

Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J. Gene Med.*, **10**; 498-507 (2008).

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. 稲村充、川端健二、櫻井文教、山西弘一、水口裕之：内胚葉関連遺伝子 FOXA2 および SOX17 の転写制御機構の解明. 日本薬学会第 129 年会、京都、2009 年 3 月 26 日-28 日

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

G. 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

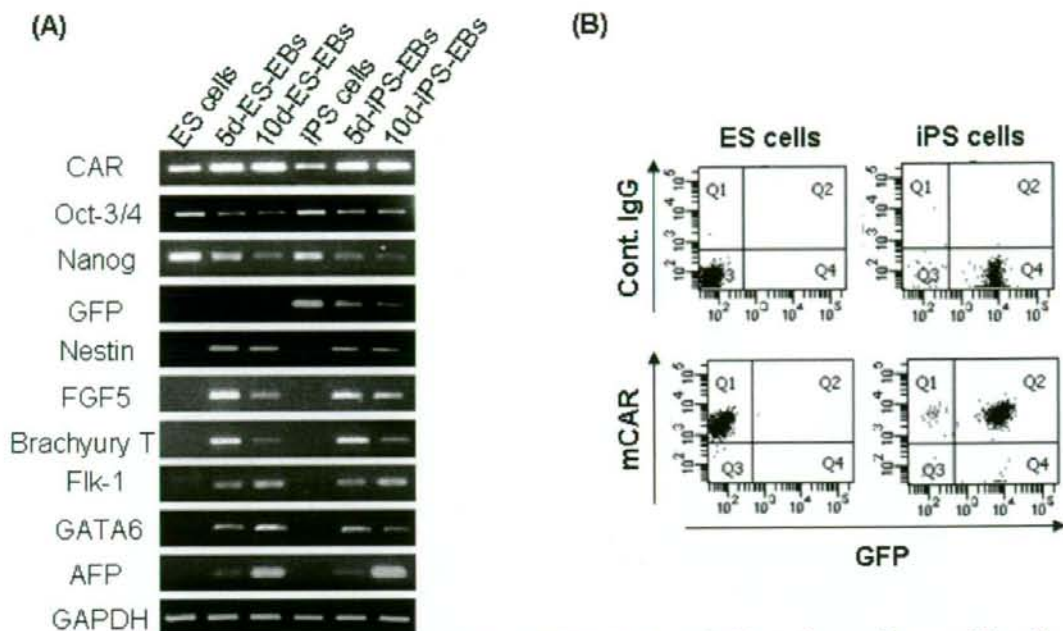


Figure 1 Gene expression patterns of mouse iPS cells were similar to those of mouse ES cells
 (A) Total RNA was isolated from mouse ES cells (lane 1), 5d-ES-EBs (lane 2), 10d-ES-EBs (lane 3), iPS cells (lane 4), 5d-iPS-EBs (lane 5), or 10d-iPS-EBs (lane 6), and semi-quantitative RT-PCR was then performed. (B) The expression of levels CAR in mouse ES cells and iPS cells were detected with anti-mouse CAR monoclonal antibody by flow cytometry. As a negative control, the cells were incubated with an irrelevant antibody. Data shown are from one representative experiment of three performed. Abbreviations: ES cells, embryonic stem cells; EB, embryoid body; 5d-ES-EBs, ES cell-derived five-day-cultured EB; 10d-ES-EBs, ES cell-derived ten-day-cultured EB; iPS cells, induced pluripotent stem cells; 5d-iPS-EBs, iPS cell-derived five-day-cultured EB; 10d-iPS-EBs, iPS cell-derived ten-day-cultured EB; CAR, coxsackievirus and adenovirus receptor; GFP, green fluorescent protein; FGF, fibroblast growth factor; GATA, GATA-binding protein; AFP, alpha fetoprotein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Cont., control.

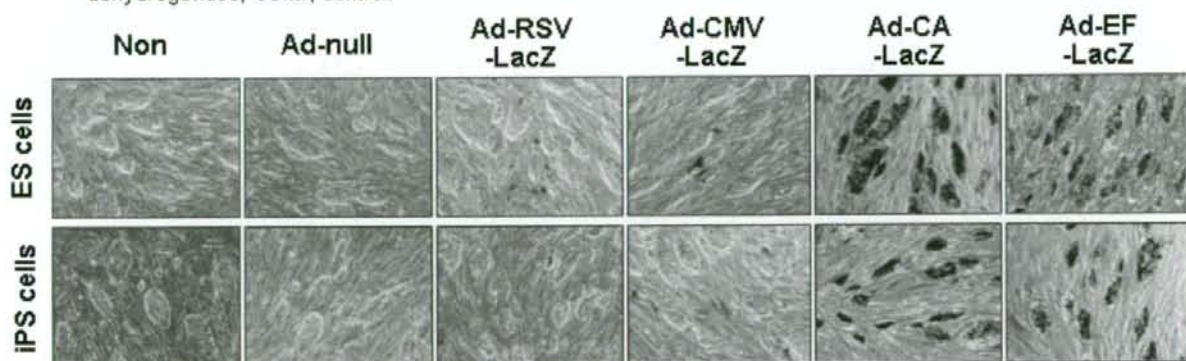


Figure 2 Efficient LacZ expression in mouse iPS cells by using an Ad vector containing the CA and the EF-1 α promoter. Mouse ES cells or iPS cells were transduced with LacZ-expressing Ad vector at 3,000 VP/cell. On the following day, X-gal staining was carried out. Similar results of X-gal staining were obtained in three independent experiments. Abbreviations: Ad, adenovirus; RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ β -actin promoter; EF, elongation factor-1 α ; LacZ, β -galactosidase.

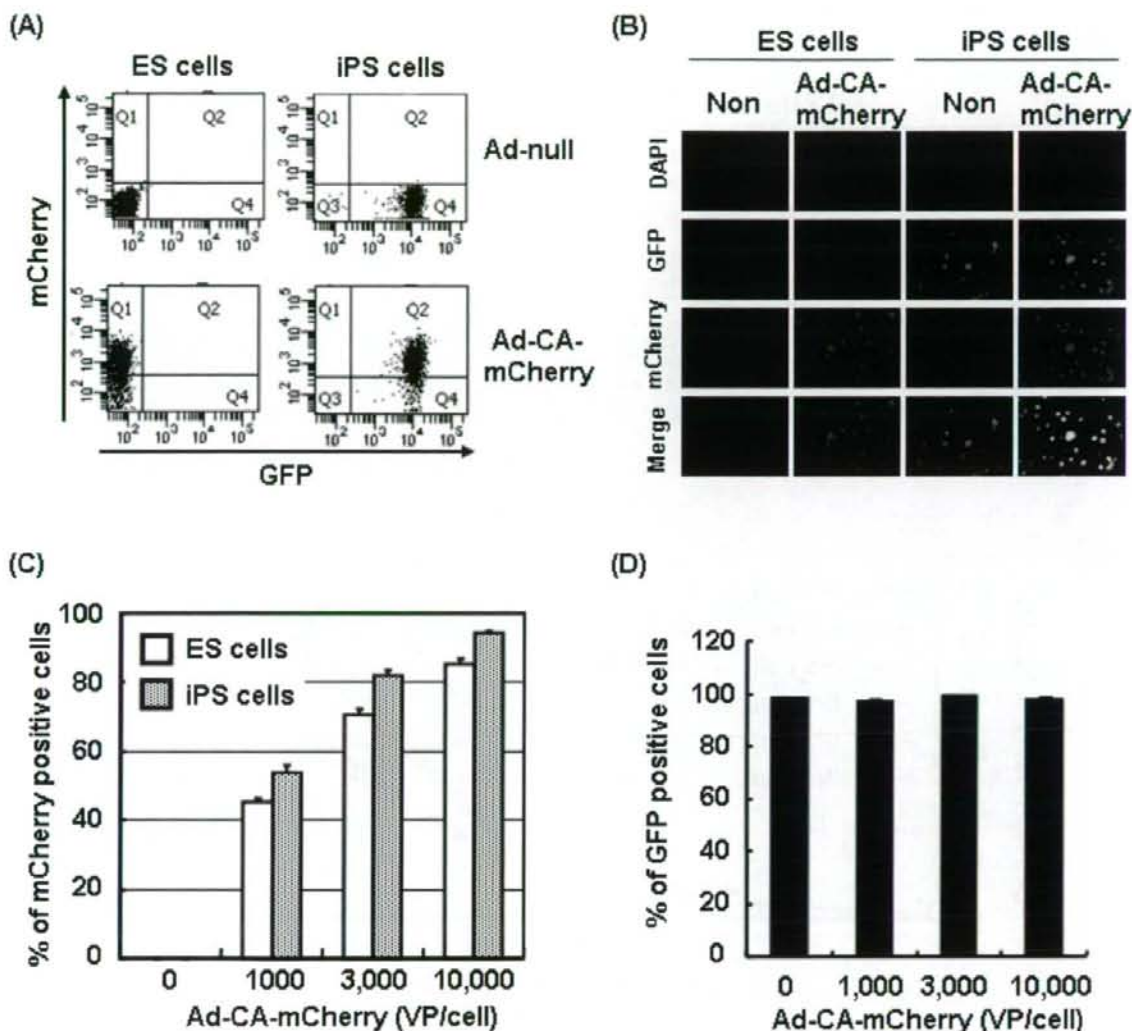
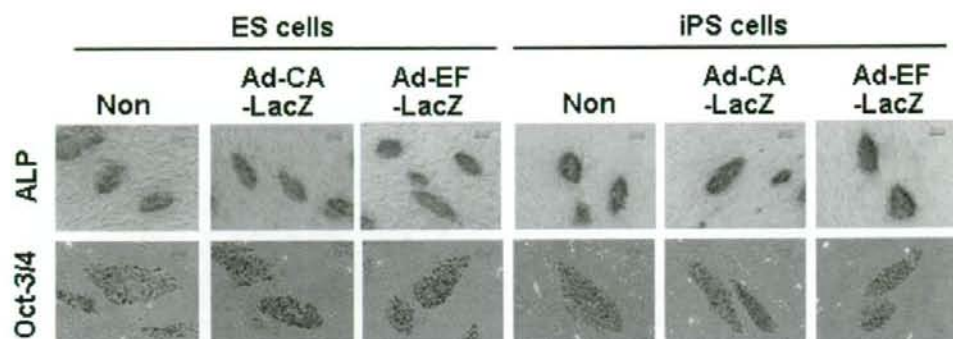


Figure 3 Efficient mCherry expression in GFP-expressing undifferentiated iPS cells by Ad vectors. (A) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with Ad-CA-mCherry at 3,000 VP/cell, and the expression of GFP and mCherry was then analyzed by flow cytometry (A) and fluorescent microscopy (B). (C, D) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with different amounts of Ad-CA-mCherry for 1.5 hr. mCherry expression (C) and GFP expression (D) was determined by flow cytometry. The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). Abbreviations: DAPI, 4',6-diamino-2-phenylindole; GFP, green fluorescent protein.

(A)



(B)

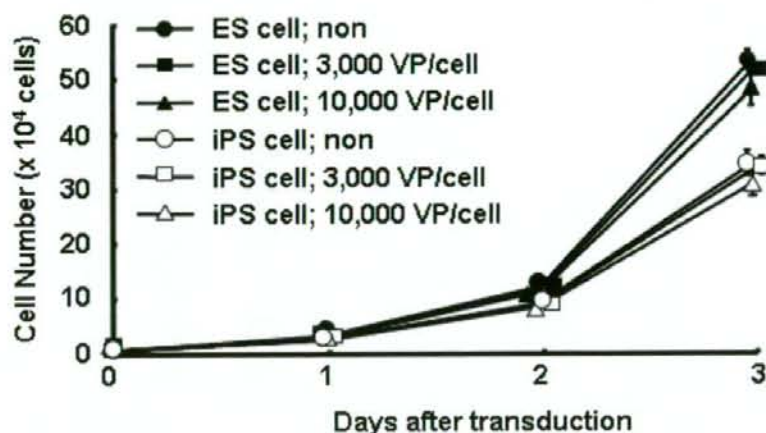


Figure 4 Ad vector-mediated transduction has almost no cytotoxicity against mouse iPS cells. (A) Mouse ES cells and iPS cells were transduced with Ad-CA-LacZ or Ad-EF-LacZ at 3,000 VP/cell. Three days later, ALP activity and Oct-3/4 expression were observed by light microscopy. (B) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with Ad-CA-mCherry at 3,000 or 10,000 VP/cell. After transduction, viable mouse ES cells or iPS cells were counted. The data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). Abbreviation: ALP, alkaline phosphatase.

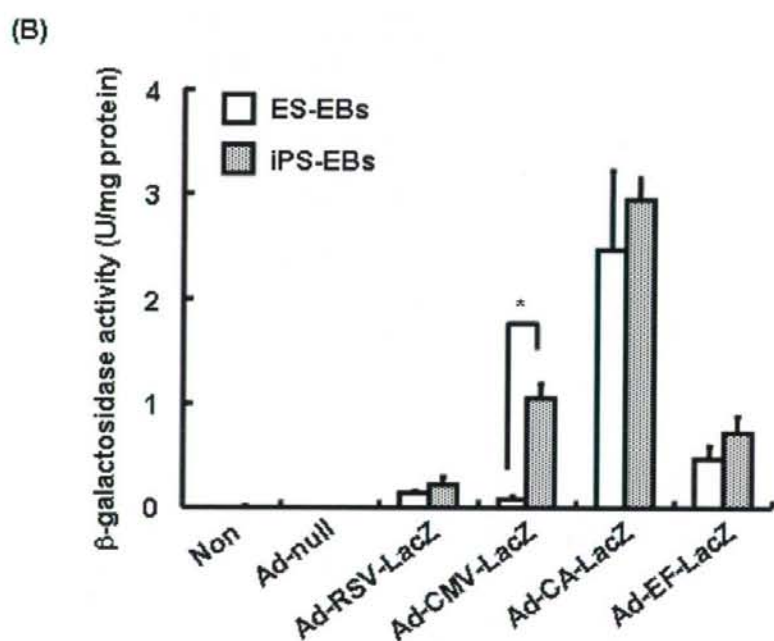
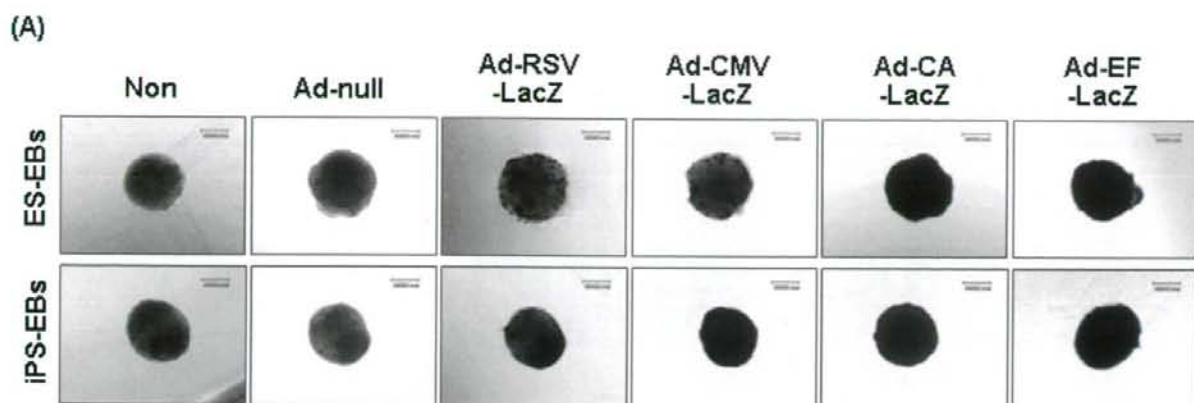


Figure 5 Comparison of promoter activity in IPS-EBs by using Ad vectors. 5d-ES-EBs or 5d-IPS-EBs were transduced with each Ad vector at 3,000 VP/cell. After 48 hr, X-gal staining (A) and β -galactosidase luminescence assay (B) were performed as described in the Materials and Methods. (A) Similar results of X-gal staining were obtained in six independent experiments. (B) The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). * $p < 0.001$

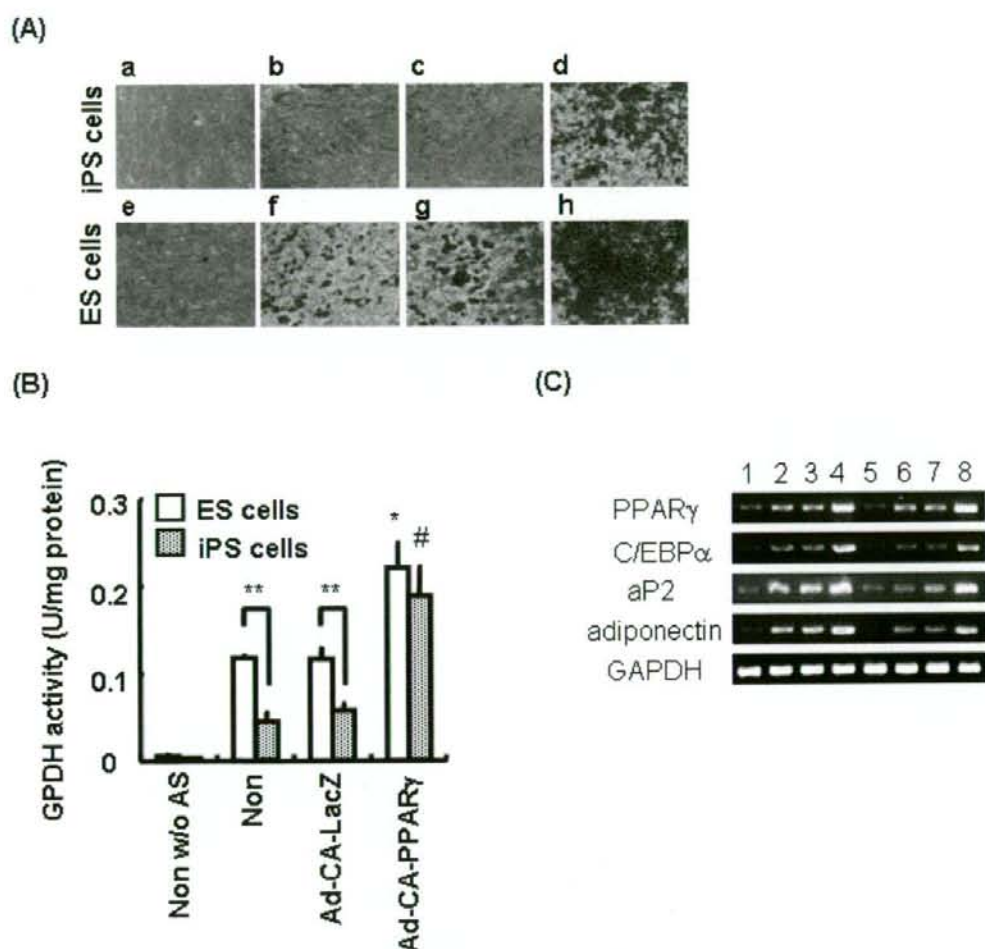


Figure 6 Efficient adipocyte differentiation from mouse ES cells and iPS cells by the transduction of the PPAR γ gene. ES-EBs or iPS-EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of Ad-CA-LacZ or Ad-CA-PPAR γ . After plating onto a gelatin-coated dish on day 7, ES-EBs and iPS-EBs were cultured for 15 days in the presence or absence of adipogenic supplements (AS). After cultivation, (A) lipid accumulation was detected by oil red O staining, and (B) GPDH activity in the cells was measured. (A) a, non-treated iPS-EBs; b, iPS-EBs with AS; c, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; d, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ ; e, non-treated ES-EBs; f, ES-EBs with AS; g, ES-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; h, ES-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ . The scale bar indicates 60 μ m. (B) The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced ES cells. # $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced iPS cells. (C) The expression of PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, and GAPDH was measured by semi-quantitative RT-PCR. Lane 1, non-treated ES-EBs; lane 2, ES-EBs with AS; lane 3, ES-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; lane 4, ES-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ ; lane 5, non-treated iPS-EBs; lane 6, iPS-EBs with AS; lane 7, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; lane 8, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ . Abbreviations: AS, adipogenic supplements; w/o, without; GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; C/EBP α , CCAAT/enhancer binding protein alpha.

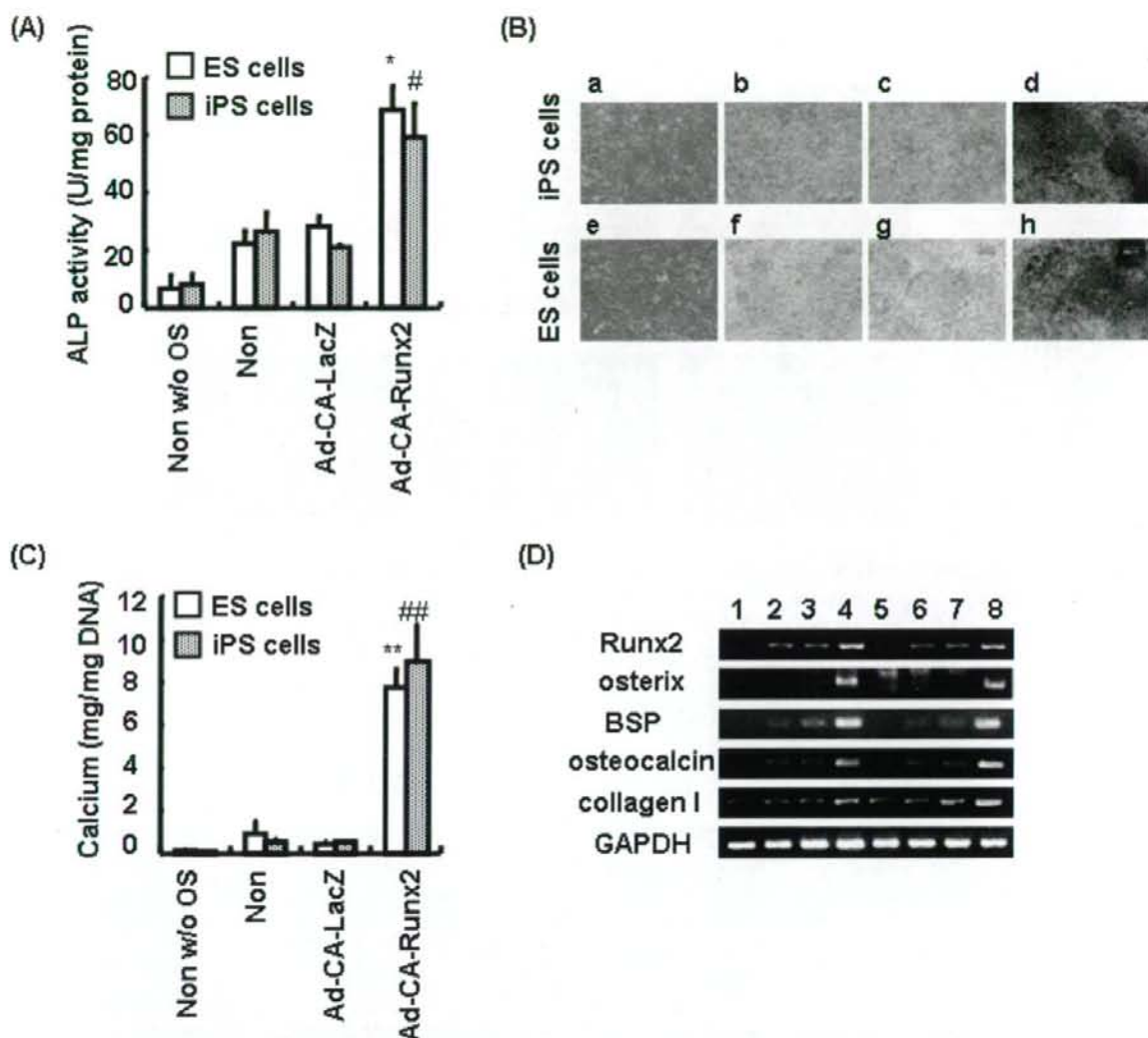


Figure 7 Enhanced osteoblast differentiation from ES cells and iPS cells in Ad-CA-Runx2-transduced cells. ES-EBs or iPS-EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of Ad-CA-LacZ or Ad-CA-Runx2. After culturing for 15 days with or without osteogenic supplements (OS), alkaline phosphatase activity in the cells was determined. The data are expressed as the means \pm S.D. ($n=3$). * $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced ES cells. # $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced iPS cells. (B) Matrix mineralization in the cells was detected by von Kossa staining, and (C) deposition of calcium was quantified as described in the Materials and Methods. (B) a, non-treated iPS-EBs; b, iPS-EBs with OS; c, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; d, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2; e, non-treated ES-EBs; f, ES-EBs with OS; g, ES-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; h, ES-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2. The scale bar indicates 60 μ m. (C) The data are expressed as the means \pm S.D. ($n=3$). ** $p < 0.01$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced cells. ## $p < 0.01$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced iPS cells. (D) Total RNA was isolated, and semi-quantitative RT-PCR was carried out using primers for Runx2, osterix, bone sialoprotein, osteocalcin, collagen type I, and GAPDH. Lane 1, non-treated ES-EBs; lane 2, ES-EBs with OS; lane 3, ES-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; lane 4, ES-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2; lane 5, non-treated iPS-EBs; lane 6, iPS-EBs with OS; lane 7, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; lane 8, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2. Abbreviations: OS, osteogenic supplements; Runx2, runt-related transcription factor 2.

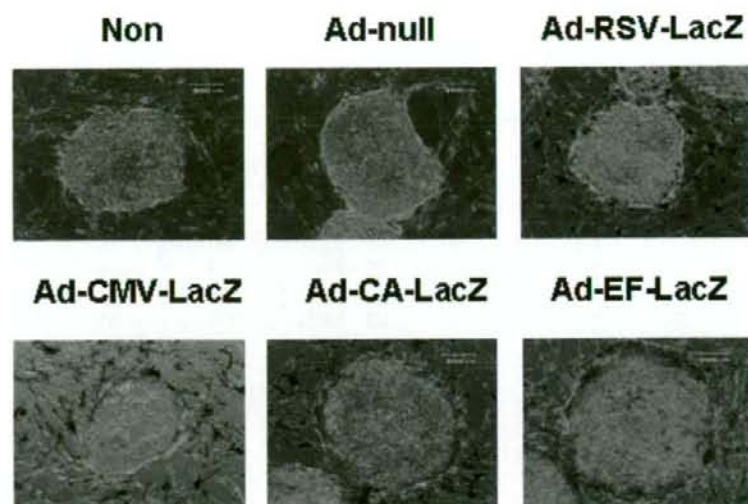


Fig.8 Ad vector-mediated transduction efficiency in human iPS cells as determined using various types of promoters. Human iPS cells (201B7) were transduced with various types of LacZ-expressing Ad vectors at 3,000 VP/cell for 1.5 hr. Two days later, X-gal staining was performed. Similar results of X-gal staining were obtained in two independent experiments. Abbreviations: RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ β -actin promoter; EF, human elongation factor-1 α .

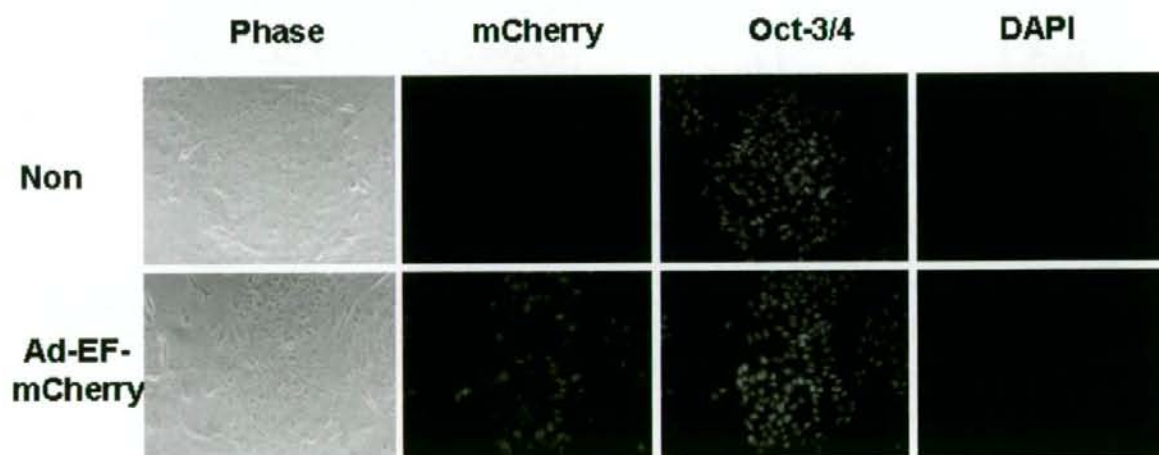


Fig. 9 Adenoviral transgene expression in human iPS cells in the presence of Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632.

Human iPS cells were pre-treated with Y-27632, and were then plated on 2-well chamber slides. On the next day, they were transduced with Ad-EF-mCherry at 3,000 VP/cell for 1.5 hr. Two days later, the expression of oct-3/4 and mCherry was observed by fluorescent microscopy.

Table 1 List of the primers used for RT-PCR

Genes	(5') Sense primers (3')	(5') Antisense primers (3')
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
CAR	TGATCAITTTGTATTCTGGA	TTAACAAGAACGGTCAGCAG
Oct-3/4	GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC	TCTAGCCCAAGCTGATTGGC
Nanog	ATGGTCTGATTCAAGAGGGC	TTCAOCTCCAAATCACTGGC
GFP	CACATGAAGCAGCAGCACTT	TGCTCAGGTAGTGGTTGTGG
FGF5	GAAGCGCTCGGAACATAGC	GGACGCATAGGTATTATAGC
Nestin	COCTCACCCTCTAATTTA	TTCTCCTAAAGGTTTATAGT
bachyuryT	CAGGAGGATGTTCCCGGTGC	TCCGAGGTTCACTTATGTC
flk-1	TCTGTGGTTCTGCGTGGAGA	GTATCATTTCCAACCACCC
GATA6	GCCAAACTGAGCCCTTCGC	GGGGGGCTGTCGGGGAGGC
AFP	TCGTATCCAAACAGGAGG	AGGCTTTTGCCTCACCAG
PPAR γ	COCTGGCAAAGCAITTTGTAT	AATCCTTGGCCCTCTGAGAT
C/EBP α	CGCTGGTGATCAAACAAGAG	GTCACCTGGTCAACTCCAGCA
aP2	TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA	ACACATTCCACCACCAGCTT
adipone ctin	GTTGCAAGCTCTCCTGTCC	GCTTCTCCAGGCTCTCCTTT
Runt2	CCTCTGACTTCTGCCTCTGG	CAGCGTCAAACAATCATTCT
Osterix	CTTAACCCAGCTCCCTACCC	TGTGAATGGGCTTCTTCTCT
Bone sialoprotein	AAAGTGAAGGAAAGCGACGA	GTTCTTCTGTGCACCTGCTTC
Osteocalcin	GCGTCTGTCTCTCTGACCT	TTGTAGGGGCTCTTCAAGC
Collagen I	CACCTCAAGAGCCTGAGTC	GCTACGCTGTCTTGCAGTG

iPS 細胞等の幹細胞の細胞特性の評価、ならびに細胞試験系における品質管理
技術の開発

分担研究者 古江 美保

独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部門 細胞資源研究室 研究員

研究要旨：毒性評価などのスクリーニングに用いる細胞の条件として、再現性のある安定した試験が可能で、その細胞を十分量安定供給できることなどが重要である。創薬研究に応用するためには、まず、iPS 細胞の標準化から始める必要がある。そこで、再現性のある安定したヒト iPS 細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発し、iPS 細胞の標準化を行い、ヒト iPS 細胞から肝細胞への安定した高効率分化誘導技術の開発と分化誘導細胞コレクションの構築を行うことを分担研究の目的とした。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は、その樹立の方法や培養条件がラボにより異なるために、株間の差が大きいと予想される。さらに、同じ細胞から作製された iPS 細胞であっても、クローン間で形質が異なる。さらに、他の幹細胞に比べて、デリケートで、高品質を維持することは大変難しい。分化しやすく、継代するうちに異なる細胞集団になることも多い。細胞分散法を間違えば、ほとんどの細胞がアポトーシスを起こして死んでしまうことも稀ではない。

ヒト ES、iPS 細胞は、一般的に、マウス胎児組織由来フィーダー細胞上で、牛胎児血清、あるいは、代替血清・knockout-serum replacement® (KSR) と、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を添加した培地を用いて培養されている (図 1)。血清は、増殖因子だけでなく、未知の分化促進因子や

ウイルスなどを含んでいる可能性がある。また、マウス胎児由来フィーダー細胞は、牛胎児血清添加の条件で準備され、未知なる因子を含む様々な因子を分泌しており、ロットが異なるたびに、ヒト ES、iPS 細胞の形状も異なってくる。KSR は無血清であると言われているが、ロット差のある動物由来成分を含み、組成が公開されていない。このような条件で培養を行うために、一研究室内においても、継代のたびにヒト ES、iPS 細胞の品質は異なる。また、分化誘導を行っても、毎回、その誘導率が異なる。

毒性評価などのスクリーニングに用いる細胞の条件として、再現性のある安定した試験が可能で、その細胞を十分量安定供給できることなどが重要である。作製された iPS 細胞は他の研究機関に配布・分譲する予定である。将来、創薬研究に応用するためには、まず、iPS 細胞の標準化から始

める必要がある。そこで、再現性のある安定したヒト iPS 細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発し、iPS 細胞の標準化を行い、ヒト iPS 細胞から肝細胞への安定した高効率分化誘導技術の開発と分化誘導細胞コレクションの構築を行うことを分担研究の目的とした。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の品質管理・品質評価法の開発

ヒトES、iPS細胞の品質の安定性のためには、ロット差の少ない合成培地を用いた無血清培養が、望ましいと考えられる。ヒトES細胞用の培養条件は、十数例が報告されている。当分担研究者は、これまでに、マウスES細胞をフィーダー細胞無しに未分化性を維持することのできる機能性無血清培養条件ESF7を開発した。この条件に改良を加え、ヒトES細胞用無血清培地hESF9を開発した。しかし、細胞株により形質が異なるために、すべてのヒトES、iPS細胞が培養できるとは限らない。そこで、hESF9を用いて、種々のヒトES、iPS細胞の培養が可能かどうかを検討した。ヒトES、iPS細胞の継代の中で、細胞分散がもっとも難しく、不安定である。そこで、だれもが安定した細胞分散ができるよう、細胞外マトリックスや細胞分散液の改良を行って、安定的培養法の開発を進めた。フィーダーを用いないhESF9培地を用いた条件においては、正確なヒトES細胞、iPS細胞の形質が解析できる。そこで、同培養条件下に、ま

ず、各種ヒトES細胞、iPS細胞のコロニー形成率を検討した。

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導

法開発：まず、未分化なiPS細胞から内胚葉への分化誘導条件の開発を行う必要がある。一般的に、ヒトES細胞、iPS細胞の分化誘導は、胚葉体 (embryoid body, EB) と言われる細胞凝集塊を作成させて、血清添加の条件下で培養を行うことにより、自発的分化を誘導してから、目的的分化した細胞を回収する。しかし、この条件では、分化誘導の過程を追うことは難しく、血清のロットにより、分化する組織が異なる。また、自発的分化誘導に任せるために、分化誘導率は毎回異なる。そこで、hESF9を改良した分化誘導培地hESF5-differを用いて、二次元培養下に、分化誘導条件の開発を行った。まず、細胞外マトリックスや細胞の播種密度の検討を行った。また、次に、種々の増殖因子による分化誘導への影響を、外、中、内胚葉分化マーカーの発現を指標として、解析を行った。

(倫理面への配慮)

文部科学省の指針に従い、ヒトESは、指定の培養室内のみ培養を行い、動物胚に移植などは行っていない。ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞の培養を行っている培養室には持ち込んでいない。また、動物胚に移植などは行っていない。ヒトES、iPS細胞を用いたこれらの研究は、(独) 基盤研究所内における倫理委員会の承認を受けて、行っている。

B. 研究結果

ヒトiPS細胞の品質管理・品質評価法の開発

の開発：当分担研究者が開発したヒトES細胞用無血清培地を用いて、京都大学で樹立されたヒトES細胞・khES-1の培養を試みた。しかしながら、シェフィールド大学樹立Shef1、3、5や、ハーバード大学で樹立されたHUES-1、5などとは異なり、そのままの条件では、細胞接着がほとんど見られなかった。また、ほとんどの細胞が、細胞死していた。原因として、細胞分散液として使用しているEDTA、また、接着因子の影響が考えられた。そこで、まず、細胞分散液の検討を行った。これまでは、EDTAを使用していたが、ディスパーゼ、アキュターゼ、CTK（トリプシン・コラゲナーゼ・KSR混合液）の使用を試みた。その結果、hESF9を用いた場合は、ディスパーゼ、アキュターゼを使用することにより、劇的に細胞死が減少した（図2）。一方、フィーダーとKSRベースの培地を用いた条件においては、アキュターゼを使用すると、半分以上の細胞が分化し、未分化性が保てなかった。しかし、ディスパーゼによる細胞分散は、フィーダーとKSRベースの培地を用いた条件においても、未分化コロニーが多数形成され、技術者による差も比較的少ない結果が得られた。フィーダーを用いた従来の方でも無血清培地であっても、ディスパーゼは標準的に使用が可能であることが明らかとなっ

た。

次に細胞外マトリックスの影響を検討した。すなわち、96ウェルプレートに、I型コラーゲン、ゼラチン、マウスラミニン、牛ファイブロネクチンを種々の濃度によりコートを行って、hESF9培地を用いて、khES-1細胞を播種して培養を行った。コロニーが形成されるまで培養を行って、未分化マーカーであるSSEA-3の染色を行って、未分化性を同定した。その結果、シェフィールド大学樹立細胞やハーバード大学樹立細胞とは異なり、khES-1細胞は、I型コラーゲン、ゼラチン、マウスラミニンには、ほとんど接着せず、ファイブロネクチンに対して、強い接着性を示すことが明らかとなった。そこで、次に、hESF9培地において、ヒトiPS細胞201B7をディスパーゼを用いて細胞分散を行ったところ、細胞死は認められず、標準的に、ディスパーゼを用いることが可能であることが明らかとなった。次に、ヒトES細胞と同様に、細胞外マトリックスの影響を検討した。ヒトiPS細胞201B7は、I型コラーゲン、ゼラチン、マウスラミニン、牛ファイブロネクチンのいずれにも接着が可能であった。そこで、ディスパーゼを用いて細胞分散を行い、ファイブロネクチンをコートしたディッシュに播種したところ、多くの未分化コロニーが認められた。これらの結果から、ディスパーゼとファイブロネクチンを用いて、ヒトES細胞、iPS細胞が、無血清培地hESF9を用いて、標準的に培養が行えることが明らか

となった。

次に、ファイブロネクチンをコートしたプレートに、単一細胞に細胞を分散させたkhES-1細胞を種々の細胞密度で播種して、コロニー形成を計測したところ、フィーダー細胞を用いた条件に比べて、コロニー形成率が低いことが明らかとなった。フィーダー細胞上では、分化細胞がかなり多く見られたが、hESF9では、分化細胞は発現せず、未分化なコロニーのみが認められた。hESF9は、毒性評価系としてコロニー形成率を指標とすることが可能であることが示唆された。

ヒトiPS細胞から肝細胞への分化誘導法開発：

これまでに、細胞外マトリックスは、マウスES細胞の未分化性を制御しており、I型コラーゲンは未分化性を維持するが、ラミニンは、マウスES細胞の分化を促進することを明らかにしてきた。ヒトES細胞iPS細胞の場合も、ラミニンが良いと考えられ、hESF9培地を改良した分化誘導培地hESF5-diferを用いて、マウスラミニン、ヒトラミニンに対する接着性や分化誘導に与える影響を検討した。ヒトES・khES-1細胞は、これまでに、ヒトラミニンにしか接着しないと報告されているが、分化誘導の際には、マウスラミニンにもよく接着した。ヒトES細胞から神経系への誘導の際には、高密度に播種することにより、誘導効率が上昇していることが知られている。しかし、マウスES細胞を用いて、無血清

培養下に神経系への誘導を試みた際には、細胞密度は高すぎると、十分な分化誘導が得られないという未発表データを持っている。そこで、ヒトiPS細胞の細胞密度の分化誘導に与える影響を検討した。マウスラミニンをコートしたプレートに種々の細胞密度で播種を行って分化誘導を行ったところ、細胞密度が高すぎると、未分化なコロニーが多数出現して、分化誘導を制御できないことが明らかとなった。一方、細胞密度が低すぎると、ほとんどの細胞が細胞死した。従って、適度な細胞密度を必要とすることが明らかとなった。

次に、未分化なiPS細胞から、中内胚葉系に分化誘導に与える種々の増殖因子の影響を解析した。中内胚葉マーカーであるグースコイド、ブラキュリー、Foxa2やSox17などを指標に検討を行った。その結果、BMP4により胚体外組織が誘導されるが、アクチビンにより、中内胚葉への誘導が制御されていることが明らかとなった。

C. 考察

ヒトES細胞は、その樹立の方法や培養条件がラボにより異なるために、株間の差が大きく、ヒトES細胞に関連する報告が追試できないことも多いことが知られている。そのために、シェフィールド大学のAndrewsらが中心となって、ヒトES細胞研究の標準化が行われている。ヒトiPS細胞についても各研究室で作成方法や培養方法が異な

り、さらに、同じ細胞から作製されたiPS細胞であっても、クローン間で形質が異なる。ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞と同様の形質を有している。従って、ヒトiPS細胞独自に標準化することではなく、ヒトES細胞を比較することにより、標準化を行う必要があると考える。当分担者は、Andrewsらが行っているヒトES細胞研究の標準化研究に参加をしており、これらの標準化されたヒトES細胞の分析データを持っている。これらの結果と、ヒトiPS細胞の分析結果と比較することにより、より効率的かつ正確に標準化することが可能である。今回、hESF9培地を用いて、国内樹立ヒトES細胞khES-1ならびにヒトiPS細胞を用いて、細胞外マトリックスの接着性を検討した。その結果khES-1は、シェフィールド大学やハーバード大学のES細胞とは細胞外マトリックスに対する接着性は異なることが明らかとなった。しかし、ヒトiPS細胞は同様の形質を示していた。これらの結果は、ヒトES、iPS細胞は、細胞株によって様々な形質を有していることが示唆された。しかし、ファイブロネクチンは、そのいずれの細胞にも強い接着性を示すことから、ファイブロネクチンを標準培養法として使用することが可能であることが示唆された。最近、オランダの研究チームが、無血清培地においては、合成ビトロネクチンが有効であることが発表された。今後、合成ファイブロネクチンや合成ビトロネクチンも検討する必要がある。

細胞分散法は、ヒトES細胞の培養において、もっとも難しいと言われている。特に、無血清培養下における細胞分散は、種々の検討が行われ、各種企業から、組成の明らかにされていない細胞分散液が販売されている。EDTAは、合成物質であり、ロット差がほとんどなく、シンプルであり、EDTAを用いた細胞分散法が使用できれば、安定した結果が得られるはずである。シェフィールド大学やハーバード大学、あるいは、ウィスコンシン大学のヒト細胞はEDTAを用いることにより、未分化な細胞だけが回収でき、それにより、細胞死することは、ほとんど見られなかった。しかし、京都大学ヒトES細胞khES-1細胞は、EDTAにより、未分化コロニーのみが回収できず、さらには、EDTAを用いることにより、細胞死することが明らかとなった。細胞表面に発現する蛋白や糖質が異なることも予想される。今後、輸入ヒトES細胞の培養が許可されれば、これらの細胞と比較していく予定である。

hESF9におけるコロニー形成率は、フィーダー細胞とKSRを用いた条件に比べると低い。おそらく、フィーダー細胞とKSRを用いた条件においては、細胞死を救済する因子が含まれていると考えられる。しかし、一方で、分化誘導する因子も含まれているために、多くの分化細胞が認められた。今後、細胞死を救済する因子を検討していく必要があるだろう。単一細胞の細胞死を救済すると報告されたロック

インヒビターの使用も検討していく予定である。

ヒトES細胞、iPS細胞は、分化細胞を得るために、非常に有効な細胞である。しかし、その分化制御が非常に難しいために、様々な研究が行われている。これまで、フィーダーやKSRなどロット差の異なる培養条件を用いていたために、未分化状態を保っていたとしても、若干の分化細胞が発現する。そういった細胞を含んだ状態で分化誘導を始めれば、当然、様々な分化細胞が発現するだろう。安定した分化誘導を行うためには、ロットができるだけ少ない培養条件を用いることが必要だろう。hESF9を改良したhESF5-differは、精製成分を用いた既知の因子よりなる培地であり、ロットがほとんどない。この培養条件を用いることにより、毎回、同様の結果が得られる。また、増殖因子による影響も正確に解析することが可能である。これにより、細胞株による分化傾向を解析でき、分化能を指標とした品質評価法開発にもつながるものと考えられる。

D. 結論

ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞と比較をすることにより、細胞の標準化を行うことが可能であることが明らかとなった。また、無血清培地hESF9を用いることにより、正確な品質評価を行うことが可能であり、今後、さらに詳細に検討していく必要があることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Mio Nakanishi, Akira Kurisaki, Yohei Hayashi, Masaki Warashina, Shoichi Ishiura, Miho Kusuda-Furue, and Makoto Asashima:

Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology 23:14-22. (2009)

(2) 古江一楠田 美保:

日本におけるヒトES、iPS細胞研究標準化 その1 Tissue culture research communications 印刷中

(3) 林 洋平, 古江一楠田 美保, 明石 靖史, 岡本 哲治, 浅島 誠 :マウス ES 細胞の無血清培養法. Tissue culture research communications, 27: 107-115 (2008)

2. 学会発表

(1) 古江一楠田美保

彩都・医薬基盤研連携フォーラム
平成20年12月 (大阪)
創薬開発ツールとしてのヒトES細胞培養法

(2) 古江一楠田 美保

歯周病学会 若手研究者の集い
平成20年10月 (三重)

マウス、ヒトES細胞の無血清培地開発

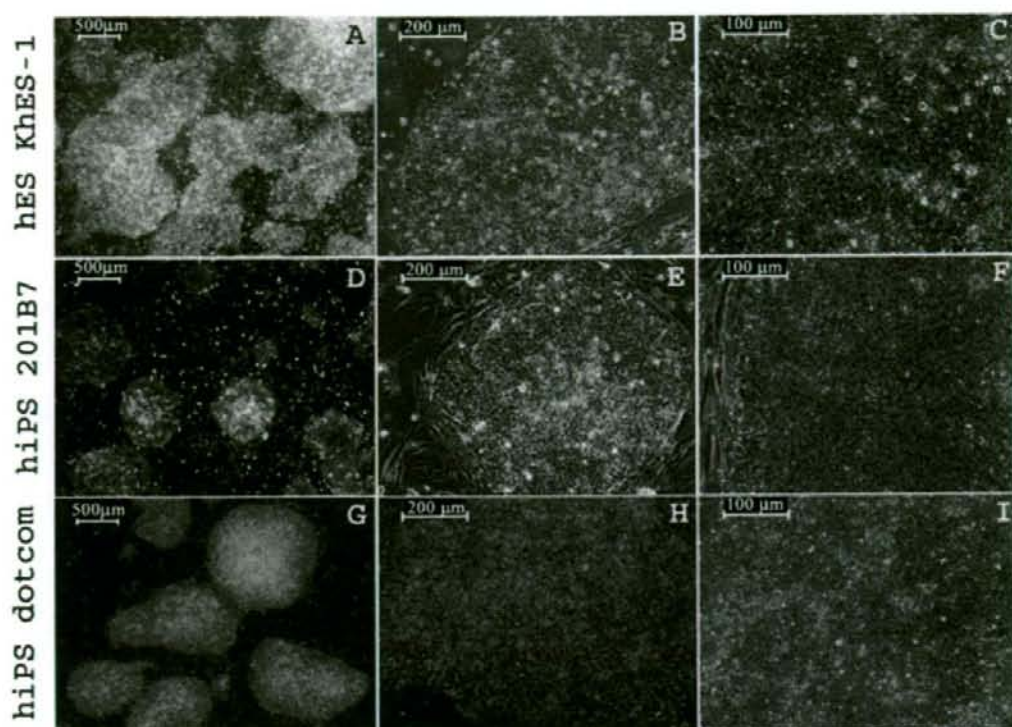


図1:

A~C: hES khES-1 京都大学再生医科学研究所により分配されたヒトES細胞 khES-1.

D~F: hiPS 201B7; 物質-細胞統合システム拠点 iPS細胞研究センター/再生医科学研究所・山中伸弥教授から共同研究契約により提供されたヒトiPS細胞 201B7 clone.

G~I: hiPS Dotcom; 国立成育医療センター生殖医療研究部梅澤明弘部長より寄託されたヒトiPS細胞 Dotcom clone

(Tissue Culture Research Communications, 27:139-147(2008) 図1より)

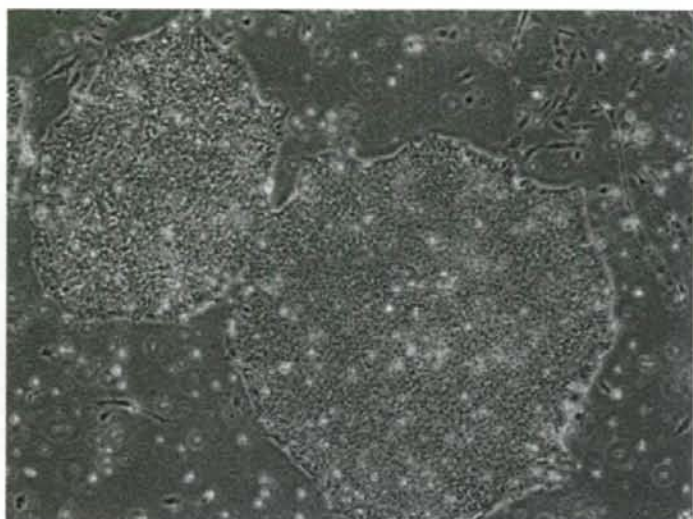


図2: hESF9で培養を行ったkhES-1

iPS 細胞を効率よく作製し、さらに効率よく目的の体細胞に分化させる技術の開発研究

分担研究者 高橋 一朗 (医薬基盤研究所・生物資源研究部遺伝子資源研究室)
分担研究者 亀岡 洋祐 (医薬基盤研究所・生物資源研究部遺伝子資源研究室)
分担研究者 長田 直樹 (医薬基盤研究所・生物資源研究部遺伝子資源研究室)

研究要旨

iPS 細胞作製の効率は 0.2% 前後で現時点では、基本の 4 遺伝子を導入して体細胞を iPS 細胞に変換するのはかなり低い。この効率を上昇させることは、iPS 細胞の応用という面で多大な力となる。しかし現実に基本の 4 遺伝子を導入して iPS 細胞を作る系を確立していないと比較ができないので、基本の系で iPS 細胞の作製に現在取り組んでいるところである。

A. 研究目的

iPS 細胞はヒト ES 細胞と同様に自己増殖能と多分化能をもつが、ヒト ES 細胞のようにヒト初期胚から作製するわけではないので、倫理的な問題を回避することができる。ただし、基本的には体細胞に 4 遺伝子を導入し遺伝子発現を再プログラミングして ES 細胞様の自己増殖能と多分化能を持った細胞を得ることである。この過程ははなはだ効率が悪くほしい 0.2% 前後である。

そこで、できるだけ効率よく体細胞を iPS 細胞化する技術を確立することは、iPS 細胞を分化させて様々な体細胞にする技術とともに、iPS 細胞の応用という意味で重要であるので本年度は基本的な方法で iPS 細胞の作製を試みる。

B. 研究方法

iPS 細胞化において最初に報告された 4 遺伝子 (POU5F1, SOX2, KLF4, c-MYC) をレトロウィルスベクターに組み込んでパッケージング細胞に導入することで、それぞれの 4 遺伝子に対応した組換えレトロウィルスを作製し、ヒトの体細胞に感染させて体細胞が再プログラミングすることで ES 様細胞となった細胞を選択する。その ES 細胞様の iPS 細胞については、遺伝子発現状態を解析する。

C/D. 結果および考察

現在作製に取り組んでいるところで、iPS 様の細胞が得られるに至っていないので、解析はできていない。基本的な 4 遺伝子を導入する系で iPS 細胞が得られるということが確認できたところで、効率のよい方法—たとえば DNA のメチル化の阻害剤などの添加—を検討していく予定である。あわせて、発現している遺伝子、発現が抑えられている遺伝子の解析を詳細に行うことで、効率のよい誘導法そして分化法を検討していく。

E. 結論

現在、基本的な 4 遺伝子 (POU5F1, SOX2, KLF4, c-MYC) を公知の細胞に導入して iPS 細胞の作製に取り組んでいるところである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表(論文発表)

関係論文なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

図1. 組換えウイルス作製方法

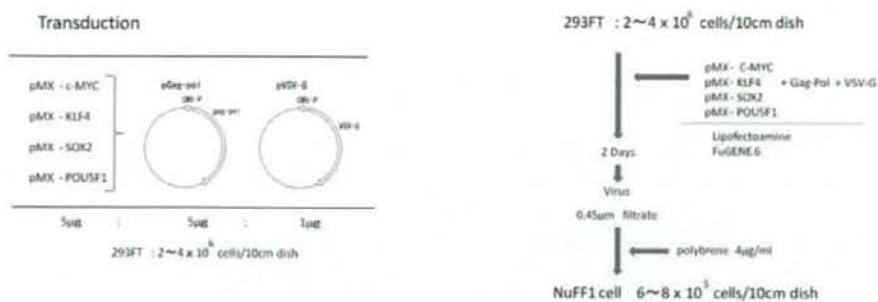
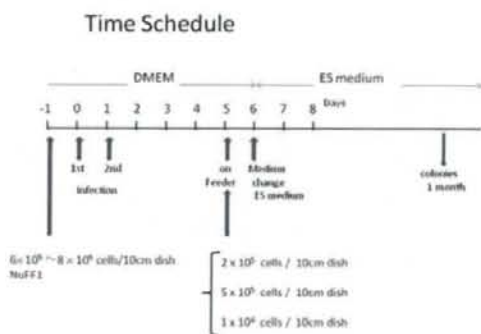


図2. iPS 細胞作製スケジュール



ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構築のための基盤研究

分担研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

研究要旨 医薬品開発における細胞を用いた *in vitro* での様々な安全性・有効性評価はヒト iPS 細胞の登場に伴い期待が高まってきている。これまでの我々はヒト間葉系幹細胞の樹立、機能解析し、安定した幹細胞培養条件の開発を行ってきた。そこで本研究ではこうした実績と経験を生かし創薬研究への応用が期待されているヒト iPS 細胞並びにヒト胚性・体性幹細胞に関して、医薬品開発に応用可能な新しい安全性・有効性の細胞評価系開発のための基盤研究を担当する。具体的にはヒト iPS 細胞等の幹細胞の再現性ある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発を行う。本年度はヒト胎児肺組織由来細胞から樹立した iPS 細胞を用いて未分化マーカーの発現解析並びに免疫組織化学的解析を行い、培養行程における未分化評価法のための基盤を確立した。また iPS 細胞における無フィーダー無血清培地による安定培養のための培養条件の検討を行った。

A. 研究目的

創薬における医薬品候補物質の効率的なスクリーニングを図るうえで、生体組織に近い性質・機能を有した幹細胞を用いた評価系の確立は重要な課題である。そのため幹細胞の再現性や安定供給にむけた培養条件の開発、またその安全性・有効性の評価系の確立が必要である。そこで本研究では創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質管理法の開発を目的とする。

B. 研究方法

(1) 未分化性安定評価法開発

幹細胞の未分化マーカーの発現プロファイルを定量PCRにより評価する。また細胞表面マーカーについて免疫組織学的解析を行う。

(2) 培養技術の標準化

ヒト iPS 細胞を、無フィーダー無血清条件下で安定的に培養可能な培地組成を検討する。この条件下で培養した細

胞と従来方法で培養した細胞において (1) で示した未分化細胞表面マーカーにより検定する。

C. 研究結果

(1) 未分化性安定評価法開発

ヒト胎児肺組織由来 MRC-5 細胞から樹立した iPS 細胞について、未分化マーカーである *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *TERT* の遺伝子発現を、ヒト ES 細胞での発現を基準として定量PCRを行った。その結果未分化マーカーの発現は ES 細胞と比較していずれも同等もしくはそれ以上の発現が認められた。さらに免疫組織学的解析において表面マーカーである *Tra-1-60*, *SSEA-4* の発現が確認できた。一方導入遺伝子の発現はサイレンシングされていた。またヒト iPS 細胞の発現パターンは、ES 細胞と比較してそれぞれのクローン間において多様であることが明らかとなった。

(2) 培養技術の標準化

これまで有していたヒト幹細胞 (ES 細胞や間葉系幹細胞) の培養実績や遺伝子発現解析に基づき、ヒト iPS 細胞を無フィーダー無血清培地によって安定的に培養する方法について検討した。その結果ヒト