

2008/1007A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：生物資源・創薬モデル動物研究

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・
医療応用に関する基盤技術開発研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川端健二

平成21(2009)年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：生物資源・創薬モデル動物研究

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・
医療応用に関する基盤技術開発研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川端健二

平成21（2009）年4月

目 次

I. 総括研究報告		
ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・医療応用に関する基盤技術開発研究	-----	1
川端健二		
II. 分担研究報告		
ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理に関する研究	-----	16
水澤 博		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷		

総括研究報告書

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・医療応用に関する基盤技術開発研究

主任研究者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所

基盤的研究部 遺伝子導入制御プロジェクト 主任研究員

ヒト ES 細胞および間葉系幹細胞は無限に増殖し、機能細胞へ分化するという特徴を有しており、これら細胞を再生医療へ応用できれば、がん、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞等の致命的疾患に対する極めて有効な治療法になる。しかしながら、ヒト胚由来の ES 細胞を用いることによる倫理的な問題も存在し、本邦ではヒト ES 細胞を用いた研究はわずかとなっており、研究基盤技術として普及しているとはいえない。また、幹細胞の分化制御機構の解明や幹細胞を用いた動物モデルにおける医療への応用実験などは活発に試みられているが、ヒトに応用するうえで必須となってくる幹細胞の品質管理に関する情報は極めて乏しく、国際的な安全性基準が明確に定められていないのが現状である。

そこで本研究では、長期安定的なヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の機能維持、品質管理、ならびにその評価法の開発を目的として、①ヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の培養環境・培養技術の改良による長期安定培養法の開発、②ヒト ES 細胞凍結保存法の改良(容器・溶液・凍結方法など)、③遺伝子発現解析およびマーカーたんぱく質解析によるヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の未分化状態・機能維持の検討、④ヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の核型解析および染色体プロファイル解析による品質評価法開発を行う。また、⑤ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を再生医療へ応用するうえで必須の技術となる高効率な遺伝子導入法の確立を行い、更に機能遺伝子を導入することで、品質管理された幹細胞の未分化維持法や目的細胞への分化誘導法の確立を目指す。本年度は、ヒト ES 細胞の品質管理における基礎的知見を得ることを目的として、ヒト間葉系幹細胞およびマウス ES 細胞を用い、以下の結果を得た。

- (1) 長期培養によって 13 番染色体の 1 本の欠失が再現される細胞に着目し、そのゲノム詳細解析を実施した結果、欠失する 1 本の 13 番染色体はランダムではなく特定アレルの欠失が起こることが詳細解析にて明らかとなった。ヒト ES 細胞、iPS 細胞についても詳細解析を実施中でありデータを蓄積しているところである。
- (2) 改良型アデノウイルスベクターを用いることによりヒト ES 細胞に効率良く遺伝子導入が可能であった。これはヒト ES 細胞がアデノウイルス受容体 CAR を高発現しているためと考えられた。しかしながら、ES 細胞と類似していると考えられている iPS 細胞に対しては辺縁部しか遺伝子導入細胞がみとめられず、iPS 細胞への遺伝子導入にはさらなる改良が必要であると考えられた。

本研究から、ヒト ES 細胞の品質管理においても重要な基礎知見が得られ、再生医療に用いる細胞の品質管理の必要性を確認した。

分担研究者

水澤 博 (独) 医薬基盤研究所
部長

協力研究者

水口裕之 (独) 医薬基盤研究所
プロジェクトリーダー

櫻井文教 (独) 医薬基盤研究所
研究員

古江美保 (独) 医薬基盤研究所
研究員

小原有弘 (独) 医薬基盤研究所
研究員

古川智久 (独) 医薬基盤研究所
リサーチレジデント

田代克久 大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞などの幹細胞を用いた再生医療や移植医療、特に他家移植の実現に向けた基礎研究が欧米で盛んに行われており、難治性疾患の治療法開発が進んでいる。一方、日本国内においてはこれら幹細胞を用いた研究はあまり進んでおらず、研究基盤技術として普及していない。しかしながら、ヒト由来の細胞で無限に増殖し、様々な機能細胞への分化能を有するヒト ES 細胞や間葉系幹細胞への期待は大きく、今後、再生医療や移植医療の実現を目指し、様々な基

礎研究が行われることが予想される。

その一方で、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を再生医療へ応用するには、①種々の培養条件による安定性評価、②未分化維持因子の同定ならびに長期培養培地の改良、③高い細胞生存率を維持する細胞凍結保存法の開発、④高効率な遺伝子導入技術の開発、⑤遺伝子導入による細胞分化制御法の開発、などに関する基礎的検討課題が残されているのが現状である。

そこで、これら幹細胞を用いた生命科学研究の積極的推進支援を目指し、より多くの研究者が高度に品質管理された研究資源を使用し、信頼性の高い研究を行う必要があると考え、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞の機能維持、品質管理、ならびにその評価法の開発を目的として、幹細胞研究の基盤整備を目指した研究を行う。これによって得られる成果は、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を樹立時の機能を保持したまま維持・管理できる技術の開発につながり、また、幹細胞の品質や再生医療に向けた安全性評価にも役立つと考えられ、厚生労働行政に果たす役割は非常に大きいものと考えられる。

また、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞を医療応用する上で問題となる免疫拒絶、移植細胞の予期しない増殖、分化制御等の問題を解決するためには遺伝子改変技術を確立することが必須であると考えられ、高効率な外来遺伝子導入法の確立を目指す。これにより、ヒト ES 細胞や間葉系幹細胞の分化が自由に制御可能となり、幹細胞を用いた再生医療における有効性や安全性の向上が見込まれる。

B. 研究方法

B.1 幹細胞染色体の詳細解析

(1) 細胞培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、UE6E7T-3 (JCRB1136) は当 JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) で保存された細胞を使用した。UE6E7T-3 は hTERT と HPV16E6E7 遺伝子により不死化したものであり、Poweredby 10 培地 (Med-Shirotori Co. Japan) で培養した。培養開始の細胞密度は 2000 cells/cm² で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。PDLs の計算は次の式に従った: $PDLs = \log(\text{cell output}/\text{cell input})/\log 2$ 。

(2) 染色体解析

細胞は直径 100mm のプラスチックディッシュで培養し、継代後約 2 日目にコルセמידを加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、トリプシンで剥離し、ディッシュから回収した。次に 0.075M・KC1 低張処理後、カルノア液で固定した。染色体数の測定には metaphase spread chromosome を DAPI 染色し、Axioplan II imaging microscope (Carl Zeiss, GmbH) で観察し、プログラムソフト LeicaQFISH を用いて画像の取得と解析をした。pFISH 解析には 13 番染色体、17 番染色体に特異的なプローブ (XCP13 - kit - FITC、XCP17 - kit - Texas Red) (MetaSystems, GmbH) を、mFISH の解析にはマルチカラープローブ (24Xyte-MetaSystems' 24color kit) を用いた。方法は MetaSystems 社のプロトコールに従った。FISH 像は Zeiss Axio imaging microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH) で観察し、プログラムソフト mBAND/mFISH (MetaSystems, GmbH) で解析した。

(3) CGH アレイ解析 (アジレント社)

サンプル DNA は約 5 x 10⁶ の細胞から AllPrep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。2 種類の DNA 試料は、それぞれ Alexa FluorR 3 または Alexa FluorR 5 (BioPrime® Total Genomic Labeling System, Invitrogen Co., Japan) で標識した。標識した DNA と Cot-1 DNA をハイブリダイゼーション溶液 (10 x Blocking Agent, 2 x Hybridization Buffer) に溶かした。95 °C 3 分処理で DNA を変性したのち、37 °C 30 分インキュベーションした。CGH マイクロアレイスライド (Human Genome CGH 244A Oligo Microarray kit, Agilent Co., Japan) にアプライし、65 °C 40 時間ハイブリダイゼーションした。Agilent Oligo aCGH 洗浄バッファ 1 で室温、5 分間、Agilent Oligo aCGH 洗浄バッファ 2 で 37 °C、1 分間洗浄したのち各スポットの蛍光量を DNA Microarray Scanner (Agilent Co., Japan) で測定し、Agilent Feature Extraction (Agilent Co., Japan) を用いてデータを解析した。

(4) SNP アレイ解析 (アフィメトリックス社)

サンプル DNA は約 5 x 10⁶ の細胞から AllPrep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。解析には GeneChip® Human Mapping 500K Array Set のうち、Human Mapping 250k Nsp Array を用いた。抽出した Genomic DNA を制限酵素 (NspI) で切断し、4 塩基の特異的突出末端に対応するアダプターをライゲーションした。アダプター配列に対応する 1 種類のプライマーを用いて、アダプター付加 DNA フラグ

メントを PCR 増幅した。200~1100bp サイズのフラグメントを優先的に増幅するように PCR を行い、増幅産物を断片化し、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase にて末端 Biotin 標識した。標識した DNA は GeneChip Mapping 500K Set アレイにハイブリダイゼーション後 (Hybridization Oven 使用), 専用装置 Fluidics Station (GeneChip Fluidics Station 450) を用いて洗浄および streptavidin-phycoerythrin の染色を行い、レーザースキャナー (GeneChip Scanner 3000) でデータ収集を行った。

(5) 分化能の測定

脂肪細胞への分化能を測定するため、カバースリップの上に培養した各細胞を誘導培地 (hMSC Differentiation BulletKit - Adipogenic; PT-3004, Camblex BioScience Walterville, Inc. USA)、神経細胞への誘導には NPMM Bullet kit (NPMMTM BulletKit (B3209, Camblex BioScience Walterville, Inc. USA) を用いた。骨芽脂肪への分化誘導には 0.1 μ M dexamethasone (Sigma Chemical Co., USA), 50 μ g/ml L-ascorbic acid (Sigma Chemical Co., USA) と 10 mM β -glycerophosphate (Sigma Chemical Co., USA) を Plusoid-M 培地 (Med-Shirotori Co., Tokyo, Japan) 培地または Poweredby10 培地 (Med-Shirotori Co., Tokyo, Japan) に入れ、2-4 週間培養した。phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後、4% paraformaldehyde で固定した。

脂肪細胞は Oil Red-O (Sigma Chemical Co., USA) 染色し、骨芽細胞には 0.25 mg/ml naphthol AS-BI phosphate および 0.25 mg/ml Fast violet LB salt で alkaline phosphatase

染色した。神経細胞の観察には、パラフォルムアルデヒドとメタノール固定したのち、anti-III β tubulin 抗体 (Sigma Chemical Co. USA) または anti-neurofilament antibody NF-200 (Sigma Chemical Co., USA) と Texas Red-anti-mouse IgG 抗体 (Southern Biotechnology Associates, Inc., USA) で免疫染色した。

B.2 Ad ベクターを用いた ヒト ES/iPS 細胞への高効率遺伝子導入

(1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHCMV5 およびそのプロモーターを CA (cytomegalovirus enhancer/b-actin promoter)、EF-1 α (elongation factor-1 α) および RSV プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 および pHMRSV5 を作製した。それぞれのマルチクローニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子または単量体赤色蛍光タンパク質発現遺伝子 mCherry を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHCMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ および mCherry 発現シャトルプラスミド pHMEF5-mCherry を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより LacZ 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVlacZ1、pAdHM4-CALacZ1、pAdHM4-EFLacZ1 および mCherry 発現ベクタープラスミド pAdHM4-EFmCherry を得た。作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、Superfect (キアゲン社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ および mCherry 発現 Ad ベクター Ad-EF-mCherry を得た。定法により Ad ベクタ

一の増殖、精製を行った。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定した。

(2) ヒト ES 細胞、iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 Kh-ES1 (京都大学、中辻憲夫教授から供与) は、5 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF) を含むヒト ES 細胞用培地 (DMEM/F-12, 20% GIBCO Knockout Serum Replacement, 1% non-essential amino acid solution, 1mM L-glutamine, 0.1mM β -mercaptoethanol) にて、マイトマイシンC 処理済みの ICR 系統のマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) 上で培養した。4-5 日ごとにコラゲナーゼとスクレイパーを用いてヒト ES 細胞コロニーを回収後、20-30 cells/コロニーとなるように (単細胞にしないように) 懸濁して継代を行った。

ヒト iPS 細胞株 201B7 および 253G1 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は 4 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF) を含む霊長類 ES 細胞用培地 (ReproCell) にて、マイトマイシンC 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞 (MEF, Chemicon) 上で培養した。ヒト iPS 細胞の 201B7 株は Myc を含む 4 因子 (Oct-3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc) を、253G1 株は Myc を含まない 3 因子 (Oct-3/4, Sox2, Klf-4) を、それぞれヒト皮膚繊維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts, HDF) へ遺伝子導入することにより樹立された。5-7 日ごとにコラゲナーゼとスクレイパーまたは、霊長類 ES 細胞用細胞剥離液 (CTK) を用いてヒト iPS 細胞コロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。ヒト iPS 細胞を単細胞で継代する時は、継代の前に 10 μ M の ROCK 阻害剤 (Y-27632, Wako) を含む培地中で 1 時間培養し、CTK を用いてヒト iPS 細胞コロニーを回収した後ピペッティングに

よりヒト iPS 細胞を単細胞にした。その後 MEF に播種し、10 μ M の ROCK 阻害剤を含む培地にて 12 時間培養した。その後は ROCK 阻害剤を含まない培地で培地交換を行った。

(3) LacZ アッセイ

MEF を播種しておいた 12 well プレートにヒト ES 細胞または iPS 細胞を播種した。その 2 日後に LacZ を発現する種々の Ad ベクター (Ad-null, Ad-RSV-LacZ, Ad-CMV-LacZ, Ad-CA-LacZ, Ad-EF-LacZ) を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させ、24 時間経過後、X-gal 染色を行った。

(4) 免疫染色

2 well チャンバーズライドに播種したヒト iPS 細胞を PBS にて 2 回洗浄し、4% PFA/PBS を加えて室温で 15 分固定した後、2% BSA/PBS でブロッキングを行った。Oct-3/4、Nanog を検出する時はブロッキングの後に 0.2% Triton X-100/PBS にて細胞透過処理を行った。一次抗体として mouse anti-Oct-3/4 antibody (Santa Cruz Biotechnology)、mouse anti-human CAR monoclonal antibody (Upstate Biotechnology) を 4°C で一晩反応させ、続いて fluorescein isothiocyanate (FITC) または Alexa Fluor594 で標識した 2 次抗体 (それぞれ BD Bioscience, Molecular Probe) を室温で 1 時間反応させた。その後、ProlongGold with DAPI を用いて核染色および封入を行い、蛍光顕微鏡 (BIOREVO、キーエンス) にて観察した。なお、Ad ベクターにて遺伝子導入したヒト iPS 細胞の免疫染色は、ヒト iPS 細胞へ Ad-EF-mCherry を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させて 48 時間後に上述の手順で行った。

C. 研究結果

C.1 幹細胞染色体の詳細解析

(1) アレイ CGH の感度・再現性確認

研究に用いるアレイ CGH (Human Genome CGH 244A) の感度・再現性を確認するために正常細胞から抽出した DNA とがん細胞から抽出した DNA を用いて解析を実施した。感度として、正常 DNA に対してがん DNA を混合して解析することにより、3 割程度の混合において十分に 2 つのサンプルにおけるゲノムの増減を区別できる感度を有していること、ならびに、10kb 程度の欠失をシグナルとして検出できることが明らかとなった。さらにこれらの結果に関して再現性を確認したが、その感度に変化は見られなかった。

(2) 不死化間葉系幹細胞における染色体解析・ゲノム性合解析

長期培養を行った不死化間葉系幹細胞 UE6E7T-3 においては染色体数の変化がみられた。PDL 62 の UE6E7T-3 は 90 % の細胞が 46 本の染色体をもっていたが、PDL 147 では染色体欠失により 44 本になった細胞が 43% 観察された。

次に、染色体の不安定性を調べるために、アレイ CGH 法による解析を行ったところ 13 番染色体 1 本と 16 番染色体の長腕部の欠失が確認された。この 13 番染色体 1 本の欠失に着目し、間期の細胞における 13 番染色体ならびに中心体の蛍光染色を行った。間期においても培養初期の細胞には 13 番染色体 2 本が観察され、長期培養後の細胞においては 13 番染色体が 1 本しか認められなかった。また、中心体の蛍光染色により欠失が起こる細胞において中心体の数の増加が認められること、ならびにそれに伴う 13 番染色体の不

均等分割が起こることを明らかにした。欠失する 13 番染色体がランダムであるのか特定アレルであるのかを明らかにするため、SNP チップによる解析を実施した。13 番染色体および 16 番染色体に長腕部における SNP タイピングの出現は欠失がランダムに起こる場合には AA : AB : BB = 1 : 2 : 1 の割合でタイピングされるはずであるが長期培養後の細胞には AB とタイピングされる SNP は殆ど存在しなかった。このことから欠失は特定アレルに起こることが明らかとなった。

(3) 細胞の分化能評価

間葉系幹細胞は骨芽細胞、軟骨細胞や脂肪細胞に分化することができるし、ときには神経様細胞に分化したりすることが可能であり、すなわち多分化能を持っていると報告されている。今回用いた間葉系幹細胞を適切な誘導培地で 2 ~ 4 週間培養した。特に、UE6E7T-3 細胞は他の細胞よりも脂肪細胞へ分化する能力が強いことが明らかとなった。このことは染色体の変化が起こっても変化しないことを明らかとした。

(4) ヒト ES・iPS 細胞のゲノム詳細解析

京都大学より 2008 年 8 月にヒト ES 細胞 3 株の分配を受け、9 月より細胞の長期培養を開始した。長期培養に伴うゲノム変化の解析を実施しており、今後培養条件、細胞の継代方法、凍結方法など細胞培養に関わる基礎項目に関して条件設定を行い、その際の表現型とゲノム詳細解析結果との関係を解析する予定である。また、ヒト iPS 細胞に関しても 2008 年 10 月に入手し培養を開始しており、ゲノム詳細解析を実施中である。プレリミナリーな結果としてヒト iPS 細胞に染色体変化

が起こっていること確認された。今後ヒト ES 細胞と同様に表現型とゲノム詳細解析結果との関係解析を行う予定である。

C.2 Ad ベクターを用いた ヒト ES/iPS 細胞への高効率遺伝子導入

ヒト ES /iPS 細胞への遺伝子導入に最適な Ad ベクターを探索するため、まずプロモーターの異なる LacZ 発現 Ad ベクター (Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-RSV-LacZ) をヒト ES 細胞 (Kh-ES1) へ作用させて検討を行った。その結果、CA または EF プロモーターを有する Ad ベクターが、ヒト ES 細胞 (Kh-ES1) へ最も効率良く遺伝子導入可能であることが明らかとなった (Fig. 1)。

次に、Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞への遺伝子導入法を確立するため、ヒト ES 細胞を用いた時と同様に、ヒト iPS 細胞にプロモーターの異なる LacZ 発現従来型 Ad ベクターを作用させて遺伝子導入効率を検討した。ヒト iPS 細胞は、Myc を含む 4 因子の遺伝子導入により樹立された 201B7 株と、Myc を含まない 3 因子の遺伝子導入により樹立された 253G1 株を用いて検討した。その結果、いずれの従来型 Ad ベクターを使用してもヒト iPS 細胞コロニーの辺縁部においては LacZ 発現が認められるものの、コロニーの中心部ではほとんど発現が認められなかった (Fig. 2)。ヒト iPS 細胞 (201B7) が Ad 受容体 CAR を発現しているかどうかを検討したところ、ヒト iPS 細胞 (201B7) は CAR を発現していることが示された (Fig. 3)。よってヒト iPS 細胞は CAR を発現しているにも関わらず、Ad ベクターを用いてコロニーの中心部へ効率良く遺伝子導入ができなかった。

ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様、単細胞にして継代すると生存率が著しく低下するため、コロニーで継代する必要がある。しかしながらコロニーを形成しているヒト iPS 細胞においては Ad ベクターが細胞内に侵入できていない可能性が考えられたため、ヒト iPS 細胞を単細胞にまで解離して Ad ベクターを作用させることを考えた。ヒト ES・iPS 細胞を単細胞にまで解離して継代すると生存率は著しく低下するが、ROCK 阻害剤がヒト ES 細胞継代時における細胞死を抑制することが報告され、さらに、ROCK 阻害剤はヒト iPS 細胞継代においても細胞死を抑制できることが示されている。そこで ROCK 阻害剤により単細胞にまで解離したヒト iPS 細胞 (201B7) に Ad-EF-mCherry を作用させ、その 48 時間後の Oct-3/4 の発現と共に解析した。その結果、mCherry の発現は 70-80% のヒト iPS 細胞コロニーにおいて観察され、さらに、これらの細胞は Oct-3/4 を発現していることが明らかとなった。したがって、EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクターは Oct-3/4 を発現しているヒト iPS 細胞の未分化な部分へ遺伝子導入されていることが示された。

D. 考察

本研究では、アレイ CGH の感度と再現性の確認を行った。アレイ CGH によるコピーナンバーバリエーション (CNV) 解析や LOH 解析は病態との関係性が非常に多く、近年注目が注がれている。健康成人のゲノム解析を行うとタンパクの昨日変化が予測されるような変異が 300 近くの遺伝子において見出される。その数はヒトゲノム中にあるタンパクコード遺伝子の 1% 以上にも及び、ゲノムのコピー数異常である CNV も数多く検出されている。このことは健康に日々暮らしている私たちにおいても機能の軽重を問わず多数の遺伝子に変異が起きているものの、たまたま細胞や臓器、運動器や神経、さらに精神発達などにおいて日常の生活に支障が無い程度におさまっているに過ぎないことを示している。しかし、近年の解析結果から、アンドロゲン代謝酵素 (UGT2B17) と前立腺がんの発症、セリンプロテアーゼ遺伝子 (PRSS1) と家族性膵炎など病態 (表現型) との関係が明らかにされる例も数多く存在している。本研究においてアレイ CGH 解析を実施することにより細胞の詳細なゲノム解析を行い、細胞をキャラクタライズすることである。このキャラクタライズが実際には細胞の品質を評価するために表現型と結びつけることができれば非常に有用な方法となり、新たな評価方法となる。確認した感度は 3 割程度のゲノム量の変化を解析することが出来た。全ての細胞において変異が起これ、ゲノム量が変化した場合には 2 つあるアレルの 1 本分の増減に基づくことが考えられ、その増減量は 5 割と推定される。本研究の結果から十分に検出可能でありアレイ CGH が十分な感度であるとわかった。また、再現性に関しても同じ試料による

解析によって同じ結果が得られることを確認できた。

遺伝子を導入したヒト骨髄間葉系幹細胞が *in vitro* 培養で遺伝子型、表現型にどのような変化を示すかを解析し明らかにした。本研究で使用した細胞株 UE6E7T-3 はヒトパピローマウイルス E6E7 遺伝子と hTERT を用いて不死化されており長期培養を続けると、染色体数に大きな変化を示した。培養初期には diploid (2n) であるが、培養期間が長くなるにつれて、aneuploid (2n-1~2)、tetraploid (4n) と tetraploid より少し少ない異数体 aneuploid (4n-1~5) になるのが観察された。最近、ヒト N/TERT-1 ケラチノサイトや HeLa 細胞の *in vitro* 実験で、異数体 aneuploid が形成される前に tetraploid の形成があり、それは分裂期に 2 つの娘細胞の不分離によるという nondisjunction 説が報告されたが、古くからヒトがん細胞でも高頻度で tetraploid が観察されている。UE6E7T-3 において観察された aneuploid (2n-1~2) においては、17 番染色体は正常であるのに 13 番染色体の 1 本の欠失が UE6E7T-3 の 70~80% で観察された。このことから、細胞株が増殖していくためには 13 番染色体の欠失が重要であったことが示されている。特定染色体の欠失によるカリオタイプ変異はヒト ES 細胞でも報告されている。これまで染色体異数体は tetraploid から形成されるという主張が強かったが、本研究から tetraploid を経由せず、diploid からでも形成されるという異数体形成機構の新たな事実が示された。

tetraploid 形成なしに起こる異数体形成機構は不明であるが、中心体が重要な役割をしている可能性が高い。正常細胞では、中心体が細胞あたり 1~2 個しかないものが、本

研究で使用した UE6E7T-3 では 3~10 個も存在するものが細胞の 12~35%にも及ぶ。この中心体の増加が染色体の不均衡分割につながったものと考えられる。

さらに本研究では SNP チップを用いて欠失する 13 番染色体がランダムに欠失するのか、あるいは特定のアレルが欠失するのかに関して解析を行った。その結果、特定アレルの欠失が起こっていることが証明され、そのメカニズムに非常に興味を持たれ、この細胞が異数体形成のメカニズムを解析するための良いモデルとなると考えられた。

細胞治療で最も重要な問題は移植する細胞の質的要素である。間葉系幹細胞が今日再生医療面で大きな期待を受けているのは、他の組織幹細胞ではみられないいろいろな他組織への分化能を持っているからである。この研究で用いた細胞株は臍帯血と骨髄由来の幹細胞であるが、*in vitro* の限られた条件下でも骨細胞、脂肪細胞、神経細胞への分化能を保持していた。遺伝子を導入してもその分化能を維持していた。さらに市販されているヒト間葉系幹細胞に関しても、長期培養における染色体異常解析を行ったが、培地の違いによりその増殖速度に影響を与えることは明らかになったが、長期培養による染色体異常は観察されなかった。今後アレイ CGH による染色体のより詳細な解析を試み、より微細な染色体変化を、より簡便に解析する評価系開発を目指す。

また、改良型アデノウイルスベクターを用いることによりヒト ES 細胞に効率良く遺伝子導入が可能であった。これはヒト ES 細胞がアデノウイルス受容体 CAR を高発現しているためと考えられた。しかしながら、ES 細胞と類似していると考えられている iPS 細

胞に対しては辺縁部しか遺伝子導入細胞がみとめられなかった。これが ES 細胞と iPS 細胞の差であるかどうかは今後クローン数を増して検討することにより明らかになるものと思われる。また、ROCK 阻害剤の併用により iPS 細胞にも効率良く遺伝子導入が可能であったが、分化誘導実験等を行う場合、ROCK 阻害剤が副作用をもたらす可能性も考えられ、iPS 細胞への遺伝子導入にはさらなる改良が必要であると考えられた。

E. 結論

(1)細胞のゲノム DNA を用いて、アレイ CGH の感度及び再現性を検証したが、染色体の増減を解析するのに十分な検出感度、ならびに再現性を示すことが明らかとなった。本研究に用いた遺伝子導入細胞株は 13 番染色体 1 本の特異的欠失を伴うが、間葉系細胞本来の分化能は保持していた。また、欠失する 13 番染色体が特定アレルに起こっていることが明らかとなり、この細胞株は異数体形成におけるモデル細胞として非常に有用であると考えられた。

今後、細胞治療がますます盛んになるが、ES 細胞だけではなく、組織幹細胞でも移植に必要な細胞量の確保には *in vitro* 増幅が不可欠である。そのためには他細胞のコンタミネーションやマイコプラズマ汚染、ウイルス汚染チェックと同じように、移植された組織の悪性変異を防ぐためにもカリオタイプの検査は品質管理の重要な項目に加えなければならないことをこの研究は警告している。

(2)改良型アデノウイルスベクターを用いることによりヒト ES 細胞に効率良く遺伝子導入が可能であった。これはヒト ES 細胞がアデノウイルス受容体 CAR を高発現しているためと考えられた。しかしながら、ES 細胞と類似していると考えられている iPS 細胞に対しては辺縁部しか遺伝子導入細胞がみとめられず、iPS 細胞への遺伝子導入にはさらなる改良が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakurai F, Nakamura SI, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Ther.*, 16, 297-302 (2009).
- 2) Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates. *Mol. Ther.*, 16, 726-733 (2008).
- 3) 水澤博, 小澤裕, 小原有弘, 増井徹, 佐藤元信, 岩瀬秀, 深海薫, 西條薫, 中村幸夫; 培養細胞で頻発するクロスコンタミネーションへの警戒; 実験医学;26(3):561-567 (2008)
- 4) 水澤博, 小澤裕, 増井徹, 平田誠, 小原有弘; STR 分析によるヒト培養細胞の迅速同定法—培養細胞のクロスコンタミネーション防止のために—; 実験医学;26(9):1395-1403 (2008)
- 5) Takeuchi M, Takeuchi K, Ozawa Y, Kohara A, Mizusawa H. Aneuploidy in immortalized human mesenchymal stem cells with non-random loss of chromosome 13 in culture. *In Vitro Cell*

Dev Biol Anim. (2009) in press.

2. 学会発表

1. 田代克久、稲村充、川端健二、櫻井文教、水口裕之: アデノウイルスベクターによるマウス iPS 細胞への遺伝子導入の最適化と分化誘導. 日本薬学会第 129 年会、京都、2009 年 3 月 26 日-28 日
2. 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之: アデノウイルスベクターを用いたマウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入と細胞分化. 第 8 会日本再生医療学会総会、東京、2009 年 3 月 5 日-6 日
3. 田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、櫻井文教、水口裕之: 改良型アデノウイルスベクターを用いた骨芽細胞への高効率分化誘導法の開発. 第 31 回日本分子生物学会年会、神戸、2008 年 12 月 9 日-12 日
4. Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Asami Ino, Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi: Efficient Differentiation into Osteoblastic Lineage from Both Mouse Embryoid Bodies and Bone Marrow Stromal Cells by Adenovirus Vectors. 11th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, May 28 - June 1, 2008
5. 田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、櫻井文教、水口裕之: 最適化アデノウイルスベクターを用いた高効率骨芽細胞

分化. 遺伝子デリバリー研究会第8回シンポジウム、大阪、2008年5月8日

6. 小原有弘、水澤博：細胞バンクの現状と課題. 日本組織培養学会第81回大会（つくば）

7. Arihiro Kohara, Azusa Ohatani, Yutaka Ozawa, Setsuko Shioda, Tohru Masui, Hiroshi Mizusawa. Mycoplasma Contamination and Cross Contamination in Tissue Culture: A Survey of Major Institutions in Japan. Annual meeting of Symposium In Vitro Tecnology Jun. 2008 (Tucson CA).

8. Arihiro Kohara: Genomic Stability Analysis of Immortalized Human Cells and Human Tumor Cells Using High-Resolution Array-Based Comparative Genomic Hybridization. 48th ASCB Annual Meeting Dec. 2008.

9. Yutaka Ozawa, Masao Takeuchi, Kikuko Takeuchi, Arihiro Kohara, Hiroshi Mizusawa Genomic Stability of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells (Non-random Loss of Chromosome 13 in Culture). 日本環境変異原学会第37回大会（沖縄2008年12月）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

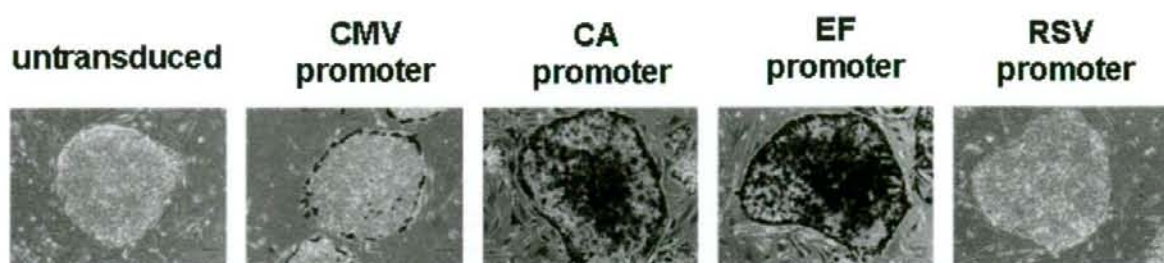


Fig. 1 Ad vector-mediated transduction efficiency in human ES cells as determined using various types of promoters.

Human ES cells (KhES-1) were transduced with Ad vectors at 3,000 VP/cell for 1 day. After 24 hr, X-gal staining was performed. Abbreviations: RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ β -actin promoter; EF, human elongation factor-1 α .

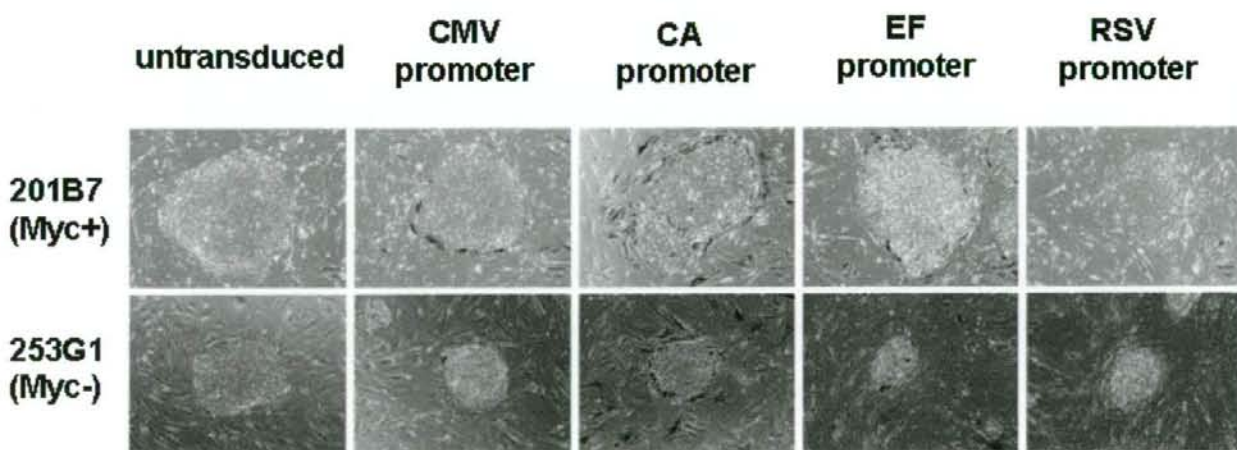


Fig. 2 Ad vector-mediated transduction efficiency in human iPS cells as determined using various types of promoters.

Human iPS cells 201B7 (Myc+) and 253G1 (Myc-) were transduced with Ad vectors at 3,000 VP/cell for 1 day. After 24 hr, X-gal staining was performed. Abbreviations: RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ β -actin promoter; EF, human elongation factor-1 α .

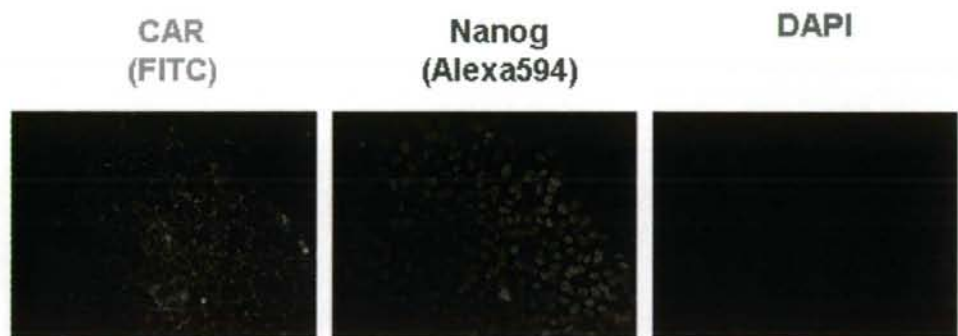


Fig. 3 Human iPS cells express CAR.

Human iPS cells (201B7) were plated into 2-well chamber slides. After culturing for 4 days, they were reacted with anti-human CAR antibody or anti-Nanog antibody, and were then stained with FITC- or Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibody, respectively. Nuclei were counterstained with ProlongGold with DAPI.

厚生労働科学研究費補助金（生物資源 研究事業）
分担研究報告書

ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究

分担研究者 水澤 博

独立行政法人 医薬基盤研究所・生物資源研究部部長

協力研究者 小原 有弘

研究要旨： ヒト ES 細胞・iPS 細胞や間葉系幹細胞の品質を確保し、再生医療へ応用するため、長期安定培養法の開発ならびに核型解析ならびに染色体プロファイル解析を用いた細胞の品質評価法の開発を行った。再生医療に用いる幹細胞は治療に必要な細胞の確保のため細胞の増殖能が必要となるが、その試験管内での増殖においては、がん化などのリスク回避が非常に重要になる。これらのリスクを的確に評価し、安全性を担保するため様々な細胞評価法開発が行われているが、我々は染色体の詳細解析法による再生医療に用いる細胞のリスク評価の可能性に関して検討を行った。まず、アレイ CGH 感度及び再現性を確認する研究を実施し、十分な感度と再現性を確認した。また昨年度に引き続きモデル細胞として、ヒトテロメラーゼ遺伝子（hTERT）、ヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子などの導入により長期増殖能をもつヒト骨髓由来間葉系幹細胞を用い、それらの長期継代培養による染色体の安定性を DAPI 染色法、FISH 法、CGH アレイ法により経時的に調べ、同時に細胞の脂肪細胞、骨芽細胞、神経様細胞への分化能も調べた。特に長期培養によって 13 番染色体の 1 本の欠失が再現される細胞に着目し、そのゲノム詳細解析を実施した結果、欠失する 1 本の 13 番染色体はランダムではなく特定アレルの欠失が起こることが詳細解析にて明らかとなった。ヒト ES 細胞、iPS 細胞に関しても詳細解析を実施中でありデータを蓄積しているところである。本研究から、ヒト ES 細胞の品質管理においても重要な基礎知見が得られ、再生医療に用いる細胞の品質管理の必要性を確認した。

A. 研究目的

ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞は無限に増殖し、機能細胞へ分化するという特徴を有しており、これら細胞を再生医療へ応用できれば、がん、筋ジストロフィー、再生不良性貧血、心筋梗塞等の致命的疾患に対する極めて有効な治療法になる。しかしながら、ヒト胚由来の ES 細胞を用いることによる倫理的な問題も存在し、本邦ではヒト ES 細胞を用いた研究はわずかとなっており、研究基盤技術として普及しているとはいえない。また、幹細胞

の分化制御機構の解明や幹細胞を用いた動物モデルにおける医療への応用実験などは活発に試みられているが、ヒトに応用するうえで必須となってくる幹細胞の品質管理に関する情報は極めて乏しく、国際的な安全性基準が明確に定められていないのが現状である。そこで本研究では、長期安定的なヒト ES 細胞・間葉系幹細胞の機能維持、品質管理、ならびにその評価法の開発を目的としており、ヒト間葉系幹細胞の培養環境・培養技術の改良による長期安定培養法の開発、ヒト間葉系

幹細胞の核型解析および染色体プロファイル解析による長期培養における品質評価法開発を行い、再生医療への適用の可能性と問題点を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、UE6E7T-3 (JCRB1136) は当 JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) で保存された細胞を使用した。UE6E7T-3 は hTERT と HPV16E6E7 遺伝子により不死化したものであり、Poweredby 10 培地 (Med-Shirotori Co. Japan) で培養した。培養開始の細胞密度は 2000 cells/cm² で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。PDLs の計算は次の式に従った: $PDLs = \log(\text{cell output}/\text{cell input})/\log 2$ 。

2) 染色体解析

細胞は直径 100mm のプラスチックディッシュで培養し、継代後約 2 日目にコルセミドを加え、37°C で 2 時間インキュベートした後、トリプシンで剥離し、ディッシュから回収した。次に 0.075M・KC1 低張処理後、カルノア液で固定した。染色体数の測定には metaphase spread chromosome を DAPI 染色し、Axioplan II imaging microscope (Carl Zeiss, GmbH) で観察し、プログラムソフト LeicaQFISH を用いて画像の取得と解析をした。pFISH 解析には 13 番染色体、17 番染色体に特異的なプローブ (XCP13 -kit - FITC、XCP17 - kit - Texas Red) (MetaSystems, GmbH) を、mFISH の解析にはマルチカラープローブ (24Xcyte-MetaSystems' 24color kit) を用いた。方法は MetaSystems 社のプロトコールに従った。FISH 像は Zeiss Axio imaging

microscope (Carl Zeiss Microimaging, GmbH) で観察し、プログラムソフト mBAND/mFISH (MetaSystems, GmbH) で解析した。

3) CGH アレイ解析 (アジレント社)

サンプル DNA は約 5×10^6 の細胞から AllPrep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。2 種類の DNA 試料は、それぞれ Alexa Fluor R3 または Alexa Fluor R5 (BioPrime® Total Genomic Labeling System, Invitrogen Co., Japan) で標識した。標識した DNA と Cot-1 DNA をハイブリダイゼーション溶液 (10 x Blocking Agent, 2 x Hybridization Buffer) に溶かした。95 °C 3 分処理で DNA を変性したのち、37 °C 30 分インキュベーションした。CGH マイクロアレイスライド (Human Genome CGH 244A Oligo Microarray kit, Agilent Co., Japan) にアプライし、65 °C 40 時間ハイブリダイゼーションした。Agilent Oligo aCGH 洗浄バッファ 1 で室温、5 分間、Agilent Oligo aCGH 洗浄バッファ 2 で 37 °C、1 分間洗浄したのち各スポットの蛍光量を DNA Microarray Scanner (Agilent Co., Japan) で測定し、Agilent Feature Extraction (Agilent Co., Japan) を用いてデータを解析した。

4) SNP アレイ解析 (アフィメトリックス社)

サンプル DNA は約 5×10^6 の細胞から AllPrep DNA/RNA Mini kit (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。解析には GeneChip® Human Mapping 500K Array Set のうち、Human Mapping 250k Nsp Array を用いた。抽出した Genomic DNA を制限酵素 (NspI) で切断し、4 塩基の特異的突出末端に対応するアダプターをライゲーションした。アダプター配列に