

200911007A

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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川端健二

平成22（2010）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21年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 川端健二

平成22（2010）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・医療応用に関する基盤技術開発研究	----- 20
古江-楠田 美保	
ヒト ES /iPS 細胞の品質管理に関する研究	----- 30
小原 有弘	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 39
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 サブプロジェクトリーダー

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 ES 細胞および間葉系幹細胞を用い、以下の結果を得た。

- (1) ヒト ES 細胞を異なる分散方法（ディスパーゼ、コラゲナーゼ、トリプシンおよび物理的方法）を用いて5回継代した時の、ヒト ES 細胞の品質に対する影響を検討した。細胞表面抗原の解析により、トリプシンを用いて継代した時は未分化ヒト ES 細胞の品質への悪影響が示唆された。
- (2) ヒト ES 細胞培養技術のプロトコール化を行うことにより、細胞の維持が安定し、研究を進めることが可能となった。また、間葉系幹細胞の無血清培養も可能であることが示され、臨床応用に向けて、正確な品質評価を行うことが可能であることが示唆された。
- (3) ヒト iPS 細胞 5 株の培養を行い G-band 法による核型解析を行うとともに、細胞から DNA を抽出し、アレイ CGH 解析を実施した。核型解析によりヒト iPS 細胞数株に異常があることが認められたため、m-FISH 法により詳細解析を行うことにより、染色体異常の詳細な情報が得られた。また、アレイ CGH 解析においては核型解析で判明した異常部位をより詳細に同定することができた。

本研究から、ヒト ES 細胞の品質管理において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

古江一楠田美保 (独) 医薬基盤研究所  
研究リーダー

小原有弘 (独) 医薬基盤研究所  
研究員

## 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

古川智久 (独) 医薬基盤研究所  
リサーチレジデント

田代克久 日本学術振興会  
特別研究員

平山知子 (独) 医薬基盤研究所  
技術補助員

林田みどり (独) 医薬基盤研究所  
技術補助員

小澤裕 (独) 医薬基盤研究所  
技術補助員

塩田節子 (独) 医薬基盤研究所  
技術補助員

大谷梓 (独) 医薬基盤研究所  
技術補助員

## 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所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った。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。

## B. 研究方法

### B.1 ヒト ES 細胞の分散方法の違いによる品質への影響

#### (1) ヒト ES 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 KhES-1 (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  $\beta$ -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。通常の維持培養は、5-6 日ごとにディスペーゼを用いてヒト ES 細胞コロニーを分散して回収後、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。

#### (2) ディスペーゼを用いた継代方法

培地を取り除き、1mg/ml のディスペーゼ (Roch) を加えて 37°C で 5-10 分間処理した。コロニーのふちがはがれ始めたならディスペーゼを取り除き、培地を添加した。ピペッティングで 10ml チューブに移し、300rpm、4°C で 2 分間遠心して上清を取り除き、新しい培地に懸濁した。さらに 300rpm、4°C で 2 分間遠心して新しい培地に (単細胞にしないように) 懸濁し、MEF を播種した dish 上に継代した。

#### (3) コラゲナーゼを用いた継代方法

培地を取り除き、1mg/ml のコラゲナーゼ IV (Invitrogen) を加えて 37°C で 5-10 分間処理した。コロニーのふちがはがれ始めたならコラゲナーゼを取り除き、培地を添加し、スクレイパーを用いて細胞をはがした。ピッペ

ッティングで 10ml チューブに移し、50g、4°C で 3 分間遠心して上清を取り除き、新しい培地に (単細胞にしないように) 懸濁し、MEF を播種した dish 上に継代した。

#### (4) トリプシンを用いた継代方法

PBS で洗浄後、0.05%トリプシン・1mM EDTA を加え、顕微鏡下で観察し、細胞がはがれてきたら培地を添加した。ピペッティングで 10ml チューブに移し、300rpm、4°C で 2 分間遠心して上清を取り除き、新しい培地に (単細胞にしないように) 懸濁し、MEF を播種した dish 上に継代した。

#### (5) 機械的方法を用いた継代方法

StemPro EZPassage Disposable Stem Cell Passaging Tool (Invitrogen) を用いてコロニーを切断した後、ピペッティングで 10ml チューブに移し、300rpm、4°C で 2 分間遠心して上清を取り除き、新しい培地に (単細胞にしないように) 懸濁し、MEF を播種した dish 上に継代した。

#### (6) 細胞表面抗原の FACS 解析

細胞を FACS 用固定液にて室温で 10 分間固定後、5%ウシ血清/PBS にて室温で 15 分間ブロッキングを行った。未分化ヒト ES 細胞に発現する SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Tra-2-54 (Alkaline Phosphatase)、分化マーカーである SSEA-1、A2B5、CD56 および間葉系幹細胞のマーカー CD90 (Thy-1)、CD105 (Endogrlin) などに対する抗体を用いて、室温にて 30 分間反応させ、5%ウシ血清/PBS にて洗浄後、二次抗体と 30 分間反応させ、5%ウシ血清/PBS にて洗浄し、BD FACSCanto™ (ベクトンディッキンソン) にて解析を行った。



## B.2 ヒト ES 細胞培養のプロトコール化、 間葉系幹細胞との比較

### (1) ヒト ES 細胞培養のプロトコール化

ヒト ES の培養において細胞分散法がもっとも難しいと言われている。シングルセルにしてしまうと、ほとんどの細胞がアポトーシスにより生存できないため、コロニーを 50～100 個ぐらいのコロニー断片にして継代を行う。継代時の細胞分散は、機械的方法と酵素による方法に大別される。機械的な方法が最もよいとされているが、酵素による方法は、均一に細胞分散でき、簡便である。一方、分散方法によっては分化しなくなる、あるいは、染色体異常となるなど、細胞分散方法による様々な現象がヒト ES 細胞研究者の間では知られている。再生医療研究を行うためには、多くの研究者が培養できることが成果の推進につながる。細胞資源研究室では、京都大学樹立ヒト ES 細胞・KhES-1、KhES-3、H9 細胞を用いて、大学院生でも培養できるように、ヒト ES 細胞培養のプロトコール作成を行った。

### (2) ヒト ES 細胞ならびに間葉系幹細胞の比較

ヒト ES 細胞ならびに MSC の細胞表面抗原発現プロファイルを Flow cytometry にて解析を行った。すなわち、細胞を FACS 用固定液にて室温で 10 分固定後、5%ウシ血清/PBS にて室温 15 分ブロッキングを行った後、MSC マーカー CD90 (Thy-1)、CD105 (Endogrin) および CD44、CD45、CD73、CD34 に対する抗体を用いて、また、未分化ヒト ES 細胞に発現する SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、Tra-2-49、間葉系幹細胞のマーカーである

CD90、CD105、分化マーカーである SSEA-1、A2B5、CD56 などに対する抗体を用いて、室温にて 30 分反応させた後、5%ウシ血清/PBS にて洗浄後、二次抗体と 30 分反応させ、5%ウシ血清/PBS にて洗浄し、BD FACSCanto™(ベクトンディッキンソン、USA)にて解析を行った。

### (3) MSC の無血清培養条件の開発

ヒト ES、MSC 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。これまでに、ヒト 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無血清培養条件 hESF9 を開発した。次に、その汎用性を評価するために、京都大学樹立ヒト ES 細胞・KhES-1、KhES-3、また、不死化 MSC 株 UE7T-13 細胞 (JCRB1154)間葉系幹細胞を用いて、無血清培地の検討を行った。

### (倫理面への配慮)

ヒト ES 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。ヒト ES を使用した研究は、文部科学省の指針に従い行っており、ヒト ES は、動物胚に移植を行っていない。

## B.3 ヒト iPS 細胞染色体の詳細解析

### (1) 細胞培養

染色体の解析には、ヒト胎児肺由来線維芽細胞、MRC-5 細胞ならびに MRC-5 に遺伝子導入することによって樹立されたヒト iPS 細胞 5 株、Dotcom (JCRB1327)、Squeaky (JCRB1329)、Tic (JCRB1331)、Lollipop (JCRB1336)、Toe (JCRB1338) を使用した。

## (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 (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  $5 \times 10^6$  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 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  $5 \times 10^6$  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 Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いた。抽出した Genomic DNA を制限酵素 (NspI, StyI) 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。



## C. 研究結果

### C.1 ヒト ES 細胞の分散方法の違いによる品質への影響

ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞と異なり、継代時に単細胞にしてしまうと生存率が激減してしまうため、コロニーの状態でも継代する。ヒト ES 細胞を分散させる方法には、物理的に細胞を分離する方法やコラゲナーゼなどの酵素を用いる方法など複数の方法があるが、分散方法の違いによってヒト ES 細胞の品質がどのように変化するかは明確でない。そこで、ヒト ES 細胞 (KhES-1) の分散方法を変えて継代・維持した時の、ヒト ES 細胞の品質に対する影響を検討した。

ヒト ES 細胞を酵素によって分散させる方法としては、ディスパーゼ、コラゲナーゼ、およびトリプシンの 3 種類の酵素を用いた。また物理的に分散させる方法としては、容易に分散可能な StemPro EZPassage Disposable Stem Cell Passaging Tool (EZPassage) を用いた。ディスパーゼ、コラゲナーゼおよび EZPassage を用いた時は 1:5 となるように継代し、トリプシンを用いた時は生存率が低かったため 1:3 となるように継代した。KhES-1 細胞株はトリプシンを用いて分散させても培養可能であったが、コロニーを分散させ過ぎないように顕微鏡下で観察しながらトリプシン処理を行った。各分散方法を用いて 5 日毎に 5 回継代を繰り返した後、FACS を用いて細胞表面抗原の解析を行った。(Fig. 1)

その結果、未分化ヒト ES 細胞で発現している SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 や Tra-1-81 などの未分化マーカー遺伝子は、どの方法を用いた時においても発現が確認された。一方、未分化ヒト ES 細胞では通常発現していない SSEA-1 の分化マーカー遺伝子は、ディスパー

ゼ、コラゲナーゼおよび EZPassage を用いて継代を繰り返した時には発現が見られなかったが、トリプシンを用いて継代を繰り返した時には発現が見られた。よって、トリプシンを用いて継代を繰り返した時にはヒト ES 細胞の分化が進み、品質への悪影響が示唆された。

### C.2 ヒト ES 細胞培養のプロトコール化、間葉系幹細胞との比較

#### (1) ヒト ES 細胞培養のプロトコール化

ヒト ES 細胞株・KhES-1、KhES-3、H9 を用いて、現在広く用いられているフィーダー細胞と KSR を用いた培養条件下に、① 機械的方法、② コラゲナーゼ、③ EDTA、④ トリプシン/EDTA、⑤ トリプシン/コラゲナーゼ (CTK)、⑥ ディスパーゼ、⑦ アクチュターゼ™を用いて継代を行った。

#### ① 機械的、いわゆる mechanical による継代方法

染色体変異が少なく、分化能や未分化性の維持がもっとも良いといわれる方法である。KhES-1 や KhES-3 細胞の機械的継代培養は、熟練した技術が必要であり、プロトコール化が難しい。

#### ② コラゲナーゼ

国際的には 0.1%コラゲナーゼ IV とセルスクレーパーを用いる方法が一般的に使用されている。培地を除き、0.1%コラゲナーゼ IV を 1ml 加えて 37°C のインキュベーターに入れて約 10 分程度処理した。時間は酵素活性によるが、時々、顕微鏡下で観察し、フィーダーとコロニーの間に間隙ができる程度になったら、コラゲナーゼを吸引し、新しい培地を 2~3ml 加えてからセルスクレーパーで細胞をはがした。培地をさらに 7ml 程度加えて

フィーダーとコロニーを引き離すように、ピペティングを数回行った。分散については問題がないが、動物由来成分を含んでいるため、再生医療応用には不適であると考えられる。

#### ③ EDTA

0.1~0.2% EDTA で処理すると、適度な大きさにコロニーが分散され、未分化なコロニーだけが回収できた。分化した細胞集団から未分化なコロニーを選択する際に使用できた。しかし、EDTA に対する感受性は細胞株によって異なり、KhES-1 や KhES-3 は、シングルセルになり、使用できなかった。

#### ④ トリプシン/EDTA

ヒト ES 細胞はトリプシンに弱く、0.05% トリプシン/1mM EDTA を使用した。細胞の多くがアポトーシスを起こして死滅した。

#### ⑤ トリプシン/コラゲナーゼ (CTK)

日本国内では末盛らにより開発された  $[Ca^{2+}]$  で活性を弱めたトリプシンとコラゲナーゼとの混合液 CTK が使用されている。処理時間も短く簡便であったが、適度で均一な大きさのコロニーにするためには若干の熟練を要するため、標準方法として使用は難しい。

#### ⑥ ディスパーゼ

合同酒精が自然界より分離選択したバチルス属の菌株の培養液より精製したプロテアーゼで、トリプシンやコラゲナーゼより穏やかに細胞を分散できた。iPS 細胞に比べて、早く細胞が剥離されるものの、細胞がシングルセルになることが少なく、また、フィーダー細胞と凝集塊を作成することも少なく、安定した技術となりえると考えられた。

#### ⑦ アクユターゼ™

ミリポアから販売されているプロテアーゼ、コラーゲン分解酵素による細胞剥離剤と

されているが組成は明らかにされていない。ヒト ES 細胞は通常シングルセルとなると増殖できないが、この分散液を使用した場合には、ヒト ES をシングルセルにしても細胞が増殖した。しかし、KhES-1 や KhES-3 細胞では分化細胞が大量に出現した。

以上の結果から、ヒト ES 細胞のフィーダー細胞と KSR を用いた条件下においては、ディスパーゼを用いた細胞分散法が、技術に依存性が少なく、安定して培養できる方法であると示唆された。

#### (2) ヒト ES 細胞ならびに間葉系幹細胞 MSC の比較

ヒト ES 細胞 KhES-1、ヒト胚性がん(EG)細胞 PA-1、iPS 細胞 JCRB1327、JCRV1329、JCRB1331、ヒト胚・肺由来細胞 MRC-5、間葉系幹細胞 JCRB1110 におけるヒト ES 未分化マーカー、分化マーカー、間葉系幹細胞マーカーの発現プロファイルを、FACS を用いて解析を行った。その結果、ヒト ES 細胞、iPS 細胞は SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81、Tra-1-49 などの未分化マーカーを発現していた。間葉系幹細胞 JCRB1110 においては、CD90、CD105 の発現が認められた。しかし、MRC-5 においても、CD90、SSEA-4、Tra-2-49 の発現が認められた。

#### (3) KhES-1、KhES-3、UE7T13 の無血清培養

ヒト ES 細胞 KhES-1、KhES-3、MSC・UE7T-13 をヒト ES 細胞用無血清培地 hESF9 培地を用いて培養を試みた。KhES-1、KhES-3 を無血清培養を行ったところ、海外の細胞に比べて接着するまでの時間を要したが、hESF9 培地で継代維持が可能であった。また、UE7T-13 は、先行研究により TGF-beta を添加した hESF-10

にて増殖可能であることを示している。しかし、この培地には、アスコルビン酸を含む。アスコルビン酸は骨分化に関与するといわれており、ヒト ES 細胞用無血清培地 hESF9 培地からアスコルビン酸を除いた hESF-differ 培地を用いて、細胞増殖への影響を検討した。その結果、アスコルビン酸は、MSC の細胞増殖を促進することが明らかとなった。

### C.3 ヒト iPS 細胞染色体の詳細解析

#### (1) アレイ CGH の感度・再現性確認

前年度までの検証したマイクロアレイとは異なる高密度なアレイ Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を使用したため、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) ヒト iPS 細胞の G-band 法による染色体解析

培養を行ったヒト胎児肺由来線維芽細胞、MRC-5 ならびに MRC-5 に遺伝子導入することによって樹立されたヒト iPS 細胞 5 株、Dotcom (JCRB1327)、Squeaky (JCRB1329)、Tic (JCRB1331)、Lollipop (JCRB1336)、Toe (JCRB1338) においては染色体数解析を行ったところ、いずれも 46 本と正常な数であっ

たが、Squeaky、Lollipop、Toe に染色体の増幅を伴う異常が認められた。Dotcom、Tic には異常が認められなかった。

#### (3) ヒト iPS 細胞の mFISHd 法による染色体解析

次に、G-band 法によって異常が認められた Squeaky について mFISH 法による染色体解析を行ったところ、17 番染色体長腕の一部が 22 番染色体短腕に増幅しているのが明らかとなった。

#### (4) ヒト iPS 細胞のアレイ CGH によるゲノム詳細解析

培養を行ったヒト胎児肺由来線維芽細胞、MRC-5 ならびに MRC-5 に遺伝子導入することによって樹立されたヒト iPS 細胞 5 株、Dotcom (JCRB1327)、Squeaky (JCRB1329)、Tic (JCRB1331)、Lollipop (JCRB1336)、Toe (JCRB1338) より DNA を抽出し、Affymetrix 社製 Genome-Wide Human SNP Array 6.0 にて解析を実施した。今回コントロールとしたデータは HapMap プロジェクトにおける 270 人分のゲノムデータをコントロールとして比較したところ、ゲノム全体においては親株である MRC-5 と共通の変動を示す領域が認められた。また、株同士の比較においては先の染色体解析において異常が認められた Squeaky、Lollipop、Toe の 3 株において大きな変動(ゲノムの増幅)が認められた。より詳細に解析結果を見てみると非常に多くの部位でゲノム変化が認められ、細胞株のプロファイル情報として非常に有用なデータが蓄積できた。

#### D. 考察

本研究では、ヒト ES 細胞を異なる分散方法（ディスパーゼ、コラゲナーゼ、トリプシンおよび物理的方法）で継代・維持した時の、ヒト ES 細胞の品質に対する影響を検討した。細胞表面抗原の解析により、トリプシンを用いて分散した時は、分化マーカーである SSEA-1 の発現が見られるようになり、未分化ヒト ES 細胞の品質への悪影響が示唆された。他の3つの方法で分散した時は SSEA-1 の発現が見られなかったことから、ヒト ES 細胞の品質維持には、分散方法の選択が重要であることが示された。

これまで、日本はマウス ES 細胞を用いた研究においては、世界をリードしてきた。2007年にヒト iPS 細胞が発表され、国際的にヒト幹細胞研究がさかんとなってきた。ところが、米英や中国、韓国に比べて、ヒト ES 細胞研究の経験の少ない日本は国際的には不利な状況にある。ヒト ES 細胞は、従来と異なる特徴をもち、培養維持には技術と経験を有する。また、絶対的なマーカーは発見されておらず、絶対的な評価方法も発明されていない。また、株間の差も大きい。培養の方法も、絶対的なものではなく、培養の状態にあわせて適時対応する必要がある。

国内では、ES 細胞だけでなく、iPS 細胞も含めて、分散はトリプシンとコラゲナーゼの混合液を使用する方法が汎用されている。しかし、この方法は、高い培養技術を必要とする。特に、ヒト ES 細胞のトリプシン・コラゲナーゼを用いた細胞分散は大変難しい。そのため、海外でも最近よく使用されているディスパーゼを用いる培養法を取り入れた。それにより、経験のない研究者であっても安定してヒト ES 細胞の培養ができるようになった。

た。

ヒト ES 細胞は、組成が公開されていないものの無血清培地で培養が行われている。一方、間葉系幹細胞は、一般的に血清を添加した条件で培養されている。これまでに、別の先行研究において、hESF9 培地に TGF-ベータを添加した培地において間葉系幹細胞の増殖が認められることを明らかにしてきた。しかし、同培地には骨分化を促進すると考えられるアスコルビン酸を含んでいる。分化を促進する可能性も懸念されたが、MSC の細胞増殖を促進することが明らかとなり、無血清培養下においては、作用が異なることが予想される。今後、詳細な検討を行って、臨床へ応用したいと考えている。

また本研究では、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。健常成人のゲノム解析を行うとタンパクの機能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

究ではアレイ 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、細胞のキャラクタライズを行った。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。本研究において使用した Affymetrix 社製 Genome-Wide Human SNP Array 6.0 の検出感度を確認したところ、2 割程度のゲノム量の変化を解析することが十分可能であることが確認出来た。全ての細胞において変異が起こり、ゲノム量が増加した場合には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。本研究の結果から細胞のキャラクターを解析するのに十分な検出感度であることが明らかとなった。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。

本研究においてはヒト胎児肺由来線維芽細胞、MRC-5 ならびに MRC-5 に遺伝子導入することによって樹立されたヒト iPS 細胞 5 株、Dotcom (JCRB1327)、Squeaky (JCRB1329)、Tic (JCRB1331)、Lollipop (JCRB1336)、Toe (JCRB1338) の染色体解析ならびにアレイ CGH 解析を実施した。親株である MRC-5 においては大きな染色体の異常は観察されず、正常細胞といえる状態であった。アレイ CGH 解析においては HapMap プロジェクトにおける 270 人をコントロールとした場合、親株である MRC-5 も非常に多くの部位でゲノムの増減が観察されたが、その多くは既にコピーナンバーバリエーションが報告されている部位であり、個人によってゲノムの増減がある場所であった。これは個人の遺伝情報における違い、個性ともとれるものであり、これらの情報が

個人のプロファイルをする上で非常に重要である。先にも述べたように、このプロファイルの違いによって、ある疾患のリスクが高い人、低い人のように今後の情報集積によって明らかになると考えられる。一方、MRC-5 に遺伝子導入して樹立されたヒト iPS 細胞 5 株の解析においては、染色体本数に変化は認められなかったが、染色体の構造に異常が認められた細胞が3株検出された。異常が認められた3株においても17番染色体に共通の異常が認められ、これらはヒト iPS 細胞樹立時において染色体構造異常をもつ細胞が他の細胞よりも優先的に増殖した結果であると考えられる。17番染色体の増幅領域には乳がん原因遺伝子である BRCA1 やホメオティック遺伝子である HOXB、DNA ポリメラーゼ $\gamma$ 、プロテインキナーゼ C などが乗っており、これらの増幅による増殖アドバンテージに興味を持たれる(17番染色体短腕には癌抑制遺伝子 p53 が乗っているが、異常のあった3株には増幅は認められない)。また、12番染色体のトリソミーが認められたのは Toe のみであり、これにおいても同様に12番染色体上の遺伝子による増殖促進が考えられる。これらの詳細な解析により、iPS 細胞樹立時における構造異常を起こしやすい染色体領域が明らかとなり、正常な核型をもつ細胞選択をする際の指標として用いることが可能であると推測される。今後のデータの蓄積により起こりやすい染色体構造異常が特定できると期待される。

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。ヒト iPS 細胞が今日再生医療面で大きな期待を受けているのは、いろいろな組織への分化能を持っているからである。この研究で用いたヒト iPS 細胞株は

公的バンクから入手した細胞より樹立されたものであるが、これらの細胞を用いて基礎データを蓄積し、細胞の表現型と相互比較しながら詳細なゲノム解析を行うことによって細胞のプロファイル情報としての有用性を検討し、細胞の評価手法としての確立を目指す。



## E. 結論

(1) ヒト ES 細胞を異なる分散方法（ディスペラーゼ、コラゲナーゼ、トリプシンおよび物理的方法）で継代・維持した時の、ヒト ES 細胞の品質に対する影響を検討した。細胞表面抗原の解析により、トリプシンを用いて分散した時は、分化マーカーである SSEA-1 の発現が見られるようになり、未分化ヒト ES 細胞の品質への悪影響が示唆された。他の 3 つの方法で分散した時は SSEA-1 の発現が見られなかったことから、ヒト ES 細胞の品質維持には、分散方法の選択が重要であることが示された。

(2) ヒト ES 細胞培養技術のプトロコール化を行うことにより、細胞の維持が安定し、研究を進めることが可能となった。また、間葉系幹細胞の無血清培養も可能であることが示され、臨床応用に向けて、正確な品質評価を行うことが可能であることが示唆された。これらの成果は今後の研究の発展に寄与するものと思われる。

(3) 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 MRC-5（親株）およびヒト iPS 細胞の染色体解析の結果、ヒト iPS 細胞 3 株に染色体異常が認められた。また、アレイ CGH を用いた更なる詳細解析を実施することにより、細胞プロファイル情報として非常に有用なデータを取得することが出来、細胞評価法として重要な意味を持つことが明らかとなった。今後、細胞治療・再生医療の研究がますます盛んになるが、その細胞ツールとなる

ES 細胞や iPS 細胞を含めた幹細胞について、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るなければならないことをこの研究は警告している。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tashiro K., Kondo A., Kawabata K., Sakurai H., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 127-132, 2009
- 2) Yohei Hayashi, Miho Kusuda Furue, Satoshi Tanaka, Michiko Hirose, Noriko Wakisaka Hiroki Danno, Kiyoshi Ohnuma, Shiho Oeda, Yuko Aihara, Kunio Shiota, Atsuo Ogura, Shoichi Ishiura, and Makoto Asashima. BMP4 induction of trophoblast from mouse embryonic stem cells in defined culture conditions on laminin. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*. 1071-2690 (Print) 2009年12月24日(Online)
- 3) 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 2 分化能の評価, *Tissue Culture Research Communications*. 28:129-133. 2009.
- 4) 古江-楠田美保、山田 弘、水口裕之: iPS 細胞を活用した安全性・有効性評価系の構築、iPS 細胞の産業的応用技術 シーエムシー出版. 218-224. 2009
- 5) 古江一楠田美保: 第 5 章細胞周辺環境のための培養技術 1 培養液, 330-333 「ますます重要になる細胞周辺環境 (細胞ニッチ) の最新科学技術」—細胞の生存、増殖、機能のコントロールから創薬研究、再生医療まで— 遺伝子医学 MOOK 別冊 メディカル ドゥ 2009
- 6) Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, Macleod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI., Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*. 2010 in press.
- 7) Dirks WG, MacLeod RA, Nakamura Y, Kohara A, Reid Y, Milch H, Drexler HG, Mizusawa H., Cell line cross-contamination initiative: an interactive reference database of STR profiles covering common cancer cell lines. *Int J Cancer*. 126(1):303-4, (2010).
- 8) 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*. 45(5-6):290-9, (2009).

### 2. 学会発表

- 1) 川端健二、田代克久、水口裕之: iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、日本薬学会第 130 年会シンポジウム、岡山、2010 年 3 月 28-30 日

日

- 2) 高山和雄、稲村充、形山和史、古江一楠  
田美保、川端健二、水口裕之：SOX17 遺  
伝子の導入によるヒト iPS 細胞からの効  
率良い内胚葉系細胞への分化誘導、日本  
薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月  
28-30 日
- 3) 田代克久、稲村充、形山和史、櫻井文教、  
古江一楠田美保、川端健二、水口裕之：  
アデノウイルスベクターを用いた未分化  
ヒト ES/iPS 細胞への高効率遺伝子導入、  
日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3  
月 28-30 日
- 4) 田代克久、稲村充、古川智久、川端健二、  
櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之：  
Adenovirus vector-mediated efficient  
transduction into human induced  
pluripotent stem cells.、第 32 回分子  
生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12  
日
- 5) 古川智久、川端健二、形山和史、水口裕  
之：Induction of human iPS cells using  
2A peptide based polycistronic  
lentivirus vectors.、第 32 回日本分子  
生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9-12  
日
- 6) 稲村充、川端健二、櫻井文教、形山和史、  
林田みどり、松村紘子、古江一楠田美保、  
水口裕之：未分化ヒト ES 細胞から中内胚  
葉へのラミニンによる分化促進効果、第  
8 回次世代を担うファーマ・バイオフォー  
ラム 2009、名古屋、2009 年 11 月 14-15  
日
- 7) 川端健二、田代克久、水口裕之：アデノ  
ウイルスベクターを用いた iPS 細胞へ  
の遺伝子導入の最適化と分化誘導、第 82  
回日本生化学会大会シンポジウム、神戸、  
2009 年 10 月 21-24 日
- 8) Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura,  
Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai,  
Hiroyuki Mizuguchi : Adipocyte and  
Osteoblast Differentiation from Mouse  
Induced Pluripotent Stem Cells by  
Efficient Adenoviral Transduction, 7<sup>th</sup>  
Annual Meeting of International  
Society of Stem Cell Research,  
Barcelona, Spain, 2009 年 7 月
- 9) Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata,  
Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama,  
Midori Hayashid, Hiroko Matsumura,  
Furue Miho, Hiroyuki Mizuguchi :  
Laminin promotes human embryonic stem  
cell differentiation into  
mesodendoderm, International Society  
for Stem Cell Research, Barcelona,  
Spain, 2009 年 7 月
- 10) 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 細胞への高効率遺伝子導入  
法の確立と分化誘導への応用、第 25 回日  
本 DDS 学会学術集会、東京、2009 年 7 月  
3-4 日
- 11) 稲村充、川端健二、形山和史、梅澤明弘、

- 阿久津英憲、林田みどり、松村紘子、古江一楠田美保、水口裕之：ヒト ES 細胞や iPS 細胞からの内胚葉系細胞および肝細胞への分化誘導法の開発、第 16 回肝細胞研究会、山形、2009 年 6 月 26-27 日
- 12) 稲村充、川端健二、櫻井文教、形山和史、林田みどり、松村紘子、古江一楠田美保、水口裕之：未分化ヒト ES 細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果、日本組織培養学会第 82 回大会、栃木、2009 年 5 月 18-19 日
- 13) Daiki Tateyama, Naohiro Kimura, Midori Hyashida, Yutaka Ozawa, Hiroko Matsumura, Arihiro Kohara, Tetsuji Okamoto, Akihiro Umesawa, and Miho Kusuda Furue: Integrins expression profile in human ES and iPS cells in the defined culture conditions. 第 7 回 ISSCR スペイン バルセロナ
- 14) 古江一楠田 美保：ヒト ES、iPS 細胞における創薬応用のための標準化. 第 22 回日本動物実験代替法学会総会 大阪 11 月
- 15) 古江一楠田 美保、創薬応用のためのヒト ES、iPS 細胞の標準化. 日本組織培養学会第 82 回大会 シンポジウム(III) 創薬 茨木 5 月
- 16) 古江一楠田 美保：ヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞の細胞表面抗原発現による標準化. Standardization of human ES and iPS cells by analyzing cell surface antigens. 第 32 回日本分子生物学会 ワークショップ幹細胞と糖鎖 12 月 横浜
- 17) 古江一楠田美保：○スーパー特区採択課題に関する研究成果発表「iPS 細胞の毒性評価系への応用」「iPS 細胞の毒性評価系への応用」スーパー特区大阪フォーラム 平成 22 年 1 月 大阪
- 18) 古江一楠田美保：ヒト細胞・組織を創薬研究にどのように利用するか？－研究資源バンクの活用－「幹細胞（ES 細胞、iPS 細胞）の品質管理の現状と課題」ヒューマンサイエンス研究資源バンクセミナー 平成 22 年 1 月 大阪
- 19) 木村直大、古江一楠田美保、岡本哲治：無血清培養系を用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞の細胞増殖と未分化マーカーの発現に及ぼす増殖因子の影響. 第 63 回特定非営利活動法人 日本口腔科学会学術集会』4 月 浜松
- 20) 舘山 大揮 木村 直大 林田みどり 小澤 裕 松村 紘子 小原 有弘 Paul J Gokhale 岡本 哲治 梅澤 明弘 Peter W. Andrews 古江一楠田 美保：無血清培養下におけるヒト胚性幹細胞ならびに人工多能性幹細胞のインテグリン発現プロフィール. 日本組織培養学会第 82 回大会一般口演 茨木 5 月.
- 21) T Suzuki, A Kohara, A Ramadan, Y Kikuchi, M Honma, M Hayashi. Comparative study on in vivo genotoxicity of ochratoxin A and aristolochic acid as a causative for

the Balkan endemic nephropathy. 10th  
International Conference on  
Environmental Mutagens (ICEM) 8月 イ  
タリア フィレンツェ

22) A. Kohara, W. G. Dirks, H. G. Drexler,  
Y. Nakamura, M. Furue, M. Mizusawa  
Warning: The Serious Problem of  
Mistaken Identities of Cultured Human  
Cell Lines. 2009 In Vitro Biology  
Meeting 6月 アメリカ チャールスト  
ン

23) 鈴木孝昌、小原有弘、ラマダン アリ、菊  
池 裕、本間正充、林 真 バルカン腎症  
の原因物質としてのアリストロキア酸お  
よびオクラトキシン A 日本環境変異原  
学会第 38 回大会 ポスター 11月 静  
岡

24) Takayoshi Suzuki, Arihiro Kohara,  
Mieko Kogi, Shiori Tanabe, Masamitsu  
Honma. CGH array analysis on  
variations in chromosome 8  
amplifications containing c-myc in  
various cancer cell line. 第 68 回日  
本癌学会学術総会 ポスター 10月 横  
浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

名称：幹細胞から肝細胞への分化誘導方法

出願番号：特願 2009-247342

出願日：2009/10/28

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明者：水口裕之、川端健二、稲村充、古江美保

### 2. 実用新案登録

該当事項なし

### 3. その他

該当事項なし