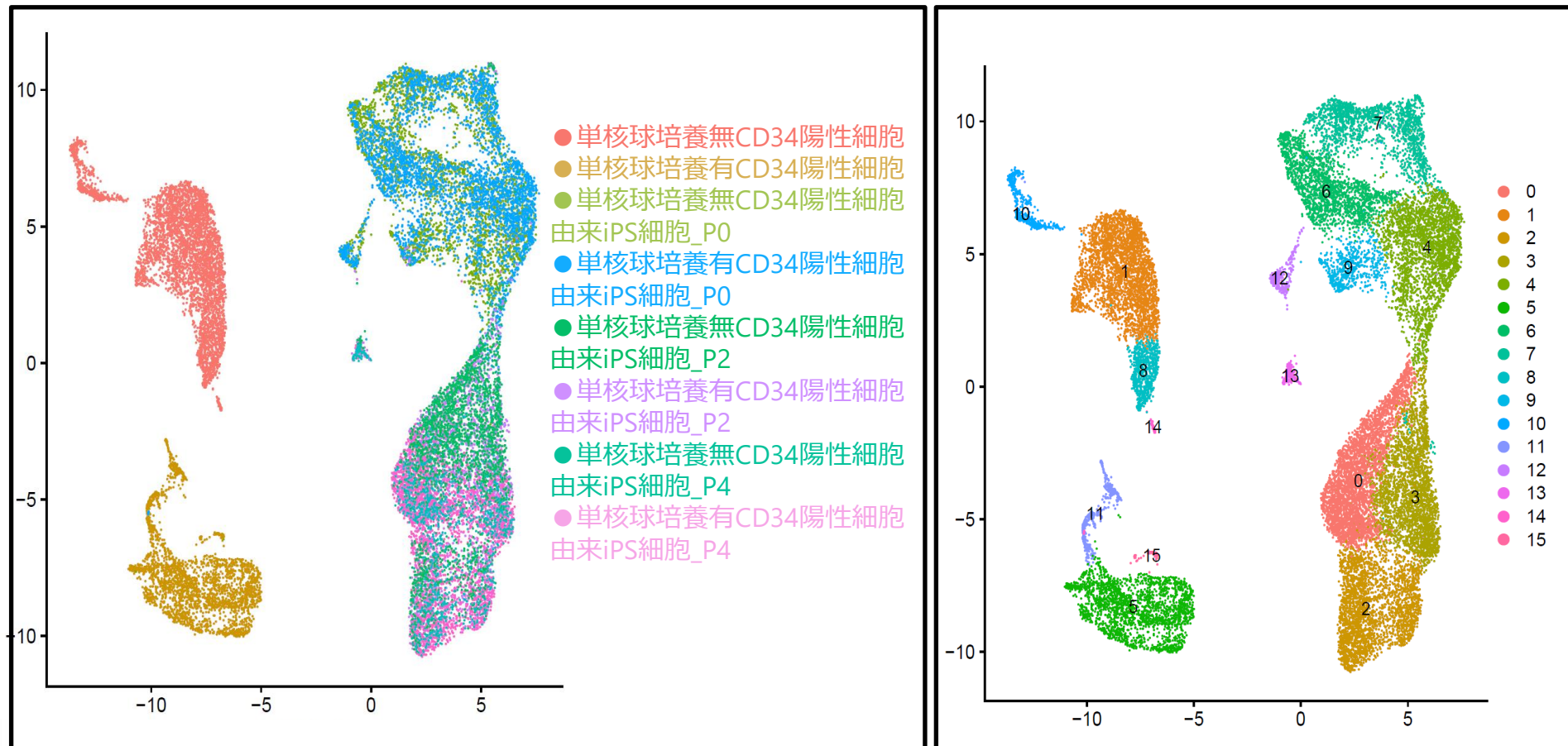
Ex_CT2Lj:単核球培養有のCD34陽性細胞由来iPS細胞

woEx_CT2Lj_P2,P4:継代回数2回および4回目の単核球培養無のCD34陽性細胞由来iPS細胞

Ex_CT2Lj_P2,P4:継代回数2回および4回目の単核球培養有のCD34陽性細胞由来iPS細胞

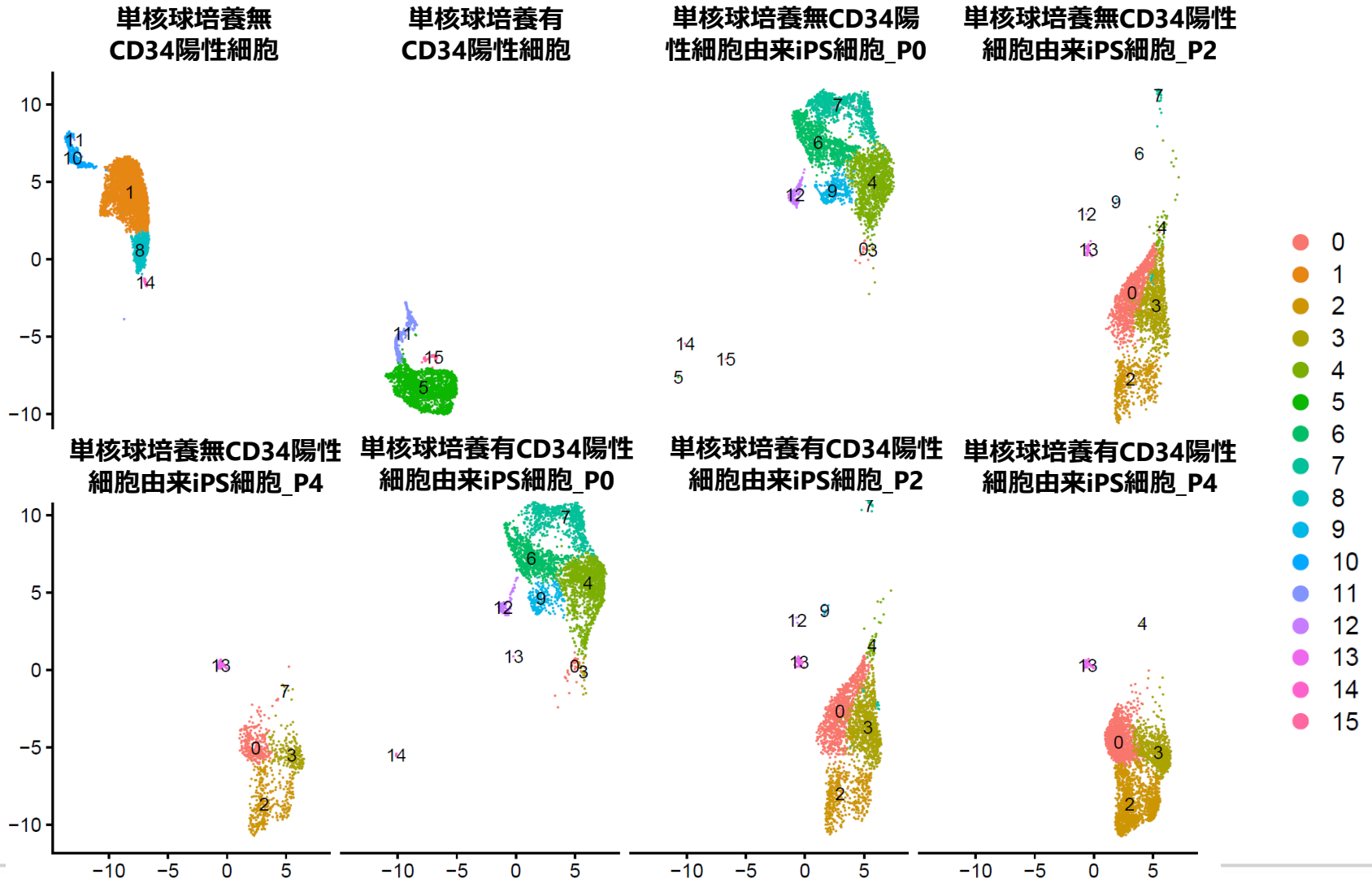
Single cell RNA sequence 結果(1/2)

- 継代の有無でiPS細胞では異なったクラスターを形成する(左図)
- 継代無・有のサンプル間でも遺伝子発現が異なるクラスターを形成する(右図)



Single cell RNA sequence 結果(2/2)

➤ 継代2回目細胞の一部が継代無し細胞のクラスターに存在する



まとめ・今後の課題

➤ 樹立プロセスの短縮の試み

- 材料となるCD34陽性細胞の単核球培養の有無について
単核球培養の有無で樹立したiPS細胞の遺伝子発現に大きな差はなかった
→ **プロセス簡素化によるコスト低減可能性示唆**

今後の課題

単核球培養無しによる樹立効率の差

= 個体間による血液中の樹立可能な細胞数の差(品質に影響する)

- 樹立したiPS細胞の継代について
樹立後の継代有無により発現している遺伝子の種類が異なっている
→ 継代作業の省略については、本結果から判断できず **更なる検討が必要**

今後の課題

初期化因子の残存影響、発現遺伝子の性質解析や分化能評価

**上記以外のプロセス(初期化因子導入など)の検討も加速させ、
低コスト・高品質な自家iPS細胞の実現を目指す**