

経様細胞に分化したりすることが可能であり、すなわち多分化能を持っていると報告されている。今回用いた4種類の細胞株を適切な誘導培地で2～4週間培養した。特に、UE6E7T-3細胞は他の細胞よりも脂肪細胞へ分化する能力が強いことが明らかとなった。このことは染色体の変化が起こっても変化しないことを明らかとした。骨芽細胞への分化能の一番強いのはUCB408E6E7 TERT-33細胞であった。UBE6T-6細胞は形態学的、マーカー遺伝子発現において神経様細胞への分化を示した。誘導培地で28日間培養後、III- $\beta$ -tubulin抗体、またはneurofilament NF-200抗体による蛍光染色すると神経突起様構造が観察された。一方、誘導培地で処理する前のUBE6T-6細胞ではこのような構造は見られなかった。

### (3) hMSCの詳細解析

Cambrex社より購入したヒト間葉系幹細胞を継代培養により長期培養維持した後、長期培養の前後での染色体解析を実施した。また、その際用いる培地による影響を検討するため、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その比較を行った。その結果どちらの培地の場合においても、増殖速度に違いは見られたものの(DMEMで培養すると増殖速度が落ちる)、mFISHの染色体写真には異常が観察されなかった。

### (4) アレイCGHの感度・再現性確認

研究に用いるアレイCGH(Human Genome CGH 244A)の感度・再現性を確認するために正常細胞から抽出したDNAとがん細胞から抽出したDNAを用いて解析を実施した。感度として、正常DNAに対してがんDNAを混合して解析す

ることにより、3割程度の混合において十分に2つのサンプルにおけるゲノムの増減を区別できる感度を有していること、ならびに、10kb程度の欠失をシグナルとして検出できることが明らかとなった。さらにこれらの結果に関して再現性を確認したが、その感度に変化は見られなかった。

### (5) 不死化間葉系幹細胞における染色体解析・ゲノム性合解析

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

次に、染色体の不安定性を調べるために、アレイCGH法による解析を行ったところ13番染色体1本と16番染色体の長腕部の欠失が確認された。この13番染色体1本の欠失に着目し、間期の細胞における13番染色体ならびに中心体の蛍光染色を行った。間期においても培養初期の細胞には13番染色体2本が観察され、長期培養後の細胞においては13番染色体が1本しか認められなかった。また、中心体の蛍光染色により欠失が起こる細胞において中心体の数の増加が認められること、ならびにそれに伴う13番染色体の不均等分割が起こることを明らかにした。欠失する13番染色体がランダムであるのか特定アレルであるのかを明らかにするため、SNPチップによる解析を実施した。13番染色体および16番染色体に長腕部におけるSNPタイピングの出現は欠失がランダムに起こる場合にはAA:AB:BB=1:2:1の割合でタイピングされるはずであるが長期培養後の細

胞には AB とタイピングされる SNP は殆ど存在しなかった。このことから欠失は特定アレルに起こることが明らかとなった。

## C.6 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

間葉系幹細胞の染色体詳細解析 (C.5) で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

### D.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、ヒト ES/iPS 細胞への高効率遺伝子導入

ES 細胞の品質を判定する良い指標になると考えられる幹細胞の分化能の検討について遺伝子導入を用いて行った。ES 細胞を *in vitro* で分化させる過程において、中間体として EB を形成することが一般的に行われている。そこで本研究では EB への遺伝子導入効率をプロモーターの異なる Ad ベクターを用いて検討した。その結果、CA プロモーターを有する Ad ベクターが最も遺伝子導入効率に優れていることを明らかにした。CA プロモーターは多くの細胞・組織において外来遺伝子を強く発現させることができるプロモーターとして知られており、未熟な細胞においてもその活性は高いことが多くのグループから報告されている。EB は ES 細胞の集合体であり、未熟な細胞であると考えられるため、EB で高い遺伝子発現を得るには CA プロモーターが適していたことが考えられる。また、Day0 からの Ad ベクターの連続作用が EB の内部でも外来遺伝子を発現させるには有効であることを明らかにした。本研究ではこの手法を用いて、Ad ベクターにより EB に機能遺伝子を導入し、実際に目的の細胞への分化効率を改善できるかどうかについて検討した。その結果、脂肪細胞分化に関与する PPAR $\gamma$  遺伝子を導入することにより、液性因子の存在に関わらず EB から脂肪細胞への分化効率を上昇させることに成功した。ただし、液性因子を作用させなかった場合、高い分化効率は得られなかったため、効率の良い脂肪細胞分化を達成するには PPAR $\gamma$  遺伝子の導入と液性因子のコンビネーションが重要であると

考えられた。以上の結果から、我々が最適化した EB への遺伝子導入法を用いることにより、EB から目的の細胞への分化効率を促進させられることが明らかとなった。

また、改良型アデノウイルスベクターを用いることによりヒト ES 細胞に効率良く遺伝子導入が可能であった。これはヒト ES 細胞がアデノウイルス受容体 CAR を高発現しているためと考えられた。しかしながら、ES 細胞と類似していると考えられている iPS 細胞に対しては辺縁部しか遺伝子導入細胞がみとめられなかった。これが ES 細胞と iPS 細胞の差であるかどうかは今後クローン数を増して検討することにより明らかになるものと思われる。また、ROCK 阻害剤の併用により iPS 細胞にも効率良く遺伝子導入が可能であったが、分化誘導実験等を行う場合、ROCK 阻害剤が副作用をもたらす可能性も考えられ、iPS 細胞への遺伝子導入にはさらなる改良が必要であると考えられた。

### D.2 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 細胞培養のプロトコール化、間葉系幹細胞との比較

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。

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- $\beta$  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。

### D.3 間葉系幹細胞染色体の詳細解析

本研究では、遺伝子を導入したヒト臍帯血、骨髄間葉系幹細胞が *in vitro* 培養で遺伝子型、表現型にどのような変化を示すかを解析し明らかにした。本研究で使用した 4 細胞株 (UCBTERT-21, UCB408E6E7TERT-33, UE6E7T-3, UBE6T-6) のうち、hTERT のみで不死化した細胞株 UCBTERT-21 は細胞周期の制御に深く関わる p53/p21 や pRB/p16<sup>INKA</sup> 経路の変異なしに寿命を相当のばすことができた。しかしながら、同じ遺伝子 hTERT で不死化したヒトケラチノサイトは延命したが、pRB/p16<sup>INKA</sup> 経路の不活性化や p16 発現の downregulation が見られることが報告されている。これらのことから細胞のタイプによって不死化にはテロメア以外のバリエーションが存在する可能性が示された。

一方、ヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子や Bmi-1 がん遺伝子と hTERT を用いて不死化した細胞株 UCB408E6E7TERT-33 (臍帯血由来)、UE6E7T-3 や UBE6T-6 (骨髄由来) は不死化したものの長期培養を続けると、染色体数に大きな変化を示した。UCB408E6E7TERT-33 細胞は培養初期には diploid (2n) であるが、培養期間が長くなるにつれて、tetraploid (4n) と tetraploid より少し少ない異数体 aneuploid (4n-1 ~5) になる。同じようなパターンが UE6E7T-3 や UBE6T-6 でも観察された。最近、ヒト N/TERT-1 ケラチノサイトや HeLa 細胞の *in vitro* 実験で、異数体 aneuploid が形成される前に tetraploid の形成があり、それは分裂期に 2 つの娘細胞の不分離によるという

nondisjunction 説が報告されたが、古くからヒトがん細胞でも高頻度で tetraploid が観察されている。Aneuploid の UCB408E6E7 TERT-33 細胞の染色体構成を CGH 解析や 13 番染色体と 17 番染色体プローブを用いた pFISH で調べた結果は見事に細胞あたり 17 番染色体が 4 本、13 番染色体が 3 本であることが明らかになった。さらに驚いたことは、17 番染色体は正常であるのに 13 番染色体の 1 本の欠失が diploid UE6E7T-3 や UBE6T-6 両細胞の 70~80%で観察されたことである。これらの 3 細胞株に共通してみられるこの現象から、この培養条件でこれらの細胞株が増殖していくためには 13 番染色体の欠失が重要であったことが示されている。特定染色体の欠失によるカリオタイプ変異はヒト ES 細胞でも報告されている。これまで染色体異数体は tetraploid から形成されるという主張が強かったが、本研究から tetraploid を経由せず、diploid からでも形成されるという異数体形成機構の新たな事実が示された。

tetraploid 形成なしに起こる異数体形成機構は不明であるが、中心体が重要な役割をしている可能性が高い。正常細胞や UCBTERT-21 細胞では、中心体が細胞あたり 1~2 個しかないものが、この 3 細胞株では 3~10 個も存在するものが細胞の 12~35%にもおよび、この中心体の増加が染色体の不均衡分割につながったものと考えられる。

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昨日変化が予測されるような変異が 300 近くの遺伝子において見出され

る。その数はヒトゲノム中にあるタンパクコード遺伝子の 1%以上にも及び、ゲノムのコピー数異常である CNV も数多く検出されている。このことは健康に日々暮らしている私たちにおいても機能の軽重を問わず多数の遺伝子に変異が起きているものの、たまたま細胞や臓器、運動器や神経、さらに精神発達などにおいて日常の生活に支障が無い程度におさまっているに過ぎないことを示している。しかし、近年の解析結果から、アンドロゲン代謝酵素 (UGT2B17) と前立腺がんの発症、セリンプロテアーゼ遺伝子 (PRSS1) と家族性膵炎など病態 (表現型) との関係が明らかにされる例も数多く存在している。本研究においてアレイ CGH 解析を実施することにより細胞の詳細なゲノム解析を行い、細胞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。確認した感度は 3 割程度のゲノム量の変化を解析することが出来た。全ての細胞において変異が起こり、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。本研究の結果から十分に検出可能でありアレイ CGH が十分な感度であるとわかった。また、再現性に関しても同じ試料による解析によって同じ結果が得られることを確認できた。

さらに本研究では SNP チップを用いて欠失する 13 番染色体がランダムに欠失するのか、あるいは特定のアレルが欠失するのかに関して解析を行った。その結果、特定アレルの欠失が起こっていることが証明され、そのメカニズムに非常に興味を持たれ、この細胞が

異数体形成のメカニズムを解析するための良いモデルとなると考えられた。

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

#### D.4 ヒト iPS 細胞染色体の詳細解析

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ィールをする上で非常に重要である。先にも述べたように、このプロフィールの違いによって、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

(1) ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させる場合、EB とよばれる中間体を介して行われているため、本研究では Ad ベクターを用いて EB への遺伝子導入効率の最適化を行った。その結果、CA プロモーターを有する Ad ベクターを用いることにより効率良く遺伝子導入可能であることが明らかとなった。さらに、EB の内部で外来遺伝子を発現させるには Day0 からの Ad ベクターの連続作用が有効であった。このベクター及び遺伝子導入法を用いて脂肪細胞分化に関与する遺伝子を EB へ導入した結果、従来の方法よりも高い分化効率を示した。以上より、EB への高効率遺伝子導入により、EB から標的の細胞への分化効率を上昇させられることが明らかとなり、Ad ベクターは幹細胞の分化能（品質）を判定する良いツールになり得るものと考えられた。

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

(3) ヒト ES 細胞を異なる分散方法（ディスペーゼ、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。

(4) ヒト ES 細胞培養技術のプトロコ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。

(5) hTERT を導入した臍帯血由来間葉系幹細胞は 133PDL という長期培養でもカリオタイプに変化は見られず、分化能も保持していた。この結果は再生医療に必要とする細胞の *in vitro* 増幅の一步前進になる。一方、がん遺伝子導入細胞株は 13 番染色体 1 本の特異的欠失を伴うが、間葉系細胞本来の分化能は保持していた。これらのことから、これらの細胞株はがん細胞のような染色体不安定性の解析や脂肪細胞、骨細胞を含めた多組織への分化能の研究には最適の材料である。

(6) 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。本研究に用いたがん遺伝子導入間葉系細胞株は 13 番染色体 1 本の特異的欠失を伴うが、間葉系細胞本来の分化能は保持していた。また、欠失する 13 番染色体が特定アレルに起



こっていることが明らかとなり、この細胞株は異数体形成におけるモデル細胞として非常に有用であると考えられた。

(7) 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

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) Sakurai F, Nakamura SI, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction following direct administration into organs of nonhuman primates. *Gene Ther.*, 16, 297-302 (2009).
- 3) Sakurai F, Nakamura S, Akitomo K, Shibata H, Terao K, Kawabata K, Hayakawa T, Mizuguchi H. Transduction properties of adenovirus serotype 35 vectors after intravenous administration into nonhuman primates. *Mol. Ther.*, 16, 726-733 (2008).
- 4) Tashiro K, Kawabata K, Sakurai H, Kurachi S, Sakurai F, Yamanishi K, Mizuguchi H. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J. Gene Med.*, 10, 498-507 (2008)
- 5) 川端健二；各種幹細胞への高効率遺伝子導入法の開発とその応用；*Drug Delivery System*, 22, 668-669 (2007)
- 6) 川端健二、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各種幹細胞への遺伝子デリバリー；*Drug Delivery System*, 22, 148-154 (2007)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 古江一楠田美保、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)
- 10) 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)

ミネーションへの警戒 ; 実験医学;26(3):561-567 (2008)

- 11) 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.
  - 12) 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)
  - 13) 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).
  - 14) 水澤博, 小澤裕, 増井徹, 平田誠, 小原有弘 ; STR 分析によるヒト培養細胞の迅速同定法—培養細胞のクロスコンタミネーション防止のために— ; 実験医学;26(9):1395-1403 (2008)
  - 15) 水澤博, 小澤裕, 小原有弘, 増井徹, 佐藤元信, 岩瀬秀, 深海薫, 西條薫, 中村幸夫 ; 培養細胞で頻発するクロスコンタ
  - 16) Takeuchi M., Takeuchi K., Kohara A., Satoh M., Shioda S., Ozawa Y., Ohtani A., Morita K., Hirano T., Terai M., Umezawa A., Mizusawa H. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7 and hTERT genes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 43, 129-138 (2007)
- ## 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
  - 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、松村絃子、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、松村絃子、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、松村絃子、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) 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
- 14) 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
- 15) 田代克久、井野麻美、川端健二、櫻井晴奈、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
- 16) 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
- 17) 田代克久、井野麻美、川端健二、櫻井晴奈、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
- 18) 田代克久、井野麻美、川端健二、櫻井晴奈、櫻井文教、山西弘一、水口裕之; ファイバー改変型アデノウイルスベクターを用いたマウス間葉系幹細胞の骨芽細胞分化; 日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜
- 19) 田代克久、川端健二、櫻井晴奈、倉知慎之輔、櫻井文教、中川晋作、早川堯夫、山西弘一、水口裕之; アデノウイルスベクターを用いたマウス胚様体への遺伝子導入法の確立; 遺伝子デリバリー研究会第 7 回シンポジウム、2007 年 5 月、東京
- 20) 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
- 21) 古江-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
- 22) 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
- 23) 古江-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

- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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-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.
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 小原有弘、水澤博；細胞バンクの現状と課題日本組織培養学会第 81 回大会(つくば)
- 33) Yutaka Ozawa, Masao Takeuchi, Kikuko Takeuchi, Arihiro Kohara, Hiroshi Mizusawa Genomic Stability of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells (Non-random Loss of Chromosome

- 13 in Culture). 日本環境変異原学会  
第 37 回大会 (沖繩 2008 年 12 月)
- 34) Arihiro Kohara: Genomic Stability  
Analysis of Immortalized Human Cells  
and Human Tumor Cells Using  
High-Resolution Array-Based  
Comparative Genomic Hybridization.  
48th ASCB Annual Meeting Dec. 2008.
- 35) Arihiro Kohara, Azusa Ohatani, Yutaka  
Ozawa, Setsuko Shioda, Tohru Masui,  
Hiroshi Mizusawa. Mycoplasma  
Contamination and Cross Contamination  
in Tissue Culture: A Survey of Major  
Institutions in Japan. Annual meeting  
of Symposium In Vitro Tecnology Jun.  
2008 (Tucson CA).
- 36) Arihiro Kohara; High-resolution  
genomic analysis of immortalized human  
cells and human tumor cells using  
array-based comparative genomic  
hybridization; 47th ASCB Annual  
Meeting; 2007 年 12 月 (Washington, DC,  
USA)
- 37) Arihiro Kohara; High-Resolution  
genomic analysis of immortalized human  
cells and human tumor cells using  
array-based comparative genomic  
hybridization; The 8th International  
Symposium on Chromosomal Aberrations;  
2007 年 10 月 (兵庫)
- 38) 竹内昌男、小原有弘、竹内喜久子、小澤  
裕、塩田節子、大谷梓、佐藤元信、梅澤  
明弘、水澤博; ヒト間葉系幹細胞のヒ  
トパピローマウイルス E6, E7 遺伝子お  
よび hTERT 遺伝子導入による染色体数の  
変化; 日本組織培養学会第 80 回大会、  
2007 年 5 月、大阪

## 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

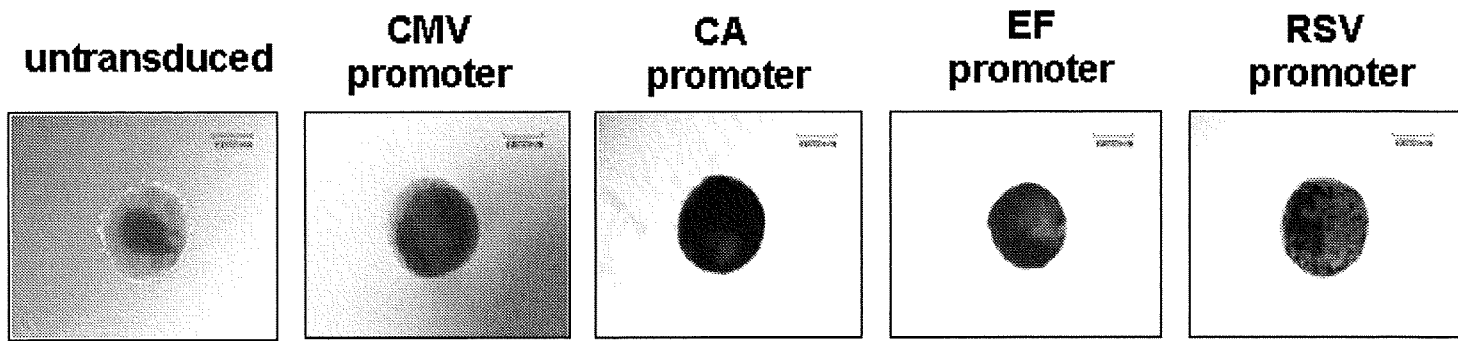
### 2. 実用新案登録

該当事項なし

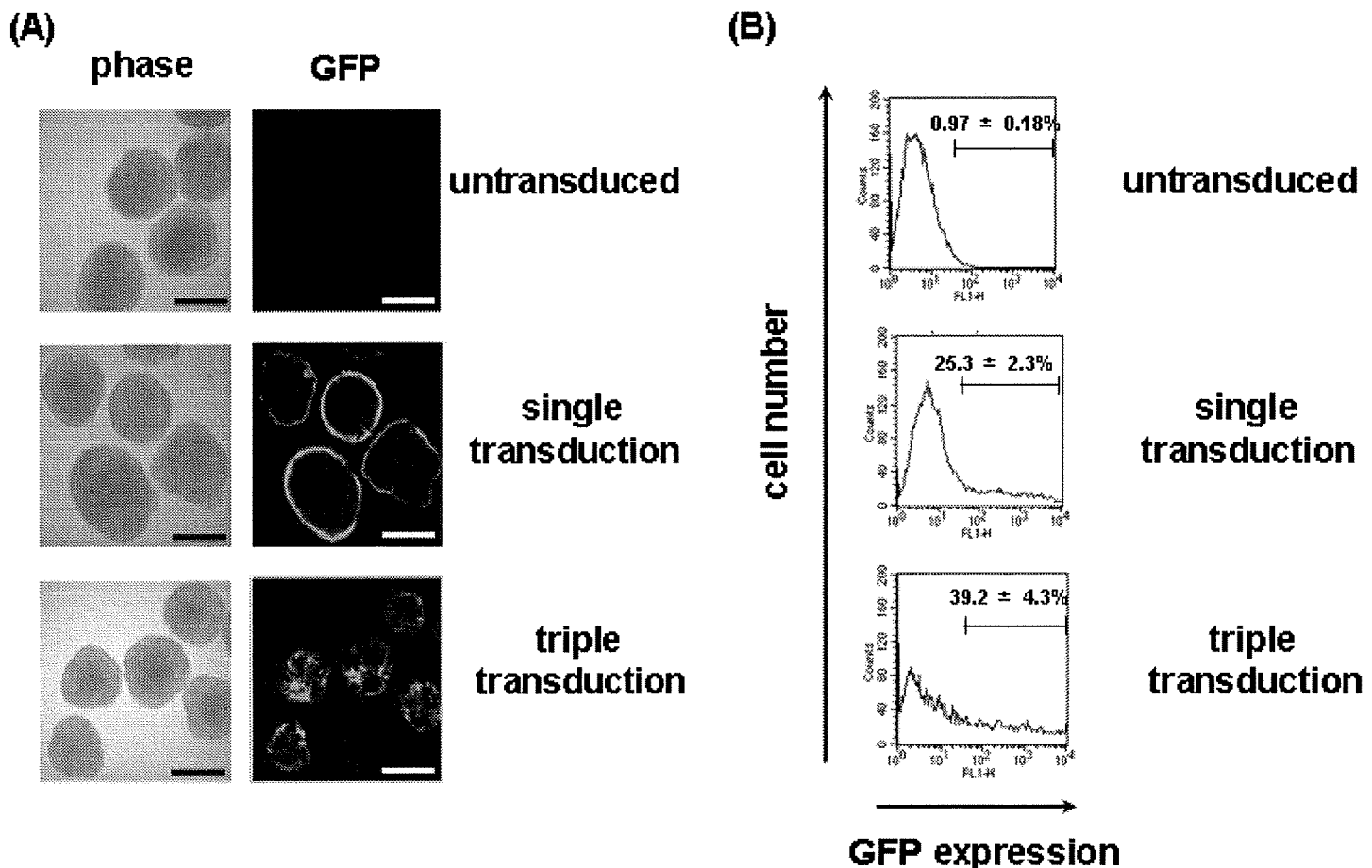
### 3. その他

該当事項なし





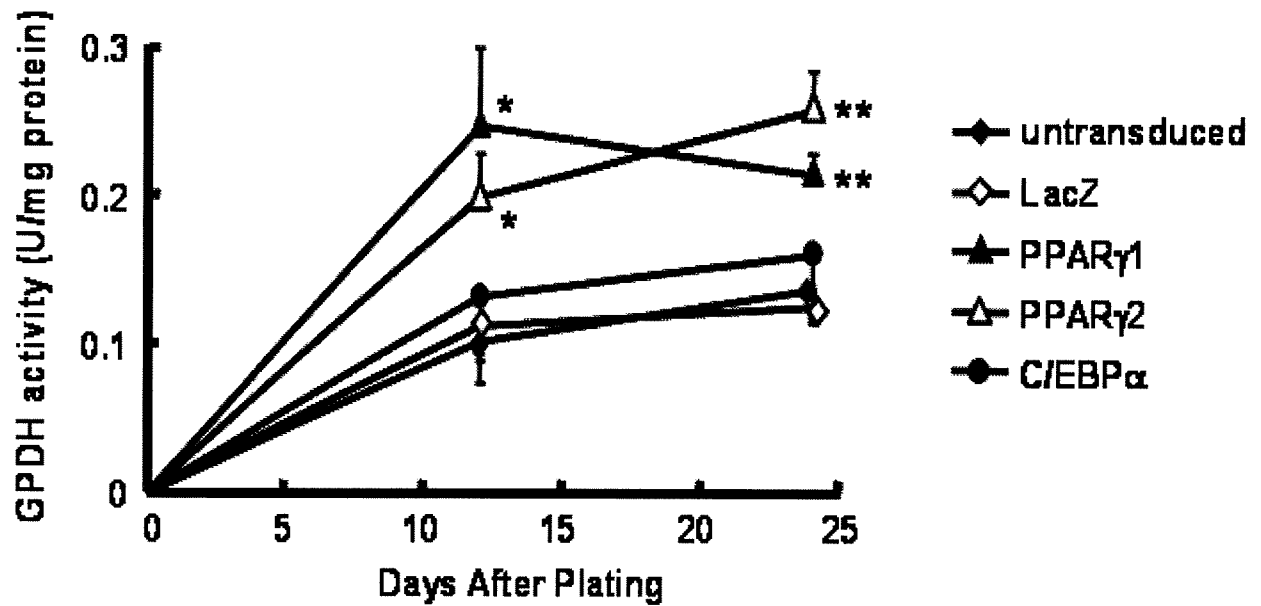
**Fig. 1 Ad vector-mediated transduction efficiency in EBs as determined using various types of promoters.** 5d-EBs were transduced with Ad vectors at 3,000 VP/cell for 2 days. After 48 hr, X-gal staining was performed. Similar results of X-gal staining were obtained in five independent experiments. Abbreviations: RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ $\beta$ -actin promoter; EF, human elongation factor-1 $\alpha$ ; 5d-EBs, five-day-cultured EBs



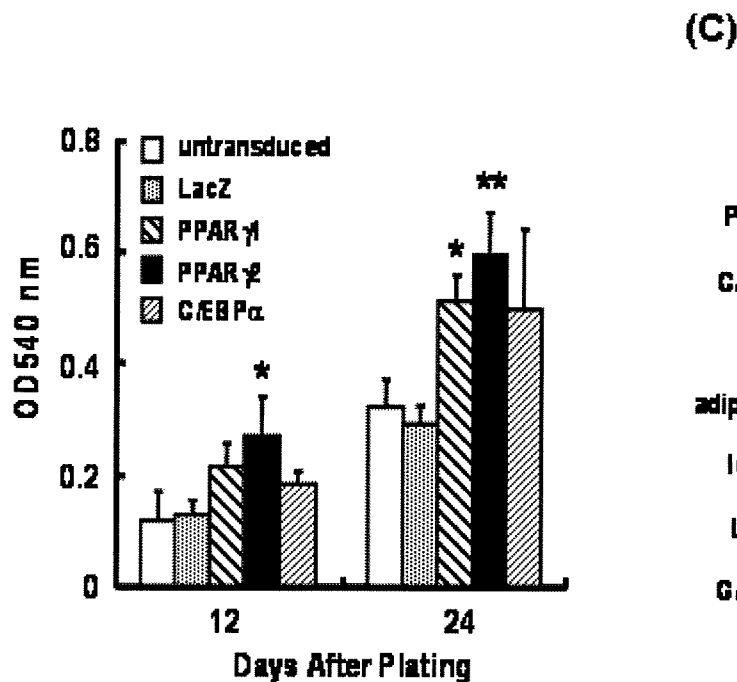
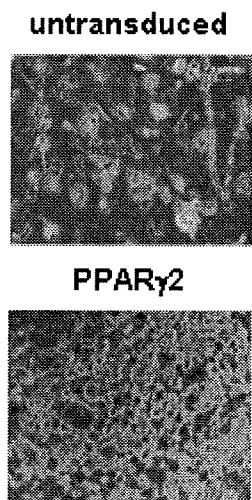
**Fig. 2 Optimization of gene transfer into EB by Ad vector.**

EBs were transduced with 10,000 VP/cell of Ad-CA-GFP by single transduction (A, B; middle) or triple transduction (A, B; bottom). On day 7, (A) confocal microscopic analysis and (B) flow cytometric analysis were performed. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=5). Untransduced EBs are represented as a negative control (A, B; top). Scale bar indicates 300  $\mu$ m.

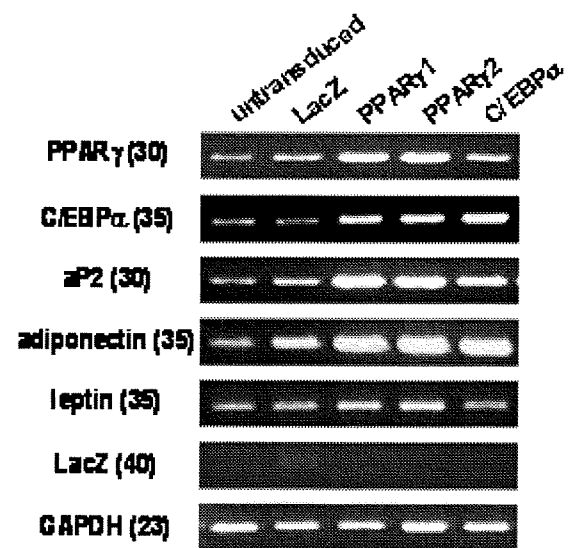
(A)



(B)

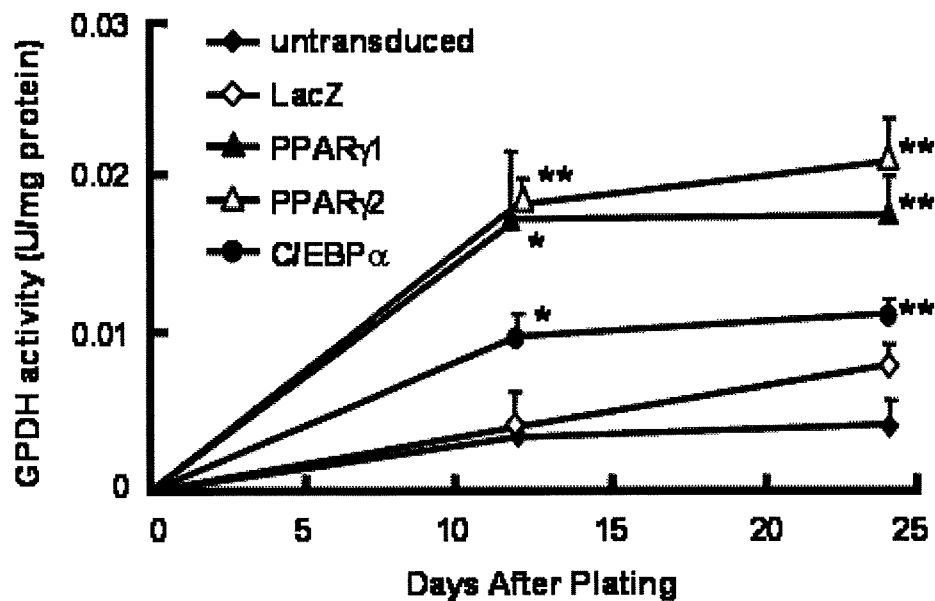


(C)

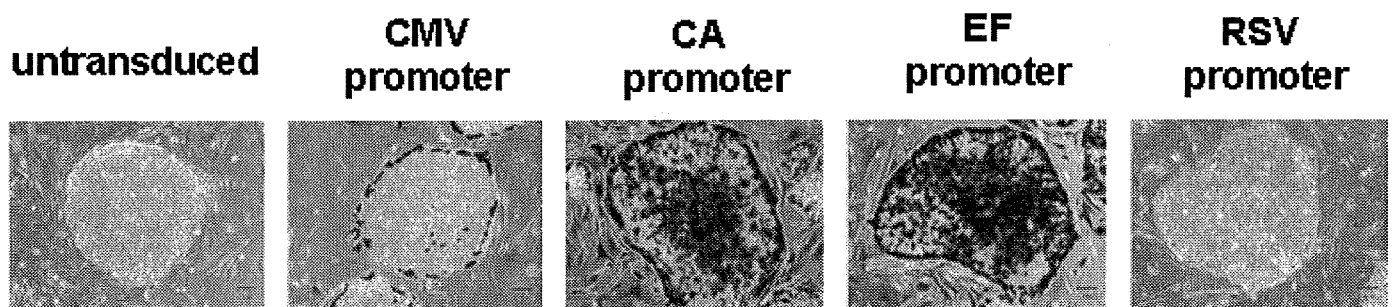


**Fig. 3 Efficient adipocyte differentiation from EBs by Ad vector-mediated PPAR $\gamma$  gene transfer.**

EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of Ad-CA-LacZ, -PPAR $\gamma$ 1, -PPAR $\gamma$ 2, or -C/EBP $\alpha$ . After plating onto a gelatin-coated dish on day 7, EBs were cultured for 24 days with adipogenic supplements. On days 12 and 24 after cultivation, (A) GPDH activity in the cell was measured. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=4). (B) Lipid accumulation was detected by Oil-red O staining at day 24 in the untransduced cells (left, top) or PPAR $\gamma$  2-expressing cells (left, bottom). Scale bar indicates 60  $\mu$ m. After staining with Oil-red O, stained lipid was extracted and the absorbance at 540 nm was measured (right). The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=4). (C) The expression of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , aP2, adiponectin, leptin, and GAPDH was measured by semi-quantitative RT-PCR. The primer for PPAR $\gamma$  amplified both PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\gamma$ 2. Cycle number is indicated in parentheses. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , respectively, as compared with untransduced EBs. Abbreviations: GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein alpha.

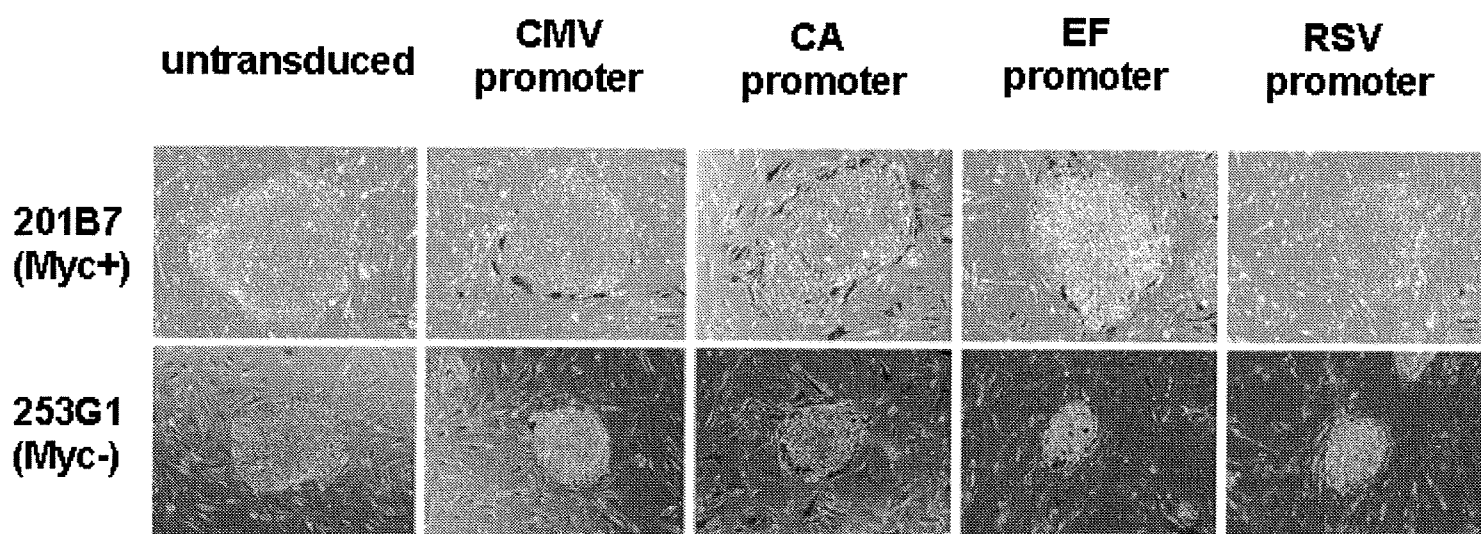


**Fig. 4 Ad vector-mediated transduction into EBs promotes adipogenesis in the absence of adipogenic supplements.** EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of each Ad vector, and then GPDH activity was measured after cultivated in differentiation medium without adipogenic supplements. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=3). \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , respectively, as compared with untransduced EBs.



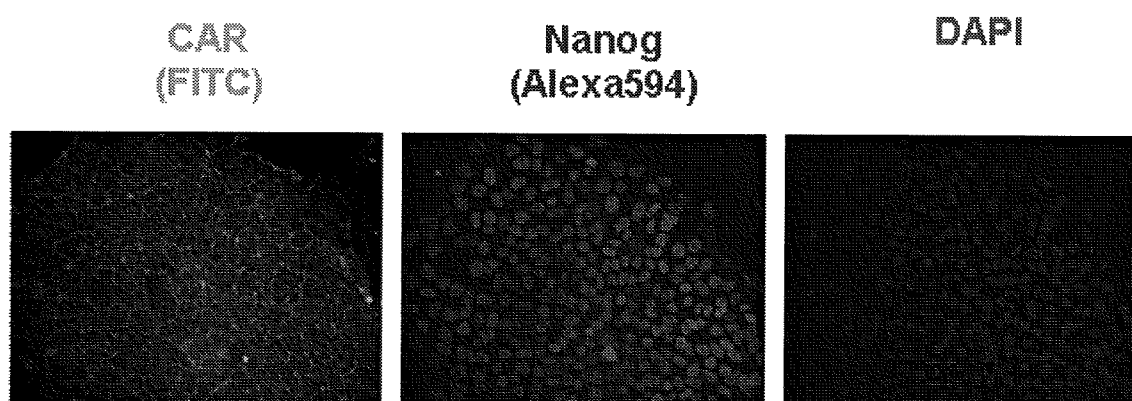
**Fig. 5 Ad vector-mediated transduction efficiency in human ES cells as determined using various types of promoters.**

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



**Fig. 6 Ad vector-mediated transduction efficiency in human iPS cells as determined using various types of promoters.**

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



**Fig. 7 Human iPS cells express CAR.**

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