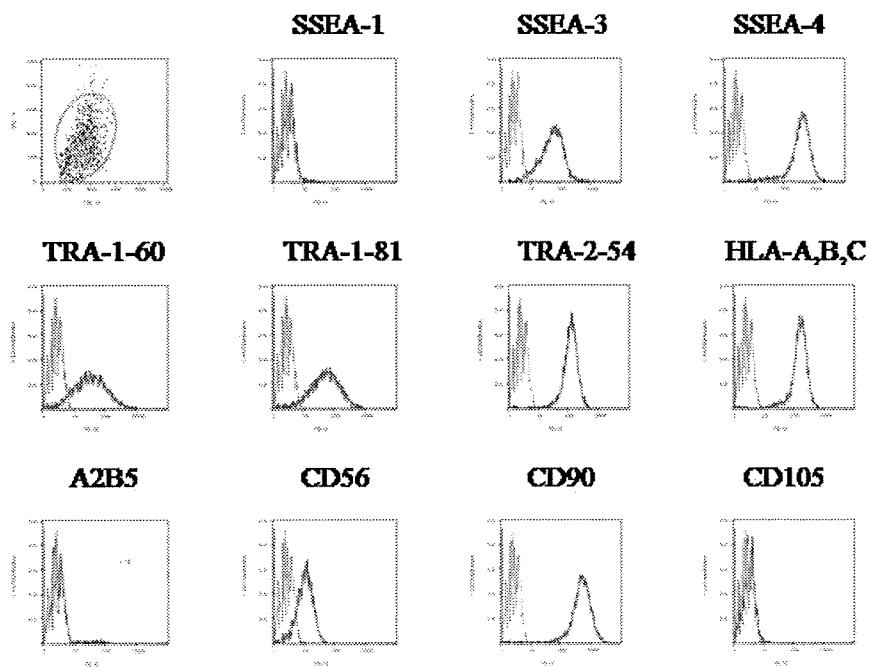
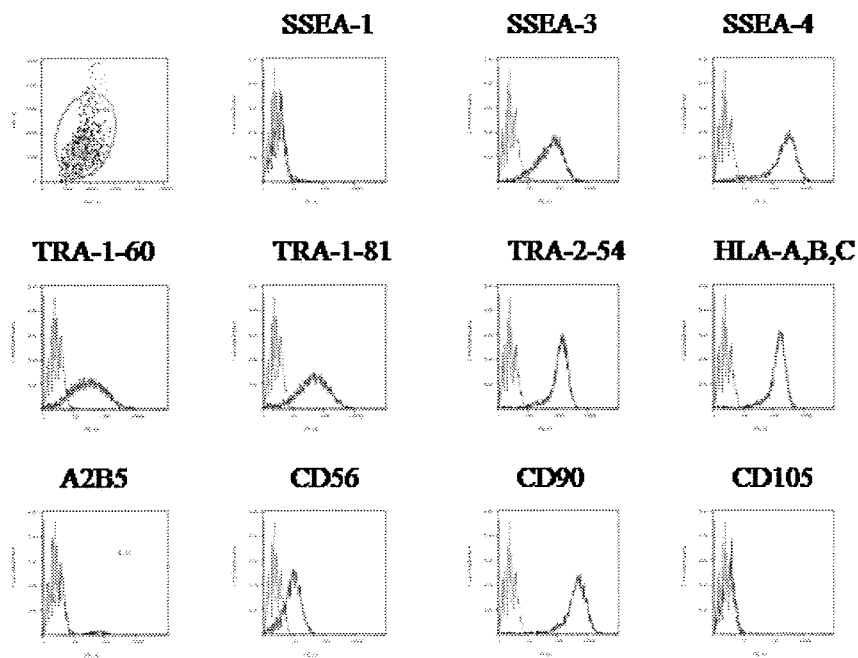


(A) **KhES-1 Dispase**

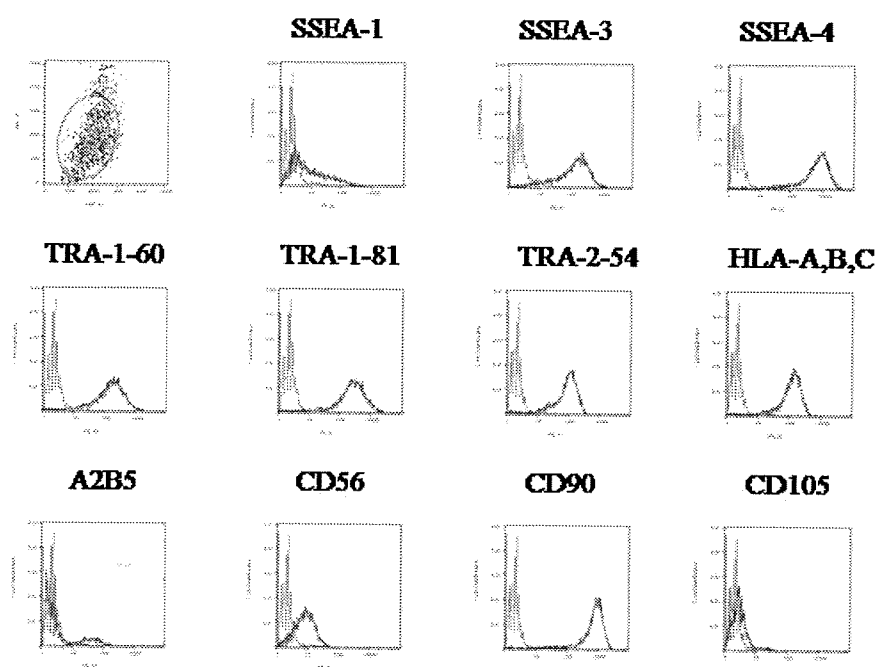


(B) **KhES-1 Collagenase+scraper**



(C)

KhES-1 0.05%Trypsin+EDTA



(D)

KhES-1 Mechanical (EZpassage)

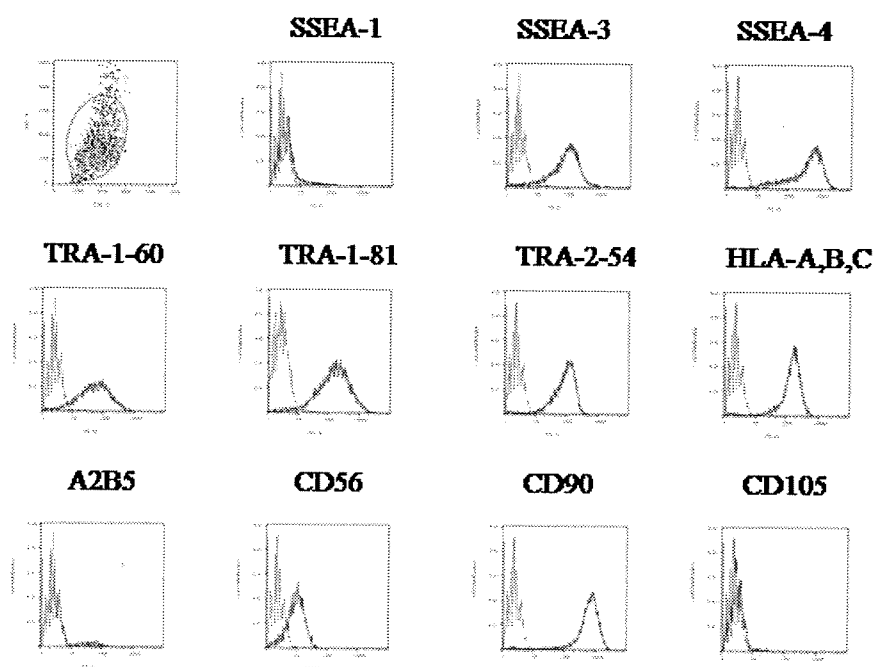


Fig. 8 FACS analysis of human ES cell surface markers.

Human ES cells were dissociated by using dispase (A), collagenase (B), trypsin (C) or StemPro EZPassage Disposable Stem Cell Passing 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（生物資源 研究事業）
分担研究報告書

ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究

分担研究者 水澤 博

独立行政法人 医薬基盤研究所・生物資源研究部部長

協力研究者 小原 有弘

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。最初にモデル細胞として、ヒトテロメラーゼ遺伝子 (hTERT)、ヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子、がん遺伝子 Bmi-1 などの導入により長期増殖能をもつヒト骨髓、臍帯血由来間葉系幹細胞を用い、それらの長期継代培養による染色体の安定性を DAPI 染色法、FISH 法、CGH アレイ法により経時的に調べ、同時に細胞の脂肪細胞、骨芽細胞、神経様細胞への分化能も検討した。E6/E7 および Bmi-1 遺伝子を導入した 3 種類の細胞株は長期培養後、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、市販されている間葉系幹細胞に関する染色体詳細解析を実施し、その有用性を確認した。さらに、アレイ CGH 感度及び再現性を確認する研究を実施し、十分な感度と再現性を確認した。特に長期培養によって 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。本研究から、ヒト ES 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

2種のヒト臍帯血由来間葉系幹細胞、UCBTERT-21 (JCRB1107) および UCB408E6E7 TERT-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/cm² で 37°C、5% CO₂ 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, UE6E7T-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・KC I 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 1×10^6 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 ArrayTM 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 5×10^6 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 5×10^6 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 Waltham, Inc. USA)、神経細胞への誘導には NPMM Bullet kit (NPMM™ BulletKit (B3209, Camblex BioScience Waltham, Inc. USA) を用いた。骨芽脂肪への分化誘導には 0.1 μ M dexamethasone (Sigma Chemical Co., USA)、50 μ g/ml L-ascorbic acid (Sigma Chemical Co., USA) と 10 mM β -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- β 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。

C. 研究結果

(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 (Fig. 1A and B)。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 (Fig. 1D and E)。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 (Fig. 1C and F)。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 (Fig. 1G)。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 (Fig. 1I and J)。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 (Fig. 1H)。

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 (Fig. 2A)。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 (Fig. 2B and D)。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(Fig. 3Ab) 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(Fig. 3Ad)。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- β -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(Fig. 3Af and Ah)。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(Fig. 3Ae and Ag)。これらの結果をFig. 3Bにまとめて記載した。

(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(Fig. 4)。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番染色体の不均衡分割が起こることを明らかにした(Fig. 5)。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(Fig. 6)。

D. 考察

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^{INKA} 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^{INKA} 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等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。健康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。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。

E. 結論

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。

また、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。さらに、本研究に用いた遺伝子導入細胞株において欠失する 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。

今後、細胞治療がますます盛んになるが、ES 細胞だけではなく、組織幹細胞でも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) 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) 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)
- 3) 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ミネーションへの警戒, 実験医学;26(3):561-567 (2008)
- 4) 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. 学会など口頭発表

- 1) 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 (沖縄 2008 年 12 月)
- 2) 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.
- 3) 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).
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

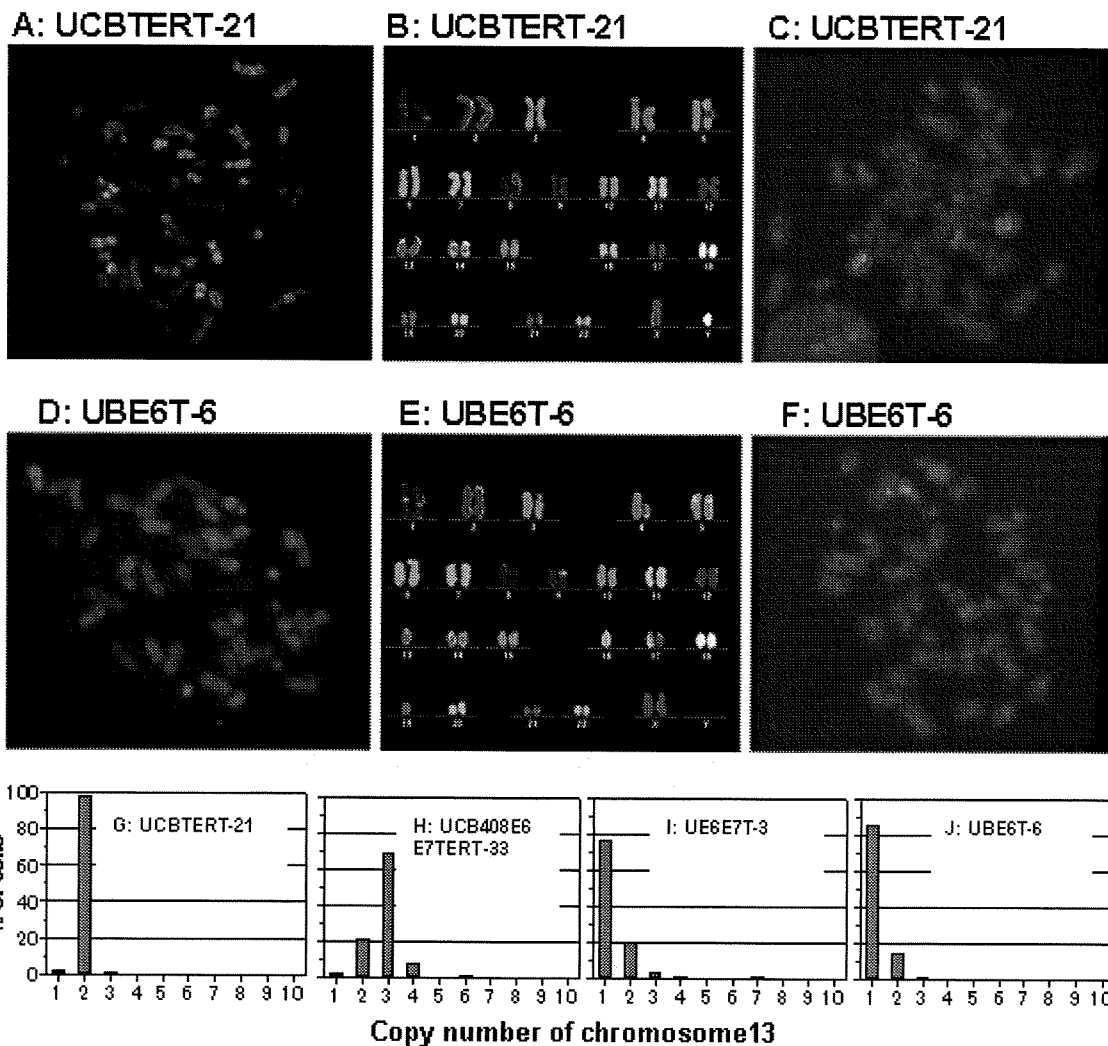


Fig. 1 遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞株の FISH 分析
 UCBTERT-21 (A, B, C) と UBE6T-6 (D, E, F) の染色体の mFISH (A, D)、カリオタイプ (B, E) および染色体 13 番 (green) および 17 番 (red) (C, F) の pFISH 画像を示した。G - J、4 種類の細胞株での細胞あたり 13 番染色体のコピー数。FISH シグナルは 120~200 の展開した染色体と間期核中のスポットを測定した。UCBTERT-21 細胞は 2 コピーの 13 番および 17 番染色体を持っている。他の細胞では 13 番染色体の 1 コピーが欠失している。

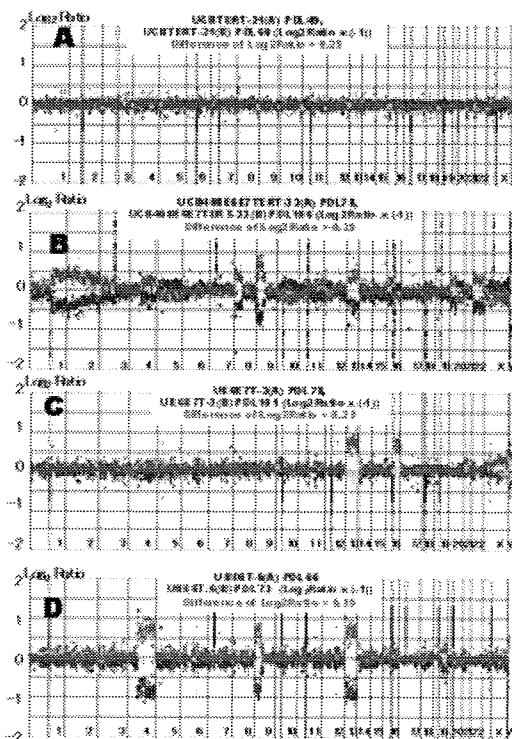


Fig. 2 培養初期と後期における 4 種類の遺伝子導入ヒト細胞株の CGH アレイプロファイル
 X 軸は 22 組の常染色体、X と Y 染色体 chromosomes を Y 軸は [cy3 (hMSCs) / cy5 (normal cell)] の蛍光強度比を \log_2 で示した。0 より上 (red spots) または 0 より下 (blue spots) はその染色体領域の欠失を示した。青スポットは培養の初期のステージ、赤スポットは後期ステージを示し、それぞれをオーバーレイした。青と赤の差のあるスポットを緑で示した。UE6E7T-3 細胞については PDL 78 と 101 の間で 13 番と 16 番染色体の各 1 本ずつ欠失が見られた。

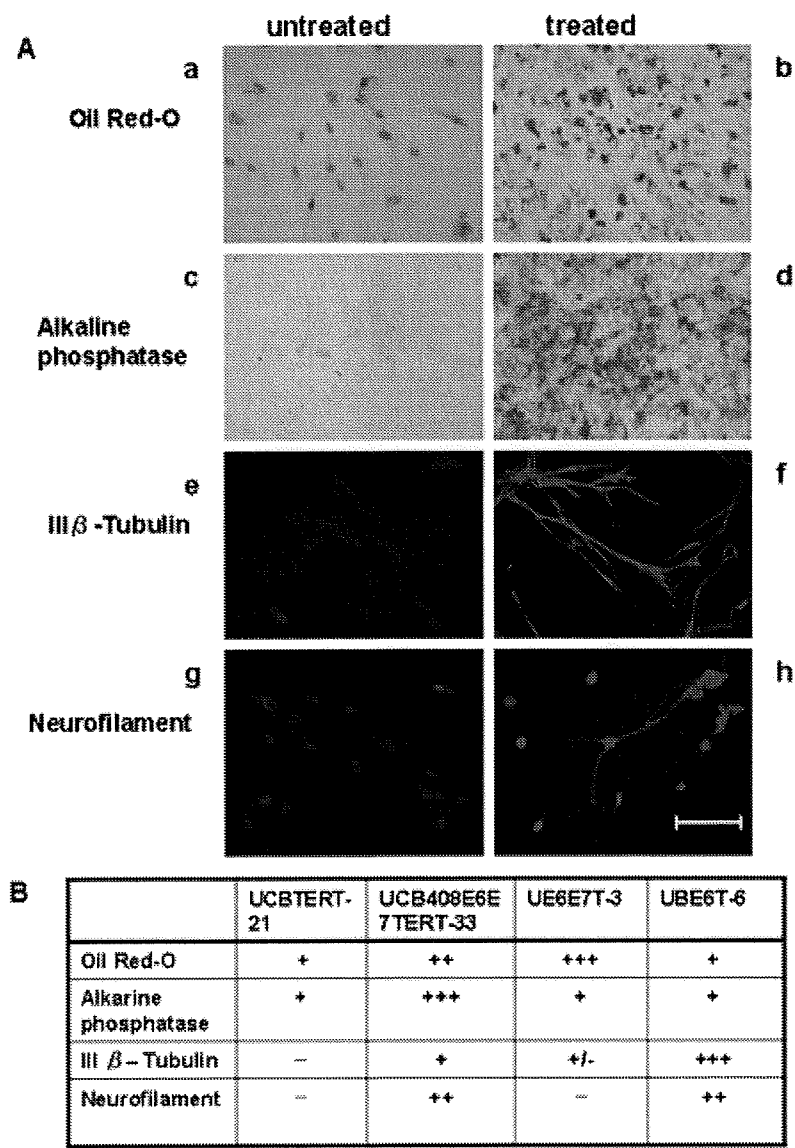
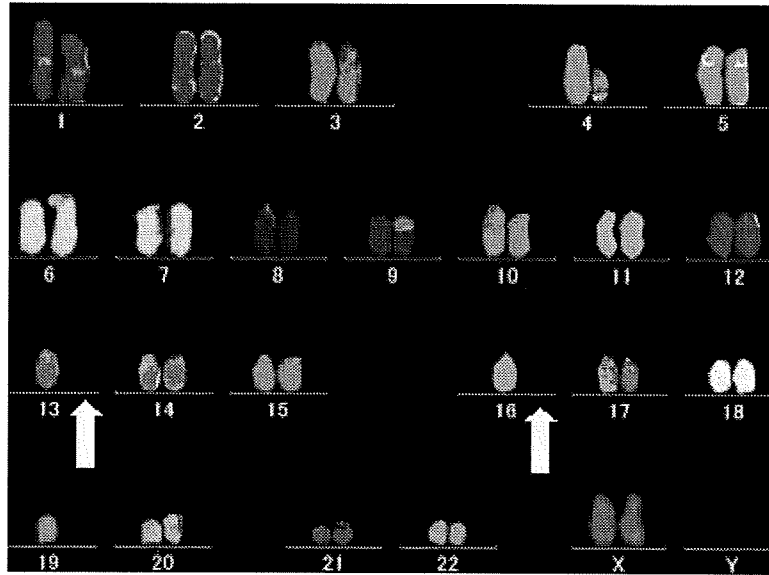


Fig. 3 遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞株の脂肪細胞、骨芽細胞、神経様細胞への分化
 A: 分化した脂肪細胞は Oil Red-O 染色による染色顆粒の蓄積が見られる (Aa and Ab, UE6E7T-3 細胞)。骨芽細胞は高い alkaline phosphatase 活性 (赤) (Ac and Ad, UCB408E6E7TERT-33細胞)を示し、神経細胞は III β-tubulin と neurofilament の特異的タンパク質の発現 (免疫抗体染色) および細胞の形態変化により示された (Ae - Ah, UBE6T-6細胞)。

B: 4 種類の細胞株について胞分化能の違いの比較を示した。
 - ; 未処理細胞と同等, + ; 弱い反応性, +++ ; 高い反応性 (Bar は 20 μm)

A



B

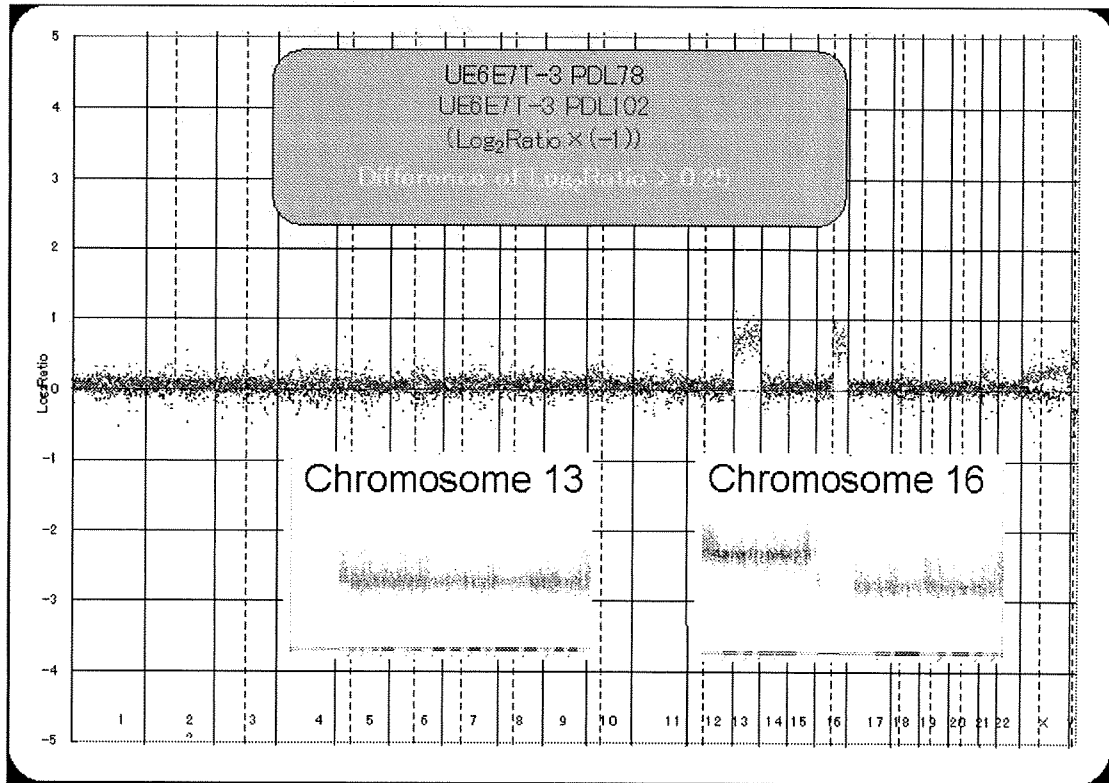


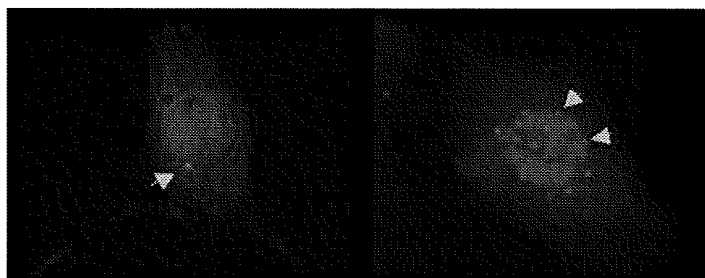
Fig. 4 A: 遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞株 UE6E7T-3 の FISH 分析

UE6E7T-3 細胞では 13 番染色体ならびに 16 番染色体の 1 コピーが欠失している。

B: 遺伝子導入したヒト間葉系幹細胞株 UE6E7T-3 のアレイ CGH 解析

UE6E7T-3 細胞では 13 番染色体ならびに 16 番染色体の長腕部 1 コピーが欠失している。

A



B

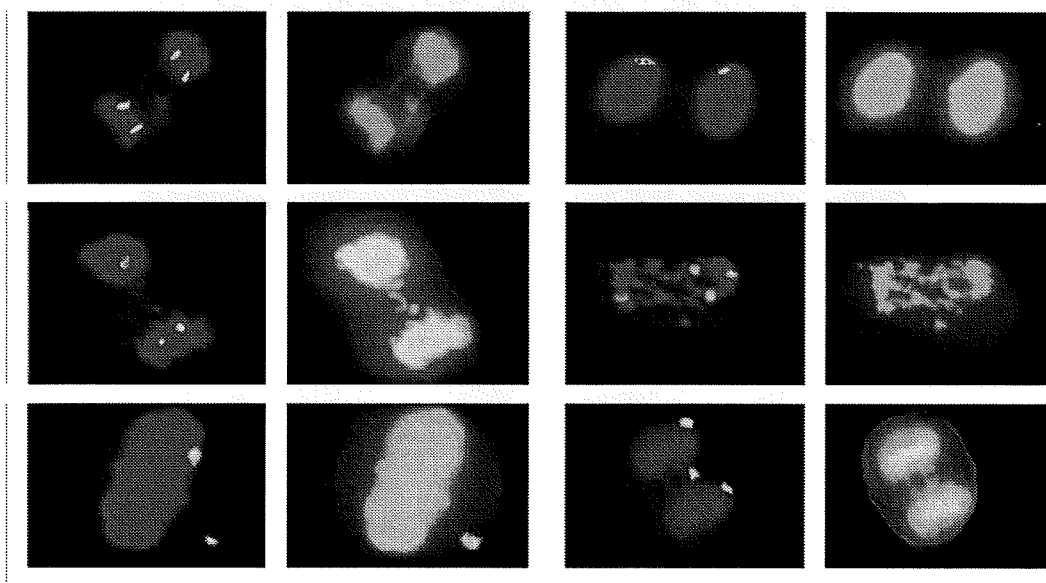


Fig. 5 UE6E7T-3 細胞における中心体の数の変化 (A) と 13 番染色体の不均衡分割 (B)

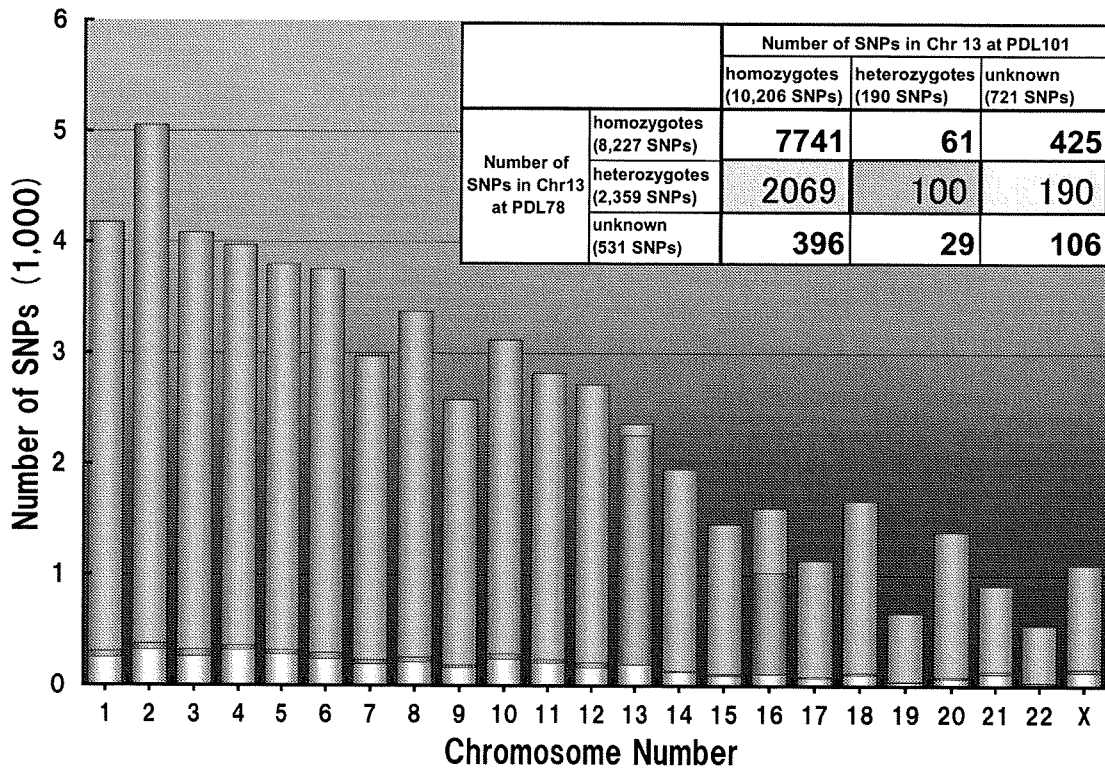


Fig. 6 欠失した13番染色体のSNPチップ解析

13番染色体および16番染色体の長腕部が欠失していることがアレイCGHで明らかとされており、その部分のSNPを解析すると、欠失する前の細胞においてヘテロであったSNPの大部分がホモであるとSNPチップの結果で示された。

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關与する 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 (Endogrlin)およびCD44、CD45、CD