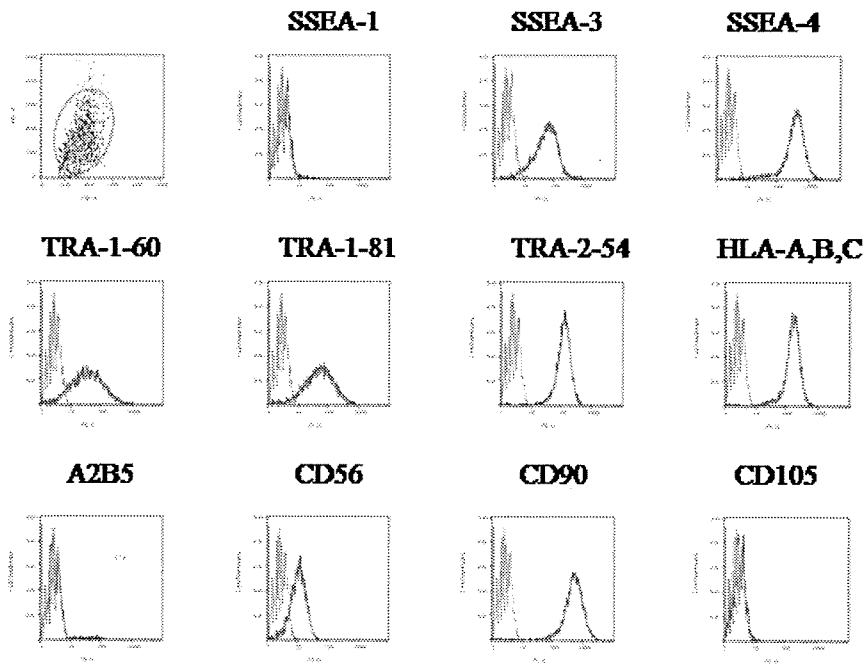


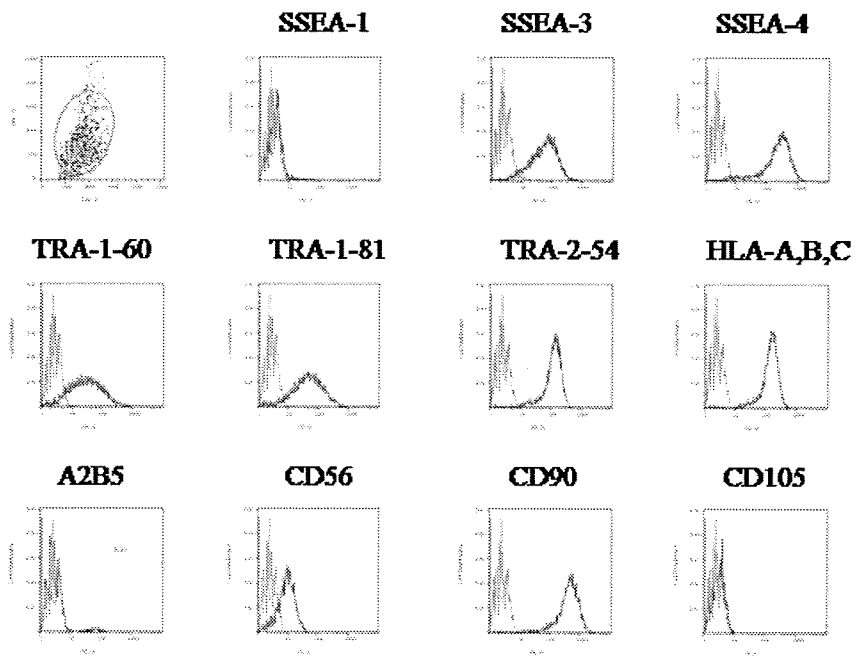
A

KhES-1 Dispase



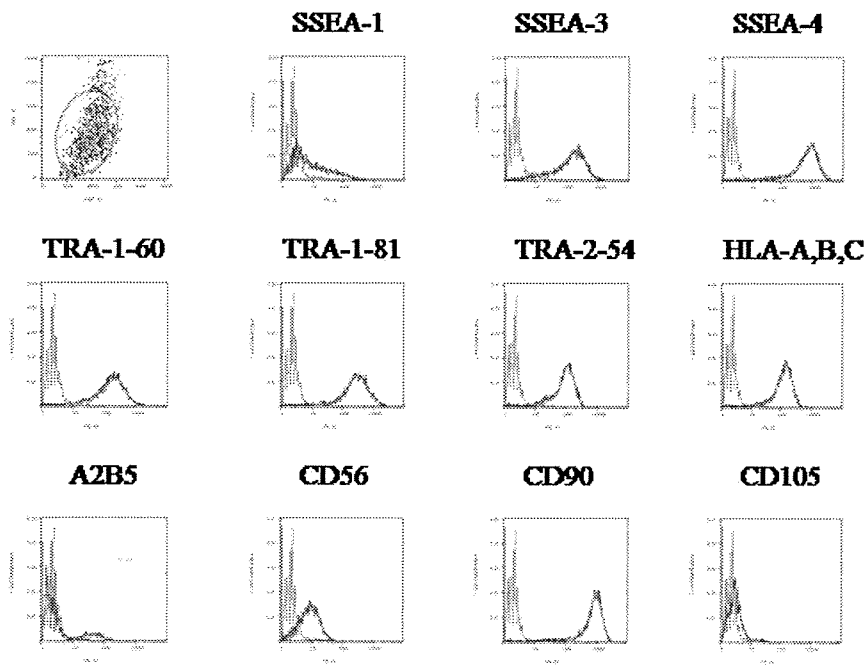
B

KhES-1 Collagenase+scraper



C

KhES-1 0.05%Trypsin+EDTA



D

KhES-1 Mechanical (EZpassage)

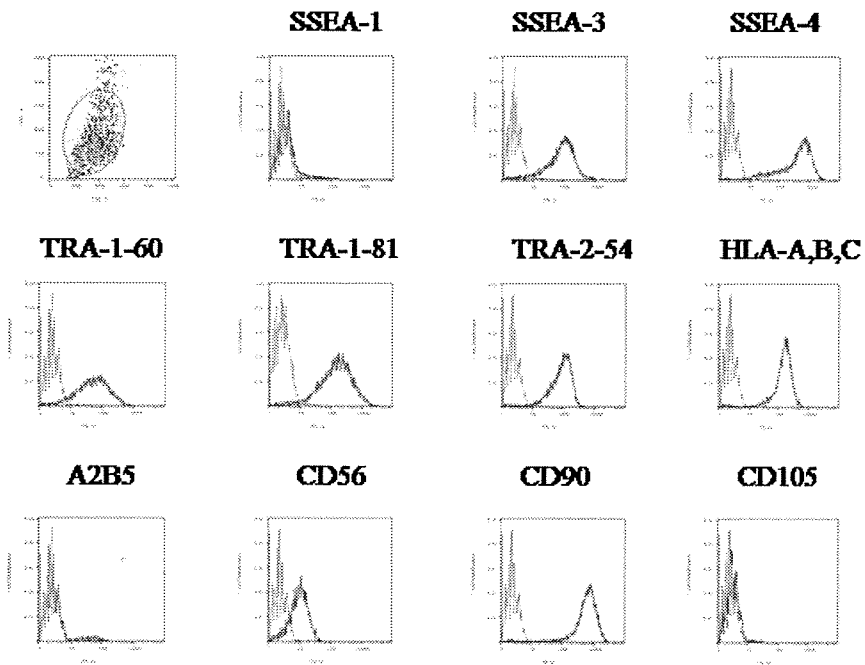


Fig. 1 FACS analysis of human ES cell surface markers.

Human ES cells were dissociated by using dispase (A), collagenase (B), trypsin (C) or StemPro EZPassage Disposable Stem Cell Passaging Tool (D) and passaged five times. Then, the surface markers of cells were analysed by flow cytometry.

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（分担）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

研究分担者 古江一楠田 美保

独）基盤研生物資源研究部 細胞資源研究室 研究リーダー

研究要旨:

安定的かつ安全な ES 細胞を供給するため、現在のところ混沌としているヒト ES 細胞の培養技術について、安定して使用可能なプロトコールの確立を目指した。特に、ES 細胞の安定性維持に重要な、継代時の細胞分散法の改良等を行った。また、ES細胞とともに注目されている間葉系幹細胞を含めて、細胞表面抗原の解析を行った。さらに、ヒトES細胞と同様に、間葉系幹細胞の無血清培養法開発についても検討を行った。

A. 研究目的

生体のあらゆる組織に分化する能力を有するヒト ES 細胞は、細胞分化のメカニズムの解明に大きな役割を果たしているとともに、再生医療における応用が期待されている。しかしながら、その培養法は十分に確立されているわけではない。また、培養系の様々な不定要素の存在によって、増殖因子・分化誘導因子の機能を正確に解析することができず、特定の細胞への分化を誘導するのが困難であり、さらに医療応用における安全性にも問題がある。このような問題点を解決するためには、血清・フィーダー細胞を使用しない、既知の因子による未分化能・多分化能を維持した長期培養系の確立が求められる。他の先行研究にて、その第一段

階として、マウス ES 細胞の未分化能と多分化能を血清とフィーダー細胞を用いずに維持可能な無血清培地・ESF7を開発した。さらに、この培地に改良を加えフィーダー細胞を用いない無血清培地 hESF9を開発した。しかし、ヒト ES 細胞は、染色体の不安定性、腫瘍化などの問題、また倫理的な課題もある。また、2007年に山中らにより、ヒトの皮膚細胞にレトロウイルスをベクターとして4遺伝子を導入することによりヒト ES 細胞に匹敵する人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cell: iPS 細胞) が開発された。ヒト iPS 細胞は倫理的問題を克服しているものの、腫瘍化の問題など依然として再生医療における課題が残っている。そのため注目を集め始めている

のが間葉系幹細胞 (mesencymal stem cells) である。近年、成体における組織の修復や維持に関与する MSC が存在すると考えられるようになった。従来、体性幹細胞は、ES 細胞とは異なり、存在する組織の細胞にのみ分化すると考えられてきたが、最近の研究により、体性幹細胞は由来組織以外の細胞にも分化しうること、さらには発生学的な起源である胚を越えた分化能力をもつことが明らかとなってきた。MSC は分化できる能力に制限はあるものの倫理的な問題も少なく、採取が容易であることから、国際的には再生医療への応用において安全性と可能性に期待が高まっている。しかし、国内においては、注目度は高くなく、十分に基盤的研究が進んでいるとは言えない。これまでに MSC の *in vitro* での増殖・分化の制御についても多くの報告がなされているが、血清添加培地や成分の明らかでない無血清培地など、色々な培養条件で検討されているため、比較検討が非常に困難となっている。このような問題を克服するためには組成の明らかな条件による培養法の標準化が急務であると考え。そこで、①ヒト ES 細胞の安定した培養技術のプロトコール化、②MSC の無血清培養条件の開発、③ヒト ES 細胞ならびに MSC の比較を行った。これにより、ヒト ES 細胞や MSC の未分化状態を高いレベルで維持可能となり、安全性・有効性の高い幹細胞の品質管理が達成され、再生医療に向けた細胞の提供が可能となる。

本研究により、ヒト ES 細胞や MSC 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有用と考えられ、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

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ィールを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、CD

73、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™(ペ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っており、ヒトESは、動物胚に移植を行っていない。

C. 研究結果

1. ヒトES細胞培養のプロトコル化：

ヒトES細胞株・KhES-1、KhES-3、H9(図1 a, b, c)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、③EDTA、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アキュターゼ™を用いて継代を行った。

①機械的、いわゆるmechanicalによる継代方法が、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、ピペッ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K

hES-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[C a²⁺]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。

表1. 分散法によるヒトES細胞KhES-3への影響:

分散法	継代後の形態	技術の熟練度
機械的	良好	高い
EDTA	不可	高い
コラゲナーゼ	やや良好	中程度
トリプシン/ EDTA	不可	—
CTK	技術差細胞死	中高程度
ディスパーゼ	良好	中程度
アキュターゼ	分化	中程度

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(EC)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(図2)。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。(図1 d) K

hES-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性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（図3）。

D. 考察

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ペ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。

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。

結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

【査読付】

(1) Yohei Hayashi, Miho Kusuda Furue,

Satoshi Tanaka, Michiko Hirose, Noriko Wakisaka Hiroki Danno, Kiyoshi Ohnuma, Shiho Oeda¹, Yuko Aihara⁵, Kunio Shiota³, Atsuo Ogura⁴, Shoichi Ishiura¹, 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)

(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2 分化能の評価, *Tissue Culture Research Communications*. 28:129-133. 2009.

【その他】

(3) 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

(4) 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

2. 学会発表

【国際学会発表】

(ポスター)

(1) Daiki Tateyama, Naohiro Kimura, Midori Hyashida, Yutaka Ozawa, Hiroko Matsumura, Arihiro Kohara, Tetsuji Okamoto, Akihiro Umesawa, and Miho Kusuda Furue: Integrins ex-

pression 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
(2) Inamura, Mitsuru, Kawabata, Kenji, Sakurai, Fuminori, Katayama, Kazufumi, Hayashida, Midori, Matsumura, Hiroko, Furue, Miho Kusuda, Mizuguchi, Hiroyuki: LAMININ PROMOTES HUMAN EMBRYONIC STEM CELL DIFFERENTIATION INTO MESODENDODERM. 第7回 ISSCR スペイン バルセロナ

【国内学会】

(シンポジウム・ワークショップ等)

(1) 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

(2) 古江-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

(3) 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

(5) 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

(6) 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

源バンクの活用ー「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

(一般演題)

(7) 木村直大、古江-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

(8) 館山 大揮 木村 直大 林田みどり 小澤 裕 松村 絃子 小原 有弘 Paul J Gokhale岡本 哲治 梅澤 明弘Peter W. Andrews 古江-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ァイル。日本組織培養学会第82回大会 一般口演 茨木 5月。

(9) Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama, Midori Hayashida, Hiroko Matsumura, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi. 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 一般口演 茨木 5月

(10) Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura, Norihisa Furukawa, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi: Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human induced pluripotent stem cells. 第32回日本分子生物学会 一般口演 12月 横浜

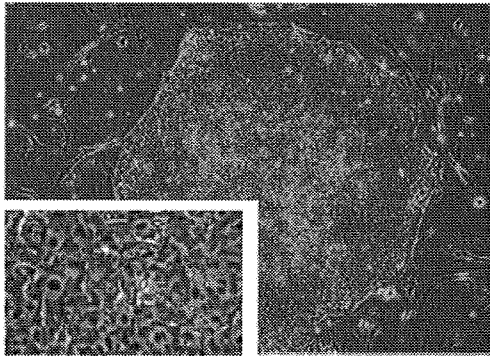
(11) 稲村 充、川端 健二、形山 和史、

梅澤明弘、阿久津英憲、林田 みどり、松村 絃子、古江-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 6月 山形

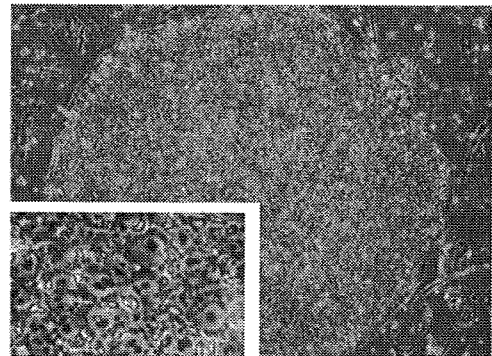
(12) 稲村 充、川端 健二、形山 和史、林田 みどり、松村 絃子、古江-楠田美保、水口裕之: 未分化ヒトES細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果。フォーラム・バイオフィオーラム2009

図1 ヒトES細胞の位相差顕微鏡像

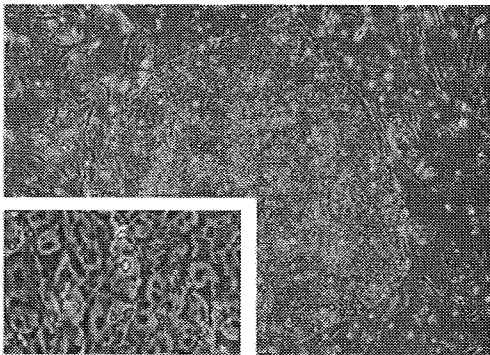
京都大学樹立ヒトES細胞KhES-1、KhES-3、ならびに海外（ウイスコンシン大学）樹立ヒトES細胞H9のフィーダー細胞上にKSRを含む培地で培養された細胞(a, b, c)および、ヒトES用無血清培地hESF9培地で培養された細胞(d)



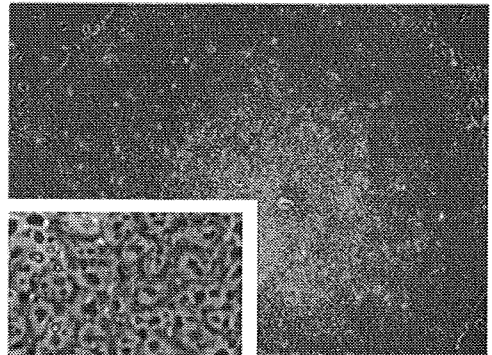
a) KhES-1 on MEF 40x, 200x
(p7+9+8+30+10)



b) KhES-3 on MEF 40x, 200x
(p7+9+12+4+11)



c) H9 on MEF 40x, 200x
(p26+3+12)



d) KhES-1 serum-free 40x, 200x
(p7+9+8+28+SP16)

図2. ヒトES細胞、胚性癌細胞、iPS細胞、胚肺由来線維芽細胞、間葉系幹細胞における細胞表面抗原プロファイル解析

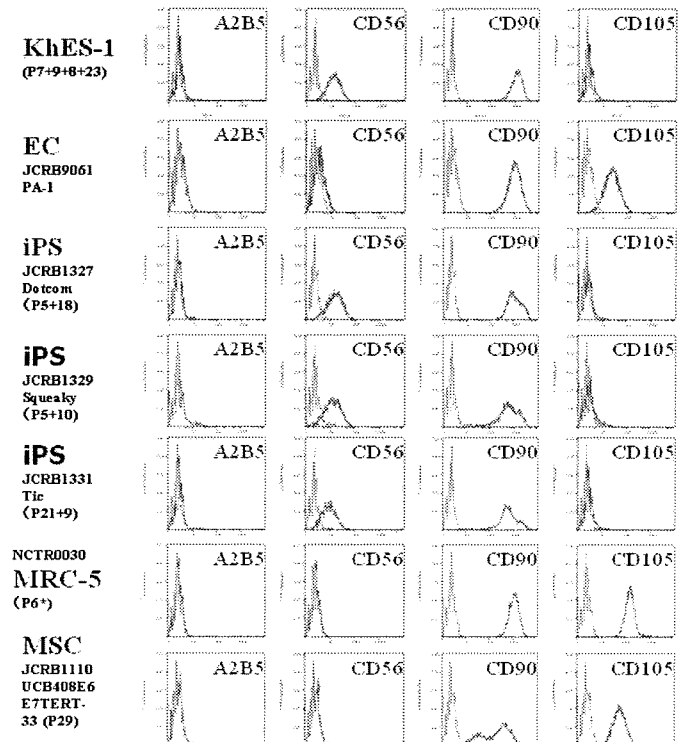
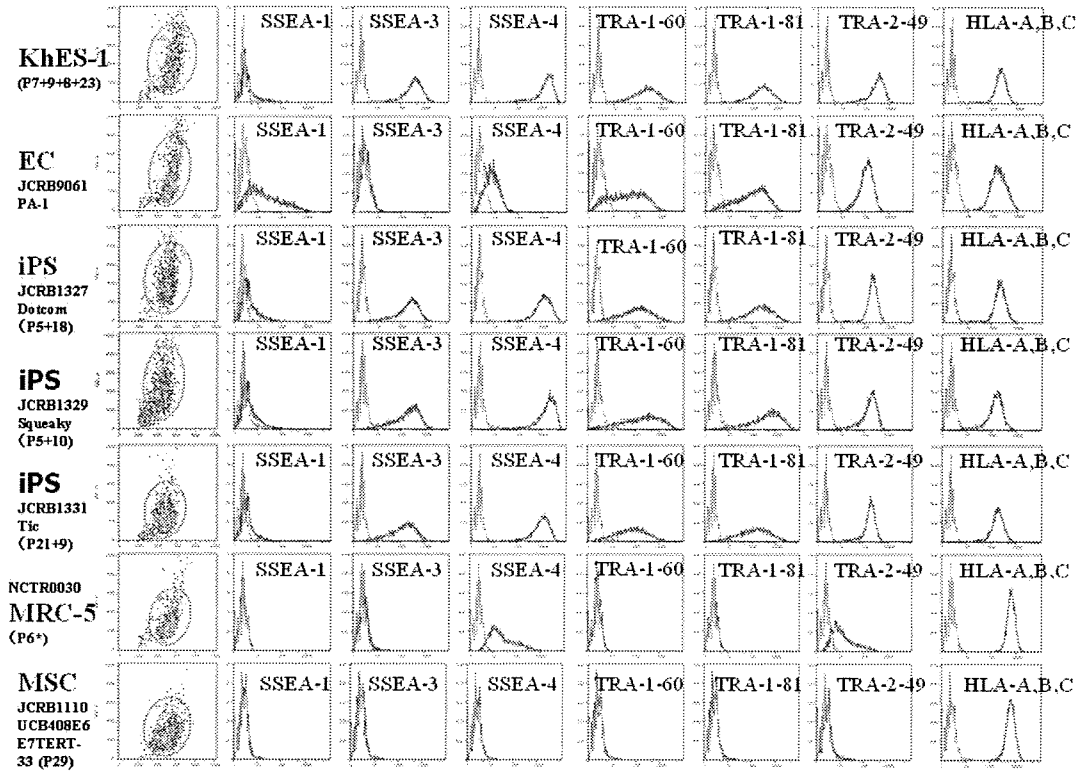
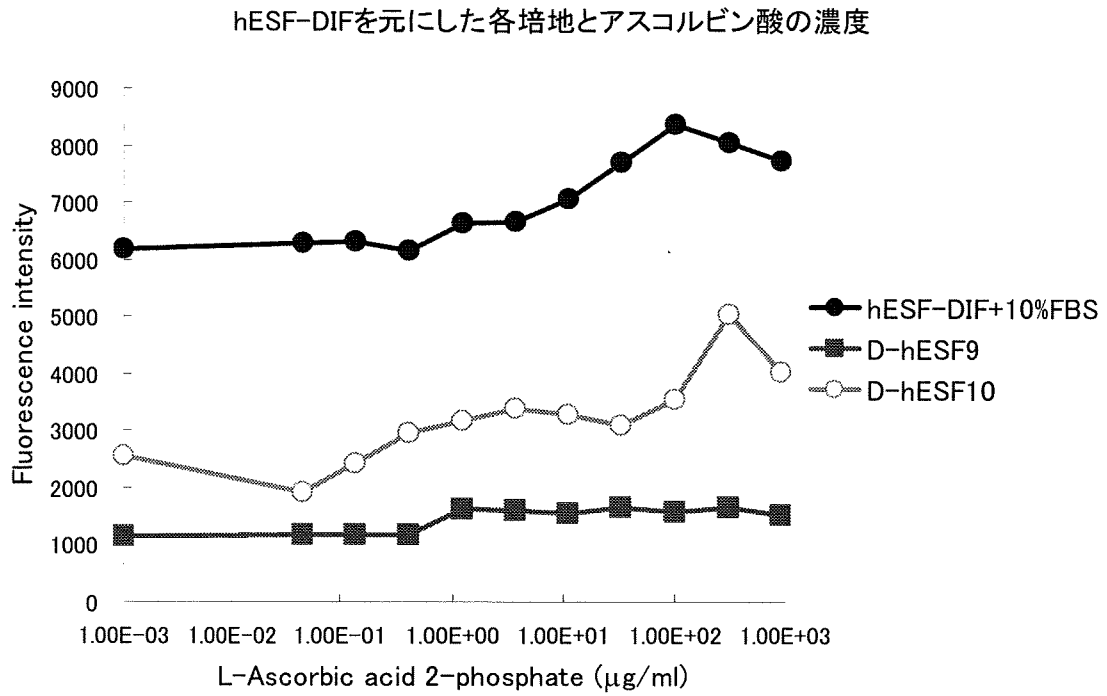
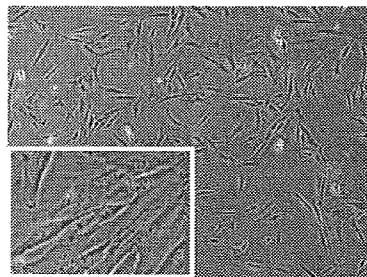


図3 間葉系幹細胞の無血清培養

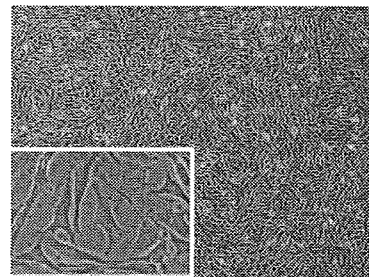
1. アスコルビン酸の細胞増殖に及ぼす影響



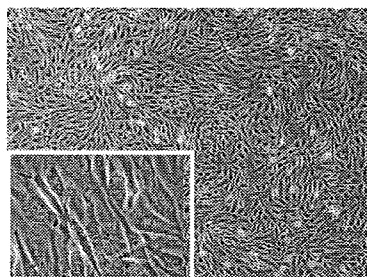
2. 無血清培地で培養を行った間葉系幹細胞の位相差顕微鏡像



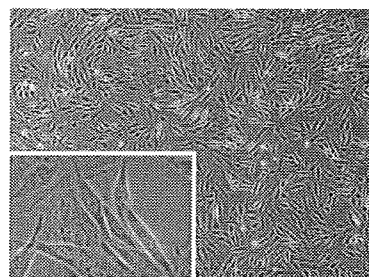
POWERDBY10 40x, 200x
(p37+5+4+12)



D-hESF9 40x, 200x
(p41+11+sp2)



D-hESF10 40x, 200x
(p37+5+10+5+sp2)



D-hESF10 40x, 200x
(p37+5+10+5+sp10)

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 /iPS 細胞の品質管理に関する研究

分担研究者	小原 有弘	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	研究員
協力研究員	平山 知子	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究員	林田 みどり	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究員	小澤 裕	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究員	塩田 節子	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員
協力研究員	大谷 梓	(独) 医薬基盤研究所・生物資源研究部	技術補助員

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に、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、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。さらに微細な染色体の変化を捉えることができ、細胞株によって異なる表現型との関係に非常に興味を持たれたが、より多くのヒト 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・iPS 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、心筋梗塞等の致死性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

解析に用いる細胞として、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 (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 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

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) (図1)、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 (図2)、Lollipop、Toe に染色体の増幅を伴う異常が認められた。Dotcom、Tic (図3) には異常が認められなかった。

3) ヒト iPS 細胞の mFISH 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 (図4)。

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 (図5)。この大きな変動部位、9番染色体、12番染色体、17番

染色体を図6に示した。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、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。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、ゲノム量が増減した場合には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 γ 、プロテinkinase 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

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

適用なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) 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).

- (3) 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).

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

2. 学会など口頭発表

- ① 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
- ② 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
- ③ 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
- ④ Takayoshi Suzuki, Arihiro Kohara,

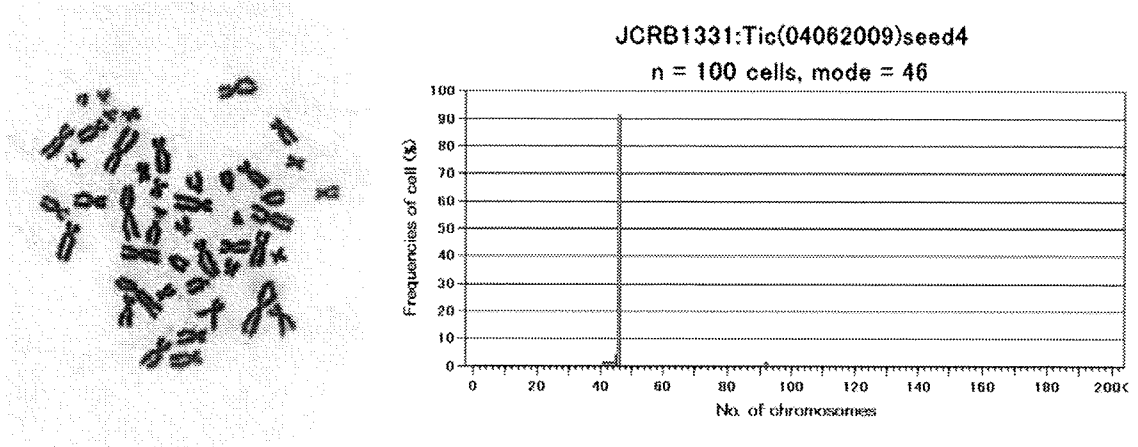


図1. ヒト iPS 細胞 (JCRB1331 : Tic) のギムザ染色像と染色体数の分布グラフ

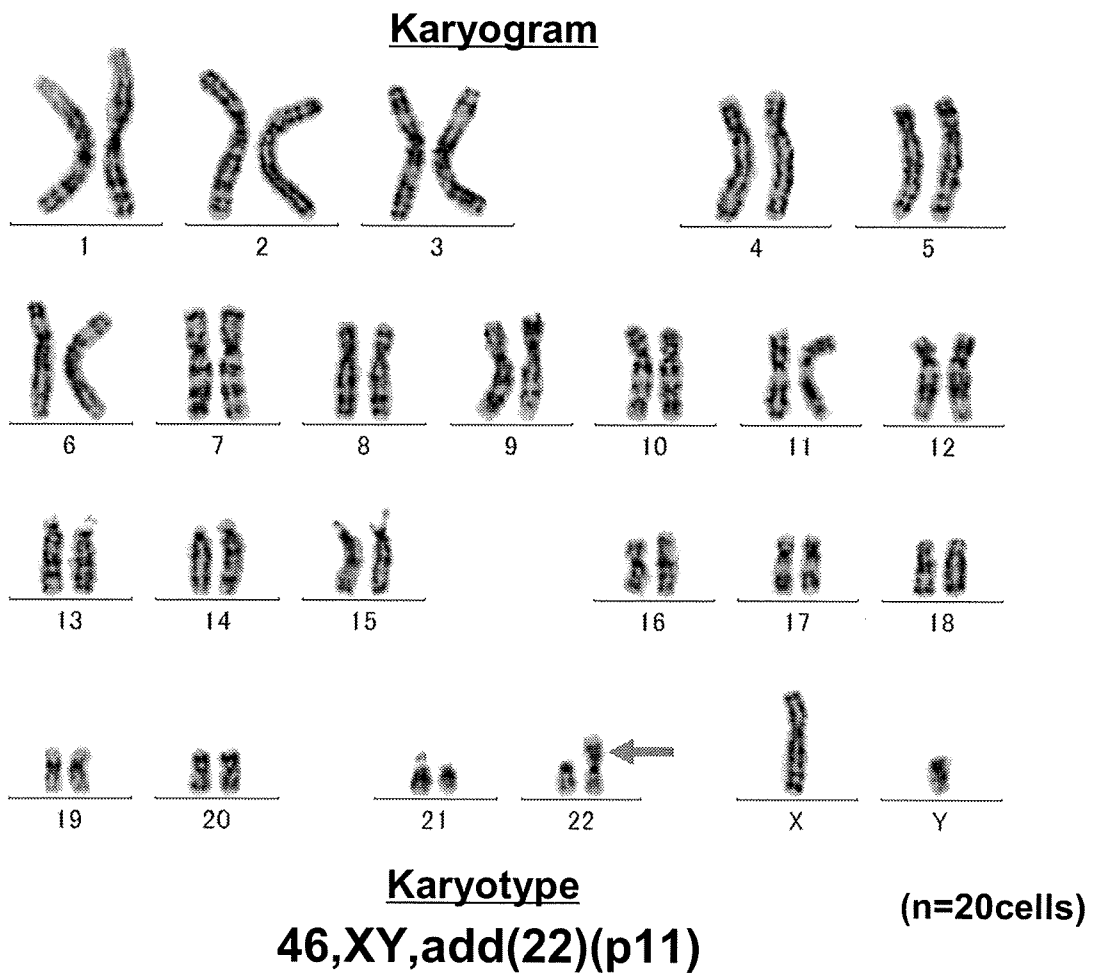


図2. ヒト iPS 細胞 (JCRB1329:Squeaky) の G-band 法による染色体解析

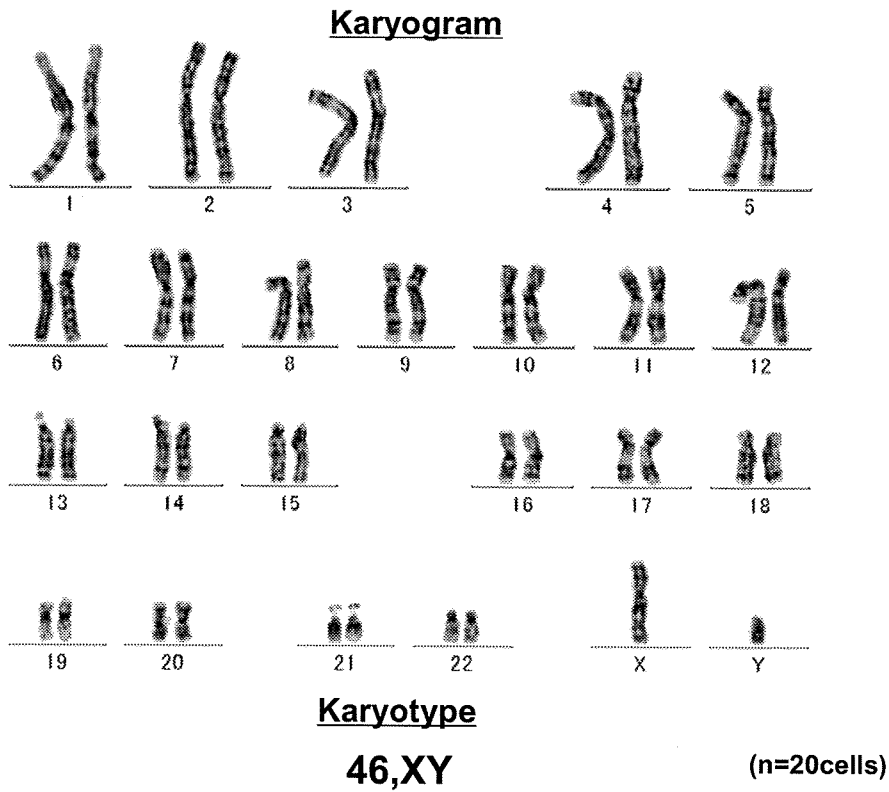


図3. ヒト iPS 細胞 (JCRB1331:Tic) の G-band 法による染色体解析

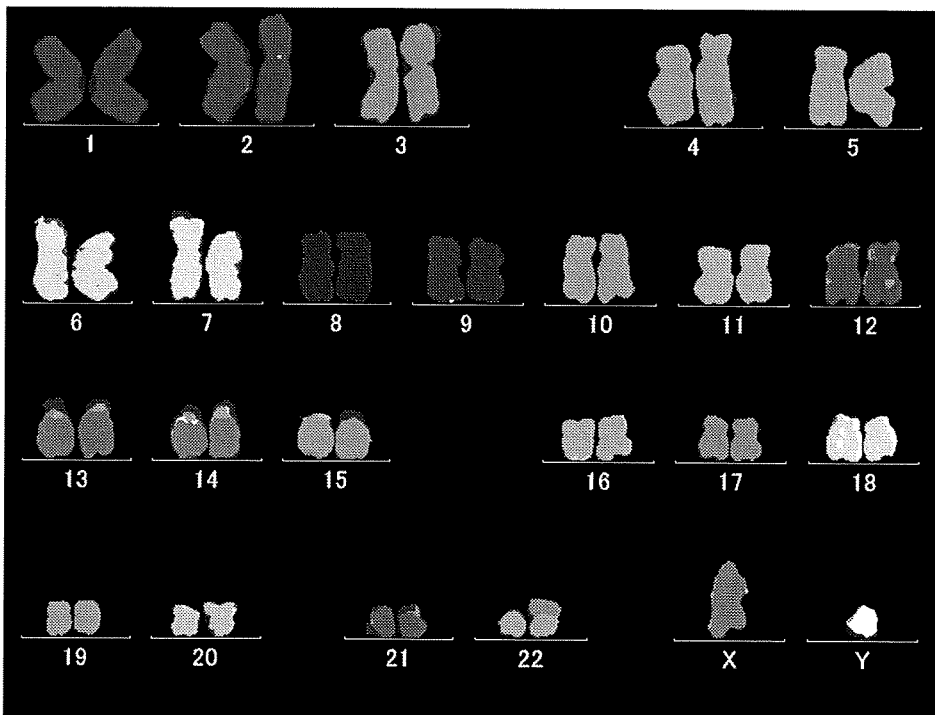


図4. ヒト iPS 細胞 (JCRB1331:Tic) の m-FISH 法による染色体解析
 46,XY, add(22) (p11). ish der (22) t(17;22) (q21;p11.2) (wcp17+)