

Fig. 32 Human ESC-derived hepatocytes uptake LDL.

The human ESCs were differentiated into hepatoblasts and transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h and cultured until day 20 of differentiation according to the protocol described in Fig. 6a. The hepatic functions of the 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (SOX17 + HEX + LacZ) and the 3 factors-transduced cells (SOX17 + HEX + HNF4 α) were compared. Undifferentiated human ESCs (hESCs) and induced hepatocytes (day 20) were cultured with medium containing Alexa-Fluor 488-labeled LDL (green) for 1 h, and immunohistochemistry and flow cytometry analysis were performed. The percentage of LDL-positive cells was measured by flow cytometry. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 100 μ m. All data are represented as means \pm SD ($n = 3$).

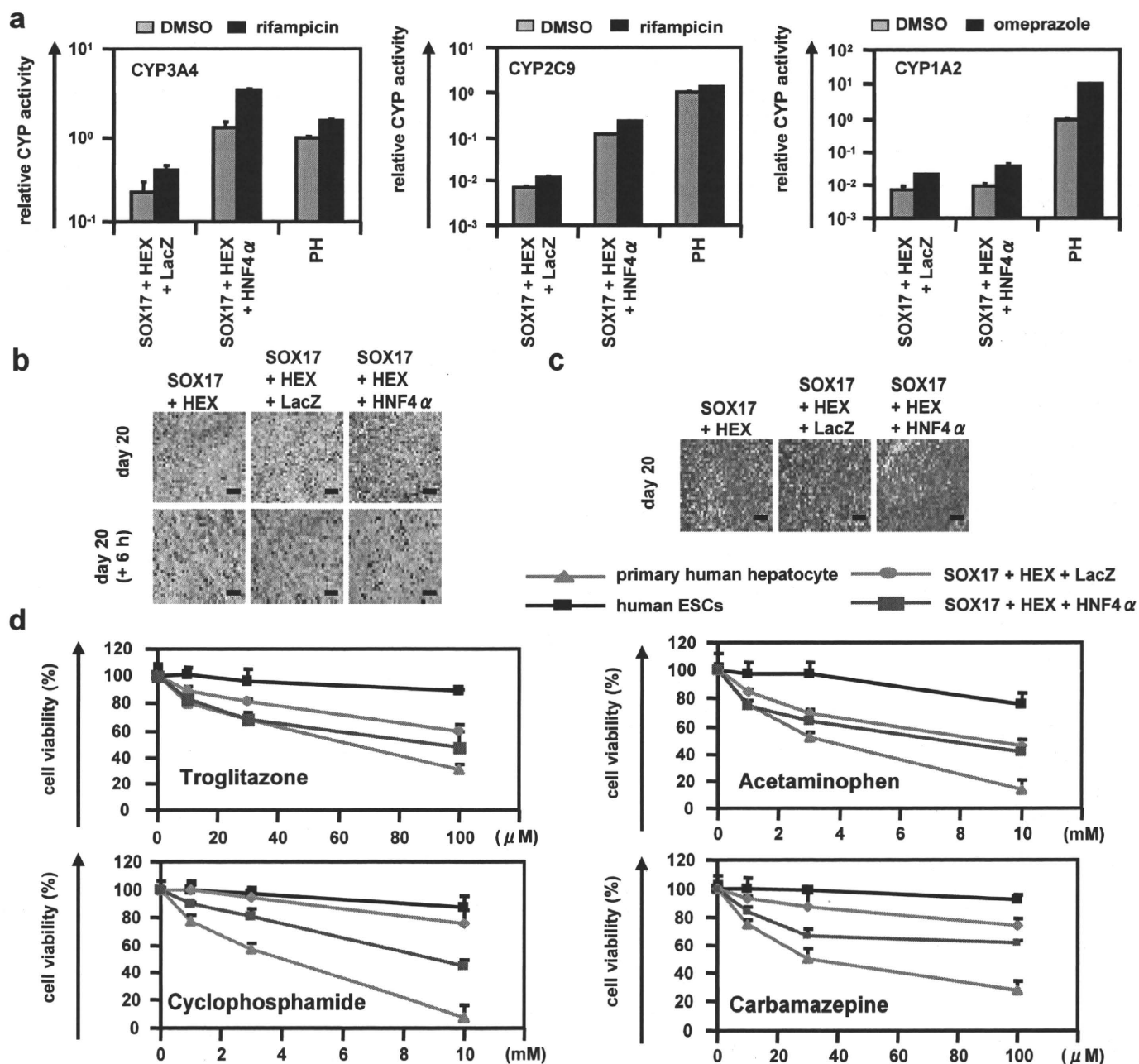


Fig. 33 Transduction of the 3 factors enhances hepatic functions.

The human ESCs were differentiated into hepatoblasts and transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h and cultured until day 20 of differentiation according to the protocol described in Fig. 6a. The hepatic functions of the 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (SOX17 + HEX + LacZ) and the 3 factors-transduced cells (SOX17 + HEX + HNF4 α) were compared. (a) Induction of CYP3A4 (left), CYP2C9 (middle), or CYP1A2 (right) by DMSO (gray bar), rifampicin (black bar), or omeprazole (black bar) in induced hepatocytes (day 20) and primary human hepatocytes (PH), which were cultured for 48 hours after the cells were plated. On the y axis, the activity of primary human hepatocytes that have been cultured with medium containing DMSO was taken as 1.0. (b) The induced hepatocytes (day 20) (upper column) were examined for their ability to take up Indocyanin Green (ICG) and release it 6 h thereafter (lower column). (c) Glycogen storage of induced hepatocytes (day 20) was assessed by Periodic Acid-Schiff (PAS) staining. PAS staining was performed on day 20 of differentiation. Glycogen storage is indicated by pink or dark red-purple cytoplasm. The scale bar represents 100 μ m. (d) The cell viability of undifferentiated human ESCs (black), 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (green), the 3 factors-transduced cells (blue), and primary human hepatocytes (red) was assessed by Alamar Blue assay after 48 h exposure to different concentrations of four test compounds (troglitazone, acetaminophen, cyclophosphamide, and carbamazepine). The cell viability is expressed as a percentage of cells treated with solvent only treat: 0.1% DMSO except for carbamazepine: 0.5% DMSO. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

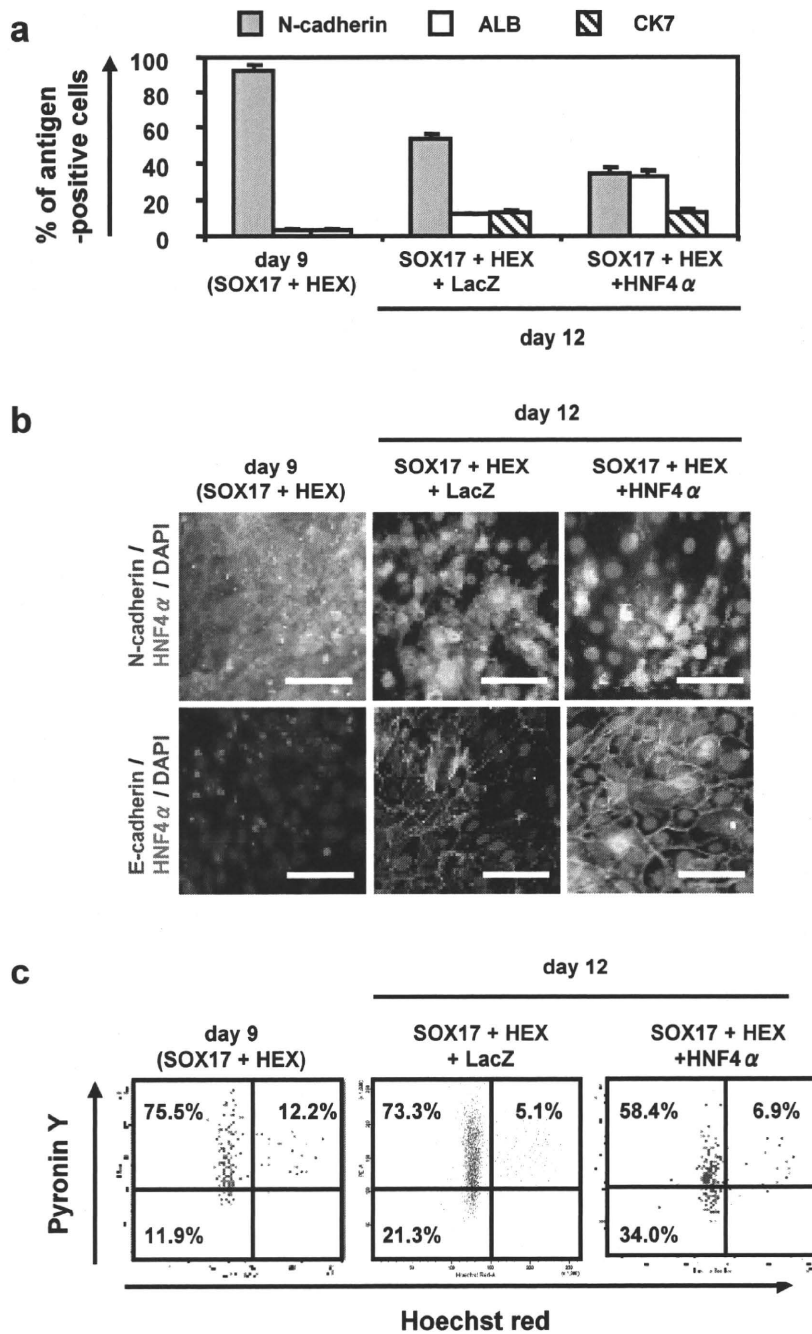


Fig. 34 HNF4 α promotes hepatic differentiation by activating MET.

Human ESCs were differentiated into hepatoblasts according to the protocol described in Fig. 2a, and then transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h, and finally cultured until day 12 of differentiation. (a) The hepatoblasts, 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (SOX17 + HEX + LacZ) (day 12), and the 3 factors-transduced cells (SOX17 + HEX + HNF4 α) (day 12) were subjected to immunostaining with anti-N-cadherin, ALB, or CK7 antibodies. The percentage of antigen-positive cells was measured by flow cytometry. (b) The cells were subjected to immunostaining with anti-N-cadherin (green), E-cadherin (green), or HNF4 α (red) antibodies on day 9 or day 12 of differentiation. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 50 μ m. Similar results were obtained in two independent experiments. (c) The cell cycle was examined on day 9 or day 12 of differentiation. The cells were stained with Pyronin Y (y axis) and Hoechst 33342 (x axis) and then analyzed by flow cytometry. The growth fraction of cells is the population of actively dividing cells (G1/S/G2/M).

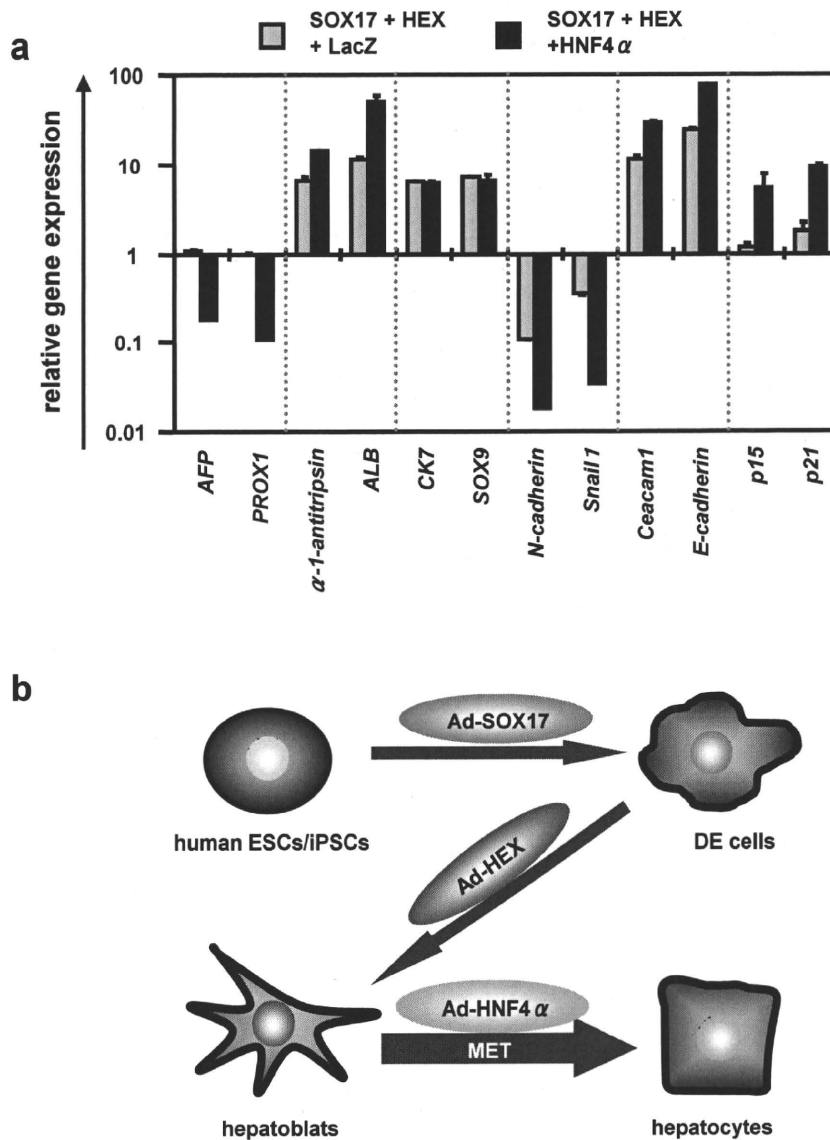


Fig. 35 HNF4 α promotes hepatic differentiation by activating MET.

Human ESCs were differentiated into hepatoblasts according to the protocol described in **Fig. 6a**, and then transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h, and finally cultured until day 12 of differentiation. **(a)** The expression levels of *AFP*, *PROX1*, *α -1-antitrypsin*, *ALB*, *CK7*, *SOX9*, *N-cadherin*, *Snail1*, *Ceacam1*, *E-cadherin*, *p15*, and *p21* were examined by real-time RT-PCR on day 9 or day 12 of differentiation. The expression level of hepatoblasts (day 9) was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n=3$). **(b)** The model of efficient hepatic differentiation from human ESCs and iPSCs in this study is summarized. The human ESCs and iPSCs differentiate into hepatocytes via definitive endoderm and hepatoblasts. At each stage, the differentiation is promoted by stage-specific transduction of appropriate functional genes. In the last stage of hepatic differentiation, HNF4 α transduction provokes hepatic maturation by activating MET.

Table 4 List of Taqman probes and primers used in this study.

Genes	Assay ID or Primers (forward/reverse; 5' to 3')
ALB	GCACAGAATCCTTGGTGAACAG/ATGGAAGGTGAATGTTTTTCAGCA
CYP2D6	CTTTCGCCCCAACGGTCTC/TTTTGGAAGCGTAGGACCTTG
CYP3A4	AAGTCGCCTCGAAGATACACA/AAGGAGAGAACTGCTCGTG
CYP7A1	GAGAAGGCAAACGGGTGAAC/GCACAACACCTTATGGTATGACA
CK7	AGACGGAGTTGACAGAGCTG/GGATGGCCCGTTTCATCTC
SOX9	TTTCCAAGACACAAACATGA/AAAGTCCAGTTTCTCGTTGA
PDX1	Hs00426216_m1
NKX2.2	Hs00159616_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA/GTGGTCGTTGAGGGCAATG
HNF4 α	CGTCATCGTTGCCAACACAAT/GGGCCACTCACACATCTGTC
CYP1A2	CAATCAGGTGGTGGTGTGTCAG/GCTCCTGGACTGTTTTCTGC
CYP2C9	GGACAGAGACGACAAGCACA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
CYP2C19	ACTTGGAGCTGGGACAGAGA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
GSTA1	ATGCCCATGATACTGGGTA/GTGAGCCCCATCAATCAAGT
GSTA2	TGCAACAATTAAGTGCTTTACCTAAGTG/TAACTAAGTGGGTGAATAGGAGTTGTATT
UGT1A1	TAAGTGCTACCCCCAAAACG/GCTTTGCATTGTCCATCTGA
POR	GGTGGCCGAAGAAGTATCTCT/ATTTTGGTGAACTCGGGGACT
MDR1/ABCB1	GCCAAAGCCAAAATATCAGC/TTCCAATGTGTTCCGGCATT
MRP3/ABCC3	GTCCGCAGAATGGACTTGAT/TCACCACTGGGGATCATT
MRP6/ABCC6	TGTCGCTCTTTGGAAAATCC/AGGAACACTGCGAAGCTCAT
BSEP/ABCB11	TGATCCTGATCAAGGGAAGG/TGGTTCCTGGGAAACAATTC
AFP	TGGGACCCGAACCTTTCCA/GGCCACATCCAGGACTAGTTTC
PROX1	TTGACATTGGAGTGAAAAGGACG/TGCTCAGAACCTTGGGGATTTC
α -1-antitrypsin	ACTGTCAACTTCGGGGACAC/CATGCCTAAACGCTTCATCA
N-cadherin	GAGGAGTCAGTGAAGGAGTCA/GGCAAGTTGATTGGAGGGATG
Snail	AATCGGAAGCCTAACTACAGCG/TCCCAGATGAGCATTGGCA
Ceacam1	TCACCTTGAATGTCACCTATGGC/GGCTTTGCTACTACTGGACTTAG
E-cadherin	CGAGAGCTACACGTTACGG/GTGTGCGAGGGAAAAATAGGCTG
p15	TGGACCTGGTGGCTACGAAT/AGGGCCTAAGTTGTGGGTTCA
p21	CTGCCAAGCTCTACCTTCC/CCCGCAGTATCTTGCCTCC

Table 5 List of antibodies used in this study.

Antigen	Type	Company
CXCR4	mouse	R&D Systems
Alpha-1-Fetoprotein	rabbit	DAKO
CK7	mouse	Invitrogen
ALB	rabbit	SIGMA
CK18	mouse	Invitrogen
CYP2D6	goat	Santa Cruz Biotechnology
CYP3A4	goat	Santa Cruz Biotechnology
ASGR1	goat	Santa Cruz Biotechnology
c-Met	mouse	Santa Cruz Biotechnology
LDL	mouse	Invitrogen

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（総合）研究報告書

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構築のための基礎研究に関する研究

研究分担者 古江-楠田 美保

独) 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室 研究リーダー

研究要旨：

毒性評価系に用いる細胞の条件として、再現性のある安定した試験が可能なこと、その細胞を十分量安定供給できることなどが重要である。そこで、まず、再現性のある安定したヒト iPS 細胞の培養系を確立する。次に、ヒト iPS 細胞から肝細胞へ分化効率を評価する方法を開発し、毒性評価系に用いるヒト iPS 細胞の品質評価法、さらに、品質管理法を確立することを分担研究の目的とした。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様に、樹立方法や培養条件が研究室により異なり、株間の差が大きいことが予想される。また、同じ細胞から作製された iPS 細胞であっても、クローン間で形質が異なることが発表されている。また、他の体細胞に比べて不安定であり、その特徴を維持して培養することが難しいことが知られている。分化しやすく、継代するうちに異なる細胞集団になることも多い。細胞分散法を間違えば、ほとんどの細胞がアポトーシスを起こして継代できないことも稀ではない。

ヒト iPS 細胞は、一般的に、マウス胎児組織由来フィーダー細胞上で、牛胎児血清、あるいは、代替血清・knockout-serum replacement® (KSR)と、塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を添加した培地を用いて培養されている。血清は、増殖因子だけでなく、未知の分化促進因子やウイルスなどを含んでいる可能性がある。また、マウス

胎児由来フィーダー細胞は、牛胎児血清添加の条件で準備され、未知なる因子を含む様々な因子を分泌しており、また、病原体や抗原性物質も含まれており、ロットが異なるたびに、ヒト iPS 細胞の形状も異なってくる。KSRは無血清であると言われていたが、ロット差のある動物由来成分を含み、組成が公開されていない。このような条件で培養を行うために、同一研究室内においても、継代のたびにヒト iPS 細胞の品質は異なる。また、分化誘導を行っても、毎回、その誘導率が異なる。

本研究事業では、iPS 細胞の毒性評価系構築を目的としており、スクリーニングに用いる細胞の条件として、再現性のある安定した試験が可能なこと、その細胞を十分量安定供給できることなどが重要である。そこで、再現性のある安定したヒト iPS 細胞培養系を確立し、ヒト iPS 細胞から肝細胞への安定した高効率分化誘導技術の開発を主任研究者らとともに行う。さらに、これを応用して肝細胞への分化指向性を評価す

る品質評価法を開発する。これらを統合して、毒性評価系応用に用いるヒト iPS 細胞の品質評価、品質管理法の策定を行うことを分担研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 培養技術の標準化

ヒト ES、iPS 細胞の継代の中で、細胞分散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 個ぐらいの細胞集団にして継代を行う。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[5]。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。特に、酵素処理によってシングルセルが多くでてしまうような操作により、染色体異常が誘導されると報告されている。操作者による差も大きく、今後改良がもっとも必要な事項であると考えられる。そこで、iPS 細胞の場合、これらのうちの分散方法が多く技術者が安定して培養が行えるか、検討を行った。

2. 未分化性評価法の標準化

未分化なヒト ES 細胞に発現するマーカー分子や表面抗原などが報告されているが、未分化性を同定する決定的なマーカー分子は見つかっていない。現状では、形態からの判断がもっとも確実であると言われている。未分化なマウス、サル、ヒトの ES 細胞は、

組織非特異的アルカリフォスファターゼ (AP) 活性を示すことが知られており、コロニーの形態と AP を染色して、判定されることも多い。フローサイトメトリー (FACS) による細胞表面抗原の同定も行われている。ヒト胚性癌細胞(EC)に発現する糖脂質である stage specific embryonic antigen (SSEA)-3、SSEA-4、糖タンパクである Tra-1-60、Tra-1-81 が広く使用されている。SSEA-1 は、マウスにおいては未分化な ES 細胞において発現するが、ヒトにおいては、分化した ES 細胞において発現する。SSEA-3、SSEA-4 は、未分化なヒト ES 細胞にも発現するが、赤血球にも発現する。一般的には、SSEA-1 と、SSEA-3 あるいは SSEA-4 が調べられている。しかし、SSEA-3 が発現しているからといって SSEA-4 が発現しているとは限らないため、これらの抗体をセットで解析することが望ましい。そこで、国際ヒト ES 細胞標準化プロジェクト (ISCI) にて使用されている抗体をシェフィールド大学より、これらの抗体の供与をうけて、ヒト ES 細胞、iPS 細胞の細胞表面抗原の発現プロフィールを FACS を用いて解析した。

また、未分化状態でのヒト iPS 細胞の遺伝子発現を PCR アレイを用いて解析を行った。ISCI での解析でも用いられた、幹細胞の未分化マーカーである Oct3/4、Nanog、Sox2 などや、goosecoid や T、MyoD などの初期分化マーカーなどの遺伝子群を解析できる Pluripotency, また、P53 などの癌抑制遺伝子群を解析できる Oncogenes and Tumor suppressor genes PCR array を用いた。

3. 無血清培養法開発

ヒト ES、iPS 細胞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。分担保研究者は、これまでに、ヒト ES 細胞をフィーダー細胞用いず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。hESF9 を用いて、種々のヒト ES、iPS 細胞の培養が可能かどうかを検討した。

4. *in vitro* における多分化能安定性評価法開発

分化能の評価は、一般的に ES/iPS 細胞を凝集させて胚様体(Embryoid body; EB)を作成させて分化誘導し、10 日間から 3 ヶ月程度培養を行って分化マーカー遺伝子の発現を解析している。そこで、ヒト ES 細胞ならびに iPS 細胞から EB を作成後、1 ヶ月から 3 ヶ月間培養を行ったのち、RNA を抽出し、外胚葉、内胚葉、中胚葉の遺伝子を複数リストアップして QRT-PCR にて発現解析を行った。

EB の培養方法には、EB 形成後に細胞接着が起こらない特殊加工した細胞培養プレートを用いて培養する方法もあるが、このようなプレートはコストがかかるとともに、細胞が浮遊している為、培地交換にも手間がかかる。多種類のヒト iPS 細胞の分化傾向を評価するためには、安定で簡便で安価な評価方法が必要である。そこで特殊加工した細胞培養プレートを用いた培養方法と従来の方法で培養を行い、これらの遺伝子発現を Stem cell Pluripotency, Array(ABI)を用いて比較解析した。

5. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分

化誘導法開発

未分化な iPS 細胞から肝細胞へ分化誘導を行うためには、まず、内胚葉への分化誘導条件の開発を行う必要がある。一般的に、ヒト ES 細胞、iPS 細胞の分化誘導は、胚葉体 (embryoid body, EB) と言われる細胞凝集塊を作成させて、血清添加の条件で培養を行うことにより、自発的分化を誘導してから、目的の分化した細胞を回収する。しかし、この条件では、分化誘導の過程を追うことは難しく、血清のロットにより、分化する組織が異なる。また、自発的分化誘導に任せるために、分化誘導率は毎回異なる。そこで、hESF9 を改良した分化誘導培地 hESF5-differ を用いて、二次元培養下に、分化誘導条件の開発を行った。まず、細胞外マトリックスや細胞の播種密度の検討を行った。また、次に、種々の増殖因子による分化誘導への影響を、外、中、内胚葉分化マーカーの発現を指標として、解析を行った。

様々な iPS 細胞株が樹立されていくことが予想される中、ハイスループットで分化能を予測することが必要となってくるものが考えられたため、Activin A に対する細胞の応答能をハイスループットで解析行える方法を検討した。すなわち、ファイブロネクチンでコートしたマルウェルプレートに、hESF9 培地を用いて細胞を播種し、ActivinA に対する Foxa2(内胚葉マーカー)の発現解析を cELISA システムによりできるかどうかを検討した。さらに、細胞播種濃度、ActivinA 濃度、培養日数、培地交換の有無等の点を改良を検討した。改良した内胚葉細胞への分化プロトコールを用いて、ヒト

iPS 細胞株間での内胚葉細胞分化誘導効率の違いを、イメージアナライザーを用いて解析した。さらにこの内胚葉細胞への分化効率と、水口らの分化プロトコールによって誘導された成熟肝細胞への分化効率に相関性があるかを検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトES, iPS 細胞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行っており、ヒトESならびにヒトiPS細胞は、動物胚に移植を行っていない。

C. 研究結果

1. 培養技術の標準化

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

いわゆるメカニカルによる継代方法[3]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。しかし、この手法は熟練と時間を要し、また、大容量での培養は難しく、毒性評価系構築への応用は難しいと考えられた。

② コラゲナーゼ

国際的には 0.1%コラゲナーゼ IV[5]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。しかし、Tic 細胞株や Dotcom 細胞株においては、フィーダー細胞と凝集塊を作り、毒性評価系構築への応用は難しいと考えられた。

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、シングルセルになる細胞株もあり、すべての細胞株に使用できるわけではないため、毒性評価系構築への応用は難しいと考えられた。

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。トリプシンを継続して使用した場合、分化しない未分化性の強い細胞が生き残るとされているため、国際的にはあまり広く使用されていない。Tic 株や Dotcom 株を処理したところ、細胞の多くがアポトーシスを起こして死滅するか、あるいは分化したため、毒性評価系構築への応用は難しいと考えられ

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熟練を要し、操作者によっては細胞がシングルセルとなり、継代後に細胞が分化してしまうか、細胞死してしまうことがあったため、毒性評価系構築への応用は難しいと考えられた。

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、処理時間依存性がそれほど高くなく、トリプシンやコラゲナーゼより穏やかに細胞を分散することが可能であった。この方法では、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、毒性評価系構築への応用できる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、ならびに iPS 細胞をシングルセルにしても細胞が増殖した。しかし、フィーダー上で KSR を用いた培養条件下においては、分化細胞が大量に出現した。未分化性維持をするうえでは、毒性評価系構

築への応用は難しいと考えられた。

表 1. 分散法による継代への影響

分散法	継代後の形態	株間の差
機械的	良好	なし
EDTA	良好	あり
コラゲナーゼ	やや良好	あり
トリプシン/EDTA	細胞死、分化	あり
CTK	技術差細胞死	あり
ディスパーゼ	良好	ほとんどなし
アクユターゼ	分化	ほとんどなし

以上の結果から、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。その培養方法を表 2 に記載する。

2. 未分化性評価法の策定

ヒト ES 細胞の国際標準化プロジェクトで使用されている抗体 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81、Tra-2-49 を、シェフィールド大学より抗体の供与を受け、ヒト ES 細胞・KhES-1、ヒト iPS 細胞・Dotcom、ヒト胚性癌細胞 PA-1 における発現プロフィールを FACS を用いて解析を行った(図 1)。ヒト ES 細胞・KhES-1、ヒト iPS 細胞・Dotcom の発現プロフィールはほとんど同様で、未分化マーカーを高率に発現していることが明らかとなった。また、胚性癌細胞である PA-1 は、分化マーカーである SSEA-1 の発現を認めるとともに、SSEA-4 や Tra-1-60 の発現率が低く、分化傾向にあることが明らかとなった。以上のことから、

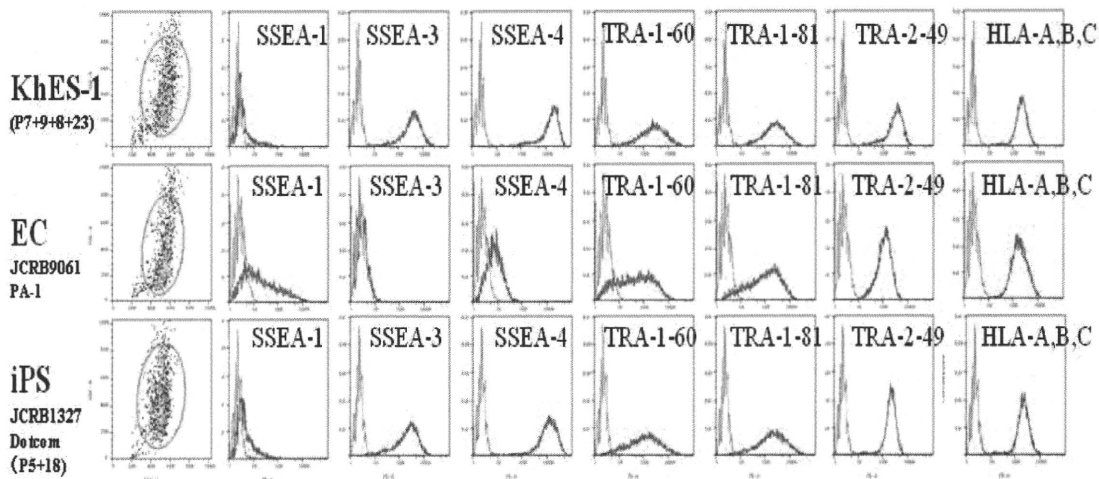


図1：ヒトES細胞・KhES-1、ヒトiPS細胞・Dotcom、ヒト胚性癌細胞PA-1の未分化マーカー発現プロフィール

ヒトiPS細胞において、国際的にヒトES細胞の標準解析として使用されているFACSによる解析が可能であり、これを用いてiPS細胞の未分化性の評価の標準化が可能であることが示された。

さらに、ES/iPS細胞におけるヒト幹細胞の未分化マーカーや早期分化マーカーなどの遺伝子群の発現をPluripotency PCRアレイを用いて、解析した(図2)。ヒトES細胞とiPS細胞における未分化マーカー遺伝子、あるいは早期分化マーカー遺伝子の発現にほとんど差は見られなかった。MRC5細胞から樹立されたiPS細胞クローンである、JCRB1331(Tic)と染色体異常を示すJCRB1329(Squeaky)を用いて、Oncogenes and Tumor suppressor genesの発現を比較した。その結果、JCRB1329において優位に発現する遺伝子が存在することが示唆された(図3)。JCRB1329については、樹立者よりテラトーマ形成を確認できないとの報告が

得られており、品質との関連性が推測された。

3. 無血清培養法開発

フィーダーを用いないhESF9培地を用いた培養系において、KhES-1, KhES-3, TicにおけるゼラチンI型コラーゲン、ウシ由来ファイブロネクチン、ヒト胎盤由来ファibroネクチン、リコンビナントファイブロネクチン、マウス由来ラミニン、ビトロネクチン、リコンビナントビトロネクチンに対する接着性を検討した。その結果、ファイブロネクチン、ラミニン(マウス)、ビトロネクチンに対してはいずれも高い接着性を示すことが明らかとなった(図4)。また、これらの条件下において、いずれも未分化マーカー蛋白であるSSEA-4やOct3/4の発現が見られた。しかし、ビトロネクチン上で培養した細胞の形態がやや扁平となり細胞の境界がはっきりしており分化傾向を示した。

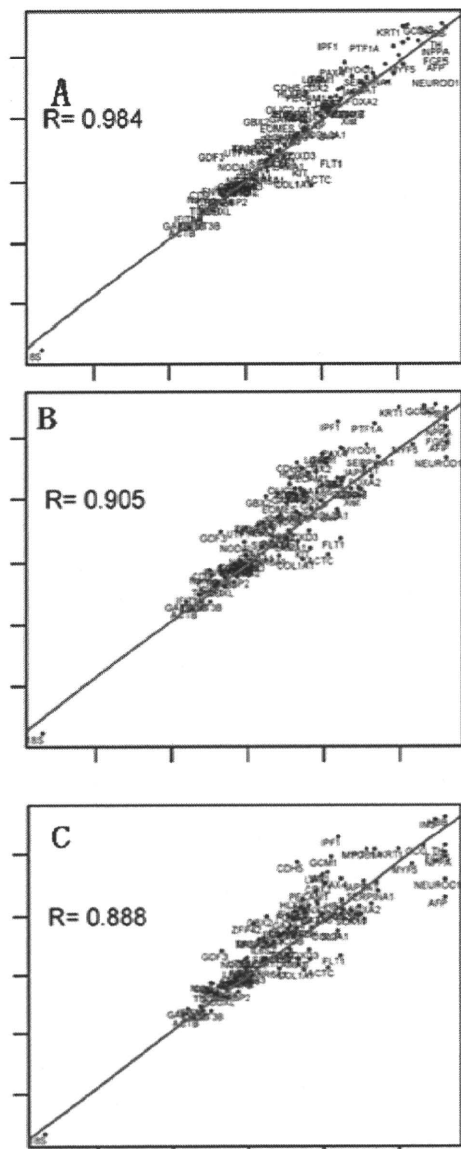


図2. ヒト ES/iPS, EC 細胞間における遺伝子発現比較解析

ヒト ES/iPS, EC 細胞の、未分化状態において、RNA を抽出し、P I u r i potency PCR array を行い、カテゴリー間 A) ES と iPS 細胞、B) ES と EC 細胞、C) EC と iPS 細胞 における各遺伝子の相対発現レベルを Scatter Plot で示した。R は相関係数を示す。

また、ラミニン上で培養した細胞も同様にやや分化傾向を示した。ファイブロネクチン上で培養を行った細胞は、細胞境界が不明瞭で細胞内で占める核の面積が大きい未分化な ES 細胞に特徴的な形態を呈していた。現在のところ、マーカーの発現よりも細胞形態がもっともよい未分化性の指標と

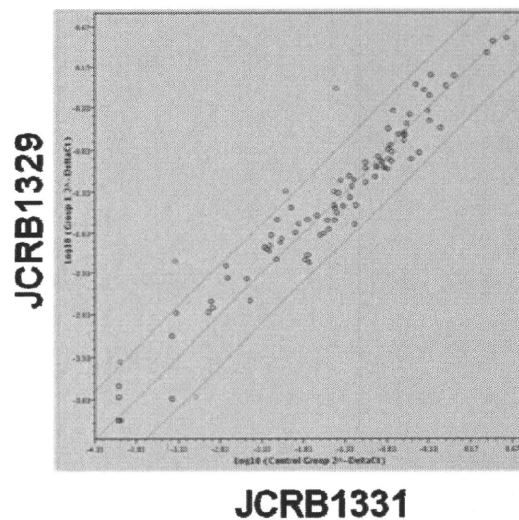
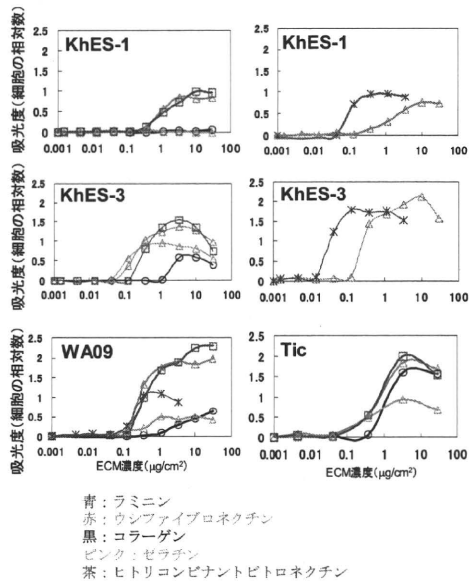


図3. 同一細胞からのクローンであるヒト iPS 細胞株における Oncogenes and tumor suppressor genes 遺伝子発現比較解析

同一細胞からのクローンである、JCRB1331 (Tic) と 染色体異常を示す JCRB1329 (Squeaky) の未分化状態において、RNA を抽出し、Oncogenes and Tumor suppressor genes PCR array を用いて、この細胞株間における各遺伝子の相対発現レベルを Scatter Plot で示した。三斜線外の部分は少なくとも3倍以上の相対変化が見られた遺伝子群であり、緑印は X medium で相対変化の高い遺伝子群、赤印は Y medium で相対変化の高い遺伝子群を示す。なることが知られている。以上の結果から、複数株において、hESF9 培地とファイブロネクチンを用いた培養系が未分化性維持に有利であることが示された。

次に、ヒト初代培養ケラチノサイトから、フィーダー細胞ならびに KSR を用いた培地中にて樹立したヒト iPS 細胞 UTA-1 (東京大学樹立、供与) を、ファイブロネクチンと hESF9 培地にアクチビンを添加した条件で、長期培養を試みた。その結果、細胞倍加時間は変化せず、テラトーマ形成による分化能も保持していた(図5)。さらに、牛血清由来の N-ノイロラミン酸が、無血清培地を用いて培養することにより、低下して

いた(図6)。以上のことから、品質管理を行う上で、hESF9 培地は有用であることが明らかとなった。



青：ラミニン
赤：ウシ由来ファイブロンネクチン
黒：コラーゲン
ピンク：ゼラチン
茶：ヒトリコンビナントビトロネクチン

図4. フィーダーを用いない hESF9 培地を用いた培養系において、KhES-1, KhES-3, Tic におけるゼラチン I 型コラーゲン、ウシ由来ファイブロンネクチン、ヒト胎盤由来ファイブロンネクチン、ヒト胎盤由来ファイブロンネクチン、ヒト胎盤由来ファイブロンネクチン、ヒト胎盤由来ファイブロンネクチン、ヒト胎盤由来ファイブロンネクチン、ヒト胎盤由来ファイブロンネクチン、ヒト胎盤由来ファイブロンネクチンに対する接着性

図6. MEF 上ならびに、無フィーダーで培養を行った UTA=1 細胞における N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) 細胞発現プロファイル解析。Plos One (2010) 10.1371/journal.pone.0014099 より転載

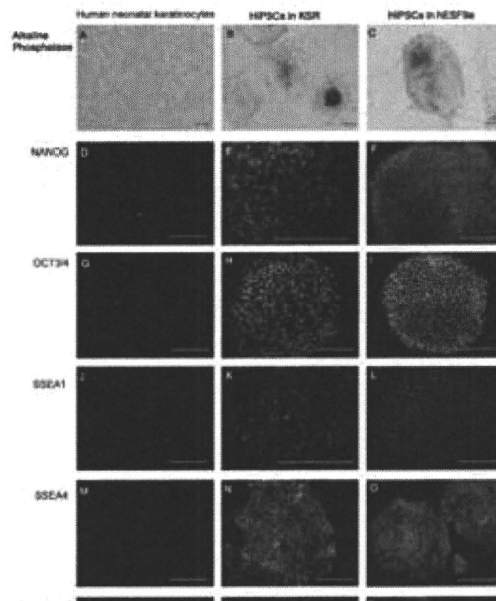
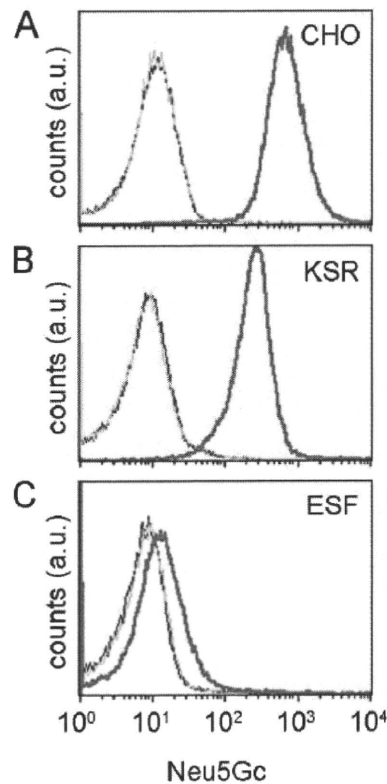


図5. ヒトケラチノサイトから、マウスフィーダー細胞 (MEF) ならびに KSR を用いた培養条件下で iPS 細胞を樹立した (UTA=1)。この細胞を、ファイブロンネクチンと hESF9a 培地を用いて継続的に培養を行った。iPS 細胞は、MEF 上でもフィーダーフリーであっても、未分化マーカーを発現していた。Plos One (2010) 10.1371/journal.pone.0014099 より転載



4. in vitro における多分化能安定性評価法開発

JCRB1331 (Tic)を用いて EB を形成後(図7)、培養期間1週間から2ヶ月までにおける遺伝子発現を、外胚葉、内胚葉、中胚葉の遺伝子を複数リストアップして QRT-PCR にて解析した(図8)。その結果、各遺伝子の増減が見られた。しかしながら、三胚葉の遺伝子を単純に選んだだけでは、分化能を評価することができないことが明らかになった。また、遺伝子を解析する時期も重要であることが示唆された。また EB 培養方法には、細胞接着が起こらない特殊加工した細胞培養プレートを用いて培養する方法もある。そこで JCRB1327 (Dotcom)を用いて、EB を形成し、2種類方法で2週間培養を行った後、RNA を抽出して遺伝子発現解析を Stem cell Pluripotency, Array(ABI)を用いて行った(図9)。両者の方法においても未分化マーカーの発現は減少し、分化マーカーの発現は増加する傾向にあり、類似した分化傾向が見られた。このことから、EB を用いたヒト iPS 細胞の多分化能評価方法として、安定で簡便、安価な従来の方法(表3)で十分であることが示唆された。

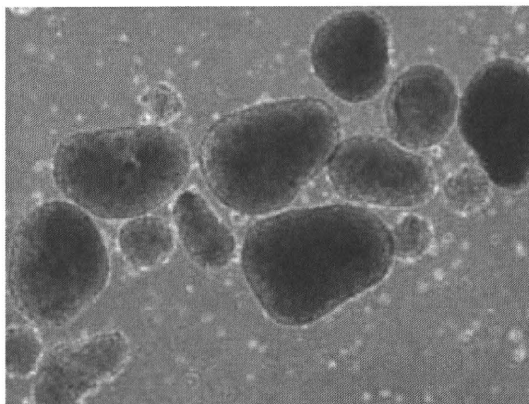


図7. EBに位相差顕微鏡像

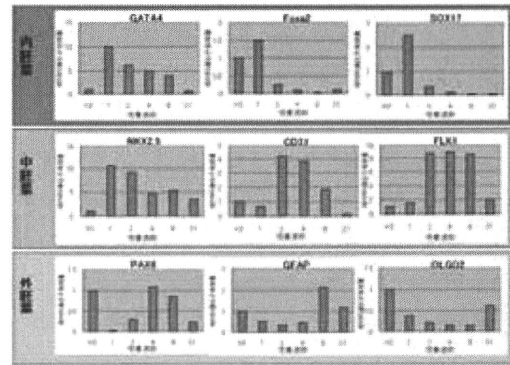


図8. Tic株の in vitro における分化能

Tissue culture research communications
27:139-147 (2008) : 日本におけるヒトES、iPS細胞研究標準化 その1 より転載

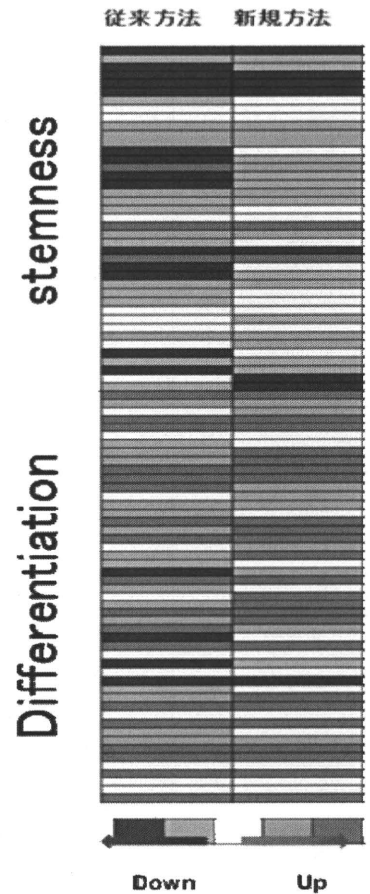


図9. EBを用いた in vitro における多分化能評価法法の開発。

JCRB1327を用いてEBを形成後、2種類の方法で2週間培養し、RNAを抽出し、その遺伝子発現をDNAアレイ解析を行った。

5. ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法開発

これまでに、細胞外マトリックスは、マウス ES 細胞の未分化性を制御しており、I 型コラーゲンは未分化性を維持するが、ラミニンは、マウス ES 細胞の分化を促進することを明らかにしてきた。さらに細胞播種濃度も分化に与える影響が大きい。そこで、ラミニン上でヒト iPS 細胞の細胞密度の分化誘導に与える影響を検討した。マウスラミニンをコートしたプレートに種々の細胞密度で播種を行って分化誘導を行ったところ、細胞密度が高すぎると、未分化なコロニーが多数出現して、分化誘導を制御できないことが明らかとなった。一方、細胞密度が低すぎると、ほとんどの細胞が細胞死した。従って、適度な細胞密度を必要とすることが明らかとなった。次に、未分化な iPS 細胞から、中内胚葉系に分化誘導に与える種々の増殖因子の影響を解析した。中内胚葉マーカーであるグースコイド、ブラキユリー、Foxa2 や Sox17などを指標に検討を行った。その結果、BMP4により胚体外組織が誘導されるが、ActivinAにより、中内胚葉への誘導が制御されていることが明らかとなった。

研究総括者である水口らとともに、ヒト iPS 細胞から内胚葉系、肝幹細胞、さらに肝細胞への二次元無血清培養法を用いた分化誘導条件、継代法などの検討を行った。その結果、hESF9を分化用に改良した分化培地に ActivinA と FGF-2 を添加して内胚葉系へ分化誘導した後、水口らが考案したアデノウィルスベクターによる遺伝子導入により、効率的に肝幹細胞、幹細胞へと分化誘導されることが明らかとなった(Inamura

et al. 2010)。この成果は水口らとともに特許申請を行った。

様々な iPS 細胞株が樹立されていくことが予想される中、内胚葉系への分化傾向の強いクローンを選択するため、ハイスループットで分化能を予測することが必要となってくるのが考えられた。多数の報告において、ヒト iPS 細胞から内胚葉細胞を誘導する培養条件に、100ng/ml という高濃度の ActivinA を使用している。我々が開発した hESF9 培地においては、添加因子への感受性が従来培地に比べて高くなることから、内胚葉細胞への分化誘導に適度な濃度決定をするために、マルチウェルプレートを用いて解析を行った。その結果、アクチビン濃度依存的に FoxA2 陽性細胞が増加するものの、50ng/ml の濃度において、Foxa2 陽性率は飽和し、100ng/ml の濃度と同等の Foxa2(内胚葉マーカー)の発現陽性率を誘導できることが明らかとなった(図 10)。また、株間の誘導効率の差も検出できた。さらに、従来の方法では、内胚葉細胞を誘導するまで 5 日間毎日の培地交換を行い、多量の ActivinA を要していた。しかしながら、今回の検討では、細胞播種時に 50ng/ml ActivinA を添加するのみで、培養期間 4 日間培地交換をしない条件でも、優位に内胚葉細胞誘導ができることが明らかとなった(図 5)。そこで、この分化プロトコールを用いて、ヒト iPS 細胞株間での内胚葉細胞分化効率を比較した(図 11)。その結果、水口らのアデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入により誘導された最終的な成熟肝細胞への分化効率と相関性があることが示唆された。

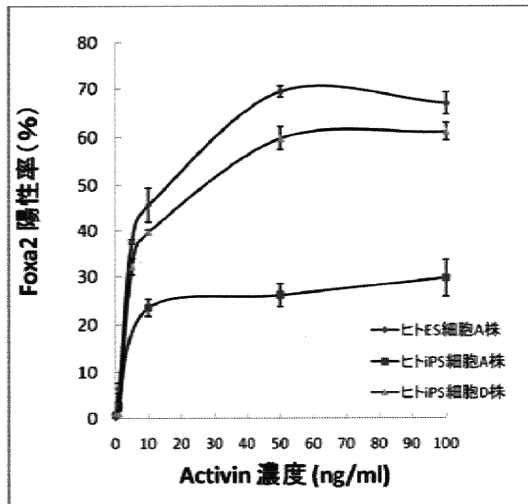


図10. 株によるアクチビンA濃度依存的内胚葉分化誘導効率の違い

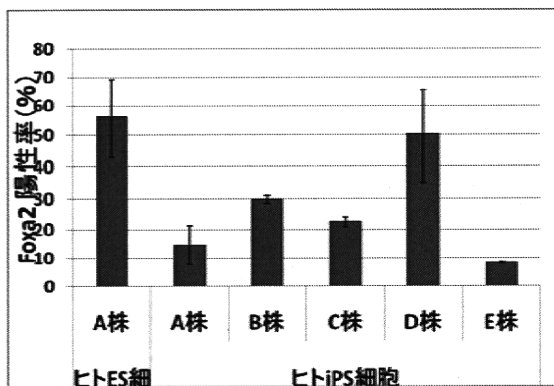


図11. 株による内胚葉分化誘導効率の違い

D. 考察

2007年にヒトiPS細胞が発表され、日本においても幹細胞研究がさかんとなってきた。しかし、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。国内におけるヒトiPS細胞培養法や未分化性の確認について、国際的レベルには達してないのが

現状である。ヒトES細胞ならびにiPS細胞において、絶対的なマーカーは発見されておらず、また、絶対的な評価方法も発明されていない。様々な角度で評価を行う必要があるが、現状では、形態がもっとも良い評価法であるため、経験が必要である。当該分担研究者は、海外においてヒトES細胞培養の経験をもっており、この経験をいかして、本分担研究を行った。まず、ヒトES細胞培養の経験がなくても安定した培養を行えるよう培養技術の標準化を行う必要があったため、海外でも一般的に使用されているフィーダー細胞とKSRを用いた培養法のプロトコル作成を行った。国内ではiPS細胞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が、これは国際的にはあまり使用されておらず、多分化能を維持するためには高い培養技術を必要とする。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ることにより、経験のない研究者であっても安定して培養できるように培養プロトコルを作成できた。現在、細胞資源研究室からiPS細胞の分譲を行う際には、ディスペーゼを用いる継代方法を指導している。また毒性評価系構築にiPS細胞を利用するためには、再現性のある安定した試験が可能なこと、その細胞を十分量安定供給できることなどが重要である。従来のKSRとフィーダー細胞を用いた培養法での維持では、ロット差があるため安定した培養維持が難しい。そのため、国際的にもフィーダーを用いない無血清培養法の開発が盛んに進められている。しか

し、組成が公開されていない培地も多く、添加因子と組成成分との相互作用などが推測できず、問題となっている。当分担研究者が開発した hESF9 培地はすべての組成が明らかであり、添加因子の影響が正確に反映される。そのため分化誘導因子を添加した場合、効率的に誘導される。また、株間の差もこの系を用いることにより検出することが可能である。

多くの iPS 細胞が樹立され、さらに分化誘導技術が進む中、分化効率のより良い細胞株を未分化状態から予測することも重要な評価項目となると考えられる。今回、我々は未分化状態における遺伝子プロファイリングを検討したが、一般的に使用されている未分化マーカー遺伝子発現を解析しても、顕著な所見が得られないことが明らかとなった。むしろ、癌関連遺伝子などの発現の解析を行うことにより細胞株の評価を行うことが示唆された。品質評価を行うに当たり、従来解析されてきた遺伝子群では十分ではないとすれば、より多くの遺伝子発現について解析が可能な DNA アレイを用いた解析などの使用が考えられるが、PCR 法を用いて発現を再確認する必要があり、また、高価となる。癌関連遺伝子やシグナル関連遺伝子などの PCR アレイを用いて、解析していくことにより、評価に用いることが可能な遺伝子群が明らかとなることが予測される。今後、他研究プロジェクトにおいて、評価に用いる遺伝子群の同定を行

う予定である。

また、今回報告した我々の内胚葉細胞への分化プロトコールは、これまで報告されている内胚葉細胞への分化誘導方法に比べ、安価で簡便な方法である。さらに内胚葉細胞への分化効率が、本研究事業の成果であるアデノウィルスベクターによる高効率な成熟肝細胞への分化(Inamura et al. 2010)と相関性があることが示唆された。この結果から、分化誘導せず、早期の分化段階での選択が可能になり、評価のコストおよび時間短縮が期待される。

E. 結論

ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と比較をすることにより、細胞の標準化を行うことが可能であることが明らかとなった。また、無血清培地 hESF9 を用いることにより、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。ヒト iPS 細胞の一般的な培地を用いた培養プロトコールを作成し、標準化を行った。また、国際ヒト ES 細胞標準化プロジェクトで使用されている方法により iPS 細胞の未分化性評価を行い、標準化を行った。また、無血清培地 hESF9 を用いた我々の開発中の内胚葉細胞分化プロトコールとハイスループットな分化誘導効率評価方法は、ヒト肝細胞への分化効率の高い細胞株を予測する際、再現性が高く、簡便、さらに安価な方法であり、細胞機能評価方法としての有用が期待される。

表2. ヒト ES、iPS 細胞の継代の手順

	手 順	時間
準備	25cm ² フラスコ ^① に 0.1%ゼラチン溶液を 2ml ずつ入れる ^② .	
	37°C インキュベーターに静置.	30 min
	MEF 用培地を作成 ^③ .	
	ゼラチン液を吸引.PBS にて洗浄. 各フラスコに MEF 用培地を 4ml ずつ入れる.	
	15ml チューブに MEF 培地を 9ml 入れる.	
	N ₂ に入れたまま MEF をクリーンベンチ近くに持ってくる.	
	バイアルの蓋をクリーンベンチ内で開けてバイアルの N ₂ を抜く.	
	37°C ウォーターバスに入れて溶解. 半分以上凍った状態でクリーンベンチ内へ移動する. MEF 培地でピペッティングしながら溶解.	できるだけ短い時間で 行う.
	MEF 浮遊液を 15ml チューブに入れる.	
	1000rpm 遠心	2 min
	新しい MEF 用培地に MEF を浮遊させる.	
	MEF 細胞浮遊液を 1ml ずつ各フラスコに入れる.	
	MEF を CO ₂ インキュベーターに入れて、培養.	24 h
MEF 用培地から ES 用培地 (FGF-2 なし) に交換し、培養 ^④ .	24 h	
継代	培地を吸引.	
	1unit/ml Dispase [®] (Roche/ 解凍後 3 日以内に使用) を 1ml 入れる.	
	37°C・CO ₂ インキュベーターに入れてインキュベーション.	3~10 min [®]
	Dispase を吸引.	
	hES 培地 10ml を入れて、セルスクレーパーを使用してコロニーをはがす	
	顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する.	
	15ml チューブに細胞浮遊液を入れて、300rpm にて遠心 (大きいコロニーのみを回収する) .	2 min
	新しい hES 培地を入れて細胞浮遊液とする (ピペッティングはしない). MEF の培地を吸引.	
	各フラスコに細胞浮遊液を入れる (Slit の割合は株による)	
	顕微鏡でコロニーの分散状態を確認.	
CO ₂ インキュベーターに入れて培養.	24h	
培地交換	翌日の培地交換は行わない	24h
	翌々日に培地交換に必要な hES 培地をチューブに分取し、FGF-2 を入れる.	
	37°C ウォーターバスで培地を温める.	5 min
	細胞の状態を顕微鏡でチェック.	
	温めた培地を取り出す.	
	フラスコの培地を吸引. 温めた培地を入れる.	
	細胞の状態をチェック [®] .	
CO ₂ インキュベーターに入れて、培養.		

① メーカーによって細胞の生着率や継代時のディスパーゼの処理時間なども変わってくる。当バンクではコーニングを使用している。

② 成育医療センター樹立iPS細胞は、C57/BL6 マウスのMEFを使用して樹立されている。市販のものでは、Hygro Resistant Strain C57/BL6 (ミリポア) が使用可能であることを

確認している。MEFバイアル1本を30枚の25cm²フラスコに播種している。ただし、ロット差があるため、新しいロットの際には、密度を変えて播種してチェックする必要がある。

③ high glucose, L-gluthaminem、15%牛胎児血清 (ESグレード) 含有 DMEM

④ MEFは播種してから24時間後では十分に広がっていないため、2日後以降に使用の方が望ましい。継代する前に、事前にヒトES用培地に交換をしておき、MEFをヒトES培地になじませておくとよい。

⑤ Dispaseの活性は解凍後3日以後は急激に低下する。細胞分散の処理時間を一定にするためには、用事解凍して使用するのが望ましい。また、提示されている酵素活性が同様であっても、会社によって微妙にその活性は異なる。当セルバンクではRoch・Dispase 1unit/mlで使用できることは確認している。

⑥ Dispaseに対する感受性は株によって異なる。新しいロットのディスペーゼあるいは新しい細胞株の場合には、まず、3分37℃で処理して顕微鏡でコロニーの状態を確認する。ES、iPS細胞のコロニーのエッジが光って、少しだけ丸くカールしていたら、すぐにディスペーゼを除く。コロニーが巻きあがるようにカールしている場合には処理時間が長すぎる。その場合、簡単に揺らしただけでコロニーがはがれてしまう可能性があるため、ディスペーゼは吸引せずに、培地を加えて遠心してディスペーゼを除く。2～3回培地で洗った方が生着率が良い。

⑦ 培地の調整でよく間違えるのが2-MEの濃度である。2-MEの濃度が高い場合、培地交換してすぐにあっという間に細胞が死んでいく。

⑧ 平日は毎日培地交換を行うが、週末は土曜日か日曜日のどちらか1回のみに行っている。ただし、その場合、コンフルエントでない状態にしておく必要がある。