

図10. *in vitro* 分化能評価

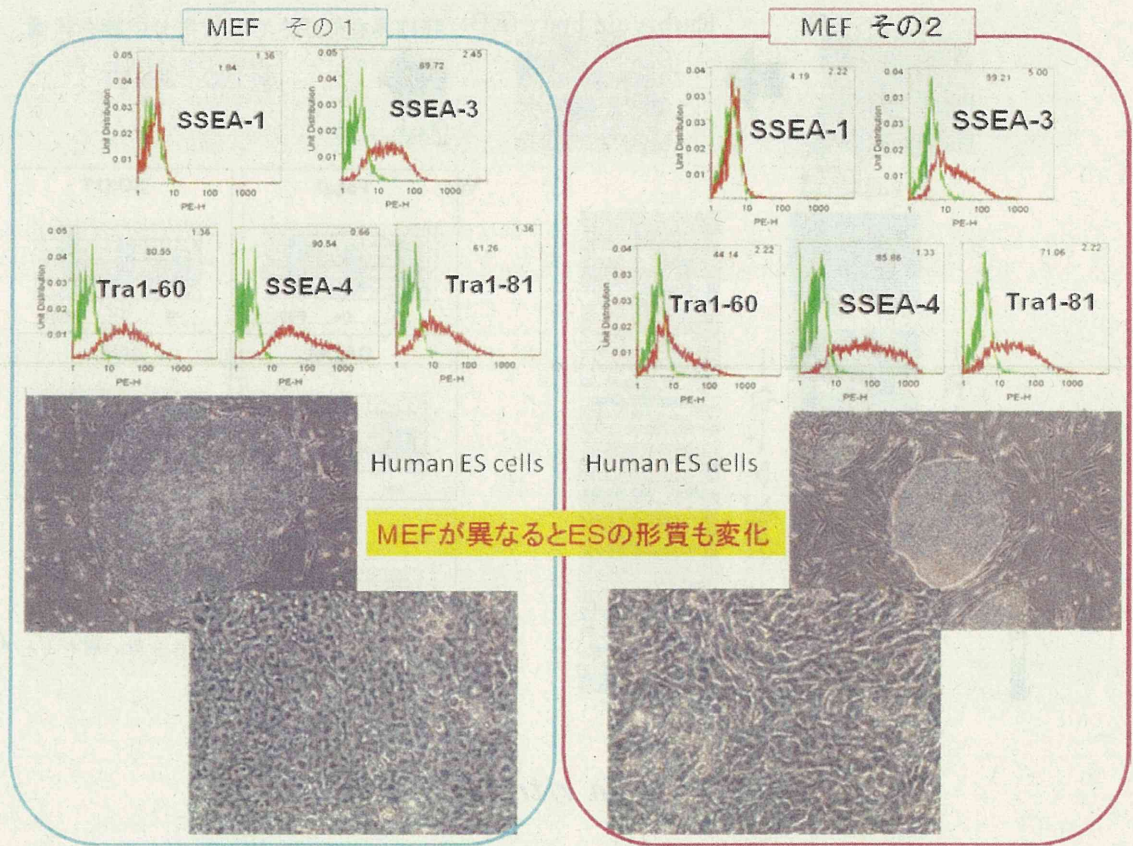
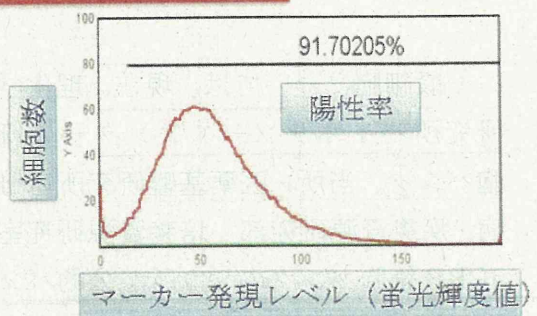


図 1 1. 異なる MEF によるヒト ES/iPS 細胞の品質変動



イメージングサイトメトリー



フローサイトメトリー (FACS)

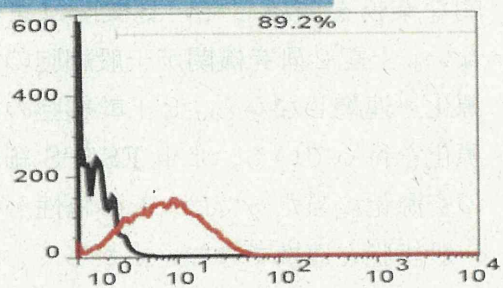


図 12. イメージアナライザーによる細胞表面マーカー発現プロフィール解析

D. 考察

一般細胞については、現在、理化学研究所バイオリソースセンターの細胞バンク、当所・医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室 JCRB 細胞バンクの2カ所が公的バンクとして業務を行っている。しかし、国内でヒト幹細胞バンクとして実質的な業務を開始している機関はまだない。上記2研究機関が一般細胞の資源化と連携しながら、ヒト幹細胞の資源化を行っている。ヒト ES/iPS 細胞の資源化に当たっては、その特性から一般細胞と連携できない点が多く、両者の運営は難しい。英国、米国、スペイン、韓国、中国などにおいては、幹細胞バンクとして独立して運営がなされている。その理由として検査にかかる業務の運営体制にあると考えられる。海外のバンクにおいては、細胞を増殖させ、保存することが主な業務であり、検査は他の研究部門に依頼をする、あるいは、検査企業などへ委託をすることが可能であり、分業体制が整っているからと考えられる。国内においては、マイコプラズマ検査やウィルス検査、あるいは染色体検査などについて研究用サンプルの解析を行う企業が少ないため、ほとんどの検査をバンク内で行う必要がある。正確な検査を行うためには、検査工程技術の熟練が必要であり、ヒト幹細胞バンクが

独立して運営を行うためには、検査のために技術員のトレーニングが必要となる。ヒト ES/iPS 細胞は未分化状態で培養維持できるようになるためにも技術が必要であり、検査のためのトレーニングまで行っている余裕はない。今後、ヒト ES/iPS 細胞を実用化していく上において、これら検査体制を整えていく必要があると考えられる。また、検査におけるコントロールも懸案事項である。一般の細胞のように標準株というものを設定したとしても、培養の過程で変化することが多く、基準値として使用することは難しい。遺伝子発現などにおいては、基準とすべき cDNA の配布するなど、標準化の課題は多い。細胞株を標準化することは不可能であるため、評価法や評価装置などを開発し、標準化することが先決であると考えられる。

実際の作業においては、その施設の場所、人員により作業工程が影響を受ける。たとえば、凍結するその細胞の品質を評価するためには、その凍結する細胞の遺伝子発現プロフィール、表面マーカープロフィールを解析する必要がある。細胞の遺伝子発現プロフィールの場合は、RNA を回収し、凍結保存が可能であるが、表面マーカープロフィールの解析をフローサイトメトリーで行う場合には、当日にその作業に従事できる人員と作業スペースの確保が必要となる。フローサイト

メトリーではなく、固定を行って免疫染色を行って解析を行う場合には当日ではなく、数日以内に作業を行うことが可能となり、人員の確保が猶予される。実用化の際には、管理された培養室における入室も制限されるため、また、コストの面からも効率的に人員を配置する必要がある。すべての評価を画一的に行うのではなく、コストとのバランスを考えた運営体制の構築が必要である。

E. 結論

海外の幹細胞バンクなどの作業工程表を参考にしながら実際に資源化を行うことにより、検討すべき課題が明らかとなった。実用化においては、コストとのバランスも考える必要があり、効率的な作業工程表の策定が重要である。

参考文献

1. International Stem Cell Banking Initiative. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Reviews and Reports* 5: 301-314; 2009.
2. Crook J, Hei D, and Stacey G: The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): raising standards to bank on. *In Vitro Cellular & Developmental Biology -Animal* 46: 169-172, 2010
3. L. Healy, C. Hunt, L. Young, G. Stacey. The UK Stem Cell Bank: Its role as a public research resource centre providing access to well-characterised seed stocks of human stem cell lines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 1981-1988 (2005)
4. A. Nieto, F. Cobo, A. Barroso-delJesús, A. H. Barnie, P. Catalina, C. M. Cabrera, J. L. Cortes, R. M. Montes, and A. Concha. Embryonic Stem Cell Bank A Work Proposal. *Stem Cell Reviews*, 6: 117-126 (2006)
5. Luong MX, Auerbach J, Crook JM, et al: A call for standardized naming and reporting of human ESC and iPSC lines. *Cell Stem Cell* 8: 357-359, 2011
6. Higashi H, Brüstle O, Daley G, et al: The nomenclature system should be sustainable, but also practical. *Cell Stem Cell* 8: 606-607, 2011
7. Rust W and Pollok B: Reaching for consensus on a naming convention for pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 8: 607-608, 2011

F. 健康危険情報

ヒト ES/iPS 細胞はヒト由来細胞であることから、P2 レベルでの使用とし、白衣ならびに手袋を着用し、直接細胞に振れることがないように技術指導を十分に行っている。現在までに特に報告事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. PLoS One, 6, e21780 (2011).

② Saito S, Morita K, Kohara A, Masui T, Sasao M, Ohgushi H, Hirano T. Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines. Hum Cell, 24(1):2-8 (2011).

③ Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Katayama K, Higuchi M, Tashiro K, Nonaka A, Sakurai F,

Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. Mol. Ther., 20:127-37 (2012).

④ 日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化：その 3 品質管理 平田 みつひ、シャンダー・アハマド、菅三佳、藤木 彩加、松村 紘子、若林真理、上田 直子、劉 克紅、林田 みどり、平山 知子、小原 有弘、柳原 佳奈、水口 賢司、古江一楠田 美保 Tiss. Cult. Res. Commun. 30: 137-149 (2011)

⑤ ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一規格案について 菅 三佳、高田 圭、小原 有弘、末盛 博文、青井 貴之、中村 幸夫、古江-楠田 美保 再生医療 11: P72-77

2. 学会発表

【国際学会】

〈一般演題〉

① Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H.: EFFICIENT GENERATION OF FUNCTIONAL HEPATOCYTES FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 α TRANSDUCTION., International Society for Stem Cell Research (ISSCR 9th Annual Meeting) トロント 2011年6月

② Hayashi Y., Chan T., Warashina M., Fukuda M., Ariizumi T., Okabayashi K., Takayama N., Otsu M., Eto K., Furue MK., Michiue T., Ohnuma K. (発表者), Nakauchi H., Asashima M. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Dermal Fibroblast under Feeder- and Serum-free Defined Conditions. International Society for Stem Cell Research (ISSCR 9th Annual Meeting) トロント 2011年6月

③ Kinehara M., Kawamura S., Tateyama D., Matsumura H., Hirata M., Furue MK. Protein kinase C induces epithelial-mesenchymal transition in human ES and iPS cells. International Society for Stem Cell Research (ISSCR 9th Annual Meeting) トロント 2011年6月

④ Tateyama D., Kinehara M., Hirata M., Matsumura H., Inoue S., Furue MK. DEVELOPMENT OF A

DEFINED SERUM FREE AND XENO FREE MEDIUM COMPOSED OF MINIMAL COMPONENTS FOR CULTURING HUMAN ES/IPS CELLS. International Society for Stem Cell Research (ISSCR 9th Annual Meeting) トロント 2011年6月

⑤ Hirata M., Hayashida M., Tateyama D., Ozawa Y., Matsumura H., Iemura M., Shofuda T., Kanemura Y., Kohara A., Kawabata K., Mizuguchi H., Furue MK. Comparative analysis of characteristics among human iPS, ES and neuroblastoma cell lines. International Society for Stem Cell Research (ISSCR 9th Annual Meeting) トロント 2011年6月

⑥ Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H. HNF4 α promotes hepatic maturation from human embryonic stem cell-derived hepatoblasts. The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists ソウル 2011年6月

⑦ Furue, MK. Development of a

novel drug screening system using human iPS cells in a defined culture system.

Rediscovering pluripotency: From

teratocarcinomas to embryonic stem cells

イギリス カーディフ 2011

年 10 月 10-12 日
〈国際シンポジウム・ワークショップ等〉

Furue, MK. Regenerative Medicine and Stem Cell Bank in Japan. Symposium Regenerative

Medicine on 8th Asia-Pacific Weeks Berlin 2011 (APW)

ベルリン 2011 年 9 月 6-9 日

Furue, MK. Human iPS cell Banking for Drug Discovery Research. BIT' s 4th Annual World

Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2011 北京 2011 年 11

月 11-13 日

【国内学会】

〈一般演題〉

① 平田みつひ、林田みどり、館山大揮、小澤 裕、松村紘子、家村将士、正札智子、金村米博、小原 有弘、川端健二、水口賢司、水口裕之、古江-楠田美保。ヒト胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、間葉系幹細胞の細胞特性比較解析 日本組織培養学会第 84 回

大会 東京 2011 年 5 月 27-28 日

② 高山和雄、稲村 充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江-楠田美保、水口裕之 HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導 第 18 回肝細胞研究会 東京 2011 年 6 月 24-25 日

③ Kawasaki T., Yamaguchi KK., Nakao H., Nonaka M., Bruce Yong Ma, Kawasaki N., Toyoda H., Furue MK. Novel monoclonal antibodies recognizing human induced pluripotent stem (iPS) cell carbohydrate epitopes. The 31st Naito Conference 札幌 2011 年 9 月

④ Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H. EFFICIENT GENERATION OF MATURE HEPATOCYTES FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS BY HNF4 α TRANSDUCTION. (ベストポスター賞受賞) 第 26 回日本薬物動態学会年会 広島 2011 年 11 月 16-18 日

⑤ Kawamura S., Kinehara M., Nikawa H., Furue MK. EMT-related

gene expression during cell differentiation into extraembryonic endoderm in human embryonic stem cells. 第34回日本分子生物学会年会 横浜 2011年12月13-16日

⑥ 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江・楠田美保、水口裕之 FOXA2・HNF1 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞の分化誘導 日本薬学会第132年会 札幌 2012年3月28-31日

⑦ 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江・楠田美保、川端健二、水口裕之 3次元共培養法によるヒトES・iPS細胞由来肝細胞の効率的な分化誘導法の開発 日本薬学会第132年会 札幌 2012年3月28-31日

〈国内シンポジウム・ワークショップ等〉

① 古江・楠田美保 創薬応用のためのヒト多能性幹細胞の品質 CPhI Japan 2011 大阪 国際医薬品原料・中間体展 大阪 2011年7月15日

② 古江・楠田美保 多能性幹細胞からの歯再生の可能性 第9回再生歯科医学会学術大会・総会 大阪 2011年9月10日

③ 古江・楠田美保.サイエンスエキスポ関西 2011 併催「先端科学技術フォーラム 2011“iPS細胞の産業化と今後の展開”」 大阪 2011年10月21日

④ 古江・楠田美保.創薬研究のためのES/iPS細胞の培養法.大阪大学蛋白質研究所セミナー幹細胞を制御する環境因子の分子基盤～細胞・基質間・細胞・細胞間接着による幹細胞の制御機構～.大阪. 2011年11月30日-12月1日

⑤ 古江・楠田美保. ヒト iPS を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築 スーパー特区フォーラム in 大阪. 大阪. 2012年1月18-19日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

U.S. Provisional Patent Application 61/478,704“ANTI-iPS/ES CELL-SPECIFIC ANTIBODY AND USE THEREOF”Assignee: The Ritsumeikan Trus: Toshisuke Kawasaki, Nobuko Kawasaki, Keiko Kawabe, Miho Furue.

II. 分担研究報告

1. ヒト ES/iPS 細胞遺伝子発現プロフィールのバイオインフォマティクス解析 水口 賢司

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業） （分担）研究報告書

ヒト ES/iPS 細胞遺伝子発現プロフィールのバイオインフォマティクス解析 研究分担者：水口 賢司

（独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 バイオインフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー）

研究要旨：ヒト胚性幹細胞(hES)、及び人工多能性幹細胞(hiPS)が様々な研究所により樹立され、多くの文献に報告されている。これらの細胞株の差異を調査するために、様々な細胞特性評価が行われている。しかしながら、その分析は明瞭な結果を出していない。これらの細胞を治療目的或いは創薬研究目的のために利用するには、詳細分析や培養手順の標準化が必要である。NIBIO 培養資源研究室で出されたヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現結果について、我々は遺伝子発現プロフィールの特徴をとらえるために、バイオインフォマティクス分析を行った。

A. 研究目的

ヒト胚性幹 (ES) 細胞は、1998 年にウイスコンシン大学でトムソンらによって樹立された。それ以来、多能性をもつ多くのヒト ES 細胞株が報告されている。やがて、2006 年に人工多能性幹細胞(iPS)は日本で高橋と山中により開発された。幹細胞研究の最大の焦点は多能性の達成であり、それは組織形態学的解析及び幹細胞マーカー遺伝子の発現の分析により示される。一般的に新しくヒト ES/iPS 細胞株を樹立した際には、特定の遺伝子マーカー発現や分化させた際の分化マーカーにより形質同定がなされ、他の細胞株の比較などはほとんど行わ

れてこなかった。結果として新規細胞株の樹立論文では多くの場合、わずかな細胞特性評価しか発表されていない。

一方で、幹細胞の再生医療及び創薬研究への応用は徹底的な特性評価を必要とする。これらの細胞株の発現パターンのわずかな差異はこの研究分野の実際の応用に大きな意義を与えうる。これを考慮して、国際幹細胞イニシアチブは、世界中の 17 の研究所から集められた 59 の胚性幹細胞株の詳細な特性評価を実施した。この研究の結果は 2007 年に報告された。これらの細胞株の抗原プロフィール及び遺伝子発現パターンの両方が調査された。この研究により、この特性評

価に使われた幹細胞株は異なる条件下及び異なる樹立機関から作られたとしてもマーカー遺伝子のセットは非常に似通った発現パターンを有していたことがわかった。しかし、細胞株は同一ではなく、遺伝子発現及び抗原プロフィールにおいて差異が認められ、それが個々の細胞株を特徴づけていた。あらゆる細胞株における差異に関するその他の報告も発表されている。これらの研究はあらゆる幹細胞株の多様性及び類似点への初期的洞察を与えてはくれるが、抗体プロフィールの細胞株特定パターン及び遺伝子発現パターンに関する機能的意味、及び分子的特性はまだ解明されていない。我々はそこで、分化及び未分化状態の広く研究されているマーカーの発現プロフィールに関してコンピュータ分析を行って、特性評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

培養資源研究室において、種々のヒト ES/iPS 細胞株の未分化状態ならびに胚様体を形成させて分化させた状態の RNA を抽出して、幹細胞遺伝子 PCR アレイを行った結果を解析した。これらの実験結果はそれぞれ CT 値で表され、それは相当する遺伝子の測定可能な発現を得るために必要な増幅周期の数と定義されている。我々の狙いは CT 値を理解し妥当な統計を作成することであり、特に様々な細胞株における類似点と相違点を強調し、遺伝

子発現の全体のパターンを要約することである。

実験結果の統計的ハイライトを理解するため、我々はそれらを視覚化するために最適な方法を導入することを目指す。ヒートマップとクラスタリング図は発表文献で広く用いられており、我々はデータセットを視覚化するために、その他の簡単で広く使われているアプローチを適用することを目指す。上述したように、視覚検査と統計学的ツールの両方を用いて複雑発現パターンが検出できる。我々は細胞株及びあらゆる細胞状態のバイオマーカーとしての遺伝子の生物学的知識と一致する結論を導き出すことを目標とした。

アレイに含まれる遺伝子のリストは表 1 に示した。

PCR アレイ名	コントロール遺伝子	アレイ遺伝子
多能性アレイ (未分化及び胚様体細胞状態)	ACTB, 18S, CTNNB1, DNMT3B, EEF1A1, GAPDH	BRIX, CD9, COMMD3, CRABP2, EBAF, FGF5, FOXD3, GABRB3, GAL, GBX2, GDF3, GRB7, IFITM1, IFITM2, IL6ST, IMP2, KIT, LEFTB, LIFR, LIN28, Nanog, NODAL, NR5A2, NR6A1, PODXL, POU5F1, PTEN, REST, SEMA3A,

	SFRP2, SOX2, TDGF1, TERT, TFCP2L1, UTF1, Xist, ZFP42, FGF4, NOG, CDX2, CGB, EOMES, KRT1, GCM1, DDX4, SYCP3, COL1A1, COL2A1, RUNX2, HBB, HBZ, ACTC, NPPA, DES, MYF5, MYOD1, T, WT1, CD34, CDH5, FLT1, PECAM1, GCG, IAPP, INS, IPF1, PAX4, SST, TAT, AFP, FN1, FOXA2, GATA4, LAMA1, LAMB1, LAMC1, PTF1A, SERPINA1, SOX17, GFAP, HLXB9, ISL1, NES, NEUROD1, OLIG2, PAX6, SYP, TH
--	---

上記の PCR アレイからのデータは多数の細胞株から導き出されたもので、いくつかのケースでは、実験ノイズを最小限に抑えるために同じ細胞株での複数の実験が行われた。PCR アレイで用いられた細胞株のリストは下記の表に示した。

アレイ名	細胞株
PCR	EC_NCR.G3,
多能性	EC_2102Ep. cl. 2A6,
アレイ (分化細	ES_KhES. 1 (three experiments),

胞)	ES_KhES. 3 (three experiments), ES_H9 (three experiments), ES_HES (three experiments), iPS_Tic (three experiments), iPS_Dotcom (three experiments), iPS_Squeaky (three experiments), iPS_Toe (three experiments), iPS_Lollipop, iPS_201B7 (three experiments), iPS_201B2subclone2 (three experiments), iPS_201B2subclone4 (three experiments), iPS_ForESkin, iPS_iDMC.03, iPS_iDMC.13,
多能性 アレイ (胚様体 状態)	ES_KhES. 1, ES_KhES. 3 (three experiments), ES_H9 three experiments), ES_HES3 (two experiments), iPS_Tic (two experiments), iPS_Dotcom (three experiments), iPS_Squeaky (three experiments), iPS_Toe (three experiments), iPS_201B7 (three experiments), iPS_201B2subclone2

	(three experiments), iPS_201B2subclone4
	(three experiments), iPS_ForESkin (two experiments), iPS_iDMC.03,

PCR アレイからのデータは CT 値として記録され、それはアレイの特定の遺伝子からの最初に検出可能な発現シグナルを観察するために必要とされる増幅周期の数と定義されている。このように、実際 CT 値は負の指数値の発現レベルを示しており、実験データから妥当な結論を出す前にいくらかの再スケールリングを必要とする。また、5つのコントロール遺伝子を使用した。コントロール CT 値は適切なバックグラウンドとなり、これとその他の要因を考慮することにより、CT 値データのプレ処理のための累積測定が得られる。

C. 研究結果

プレ処理:

CT データの特定の観察にはいくらかの質の問題がある。まず、それを超えるとデータ分析に信頼性を伴って使用するためには実験ノイズが高すぎる場所で最も高い CT 値が固定される。2番目に、同じ細胞株の分化状態の複数実験のデータが組み合わせられた。これは単に個々の実験の CT 値を平均化することにより行った。いくつかのケースでは、最大数の増幅周期

まで全くシグナルが観察されなかったため、CT 値は“未決定”のままとされた。このようなケースでは未決定値を除き、残りの観察から平均値を出した。特定の細胞株の全ての観察が決定されなかった時は、“NA”値が次のステップに伝えられ、分析が行われる時にこのようなケースに印をつけた。この段階で平均され組み合わせられた CT 値は、このステップ以降は単独の実験として取り扱われた。

データスケールリングと標準化:

全ての CT 値は実験内の特定のコントロール遺伝子と関連して考えられなければならない。各実験にいくつかのコントロール遺伝子が使われているため、クエリ遺伝子の全ての CT 値はその実験に使われた全てのコントロール遺伝子の平均 CT 値から差し引かれた。結果得られた値はデルタ CT 値と呼ばれ、この段階では全ての PCR データはそれらにより表された。一方、全てのコントロールデータは今後の詳細分析から除外した。このようにデルタ CT 値は相当するコントロール遺伝子に対して特定の条件下での遺伝子の分化発現を表している。負の CT 値は PCR シグナルの初期の観察を示しており、従って遺伝子の過剰発現を意味する。各デルタ CT 値は特定の細胞株の単独の (あるいは平均の) PCR アレイの一つの遺伝子に相当する。同じ細胞株のアレイの中の二つの遺伝子間の、或いは同じ遺伝子の二つの細胞株間の比較は、これらのデルタ CT

値の差異を取ることにより行われ、従ってデルタデルタ CT と呼ばれる (Livak KJ, Schmittgen TD. 2001)。CT 値は均等目盛で指数関数的発現パターンを表すため、真の発現スコアは 2 (−デルタデルタ CT) を使って得ることができる。これらの値は広範囲である可能性があるため、プロットではそれらを表すために対数目盛が用いられており、それは二つの遺伝子或いは二つの細胞株の遺伝子発現レベルの差異を示すために用いられている。

クラスタリング:

多くの細胞株の単独アレイの全ての遺伝子の発現値の比較はクラスタリングアプローチを用いて行われ、ここでは似た発現遺伝子は自動的に様々なグループに分けられる。このアプローチは発表文献で広く適用されている。我々の研究では R-プログラミング言語が全てのクラスタリングに使われており、デルタ CT 値はそれらのプロットでいかなる変換もなく使われている。多能性アレイの様々な細胞株の発現レベルを示しているクラスタリング図の一部が下記に示されている。遺伝子は縦軸に、細胞株は横軸に示され、two-way クラスタリングが実施された。未分化状態の遺伝子発現レベルが高発現スコア、及び低発現スコアの二つのグループに明確に分けられた。概して、遺伝子のグループは以前の研究とかなり一致している (図 1, 2)。

散布図:

これは二つの変数の関係を見る標準的方法である。二つの条件での多数の遺伝子の発現パターン間の一対一の比較は単純な散布図から得られ、それは回帰直線を引くことで更に解釈ができ、一般的傾向を示す。一般的傾向からの個々の遺伝子の種分化は回帰直線の遺伝子発現値の距離を見ることでわかる。正確に距離をスケールリングすること、そしてその発現がこれらの決定ラインの範囲外である遺伝子のラベリングをすることにより、特異的発現遺伝子を明確に選択するために回帰直線に平行な線をプロットできる (図 3)。このスキームを使った典型的な表がここで示されている。H9 細胞株に対する比較評価を行った際に Dotcom 細胞や Toe 細胞、Foreskin 細胞において特異的に過剰に、或いは過小に発現している遺伝子のポイントが二つの破線で示される散布図の決定面の外に表されている。

特定の状態 (EB 或いは未分化) での各細胞株で同じ遺伝子セットが発現したように、この研究で使われた全ての ES 細胞株の全体的な作用は大変類似している。例えば、EB と未分化細胞状態の様々な細胞株のよく知られた発生遺伝子 SOX2 の発現パターンが図で示されている。全ての細胞株において EB 状態よりも未分化状態で、SOX2 がより高い発現レベルを有することが観察されている。しかし、SOX2 は全ての細胞株で双方の状態におい

て、いくらかの正の発現レベルを有している。これは、発現レベルが大幅に変化しても、SOX2 が分化細胞と同様に未分化細胞でも発現し続けるという報告結果と一致する。我々はまた、全ての細胞株の発現プロフィール間の全体的な類似にもかかわらず、わずかな差異が存在するというものを発見した。我々は現在のところこのような差異を分析しており、それは個々の ES 細胞株を特性評価するのに役立つかもしれない。

D. 考察

上述したように、幹細胞テクノロジーへの関心が高まっており、多くのヒト ES/iPS 細胞株が樹立されている。また、患者の個々の遺伝子型を踏まえながら、研究に使用されようとしている。我々の研究はその方向へのステップであり、細胞株を標準化し、それらの特定の表現パターンを探求するのが狙いである。以前に発表された研究結果を確認するとともに新たな表現法により品質評価に新しい視野をもたらすかもしれない。我々はこれらのデータ分析から得られる可能性のある新しい成果について研究を進めていく。

E. 結論

研究された殆どの細胞株は幹細胞遺伝子 PCR アレイで類似した作用が

見られたが、バイオインフォマティクス解析により若干の差違がみられた。これらの解析方法は有用であると考えられ、次年度にさらなる研究解析を行う予定である。

参考文献

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

G. 研究発表

1. 論文発表

① 日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化：その 3 品質管理 平田みつひ、シャンダー・アハマト、菅三佳、藤木 彩加、松村 紘子、若林真理、上田 直子、劉 克紅、林田みどり、平山 知子、小原 有弘、柳原 佳奈、水口 賢司、古江一楠田美保 *Tiss. Cult. Res. Commun.* 30: 137-149 (2011)

Pluripotency UD array

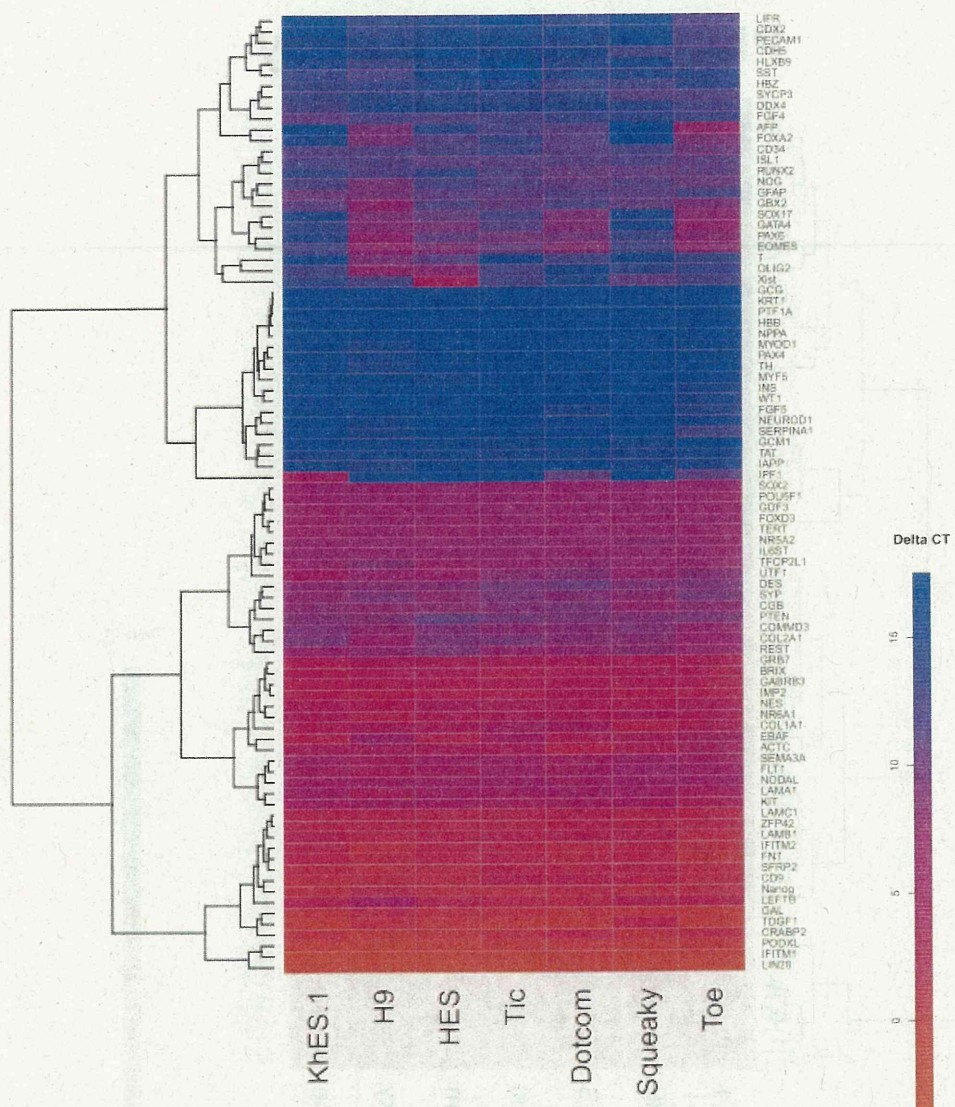


図1. ヒト ES/iPS 細胞の未分化状態における幹細胞遺伝子アレイ解析結果のヒートマップによる分析

Pluripotency EB array

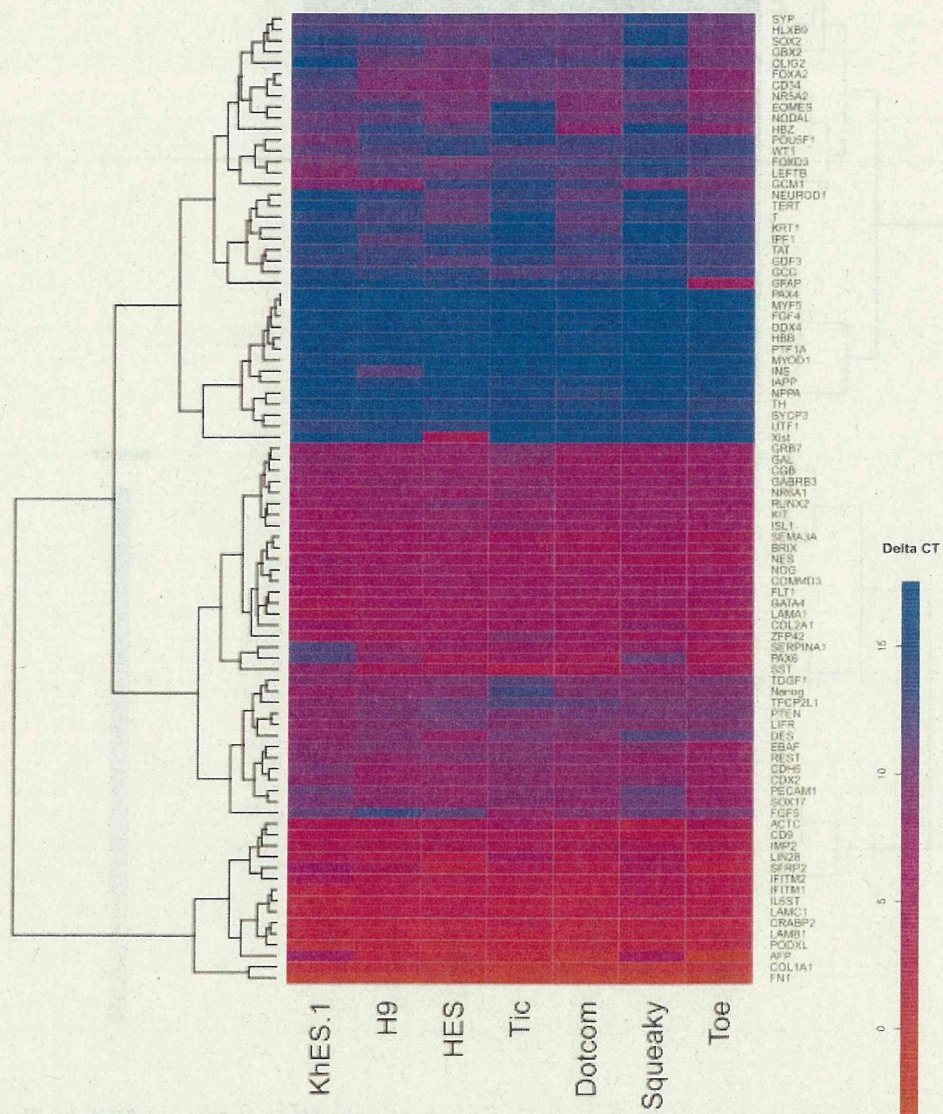


図2. EB 形成により分化させたヒト ES/iPS 細胞における幹細胞遺伝子アレイ解析結果のヒートマップによる分析

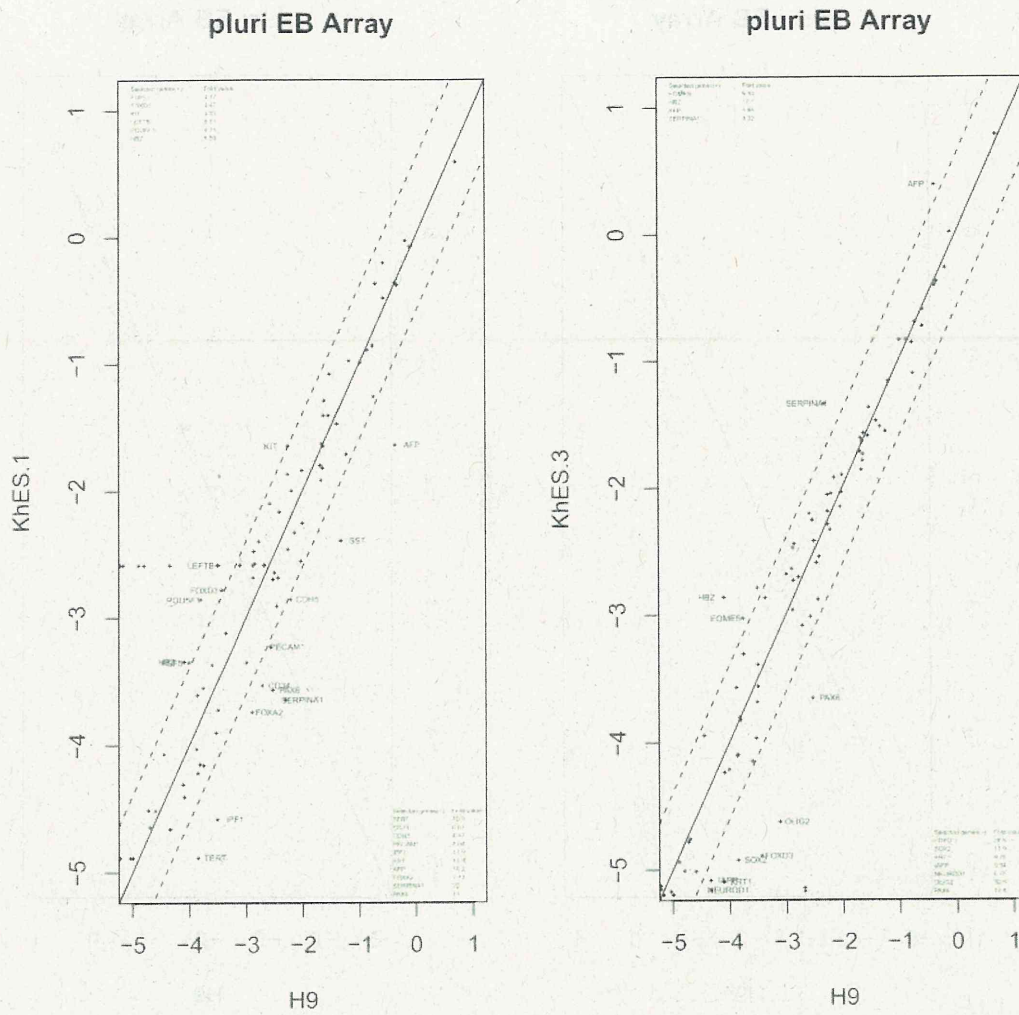


図 3-1. ヒト ES/iPS 細胞株における幹細胞遺伝子アレイ解析結果の散布図による分析 (KhES-1, KhES-3)

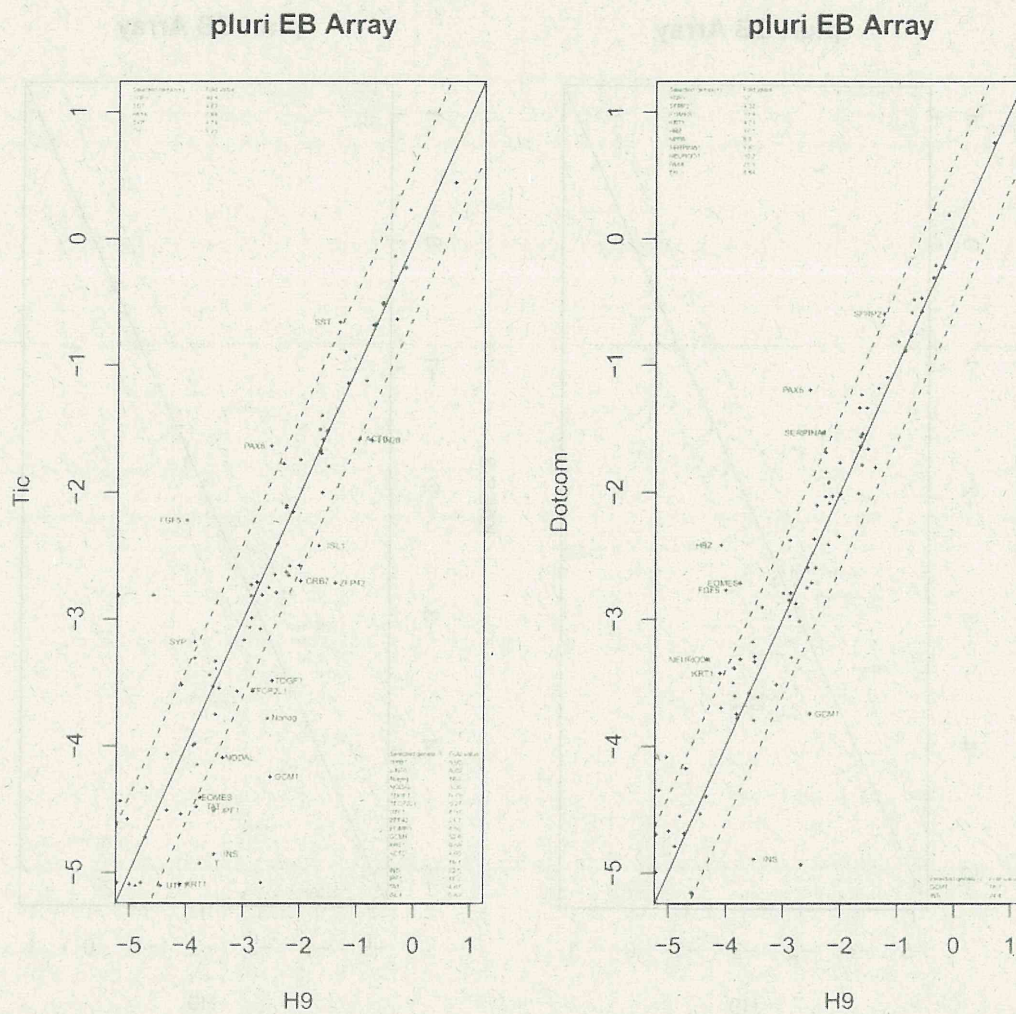


図 3-2. ヒト ES/iPS 細胞株における幹細胞遺伝子アレイ解析結果の散布図による分析 (Tic, Dotcom)

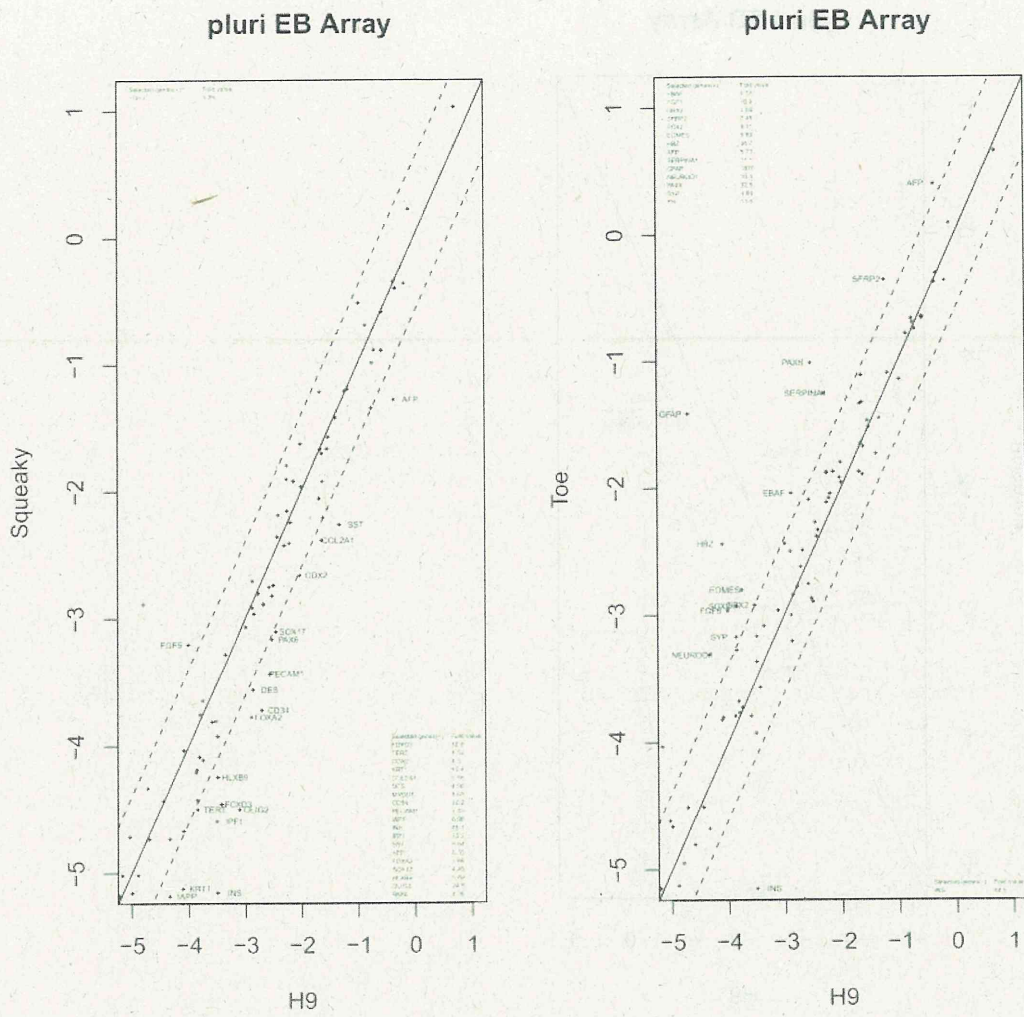


図 3-3. ヒト ES/iPS 細胞株における幹細胞遺伝子アレイ解析結果の散布図による分析 (Squeaky, Toe)