

図 3-4. 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 (Foreskin-iPS)

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
（分担）研究報告書

iPS 細胞を認識する新規抗体を用いた評価技術の策定

研究分担者 川寄 敏祐

立命館大学総合理工学研究機構教授

**研究要旨：**細胞表面の糖鎖は分化・発生の様々な段階において多様に変化する。糖鎖認識抗体はこれらの変化を鋭敏に察知するプローブであり、iPS (induced pluripotent stem cell) /ES (embryonic stem cell) のマーカーとしても常用されている。しかしながら、これら既存の抗体のほとんどが EC (embryonal carcinoma) 細胞を免疫原として得られたものであり、iPS/ES/EC に共通の成分を認識するものである。本研究では、iPS/ES に特異的な糖鎖認識単クローン抗体を作成する。そして、これら抗体をプローブとして iPS 細胞など多分化能細胞の品質管理、良質な細胞集団選別におけるこれら抗体の有効性を検討することを目的とした。

**A. 研究目的**

ヒト iPS/ES 細胞の表面マーカーとして汎用されている SSEA3, SSEA4 のエピトープはグロボシリーズの糖脂質であり、TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2, GCTM343 のエピトープはプロテオグリカンの一種ケラタン硫酸である (Wright A. J. & Andrews P. W., 2009)。しかしながら、これら既存の抗体のほとんどが EC 細胞 (embryonal carcinoma, 胎児性がん細胞) を免疫原として得られたものである。すなわち、これらの抗体は EC 細胞表面マーカーとして開発されたものが iPS 細胞

/ES 細胞にも陽性であることが判明し、利用されているのであり、iPS 細胞/ES 細胞に特異的な成分を認識するものではない。このような背景の下、申請者らは、ヒト iPS 細胞を免疫原としてヒト iPS 細胞特異的なマーカー抗体を得ることができれば、細胞の未分化性と多分化能性の維持および各分化ステージにおける糖鎖の役割の解明に大きな学術的貢献が期待でき、あわせて、多分化能細胞の品質管理、良質な細胞集団選別においてきわめて有効なツールとなると考えた。

**B. 研究方法**

免疫原としては、医薬基盤研究所より分譲されている、iPS 細胞 Tic (JCRB1331) を用いた。免疫原細胞をフロイドコンプリートアジュバントでエマルジョン化した後、マウスの腹腔あるいは皮下に注射した。1 ヶ月後にマウスの腸骨リンパ節細胞を採取し、マウスミエローマ細胞 (P 3 U1) と PEG 法により細胞融合した。融合細胞を 96 ウェルプレート 10 枚に分注し HAT 培地で培養後、ハイブリドーマを得た。次に、ハイブリドーマ培養上清を、抗原 iPS 細胞を固定化したウェルプレートに加えて反応させたのち、2 次抗体として HRP 標識-Anti Mouse IgG を加え、DAB で発色させる方法で、細胞スクリーニングを行った。まず一次スクリーニングとして、iPS 細胞陽性のハイブリドーマを選択する。つぎに、二次スクリーニングとして、iPS 細胞に対するコントロール細胞として、iPS を樹立したときの元株であるヒト胎児繊維芽細胞株 (MRC-5 細胞)、EC 細胞の一種である 2102Ep 細胞を用い、これらの細胞への結合性を比較した。また、平行して、Tic 細胞抽出物を SDS-PAGE にかき、Tic 細胞陽性ハイブリドーマの培養上清によるウェスタンブロットを行い、抗原タンパク質の分子サイズを推定した。これらの解析により、iPS 細胞にのみ結合するハイブリドーマを選別した。

### C. 研究結果

#### iPS 細胞認識単クローン抗体のスクリ

#### ーニング

96 穴プレート 10 枚に播種したハイブリドーマより、Tic 細胞表面に結合するハイブリドーマ 29 株が得られた。表 1 に示すように、これらのほとんどは元株であるヒト胎児繊維芽細胞株 (MRC-5 細胞)、およびフィーダーに用いた MEF とは反応せず、Tic 細胞表面を認識する抗体であった。一方、EC 細胞の一種である 2102Ep 細胞への結合性を調べたところ、29 種株ハイブリドーマのほとんどは染色強度の差はあるものの EC 細胞表面に結合した。この結果は一般にいわれているヒト iPS 細胞とヒト EC 細胞の間の細胞表面抗原の高い共通性、類似性を改めて示すものである。しかしながら、興味あることに、数種のハイブリドーマ上清は、iPS 細胞表面を強く染色し、2102Ep 細胞をほとんど染色しないことが明らかになった。この結果は、本研究の目的とした iPS/ES と EC 細胞とを区別して識別する iPS/ES 特異的糖鎖認識単クローン抗体が得られたことを示している。

ウェスタンブロットの結果の一部を図 1 に示した。Tic 細胞抽出物は 15kDa より 300 kDa にわたる多数のタンパク質バンドを示したが、抗体との反応性は各ハイブリドーマによって、特徴的であった。すなわち、抗体陽性バンドの位置は、35kDa-50kDa、75kDa-100kD および 250kDa 以上に分類された。筆者らはまず、iPS 細胞表面を強く染色し、2102Ep 細胞をほとんど染色せず、250kDa 以上に幅広い染色

性を示す単クローン抗体 R-10G を選び、その性質の分析を進めた。

#### R-10G と従来の iPS/ES 細胞の表面マーカー抗体との比較

ヒト iPS 細胞株 (Tic)、ヒト ES 細胞株 (KhES-3) およびヒト EC 細胞株 (2102Ep、NCR-G3) に対する、R-10G および TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-3、SSEA-4、SSEA-1、mAb84 の結合性を調べた結果を表 2 に示した。R-10G はヒト iPS 細胞株 (Tic)、およびヒト ES 細胞株 (KhES-3) に良く結合するが、ヒト EC 細胞株 (2102Ep、NCR-G3) にほんの僅かしか結合しないことが判明した。これに対し、従来の iPS/ES 細胞の表面マーカー抗体である TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-3、SSEA-4 はヒト iPS 細胞株、ヒト ES 細胞株、およびヒト EC 細胞にいずれもよく反応する。なお、mAb84 はヒト ES 細胞を免疫原として得られた単クローン抗体である (Choo A. B., *et al.* 2008)。ヒト EC 細胞株とは反応しないと報告されているが、本実験でも再確認された。なお、mAb84 の iPS 細胞染色性は弱い。

#### R-10G によるヒト iPS 細胞表面染色の特徴

R-10G により培養 Tic 細胞を蛍光染色した結果を TRA-1-60、TRA-1-81 による染色と比較して図 2 に示した。R-10G は程度の差はみられるものの、コロニー中のほとんどの Tic 細胞に結合することが分る。TRA-1-60 (A)、

TRA-1-81 (B) も同様にほとんどの Tic 細胞に結合している。しかしながら、R-10G と TRA-1-60 あるいは TRA-1-81 の染色像をマージさせると、一部の細胞では両者のエピトープがごく近傍に存在するが、ほとんどの細胞ではいずれかのエピトープが優位に発現していることが分る。

#### ヒト iPS 細胞からの R-10G 抗原の単離とその性質の解析

R-10G 抗体カラムを作成し、これに Tic 細胞抽出液をアプライし、カラムに結合したタンパク質を弱アルカリ性で溶出することにより、R-10G 抗原を精製することに成功した。精製抗原をトリプシン分解した後、LC-MS により分析した結果、本抗原分子はポドカリキシン (podocalyxin) と同定された。TRA-1-60、TRA-1-81 のエピトープもポドカリキシンタンパク質上に発現するケラタン硫酸であることが知られている。現在、R-10G 抗体のエピトープの性質について生化学的検討をすすめている。

#### **D. 考察**

今回開発に成功した iPS/ES マーカー抗体 R-10G は、既知の iPS/ES マーカー抗体である TRA-1-60、TRA-1-81、GCTM2、GCTM343、SSEA3、SSEA4、などとは異なり、ヒト iPS/ES 細胞に結合するがヒト EC 細胞には結合しない。一方、これらの抗体はいずれも大多数の iPS 細胞を染色するが、それぞ

れの強度は細胞により均一ではない。すなわち、個々の iPS 細胞表面に発現する糖鎖エピトープはきわめて多様、不均一であることを示している。このような表面糖鎖構造の相違が、細胞の未分化性と多分化能性の維持および各分化ステージとどのように関係しているのか、興味ある問題である。

## E. 結論

筆者らが開発した R-10G 抗体は、ヒト iPS/ES 細胞に結合するがヒト EC 細胞には結合しない。このため、R-10G 抗体はヒト ES/iPS 細胞実用化における幹細胞バンクの基盤整備において、多分化能細胞の品質管理、良質な細胞集団選別試薬としてきわめて有効である。

## 引用文献

Wright A.J. & Andrews P.W. (2009) *Stem Cell Res.*, 3 : 3-11.  
Choo A.B., et al. (2008) *Stem Cells* 26 : 1454-1463.

## G. 研究発表

### 1. 原著論文

(1) Nonaka M, Ma BY, Imaeda H, Kawabe K, Kawasaki N, Hodohara K, Kawasaki N, Andoh A, Fujiyama Y, & Kawasaki T. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizes a novel

ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal carcinomas. *J. Biol. Chem.* 286(25), 22403-22413 (2011)

(2) Hirano M, Ma BY, Kawasaki N, Oka S, & Kawasaki T. Role of interaction of mannan-binding protein with meprins at the initial step of complement activation in ischemia/reperfusion injury to mouse kidney. *Glycobiology* 22(1), 84-95 (2011)

### 2. 学会発表

#### 【国際学会】

(1) Kawasaki T. Outline of Japan Consortium for Glycobiology and Glycotechnology (JCGG). The 2<sup>nd</sup> ACGG Conference 6月 Seoul, Korea

(2) Kawasaki T, Nonaka M, Kawasaki N, Kawabe K, Nakao H, Ma BY, Imaeda H, Fujiyama Y, & Andoh A. Specific interaction of the serum mannan-binding protein with tumor-associated oligo-saccharides and tumor tissues. 16th European Carbohydrate Symposium 7月 Sorrento - Naples, Italy

(3) Kawasaki T. Novel monoclonal antibodies recognizing human induced pluripotent stem (iPS) cell carbohydrate epitopes. The 31st Naito Conference 9月 札幌

(4) Kawasaki T. Carbohydrate-protein-hosts. Glycobiology Japan-Netherlands Joint

Seminar 2011 10月 名古屋

- (5) Kawasaki T. Recognition of endogenous ligands by C-Type animal lectins. The 71st Okazaki Conference 10月 岡崎

【国内学会】

- (6) 野中元裕、今枝広丞、河邊圭子、川寄伸子、安藤朗、藤山佳秀、谷徹、川寄敏祐 ヒト大腸がん組織におけるマンナン結合タンパク質リガンドの発現. 第30回日本糖質学会年会【口頭発表】7月 長岡

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

- (1) Anti-iPS/ES cell-specific antibody and use thereof, 川寄敏祐, 米国特許商標庁特許仮出願受理 61/478, 704, アメリカ合衆国
- (2) マンナン結合タンパク質のがん組織診断及び治療用途, 川寄敏祐, 特許願 2011-141255, 日本

No.	Tic	2102Ep	MRC-5	MEF	No.	Tic	2102Ep	MRC-5	MEF
1	++	+++	±	-	16	+	+	±	±
2	+++	++	+	-	17	++++	±	-	-
3	+	+	-	-	18	++	++	-	-
4	+++	++	-	-	19	+++	+++	-	-
5	++	±	-	-	20	+++	+++	++	±
6	+++	+++	+	-	21	+++	+++	+	±
7	++	++	±	-	22	++	++	-	-
8	+	+++	+	-	23	++	++	++	-
9	+++	+++	-	-	24	+	+	-	-
10	+++	±	-	-	25	++	+++	+	±
11	+++	+	-	-	26	++++	+++	-	-
12	+	++++	-	-	27	+++	+++	+	-
13	+++	+++	±	±	28	+++	+++	-	-
14	++	+	-	-	29	+++	+++	-	-
15	+	++	-	-					

表 1. 細胞染色性によるハイブリドーマのスクリーニング

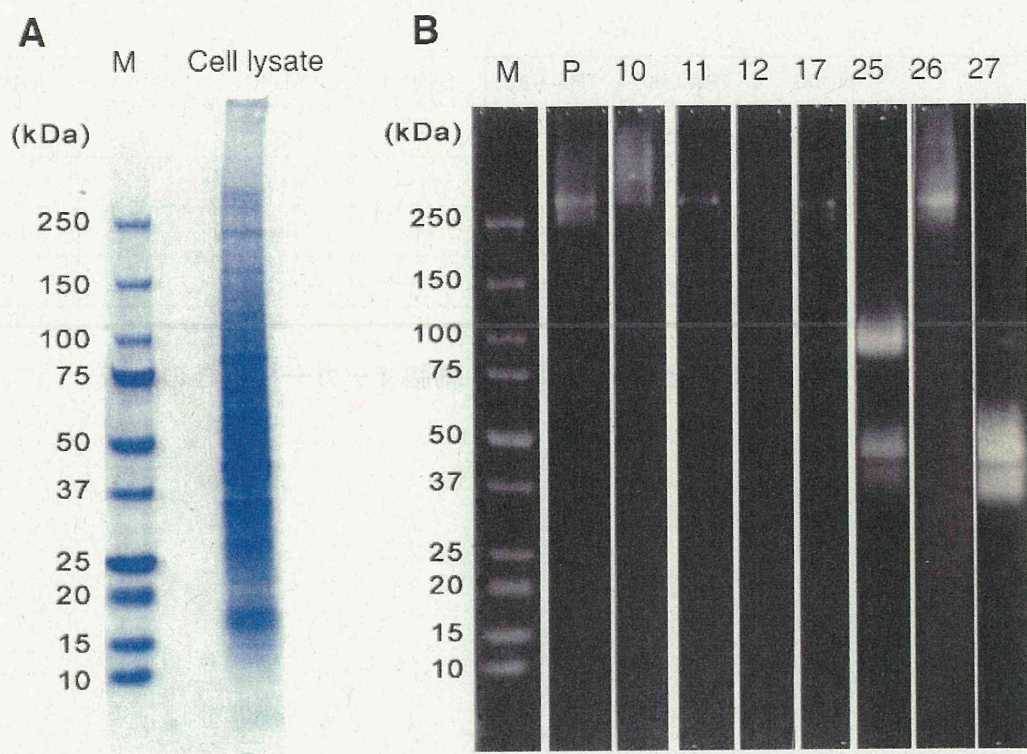


図1. ウェスタンブロットによるハイブリドーマのスクリーニング



	R-10G	TRA-1-60	TRA-1-81	SSEA-4	SSEA-3	SSEA-1	mAb84
Tic	+++	++++	++++	++++	++++	+	+
KhES-3	+++	++++	++++	++++	+++	+	+++
2102Ep	+	++++	++++	+++	+++	+	+/-
NCR-G3	+	++++	++++	++++	+++	++	+

表 2. R-10G と従来の iPS/ES 細胞マーカー抗体との比較

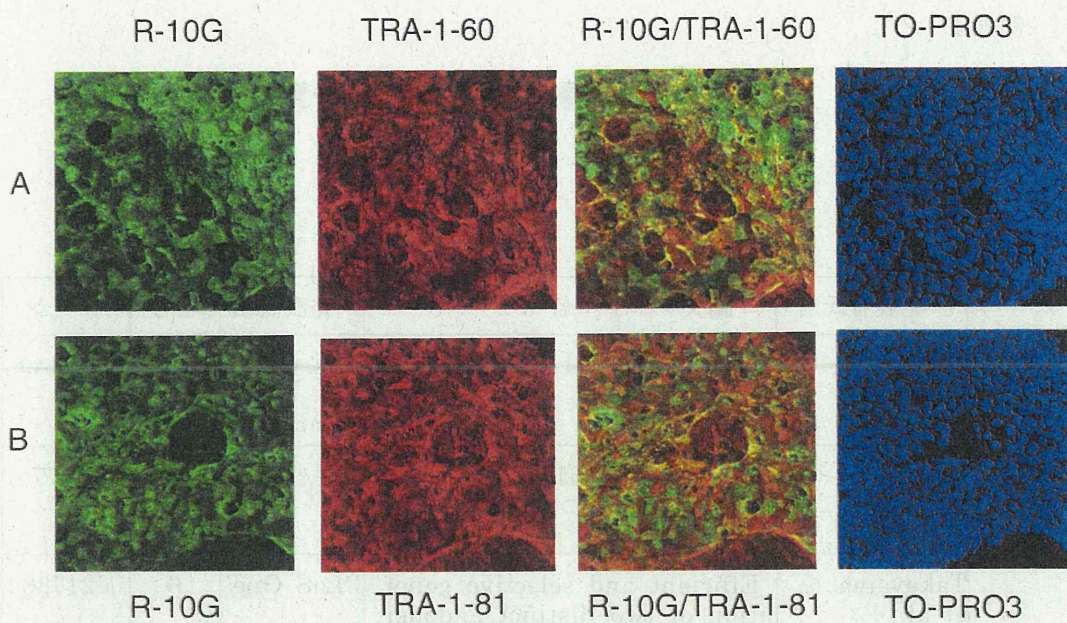


図 2. R-10G によるヒト iPS 細胞表面染色の特徴

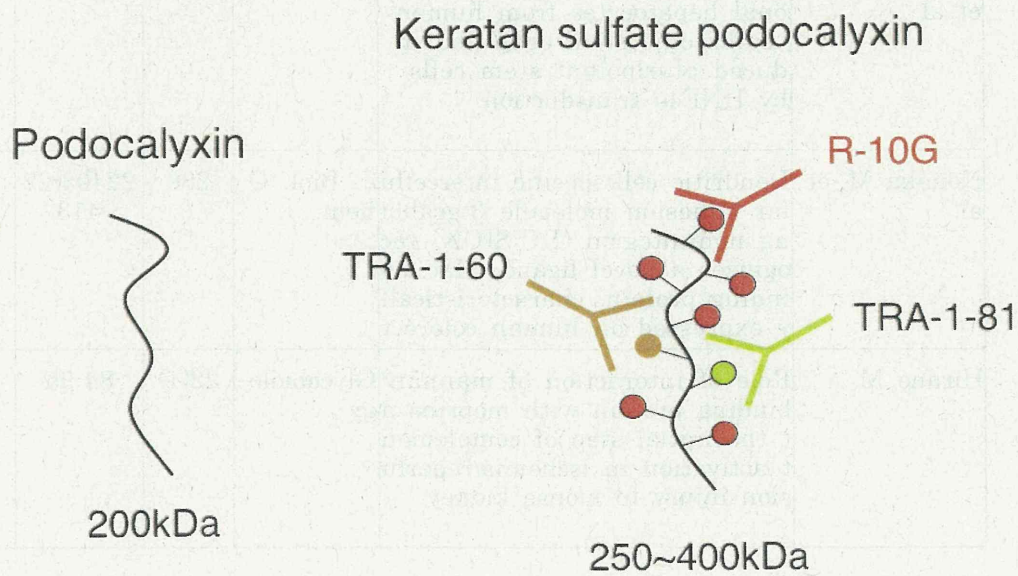


図 3. 21 ポドカリキシン上のケラタン硫酸エピトープファミリー

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
平田みつひ、その他	日本におけるヒトES、iPS細胞研究標準化：その3 品質管理	Tiss. Cult. Res. Commun	30	137-149	2011
菅 三佳、その他	ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一規格案について	再生医療	11	72-77	2012
Takayama K, et al.	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
Takayama K, et al.	Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4a transduction.	Mol. Ther.	20	127-37	2012
Nonaka M, et al.	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizing a novel ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal	J. Biol. Chem.	286	22403-22413	2011
Hirano M	Role of interaction of mannan-binding protein with meprins at the initial step of complement activation in ischemia/reperfusion injury to mouse kidney.	Glycobiology	22(1)	84-95	2011

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 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<sup>1)</sup>、シャンダー・アハマド<sup>2)</sup>、菅 三佳<sup>1)</sup>、藤木 彩加<sup>1)</sup>、松村 紘子<sup>1)</sup>、若林 真理<sup>1)</sup>、  
上田 直子<sup>1)</sup>、劉 克紅<sup>1)</sup>、林田みどり<sup>1)</sup>、平山 知子<sup>1)</sup>、小原 有弘<sup>1)</sup>、柳原 佳奈<sup>1)</sup>、  
水口 賢司<sup>2)</sup>、古江一楠田 美保<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup> 独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室

<sup>2)</sup> 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

<sup>3)</sup> 京都大学再生医科学研究所・附属幹細胞医学研究センター・細胞プロセッシング

### 要旨

ヒト胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞を用いて、発生過程におけるメカニズムの解明、あるいは再生医療や創薬などへの応用にむけて、国内外で研究が盛んに進められている。しかし、ヒト ES/iPS 細胞の形質は不安定であり、培地やフィーダー細胞のロットなどや、継代や培地交換のタイミングによっても簡単に变化する。倍加速度が早い異常クローンが出現した場合、5 継代でほとんどの細胞集団が入れ替わる可能性が予測されている。研究のツールとして使う際にも随時品質管理が必要である。この総説では、研究室内でできるヒト ES/iPS 細胞の品質管理について概説する。

キーワード： ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞、品質検査

### 序 文

1998年 Thomson ら<sup>1)</sup> によりヒト ES 細胞が樹立され、2006年山中らのグループ<sup>2)</sup> によりマウス人工多能性幹 (iPS) 細胞が発表され、世界中で多能性幹細胞の研究が盛んに行われるようになった。これまでの総説でも述べたが<sup>3,4)</sup>、ヒト ES/iPS 細胞は従来の一般的な培養細胞とは異なる点が多く、また、研究室間による研究結果や技術の差も

大きく、株間の差も大きい。ヒト ES 細胞研究の基礎知識が培われていない国内においては培養に苦勞している研究者も多い。英国シェフィールド大学 Andrews 教授がリーダーとして推進している International human stem cell initiatives (ISCI) プロジェクトでは、日本を含めた世界11カ国の研究者らが共同でヒト ES 細胞株の特徴を比較し、ヒト ES 細胞研究の標準化が進められている<sup>5)</sup>。同プロジェクトでは59株のヒト ES 細胞を集めて、フローサイトメトリーを用いた表面抗原の発現プロファイル、PCR-アレイを用いた未分化マーカー遺伝子発現、胚様体作成法により分化させた際の遺伝子発現、インプリンティング遺伝子、X 染色体不活性化について、解析方法とその結果

連絡者：古江一楠田美保

独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室

〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-6-8

TEL: 072-641-9819, FAX: 072-641-9851

E-mail: mkfurue@nibio.go.jp

細胞継代 作業チェックシート											
日時	Executioner :						プロジェクト名:				
細胞名	MMT-MEF:	CF-1	B6	ICR	SNL		EC(2102EP)NTERA2				
	hESC:	KhES-1	KhES-3	H1	H9	HES3	HES4				
	hiPSC:	201B7	201B2								
Passage No	P-( )	前回継代日:	月 日	今回の継代日は:	予定通り	予定より早い	予定より遅い				
細胞の状態	未分化コロニーがほとんど	分化した細胞がやや多い	分化した細胞が多い	熟さないコロニーが多い	よくわからないが変	コンフルエント	サブコンフルエント	細胞が予定より少ない	細胞がほとんど死んでいる	分化したコロニーが少しだけ	
写真	なし	x40( )	x100( )	x200( )	ファイル格納場所						
機器	遠心機		37°C湯浴		CO2インキュベーター						
medium	京大培地	Lot: KES	EB (-2Me)		Lot: EB(-)	mTeSR	Lot:	Variance			
	成育培地	Lot: Sip	EB+2ME		Lot: EB(+)	DMEM+FBS	Lot: EC				
	hESF8	Lot: E8	Condition Med		Lot: CMC	FGF-2	Lot:				
	hESF6	Lot: E6	Condition Med		Lot: CMB	activin	Lot:				
	hESF-FX	Lot: FX	Condition Med		Lot: CMI	PDGF	Lot:				
	hESF-Diff	Lot: Edf	PBS		Lot:	ROCK inhibitor	Lot:				
必要量	培地	ml		37°C湯浴		分					
用事添加因子	FGF-2	10ng/ul	x( )microL	最終濃度:	ng/ml		x( )microL	最終濃度:	g/ml		
	Activin A	10ng/ml	x( )microL	最終濃度:	ng/ml		x( )microL	最終濃度:	g/ml		
	PDGF	10ng/ml	x( )microL	最終濃度:	ng/ml		x( )microL	最終濃度:	g/ml		
	Rock inhibitor		x( )microL	最終濃度:	ng/ml		x( )microL	最終濃度:	g/ml		
分散液	Dispase	Lot: D	CTK		Lot: CTK	Variance					
	High Trypsin/ EDTA	Lot: TE(H)		アキュターゼ Lot:							
	Low Trypsin/ EDTA	Lot: TE(L)									
	Media Trypsin/ EDTA	Lot: TE(M)									
	STEMPRO®EZPassage*Tool										
	ピックアップ										
必要量	ml										
分散枚数	25cmフラスコ	75cm フラスコ	60mm Dish	90mm Dish	Variance						
	6well plate	12well plate	24well plate								
洗浄/培地交換	1回目PBS	ml/each	1回目培地	ml/each	Variance						
	2回目PBS	ml/each	2回目培地	ml/each							
剥離液処理	ml/each		Variance								
処理時間	室温	~1分	~2分	~7分	~10分						
	37°C	~1分	~2分	~7分	~10分						
処理後の様相	コロニーの周囲のみがカール	コロニーが半分程度剥がれた	コロニーがほとんど浮き上がった	ほとんど変化ない							
分散	剥離剤吸引除去	x( )									
	Wash with Medium	ml/each x( )									
	Wash with PBS	ml/each x( )									
	pipetting	x( )		酵素液で変化がなかったためスクレーパーした x( )							
scraeper	x( )										
回収	チューブに回収	直接次の培養器に播種									
遠心速度	200rpm (10G)	300rpm (20G)	700rpm (90G)	1000rpm (190G)	1200rpm (270G)	Variance					
	1min	2min	3min	5min							
遠心時間	上清を除去										
	Wash培地添加	ml/each		pipetting		x( )					
	繰り返し	x( )									
調製	細胞浮遊液	ml		pipetting		x( )					
細胞数計測	ヘモサイトメーター	( )micro		mix with trypanblue		( )cells/ml					
	コールターカウンター	( )mL		( )cells/ml							
	GEカウンター	( )microL		( )cells/ml							
容器と枚数	細胞浮遊液	ml/each ※分散密度									
	25cmフラスコ	x( )	75cmフラスコ	x( )	60mm Dish	x( )	90mm Dish	x( )	x( )	x( )	
	6well plate	x( )	12well plate	x( )	24well plate	x( )	x( )	x( )	x( )		
インキュベーター	No.			CO2濃度:		%					

図1. ヒト ES/iPS 細胞用培養記録用紙 (継代用)

継代用、培地交換用ともに培養記録用のファイルは培養資源研究室・幹細胞研究チームのホームページ <http://www.nibio.go.jp/baiyou/index.html> に掲載予定。

を2007年に発表している<sup>6)</sup>。また、その結果を受けて各国の幹細胞バンクや細胞バンクが参画する International stem cell banking initiative (ISCBI) では、研究用幹細胞のバンキングの国際ガイドラインを発表した<sup>7)</sup>。日本語訳は京都大学再生医科学研究所・高田らが日本再生医療学会雑誌「再生医療」に掲載している<sup>8)</sup>。さらに、2011年には、19カ国38研究室からヒト ES 細胞125株とヒト iPS 細胞11株の樹立早期と長期継代後のサンプルを集め、ゲノム安定性の比較分析を実施し、ゲノムの変化などについて発表した。特に1、12、17、20番染色体の部位に起きやすいことが明らかとなり、その中でも、20番染色体の一定部位のコピー数増幅が特に起きやすいことが示された。これまでもヒト ES 細胞株のゲノム不安定については報告があり<sup>9-20)</sup>、また、ヒト iPS 細胞株についても、ゲノム不安定性やそのメカニズムなどが報告されている<sup>21-24)</sup>。

以上のように、ヒト ES/iPS 細胞は形質が不安定であり、培地やフィーダー細胞のロットなどや、継代や培地交換のタイミングによっても簡単に変化する。倍加速度が早い異常クローンが出現した場合、5 継代でほとんどの細胞集団が入れ替わる可能性が予測されている<sup>25)</sup>。従って、ES/iPS 細胞の評価は、細胞バンクなどの特定の機関のみで行われるものではなく、研究室においても各自が使用している細胞の品質に問題がないかどうか、管理として行うことが望まれる。ISCI のようにすべての項目を検査することは難しい。そこで、研究室で日常的に行える品質管理について概説する。

## 1. 培 養 記 録

基本的な事ではあるが、維持培養などの記載がおろそかになりがちである。経験的な事例であるが、ヒト ES/iPS 細胞の場合、継代のタイミングが

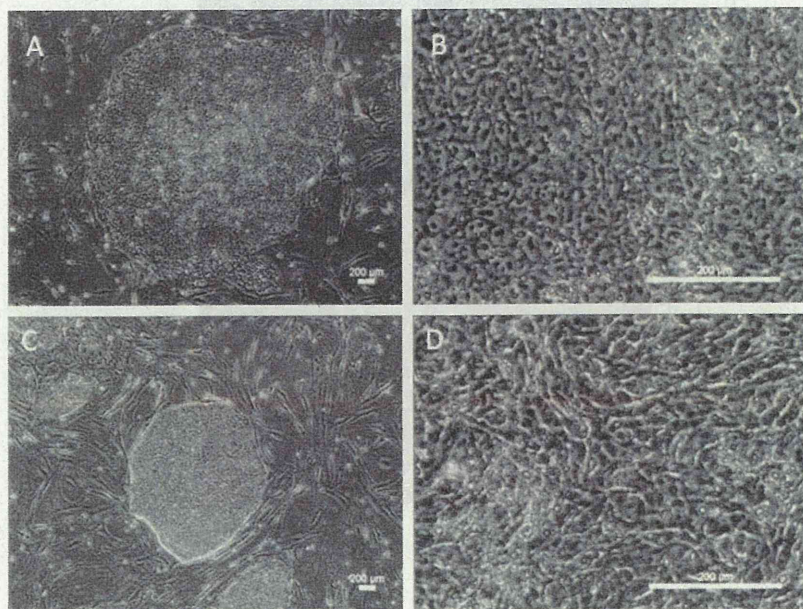


図2. ヒト ES 細胞の位相差顕微鏡像

- A: ヒト ES 細胞 KhES-1 (京都大学再生医科学研究所より分配) の未分化性の良い状態の弱拡大写真。
- B: A の強拡大写真。
- C: A の培養時とは異なるロットのフィーダー細胞を用いて未分化性があまり高くない状態の弱拡大写真。
- D: C の強拡大写真。

悪い場合 3 代継代後に影響がでることが多い。3 継代前にどのような作業を行ったか、正確に記録されていることにより、ヒト ES/iPS 細胞の未分化性の低下に与えた影響を同定できることも多い。一般的には、ヒト ES/iPS 細胞はフィーダー細胞と代替血清で培養が行われているが、昨今、新しい培養条件が次々と開発されており、研究室内でも複数の培養条件で継代維持されていることも少な

くない。同じフォーマットに記録することにより、記録漏れをなくすることができるため、当研究室では複数の培養条件であっても共有に使用できる培養記録用紙を作成した (図 1)。現在、このフォーマットを他の研究室などにも試用をお願いしている。これにより、培養に関する問題について共通のプラットフォームで意見交換する一助となればと考える。

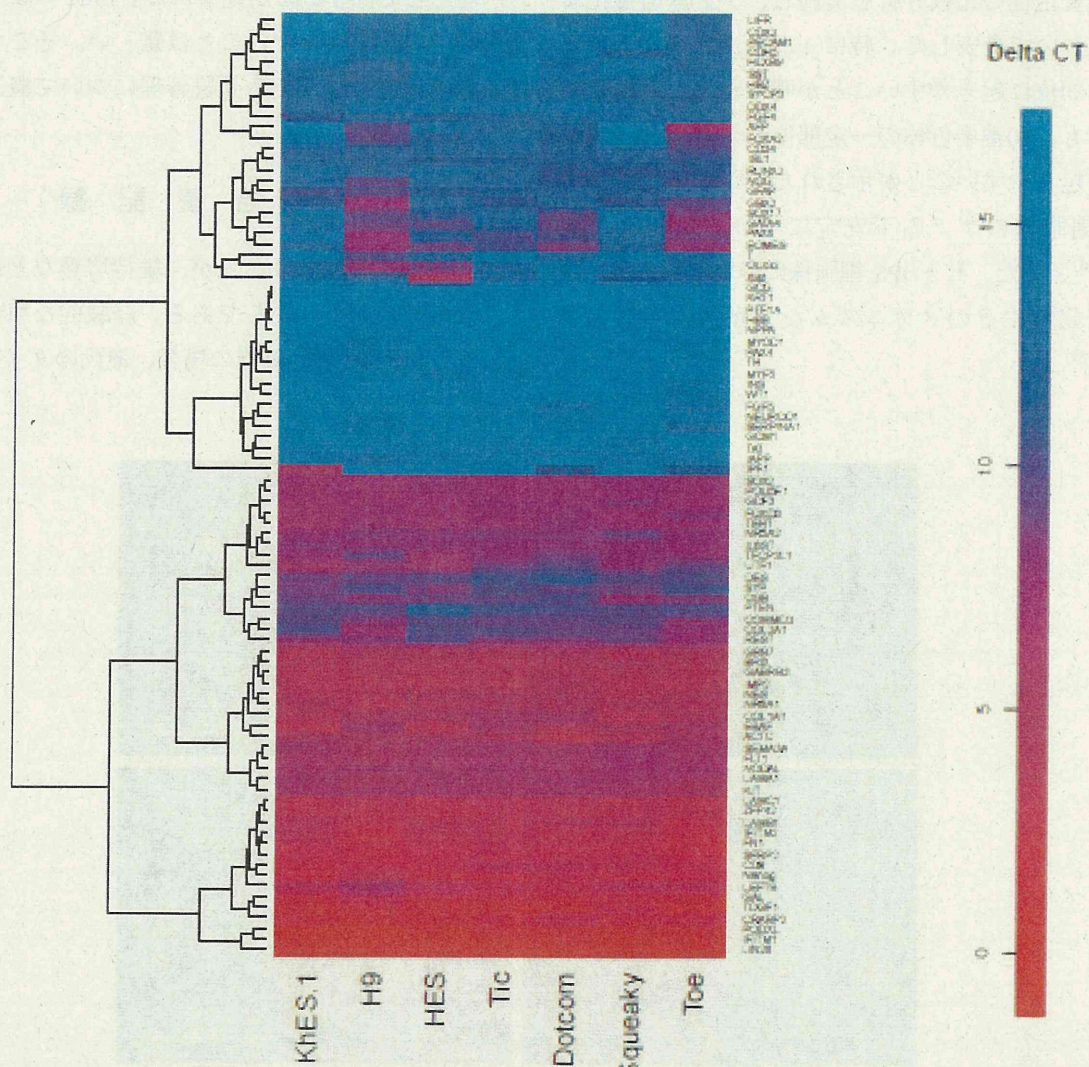


図 3. 各種ヒト ES/iPS 細胞株のヒト幹細胞関連マーカー遺伝子の解析結果  
MEF 上で培養した各種 ES 細胞 (KhES-1: 京都大学再生医科学研究所より分配、H9、HES3: WiCell バンクより分譲) および iPS 細胞 (国立成育医療センター梅澤らにより樹立され、JCRB 細胞バンクに寄託された iPS 細胞: Tic: JCRB1331、Dotcom: 1327、Squeaky: JCRB1329、Toe: JCRB1338) のヒト幹細胞関連マーカー遺伝子の発現率。赤: 高発現、青: 低発現



## 2. 位相差顕微鏡像

現状では多能性を示す絶対的なマーカーは見つかっておらず、いくつかの解析方法を用いて未分化性や多能性を同定する必要がある。その中で、形態は重要な評価基準のひとつである<sup>7)</sup>。継代直後の ES/iPS 細胞は、やや扁平な形態をしている株が多いが、継代後数日後の未分化な ES/iPS 細胞は、細胞質がほとんどなく、丸い核を持った細胞がコンパクトに集合したコロニーを形成し、細胞間境が明瞭でない特徴的な様相を呈する。英国の幹細胞研究者らは、コンパクトに集合したコロニー形態になることを「熟す」と表現することが多い。継代直前や凍結直前に、位相差顕微鏡写真を必ず撮るようにし、コロニーの形態がわかるように弱拡大と、細胞質や核の状態がわかるように強拡大の画像を取得する (図 2)。

## 3. 幹細胞関連遺伝子発現検査

2007年に ISCI の報告によれば<sup>6)</sup>、未分化なヒト ES 細胞に発現している遺伝子は、*NANOG*、*POU5F1 (OCT4)*、*TDGFI*、*DNMT3B*、*GABRB3* や *GDF3* であった。このプロジェクトで使われた幹細胞遺伝子 PCR アレイが市販されており、当研究室においても使用している。新しい株を入手して継代開始後できるだけ早いタイミングと、半年毎に RNA をサンプリングし、株間の比較を行っている。具体的には、細胞から RNA (必要 RNA 量 1 pg ~ 2 μg) を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (ABI 社、品番: 4387406) を用いて逆転写し、PCR アレイにアプライする。PCR アレイ解析には TaqMan Array Human Stem Cell Pluripotency Card (ABI 社、品番: 4385344) を使用し、AB7900HT リアルタイム PCR システムで測定することで、ヒト幹細胞関連マーカー遺伝子の発現変化を解析している (図 3)。

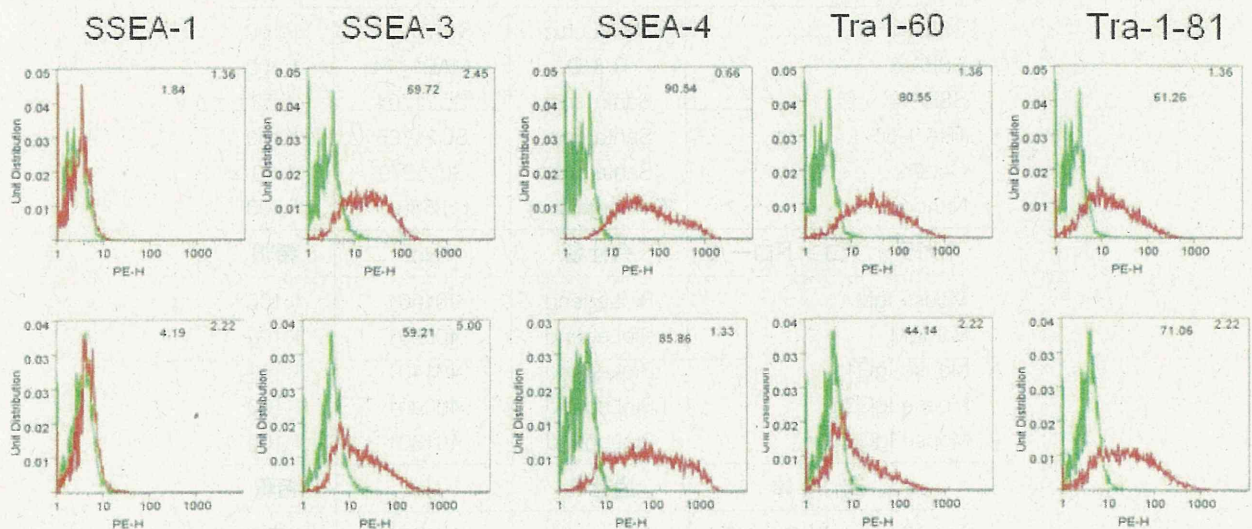


図 4. フローサイトメトリー解析結果

上段: 図 2 の A、B の状態の細胞を各種抗体にて解析した結果。

下段: 図 2 の C、D の状態の細胞を上記と同様に解析した結果。

良い状態の上段に比べて、悪い状態の下段では、SSEA-1 は発現していないものの、SSEA-3 や Tra-1-60 のピークが左にシフトしているのがわかる。

#### 4. フローサイトメトリー検査ならびに免疫染色検査

上記の幹細胞関連遺伝子発現は、それほど大きく変化することは少ないが、細胞表面抗原発現プロフィールは、ヒト ES/iPS 細胞を培養しているその培地やフィーダーのロットにより変化することも多い(図4)。位相差顕微鏡像を見て普段の状態とは異なると思われるような場合には、フローサイトメトリーを行って確認することをお薦めする。抗体2種による二重染色を行うのは効率的ではあるが、実際にはバックが高くなるなどのトラブルも多い。そのため、当研究室においては基本的にはすべてシングルで染色を行っている。免疫染色の場合には、6ウェルプレート2枚に播種し、6種類の抗体による染色を行っている。また、フローサイトメトリーと免疫染色は同じ抗体を用いている。その方法を表2-5に記載した。

#### 5. 染色体数計測

かつて日本組織培養学会が樹立細胞の登録を行っていた頃は、その細胞の染色体写真が必須であったが、近年は外部に委託することが多く、検査方法を知らない研究者も多い。Gバンド分染法による核型解析は知識と経験を有するが、染色体数の計測であれば、日本組織培養学会編の「組織培養の技術」にその方法が記載されており、それほど技術を要しない。ただ、ヒト ES/iPS 細胞においては、コルセミドに対する感受性が異なる株もあり、フィーダー細胞が邪魔をすることもあるので、若干の工夫が必要である。フィーダー細胞を除去するためにマトリジェル上に播種する方法もあるが、筆者らは EDTA にて ES/iPS 細胞のみを分散させる方法を行っている。その方法を表6、7に記載した。

表1. フローサイトメトリーと免疫染色の共通抗体

一次抗体	会社名	No.	希釈
SSEA-1	Santa cruz	SC-21702	1:100
SSEA-3	R & D	MAB1434	1:100
SSEA-4	Santa cruz	SC21704	1:50
TRA-1-60	Santa cruz	SC21705	1:100
Oct3/4	Santa cruz	SC-5279	1:50
Nanog	Cell Signaling	3580	1:400
ネガティブコントロール	会社名	No.	希釈
Mouse IgM	BioLegend	401601	1:100
Rat IgM	BioLegend	400801	1:100
Mouse IgG1	BioLegend	401401	1:100
Mouse IgG2a	BioLegend	400201	1:100
Mouse IgG3	BioLegend	401301	1:100
二次抗体	会社名	No.	希釈
Anti-Mouse IgM Alex647	Invitrogen	A21238	1:500
Anti-rat IgM Alex647	Invitrogen	A21248	1:500
Anti-Mouse IgG Alex647	Invitrogen	A21236	1:300
Anti-Rabbit IgG Alex555	Invitrogen	A21429	1:200

抗体は1%FBS/PBSで希釈している。

日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化

表 2. フローサイトメトリー解析の準備

材 料	メーカー	品 番
細胞：検体、陽性コントロール細胞 (2i02Ep)	-	-
各種抗体 (一次抗体、二次抗体)	表 1 参照	-
15 ml 用 遠心管	greiner	188271
96 well round plate	nunc	268152
シール	Diversified Biotech	BEM-1
PBS (-)	GIBCO	10010-23
0.05%Trypsin/1mMEDTA	GIBCO Invitrogen	15090 E-6511
Medium : DMEM (High glucose)+10%FBS	GIBCO	11965
4%PFA	WAKO	163-20145
cell strainer キャップ付き 5 mL ラウンドチューブ	BD	352235

表 3. フローサイトメトリーのための作業手順

1		96 well round plate に、指定の一次抗体希釈液を 10 $\mu$ L ずつ添加する。
2		使用する細胞を PBS で洗浄する。
3	ベンチ	0.05%Trypsin/1mMEDTA を 1 mL 加え、乾かない程度に吸引する。
4		3-5 min インキュベータに戻す。
		フラスコをたたいて分散し、細胞の分散状態を検鏡する。
5		【細胞がはがれていた場合】 Medium を 10 mL 加え、ピペッティング。
		【細胞がはがれていない場合】 上清をアスピレートし、Medium を 10 mL 加え、ピペッティング。
6		single cell になっているか確認する為、再度検鏡する。
7		細胞数を測定する。
8	ベンチ	細胞懸濁液を遠心し、上清をアスピレートした後、Medium で $1-4 \times 10^6$ cells/mL に調整する (クリーンベンチ内で実施)。
9		96 well round plate に 10 $\mu$ L ずつ分注する。
10		plate をシールし、4°C で 60 min 振揺する。
11		300G (1,260 rpm) 3 min 遠心する。
12		ペレットを確認した後、デカントで上清を捨て、Medium を 150 $\mu$ L/well 加え、遠心洗浄。
13		上記を二度繰り返す。
14		Medium を 45 $\mu$ L/well 加え、指定の二次抗体希釈液を 5 $\mu$ L ずつ添加する。
15		plate をシールし、4°C で 30 min 振揺する。
16		300G (1,260 rpm) 3 min 遠心する。
17		上記同様に、遠心洗浄を三度行う。
18		ペレットを確認した後、上清を捨て、PBS を 150 $\mu$ L/well 加え、遠心洗浄する。
19		上清を捨て、 $5 \times 10^5$ cells/mL となるよう 4% PFA を加え、strainer を通した後、FACS 用 sample とする (ドラフト内で実施) (FACS にかける際、液量は最低 200 $\mu$ L 以上必要)。

表 4. 免疫染色のための準備

材 料	メーカー	品 番
細胞：検体、陽性コントロール細胞 (2102Ep)	-	-
各種抗体 (一次抗体、二次抗体)	表 1 参照	-
50 mL 用 遠心管	greiner	227261
6 well plate	nunc	268152
PBS (-)	GIBCO	10010-23
4% PFA	WAKO	163-20145
FBS	-	-
Triton X-100	SIGMA-ALDRICH	T8787
Tween 20	SIGMA-ALDRICH	P2287
Hoechst 33342	Invitrogen	H1399
5 mL エピペンドルフチューブ	イナ・オプティカ	ST-500

表 5. 免疫染色の手順

1. 細胞の準備

1	6 well plate に細胞を播種する (クリーンベンチ内で実施)。
2	継代日になったら、培地を吸引除去 (クリーンベンチ内で実施)。
3	PBS を 5 mL 加え、吸引除去 (クリーンベンチ内で実施)。
4	4% PFA を 1 mL/well で加え、15 min 静置 (固定) (ドラフト内で実施)。
5	4% PFA を PFA 廃液用ボトルにデカントで廃棄する (ドラフト内で実施)。
6	PBS を約 5 ml 手早く加え、PFA 廃液用ボトルにデカントにて廃棄する (ドラフト内で実施)。
7	PBS を約 5 ml 手早く加え、デカントにて廃棄する (洗浄)。
8	上記 7 を同様に 1 回 (洗浄)。
	直ちに染色を行わない場合は PBS を 5 mL/well で満たし、プレートの蓋を閉め、パラフィルムでシールし、4°C で保存する。

2. 免疫染色

【細胞表面抗原の場合】

1	3% FBS in PBS を 1 ml/well 加え、室温 30 min (ブロッキング) (シェイカー上で反応させる)。
2	希釈した一次抗体を 500 $\mu$ L/well 加え、4°C で O/N (シェイカー上で反応させる)。
3	PBS を 7 mL/well 加え、5 min 静置 (洗浄)。
4	上記を同様に 2 回 (洗浄)。
5	希釈した二次抗体を 500 $\mu$ L/well 加え、室温 30 min (シェイカー上で反応させる)。
6	PBS を 7 mL/well 加え、すぐにデカントで廃棄する。
7	PBS を 7 mL/well 加え、室温 10 min 静置 (洗浄)。
8	上記を同様に 1 回 (洗浄)。
9	PBS で 500 倍希釈した Hoechst を 1 mL/well 加え、室温で 3 min (シェイカー上で反応させる)。
10	PBS を 7 mL/well 加え、すぐにデカントにて液をのぞく (洗浄)。
11	PBS を少量入れて、検鏡する。
12	4% PFA を 1 mL/well 加え、室温 10 min 処理し、後固定をする (ドラフト内で実施)。
13	PBS で手早く 3 回洗浄する (ドラフト内で実施)。
14	PBS を 5 mL/well 加え、観察する。
	直ちに観察しない場合は、プレートの蓋を閉め、パラフィルムでシールし、アルミ箔で遮光して、4°C で保存する。