

## iPS 細胞再生臓器品質評価に資する電子顕微鏡解析の現況と 将来展望に関する調査研究

(NPO)総合画像研究支援 正会員 澤口 朗

### I. 研究代表者

澤口 朗 (48 歳) 宮崎大学医学部解剖学講座 超微形態科学分野 教授

### II. 共同調査研究者

青山 一弘、臼倉 治郎、大隅 正子、安永 卓生、菌村 貴弘、寺田 純雄、光岡 薫、  
宮澤 淳夫、諸根 信弘、山科 正平

### III. 研究期間

平成 29 年 10 月 1 日より平成 30 年 9 月 30 日まで

### IV. 研究の目的

iPS 細胞 (=人工多能性幹細胞) は、2006 年に山中伸弥博士らによって開発された新たな細胞で、再生医療の実現や新規薬剤の開発に重要な役割を果たすことが期待され、2012 年にはノーベル生理学・医学賞が授与された。現在、科学技術・学術審議会から公表された『iPS 細胞研究ロードマップ』に基づいて臨床応用研究が加速度を増しているが、再生された臓器や組織、細胞等の安全性を保証する評価システムの確立が喫緊の課題である。その評価項目の上位に挙げられる「形態学的品質評価」では、電子顕微鏡の応用が不可欠とされる。当認定 NPO 法人は微細形態科学研究装置共同利用ネットワーク (CUMNET) の構築や、微細形態技術の普及・啓発を目的とした出版事業を展開するなど、電子顕微鏡解析技術に基づく研究者のネットワーク形成と技術の継承に注力してきた。しかし、iPS 細胞を応用した再生臓器の開発研究においては、標本作製に高度な技術を要する電子顕微鏡解析 (以下、電顕解析) に携わる人材不足が深刻さを増し、光学顕微鏡レベルの解析に留まるケースが少なくない。本調査研究は、iPS 細胞から再生された臓器や組織、細胞の品質評価に資する電顕解析の現況と将来展望に関する調査研究を実施し、iPS 細胞再生臓器の品質評価を通じた「安全」と「安心」を患者に届ける人材育成に必要な研究教育環境の策定に繋がる提言を主な目的として実施された。

### V. 調査研究計画

1) 再生医療研究を取り扱う専門学会や学術専門誌における電顕解析の応用状況に関する調査、2) iPS 細胞から再生された臓器や組織、細胞の微細形態を明らかにする電顕解析に関するアンケート調査、3) 専門学会／学術専門誌調査ならびにアンケート調査の結果を分析し、将来展望を描く調査研究会議の開催、4) 国内における iPS 細胞再生医療研究への電顕解析の実例訪問調査、5) 海外における iPS 細胞再生医療研究への電顕解析の動向調査、6) ワークショップならびにシンポジウムの開催を通じた情報の共有と参加者との意見交換、を主軸とする調査研究計画を策定した。

### VI. 調査研究の実施法

#### 1) 再生医療研究を専門とする学会／学術誌における電子顕微鏡解析の応用状況に関する調査

第 17 回日本再生医療学会 (2018 年 3 月 21 日～23 日・パシフィコ横浜)、第 5 回国際組織工学・再生医療学会 (2018 年 9 月 4 日～7 日・京都国際会館) に参加し、シンポジウム講演や一般演題 (=ポスター発表) における電顕解析の実施状況を調査した。また、「Cell Stem Cell」に

代表される再生医療研究の学術専門誌に掲載された直近 5 年間の論文を精査しながら、全論文における電顕解析を取り入れた論文の割合を算出し、分析を加えた。

## 2) 国内外における iPS 細胞再生医療研究への電子顕微鏡解析の応用状況に関する訪問調査

本調査研究申請者が京都大学 iPS 細胞研究所ならびに株式会社メガカリオン社との共同研究として、iPS 細胞由来血小板の電顕解析を担当し、本共同研究の成果として、iPS 細胞由来血小板の臨床試験が 2018 年 9 月 21 日に正式承認された国内で最も進んだことの実例として、現況と今後の課題、展望をとりまとめた。

また、2014 年における世界の再生医療臓器上市状況によると、皮膚と軟骨を中心に日本が 2 品目であったのに対し、アメリカ合衆国が 11 品目、欧州諸国では大きく上回る合計 17 品目が上市されている。この状況をもとに、欧米で開催された顕微鏡関連学会に参加し、再生医療研究や電顕解析の導入状況に関する動向を調査した。

## 3) ワークショップ/シンポジウムの開催

第 11 回 IIRS 可視化技術ワークショップ (2017 年 11 月 11 日: 東京大学 武田先端知ビル) において「iPS 細胞血小板製剤開発に貢献する電顕解析と急がれる次世代電顕形態学者育成」と題して講演し、また第 17 回アカデミックサロン (2018 年 6 月 9 日: 東京大学 武田先端知ビル) において、「iPS 細胞再生臓器品質評価に資する電顕解析の現況と将来展望」を開催し、再生医療研究における電顕解析の応用例や目的、解析手法等について情報を交換し、広く意見を求めた。

また、日本顕微鏡学会第 60 回記念シンポジウム (平成 29 年 12 月 1 日~2 日: 宮崎) においてシンポジウム「再生医療研究に資する顕微サイエンス」、第 74 回日本顕微鏡学会学術講演会 (平成 30 年 5 月 29 日~31 日: 久留米) において IIRS 冠ワークショップ「再生臓器の開発と臨床応用に資する電顕解析と将来展望」を開催し、再生医療研究における電顕解析に関する本調査研究の中間報告とあわせて、参加者を対象にしたアンケート調査を実施した。

## 4) アンケート調査

iPS 細胞から再生された臓器や組織、細胞の電顕解析に関する現況を共有しながら、その発展性と将来展望の描出することを目的にして、電子顕微鏡および光学顕微鏡を用いた形態研究を主とする研究者を対象にアンケート調査を実施した。

## 5) 調査研究会議の開催

共同調査研究者を集めた調査研究会議を開催し、調査研究の基本戦略と専門学会/学術専門誌の調査、アンケート調査の実施をはじめとする具体的な調査方法を計画し、調査結果に基づく分析と提言の策定を行った。

# VII. 研究結果

## 1) 専門学会ならびに学術専門誌調査

第 17 回日本再生医療学会の一般演題 (=ポスター発表: 全 323 演題) を対象に、電顕解析の実施状況を調査した結果、形態学的解析で使用されていた機器として「位相差顕微鏡」が 141 演題 (43.7%)、「共焦点レーザー顕微鏡」が 117 演題 (36.2%) であったのに対し、「走査型電子

顕微鏡」が13演題(4.0%)、「透過型電子顕微鏡」は7演題(2.2%)にとどまった。この要因として、アンケート調査でもあげられた「障壁」に加えて、『現状では再生臓器の開発段階が光学顕微鏡で足るレベルにあり、電子顕微鏡で高精細に観察するニーズが低い』ことがポスター発表の内容から推察された。その一方で、発表者にヒアリング調査した結果、『2~3年後には再生臓器の開発と臨床応用が進み、電子顕微鏡レベルの解析ニーズが高まる』との声が複数から寄せられた。

他方、第5回国際組織工学・再生医療学会の演題抄録1,500件余りを検索した結果、電子顕微鏡を用いた抄録が約12%見いだされた。この学会は「組織工学」として、再生された臓器を構成する組織や細胞の構築を主な研究対象としており、電子顕微鏡を用いた高精細な解析の必要性を反映した結果と考えられ、本調査研究の提言策定に資する収穫が得られた。

また、再生医療研究を主に扱う学術専門誌「Cell Stem Cell」(インパクトファクター: IF=23.2)に掲載された直近5巻分の原著(Original Article)全172編を対象に調査した結果、電子顕微鏡画像が掲載されていた論文は12編(7.0%)にとどまった。

## 2) iPS細胞再生医療研究への電子顕微鏡解析の動向調査結果

本調査研究申請者は京都大学iPS細胞研究所ならびに株式会社メガカリオン社との共同研究として、iPS細胞由来血小板の電顕解析を担当し、本共同研究の成果としてiPS細胞由来血小板の臨床治験が2018年9月21日に正式承認された。本研究開発においては、血小板を産生する前駆細胞に相当する巨核球の段階から透過型電子顕微鏡を用いた形態評価が実施され、iPS細胞から効率的に巨核球を分化誘導する手法や、臨床応用に向けて血小板を量産するプロトコル確立に寄与した。この開発の過程において、2016年度に日本医療研究開発機構(AMED)の事業として「電子顕微鏡デジタル可視化技術を駆使した血小板製剤品質評価手法の開発」に取り組み、その成果が血小板以外の再生臓器開発における品質評価に水平展開されることが期待されている。

海外に目を向けると、米国では再生医療に関係するベンチャー起業創設が年々、増加している。その一方で、「最新のゲノム編集技術を応用することで新たな治療法を確立できる疾患においては、研究開発に多額の経費を要するES細胞やiPS細胞を用いた再生医療研究は不要」と考える風潮もあり、iPS細胞開発を契機に再生医療の産業化に注力する本邦との違いが明らかとなった。

## 3) ワークショップ/シンポジウムを通じた情報・意見交換

IIRS可視化ワークショップやアカデミックサロン、日本顕微鏡学会学術講演会IIRS冠ワークショップを通じ、「電顕解析で高度な技術と経験が求められる試料作製や、撮影された生体組織の構造を正しく理解する読影方法の伝承が求められる」「電子顕微鏡が誇る優れた空間分解能に代わる研究機器はなく、その重要性を若手研究者に継承する責任があるが、指導にあたる研究者や施設が年々、減少している」など、再生臓器品質評価における電顕解析の応用に向けて、貴重な意見が寄せられた。

## 4) アンケート調査

第74回日本顕微鏡学会学術講演会IIRS冠ワークショップ「再生臓器の開発と臨床応用に資する電顕解析と将来展望」の参加者にアンケート「再生臓器の形態学的評価に資する電顕解析について」を配付し、35名から回答を得た。その結果、「再生臓器の電子顕微鏡を用いた形態学的評価

の必要性について」〈必要〉23名、〈可能ならば望ましい〉7名に対して、〈分からない〉が5名、〈不要〉は0名であった。また、「再生臓器の電子顕微鏡を用いた形態学的評価における『障壁』について」〈障壁がある〉23名、〈障壁はない〉9名との回答が得られ、具体的な障壁として「超薄切片の作製」や「電顕画像の読影」、「電顕本体の購入」が上位にあがった。

## 5) 調査研究者会議における検討結果

上記の「ワークショップ/シンポジウム」における意見交換や「アンケート調査」、「専門学会ならびに学術専門誌調査」などの結果をもとに、iPS細胞再生医療研究における電顕解析の現状を分析し、将来展望に繋がる考察と提言の策定作業を行った。

## VIII. 考察と提言

今回の多角的な調査研究によって、iPS細胞再生臓器品質評価に資する電顕解析の応用例は少ない現況がとり纏められた。この背景には、電顕解析で高度な技術と経験が必要とされる試料作製や画像の読影、高価な電子顕微鏡機器の整備といった「障壁」が存在すると同時に、再生臓器開発の進捗がこの「障壁」を乗り越えてまで組織や細胞の微細形態を高精細に評価する段階に到達していないなど、複合的な要因があると考えられた。

今後、科学技術・学術審議会から公表された『iPS細胞研究ロードマップ』に基づいた再生臓器開発と臨床応用が加速的に進むと、数年以内に組織や細胞の微細形態を高精細に評価する必要性が急激に高まると予想される。実際に再生臓器の基礎研究に続く組織工学などの応用研究では電顕解析の導入が進んでおり、電顕解析の「障壁」は喫緊の課題と言える。電子顕微鏡が誇る高度な空間分解能に勝る形態学的評価手法はなく、この課題の解決をはかる上で、電顕解析を専門とする研究者や研究機関、関連学会が各種技術の普及と人材育成に一層、注力する必要がある。また、電子顕微鏡本体や試料作製装置を開発・生産するメーカーと共同し、再生臓器品質評価に必要な性能に絞り込んだ低価格の専用機器や、簡便な試料作製装置の開発など、中長期的なビジョンを共有した産学連携体制の強化が求められる。とくに、再生臓器の品質評価は均一な工業製品の品質評価とは大きく異なり、再生臓器には「多様性」が存在する。生命科学においては、この多様性があらゆる生命体の「個体」から「細胞」に至る全てに備わる前提であり、ときに進化にも寄与する。この多様性を内包する再生臓器の品質評価には、Ai（＝人工知能）技術の応用が期待されており、なお一層、産学連携体制を強化して開発に臨む必要がある。

当認定 NPO 法人総合画像研究支援では、試料作製方法を解説したラボマニュアル「超薄切片法の実際」「免疫電顕法の実際」や、「3D で探る生命の形と機能」を出版し、セミナーやワークショップを通じて、電顕解析の普及・啓発に努めてきた。さらに、新技術振興渡辺記念会の調査研究結果をもとに、国内 17 研究拠点を結んだ「微細形態科学研究装置共同利用ネットワーク (CUMNET)」を展開し、全国の医学・生物学関連の研究者が容易にアクセスできる研究環境を提供している。本調査研究の結果を受け、電顕解析が iPS 細胞の品質評価を通じた「安全」と「安心」を患者に届ける責任を実感しつつ、再生臓器の品質評価に欠かせない手法として、数年後に電顕解析のニーズが高まることを「想定内」に入れた備えを喫緊に、具体的かつ計画的に講じる必要がある。