

200911007B

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19年度－平成21年度

総合研究報告書

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19年度－平成21年度

総合研究報告書

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 細胞の品質管理に関する研究	-----	40
水澤 博		
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	-----	56
古江一楠田 美保		
ヒト ES /iPS 細胞の品質管理に関する研究	-----	66
小原 有弘		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	75
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、以下の結果を得た。

- (1) アデノウイルス (Ad) ベクターを用いて胚葉体 (EB) への遺伝子導入効率の最適化を行い、機能遺伝子を導入することで目的細胞への分化効率を上昇させることが可能となった。この結果より、Ad ベクターは ES 細胞の分化能 (品質) を判定する最適なツールとなり得る可能性が示された。
- (2) 改良型 Ad 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。
- (3) ヒト ES 細胞を異なる分散方法を用いて継代した時の、品質に対する影響を検討した結果、トリプシンを用いて継代した時は品質への悪影響が示唆された。
- (4) 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、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。
- (5) ヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子およびがん遺伝子 Bmi-1 を導入した 3 種類の間葉系幹細胞は長期培養後、染色体数にかなりの変動があり、特に 13 番染色体の欠失が各細胞株に共通して観察された。hTERT 遺伝子のみを導入した細胞株は長期培養下でも染色体は安定であった。細胞分化能はいずれの細胞株も保持されていた。また、市販の間葉系幹細胞に関しても染色体詳細解析を実施し、その有用性を確認した。
- (6) 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間葉系幹細胞に着目し、そのゲノム詳細解析を実施した。その結果、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。
- (7) ヒト iPS 細胞 5 株の培養を行い、核型解析により異常があることが認められた。また、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。さらに、アレイ CGH 解析においては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 細胞および間葉系幹細胞の品質管理・医療応用に関する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

大谷 梓 (独) 医薬基盤研究所  
技術補助員

古江-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

**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。

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 Ad ベクターを用いた ES 細胞の脂肪細胞への高効率分化

#### (1) Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作成は 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 プロモーター、EF-1 $\alpha$  プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を作成した。それぞれのマルチクロニング部位に  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHCMV5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作製した。また、pHMCA5 のマルチクロニング部位に green fluorescent protein (GFP)、peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR  $\gamma$  1)、PPAR  $\gamma$  2、CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP  $\alpha$ ) 遺伝子を挿入した pHMCA-GFP、pHMCA-PPAR  $\gamma$  1、pHMCA-PPAR  $\gamma$  2、pHMCA-C/EBP  $\alpha$  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、及び GFP、PPAR  $\gamma$  1、PPAR  $\gamma$  2、C/EBP  $\alpha$  発現ベクタープラスミド pAdHM4-CAGFP、pAdHM4-CAPPAR  $\gamma$  1、pAdHM4-CAPPAR  $\gamma$  2、pAdHM4-CAC/EBP  $\alpha$  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、及び GFP、PPAR  $\gamma$  1、PPAR  $\gamma$  2、C/EBP  $\alpha$  発現 Ad ベクター Ad-CA-GFP、Ad-CA-PPAR  $\gamma$  1、Ad-CA-PPAR  $\gamma$  2、Ad-CA-C/EBP  $\alpha$  を得た。定法により Ad ベクターの増殖、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、生物学的力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (クロンテック社) を用いて測定した。

#### (2) ES 細胞の培養、胚様体 (EB) の作製

E14 マウス ES 細胞 (ES 細胞) は leukemia inhibitory factor (LIF) 含有培地にてフィーダー細胞 (embryonic fibroblast) 上、またはゼラチンコートしたプレートで培養し、2-3 日ごとに継代した。EB は mES 細胞をペトリディッシュの蓋に 3000 cells/30  $\mu$ l で附着させ (ハンギングドロップ法)、5 日間 LIF を除いた培地で培養することにより作製した。

#### (3) LacZ アッセイ

Day5 の EB に対してハンギングドロップの状態、3000VP/cell で LacZ 発現 Ad ベクター、Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-RSV-LacZ を作用させ、2 日後に X-gal 染色を行った。

#### (3) GFP 発現解析

EB に対して Ad-CA-GFP を 10000VP/cell の濃度で感染させ、2 日後に GFP の発現部位を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、EB をトリプシンでシングルセルにしてフローサイトメーターにより GFP 陽性細胞の割合を調べた。Ad ベクターを連続で作用させる場合は、Day0、2、5 の 3 点で 10,000 VP/cell の濃度で各 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。なお、脂肪細胞へ分化誘導するときも同様に 3 点で遺伝子導入を行った。

#### (4) 脂肪細胞への分化誘導

ハンギングドロップを 2 日間行って EB を形成させ、続いて 3 日間 all-*trans*-retinoic acid (RA) 含有培地で培養した。その後 RA を除いた培地で 2 日浮遊培養して、7 日目にゼラチンコートした 12 穴プレートに 4EB/well で播種した。上記に記したように、

Day0、2、5 の3点でEBに対してAdベクター (Ad-CA-LacZ、Ad-CA-PPAR  $\gamma$  1、Ad-CA-PPAR  $\gamma$  2、Ad-CA-C/EBP  $\alpha$ ) を 10000VP/cell の濃度で作用させ、播種後は液性因子 (100  $\mu$  M 3-isobutyl-1-methylxanthine、100nM insulin、0.1  $\mu$  M dexametasone、2nM triiodothyronine) を加えた培地、または加えていない培地で培養した。

(5) オイルレッドO染色、GPDHアッセイ  
脂肪細胞への分化を細胞内の脂質の量とGPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 活性を測定することにより評価した。12穴プレートに播種して12日、24日培養した細胞を回収し、セルガレージ社のLipid Assay kit、及びGPDH Assay kitを用いて細胞内の脂質の量、及びGPDH活性を測定した。更に細胞内の脂質に結合したオイルレッドOを100%イソプロパノールで抽出し、OD540 nmを測定することにより、取り込まれたオイルレッドOの量を定量した。また、バイオラッド社のBio-Rad Protein Assay Kitを用いて回収した蛋白量を定量し、GPDH活性を補正した。

#### (6) RT-PCR

12穴プレートに播種し、分化誘導培地で24日培養した細胞から、total RNAを抽出し、インビトロジェン社のSuperScript Reverse Transcriptase IIを用いてcDNAを合成した。その後、PCRによりPPAR  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$  1とPPAR  $\gamma$  2の両方を検出)、C/EBP  $\alpha$ 、aP2、adiponectin、leptin、LacZ、GAPDHの各遺伝子発現を調べた。PCRプライマーは以下のものを用いた。PPAR  $\gamma$  (F): 5' -CCC TGG CAA AGC ATT TGT AT-3'、PPAR  $\gamma$  (R): 5' -AAT CCT TGG CCC TCT GAG AT-3'、C/EBP  $\alpha$  (F): 5' -CGC TGG TGA TCA AAC AAG AG-3'、C/EBP  $\alpha$  (R) 5' -GTC ACT GGT CAA CTC CAG CA-3'、aP2(F) 5' -TGG

AAG CTT GTC TCC AGT GA-3'、aP2(R) 5' -ACA CAT TCC ACC ACC AGC TT-3'、adiponectin(F) 5' -GTT GCA AGC TCT CCT GTT CC-3'、adiponectin(R) 5' -GCT TCT CCA GGC TCT CCT TT-3'、leptin(F) 5' -TGA CAC CAA AAC CCT CAT CA-3'、leptin(R) 5' -CTC AAA GCC ACC ACC TCT GT-3'、LacZ(F): 5' -GTC GTT TTA CAA CGT CGT GA-3'、LacZ(R): 5' -GGA ACA AAC GGC GGA TTG AC-3'、GAPDH(F): 5' -ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'、GAPDH(R): 5' -TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

## 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 pHMCMV5 およびそのプロモーターをCA (cytomegalovirus enhancer/b-actin promoter)、EF-1  $\alpha$  (elongation factor-1  $\alpha$ ) 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 $\beta$ -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 pHMCMV5-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 ベクターの増殖、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 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。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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 チャンバース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 $^{\circ}$  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、キーンエンス) 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。

### B.3 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.4 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つ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 (Endogrlin) 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.5 間葉系幹細胞染色体の詳細解析

### (1) 細胞培養

2 種のヒト臍帯血由来間葉系幹細胞、UCBTERT-21 (JCRB1107) および UCB408E6E7TERT-33 (JCRB1110) ならびに 2 種のヒト骨髄由来間葉系幹細胞、UE6E7T-3 (JCRB1136) および UBE6T-6 (JCRB1140) は当 JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) で保存された細胞を使用した。臍帯血由来間葉系幹細胞株 UCBTERT-21 は hTERT 遺伝子のみで、UCB408E6E7TERT-33 は hTERT と HPV16E6/E7 の組み合わせ遺伝子により不死化したものであり、Plusoid M (Med-Shirotori Co. Japan) 培地で培養した。また、骨髄由来間葉系幹細胞株 UE6E7T-3 は hTERT と HPV16E6E7 遺伝子で、UBE6T-6 は hTERT、HPV16E6、および Bmi-1 遺伝子の組み合わせ導入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/cm<sup>2</sup> で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。PDLs の計算は次の式に従った:  $PDLs = \log(\text{cell output}/\text{cell input})/\log 2$ 。本実験で培養を開始したときの PDLs は、UCBTERT-21, UCB408E6E7TERT-33, UE6E7-3 と UBE6T-6 それぞれ 42, 67, 40 と 56 であった。同様にヒト間葉系幹細胞 hMSC (Cambrex 社より購入) に関しても、MSCBM (間葉系幹細胞培養用培地) と DMEM の 2 種類の培地で培養を行い経時的観察を行った。

### (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 (Macrogen 社)

サンプル DNA は約  $1 \times 10^6$  個の細胞から isolation kit (Amersham BioSciences, UK) と Spin Column (QIAGEN Co., Japan) を用いて抽出・精製した。標準 DNA (Promega Co. USA) と試験 DNA はそれぞれ Cy3 または Cy5 (BioPrimer DNA Labeling System, Invitrogen Co., Japan) で標識し、Cot-1 DNA とエタノールで共沈殿し、ハイブリダイゼーションキット (50% formamide, 10% dextran sulfate, 2xSSC, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH7) に溶かした。75°C 10 分処理で DNA を変性したのち、BAC Array (MAC Array<sup>TM</sup> Karyo 4000 Component, Macrogen Co., USA) で 42°C、48-72 時間ハイブリダイゼーションした。50% formamide - 2x SSC (pH 7.0) で 50°C、15 分間、2x SSC - 0.1% SDS で 50°C、15 分間洗浄し、100 mM sodium phosphate buffer (0.1% Nonidet P-40 (pH 8) を含む) で洗浄したのち各スポットの蛍光量を GenePix4000A (Axon Instruments, USA) で測

定し、MacViewer (Macrogen Instruments, USA)を用いてデータを解析した。

#### (4) 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。

#### (5) 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 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。

#### (6) 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 (NPMM™ 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  $\mu$ M dexamethasone (Sigma Chemical Co., USA), 50  $\mu$ g/ml L-ascorbic acid (Sigma Chemical Co., USA) と 10 mM  $\beta$ -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  $\beta$  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.6 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

(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  $5 \times 10^6$  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 Ad ベクターを用いた ES 細胞の脂肪細胞への高効率分化

ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させるには、まず、胚様体 (EB) とよばれる発生初期胚に似た構造を有する細胞集合体を形成させ、その後液性因子などを加えることにより目的の細胞に分化させるという手法がとられる。そこでまず、EB への遺伝子導入に最適な Ad ベクターを探索するため、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 Day5 の EB に作用させて検討を行った。その結果、CA プロモーターを有する Ad ベクターが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)。そこで次に EB の内部においても外来遺伝子が発現しているかどうかを検討するため、GFP 発現 Ad ベクター Ad-CA-GFP を Day5 の EB に作用させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP の発現を解析した結果、GFP の発現は EB の周縁部でのみ観察された (Fig. 2A, middle)。また、GFP 陽性細胞の割合も約 25%であった (Fig. 2B, middle)。この結果から、EB を構成している細胞が物理的な障害となるために、Ad ベクターが EB 内部へ侵入できないことが考えられた。そこで、EB の内部で外来遺伝子を発現させるために、Day0、2、5 の 3 点で Ad ベクターを作用させることとした (triple transduction)。Ad-CA-GFP を 3 点で作用させることにより、EB の内部においても GFP の発現が認められ、GFP 陽性細胞の割合も有意に上昇した (Fig. 2A and 2B, bottom)。以上の結果から、CA プロモーターを有した Ad ベクターによる triple transduction は EB の内部で外来遺伝子を発現させるのに有効であることが明らかとなった。

次に、このベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、EB から標的とする細

胞への分化効率を上昇させられるかどうかについて検討した。核内受容体 PPAR $\gamma$  は脂肪細胞分化のマスター遺伝子として知られており、PPAR $\gamma$ 1 と PPAR $\gamma$ 2 の 2 つのアイソタイプが存在している。また、C/EBP $\alpha$  は脂肪細胞分化及び脂肪細胞の成熟化に重要な転写因子として知られている。そこで、CA プロモーターを有し、PPAR $\gamma$ 1、PPAR $\gamma$ 2、C/EBP $\alpha$  の遺伝子を発現するそれぞれの Ad ベクターを EB へ作用させたときの分化効率について検討を行った。上述したように 3 点で Ad ベクターによる遺伝子導入を行い、インスリンなどの液性因子存在下で培養して脂肪細胞分化の指標となる GPDH 活性を測定した結果、従来の液性因子のみを加えた群や LacZ 遺伝子導入群と比較し、PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ 1 と PPAR $\gamma$ 2 の両方) 遺伝子を導入した群において GPDH 活性の優位な上昇が認められた (Fig. 3A)。また、オイルレッド O 染色を行った結果から、Ad ベクターにより PPAR $\gamma$  遺伝子をした細胞は、コントロール群と比較し、細胞内に多くの脂質を蓄積していることが明らかとなった (Fig. 3B)。さらに半定量的 RT-PCR 法により PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、aP2、アディポネクチンなどの脂肪細胞分化のマーカー遺伝子の発現量を解析した結果、PPAR $\gamma$  遺伝子 (PPAR $\gamma$ 1 と PPAR $\gamma$ 2 の両方) を導入した群においては、全ての遺伝子の発現上昇が確認された (Fig. 3C)。また Ad ベクターの発現が続いているかどうかを検討するため、LacZ mRNA の発現を RT-PCR 法で解析した結果、プレートに播種してから 24 日後においては、その発現はほとんど確認されなかった (Fig. 3C)。以上の結果から、PPAR $\gamma$  遺伝子または C/EBP $\alpha$  遺伝子導入群でみられる、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  mRNA の多くは Ad ベクターによる発現ではなく、内因性の発現であることが示唆された。

さらに、Ad ベクターを用いた EB への遺伝子導入により、液性因子を加えない条件に

においても分化効率の改善が認められるかどうか検討した。GPDH 活性を測定することにより分化効率を評価した結果、液性因子存在下における GPDH 活性のレベルには至らなかったが、PPAR $\gamma$  遺伝子または C/EBP $\alpha$  遺伝子を導入することで、GPDH 活性の上昇がみられ、脂肪細胞分化を促進させられることが示された (Fig. 4)。以上の結果から、液性因子の存在に関わらず、Ad ベクターにより脂肪細胞分化に関与する遺伝子を導入することで、EB から脂肪細胞への分化効率を上昇させることが可能であることが明らかとなった。

## 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 (KhES-1) 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 (KhES-1) 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. 5)。

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. 6)。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. 7)。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、それらの細胞は 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 $\alpha$  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。

## C.3 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、コロニーの状態に継代する。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. 8)

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.4 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 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、ディスプレイ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。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.5 間葉系幹細胞の染色体詳細解析

#### (1) ヒト間葉系幹細胞の長期培養過程での染色体数の変化

研究に用いた不死化間葉系幹細胞において染色体数の異常が観察され、特に長期培養するとその頻度が高くなった。培養開始直後は全ての細胞株の染色体数モードは 46 本 (2n) であった。UCBTERT-21 細胞は PDL 133 にも及ぶ長期培養後でも染色体数は安定であったが、一方、UBE6T-6 および UE6E7T-3 細胞に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。UBE6T-6 細胞でも同様に染色体数の減少が見られた。UCB408E6E7TERT-33 細胞もまた染色体数が不安定で、4 倍体に近い細胞集団の増加が認められた。これらの結果から、UE6E7T-3, UBE6T-6 および UCB408E6E7TERT-33 細胞の染色体数は長期培養でかなり変動するが、UCBTERT-21 にはその傾向が見られないことが示された。

次に、染色体の不安定性を調べるために、FISH 法、CGH 法による解析を行った。PDL 52 の UCBTERT-21 細胞の mFISH 分析の結果は正常な核型を示した。UBE6T-6 細胞は 43-45 本の染色体数を示し、13, 16 and 19 番染色体の欠失が検出された。UCB408E6E7TERT-33 細

胞も不均一な染色体構成を示した。mFISH 分析の結果から UCBTERT-21 細胞以外は共通して 13 番染色体の欠失が示されたが、この結果は 13 と 17 番染色体のプローブを用いた pFISH 分析によっても確かめられた。UCBTERT-21 細胞では約 97% の細胞が 2 コピーの 13 番染色体をもっていることから、染色体構成が安定であることを示した。UE6E7T-3 と UBE6T-6 細胞の染色体数は 43-45 本であり、UE6E7T-3 の 76% が、UBE6T-6 の 86% が 13 番染色体を一本だけ持っていた。同様に、UCB408E6E7TERT-33 細胞は 70% が 3 本の 13 番染色体を持った near-tetraploid であった。さらに FISH 法により観察された染色体 13 番の欠失が CGH アレイ法によって確かめられた。長期培養の初期ステージ (青色スポット) と後期ステージ (赤色スポット) のデータを Fig. 2 に示した。UCBTERT-21 細胞では培養の初期および後期において共に変化が認められなかった。UBE6T-6 と UCB408E6E7TERT-33 細胞の培養初期に 13 番染色体が欠失していたことを FISH 法で認めたが、CGH 法からはさらに 4 番、9 番、16 番染色体も欠失していることを認めた。UE6E7T-3 については、PDL 78 から PDL 101 の間で 16 番染色体の欠失も観られたが、特に特徴的なことはこれら 3 種類の細胞株に共通して 13 番染色体の欠失が観られたことである。これらのデータは FISH 分析の結果と一致した。またより詳細な解析が可能なアジレント社製アレイ CGH 解析においても同様の結果が認められ、再現性の有る非常に貴重なデータが得られた。

#### (2) 不死化間葉系幹細胞の分化能

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