

201206008A

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

ヒトES/iPS細胞の実用化における  
幹細胞バンクの基盤整備についての研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 古江-楠田 美保

平成25(2013)年 5月

## 目次

### I. 総括研究報告

#### ヒトES/iPS細胞の実用化における幹細胞バンクの基盤整備についての研究

古江-楠田 美保 ..... 3

### II. 分担研究報告

#### 1. ヒトES/iPS細胞遺伝子発現プロファイルのバイオインフォマティクス解析

水口 賢司 ..... 44

#### 2. FACS解析・バイオインフォマティクス解析

大沼 清 ..... 55

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 70

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 71

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
（総括）研究報告書

### ヒト ES/iPS 細胞の実用化における幹細胞バンクの基盤整備についての研究

研究代表者 古江-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  
ヒト幹細胞応用開発室 研究リーダー

#### 研究要旨：

ヒト ES/iPS 細胞の実用化においては、プレマスターバンク、マスターバンク、ワーキングセルバンクを設置することが望ましい。実際に実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。一般細胞バンクにおける品質管理、ならびに臨床用細胞プロセッシングにおける作業工程などについてはすでに策定されており、本研究では、これらに加えるべきヒト幹細胞バンクにおけるデータベースの基盤設計、幹細胞としての品質管理に必要な技術の策定など、ヒト幹細胞バンク運営の基盤システムの基礎設計について研究を行った。

#### A. 研究目的

これまで培養細胞を産業利用する際においては、細菌などの微生物の利用と同様に、樹立機関から提供された資源をストックするプレマスタ

ーバンク、さらに種としてのマスターバンク、実際に使用するワーキングバンクを作成して使用することが望ましいとされ、培養細胞が資源化されてきた。しかし、ヒト胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞などの

多能性幹細胞を実用化する上においては、従来の細胞とは異なり、培養過程において形質が変化しやすく、実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、これら細胞の特性検査などを含めた作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。そこで、実用に資するヒト幹細胞バンクに必要なデータベースの基盤設計、品質管理に必要な基盤技術の策定を行い、実用ヒト幹細胞バンクの基盤システムを設計について研究することを目的とする。

ヒトES/iPS細胞などヒト幹細胞を再生医療のソース、ワクチン作製や生物製剤原料、創薬研究ツールとして実用化するために、プレマスターバンク、統合的に管理するマスターバンク、実用のためのワーキングセルバンクの設置が望まれ、共用の基盤システムを構築しておく必要がある。一般細胞のバンクは独立行政法人 医薬基盤研究所の生物資源としてJCRB細胞バンクが設置されており、微生物検査、ウイルス検査、細胞同定検査（CGHアレイ検査）など基本的な検査項目についての作業工程は策定されている。また、臨床用細胞プロセッシングの作業工程については、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則に準じた

工程が臨床研究を行っている各機関にて策定されている。しかし、ヒト多能性幹細胞は従来の細胞とは異なる形質をもつため、ヒト幹細胞特有の品質管理が必要となる。また、一番の問題点は、ヒト多能性幹細胞はゲノムが不安定であり、長期に継代を行う事によりゲノムが変異してしまう可能性があることが報告されている。そのため、ヒト多能性幹細胞を治療に用いるためには、できるだけ短期間で資源化を行った細胞を使うべきであるとの見解がでていいる。海外では、国際幹細胞バンキングイニシャティブ(ISCBI)が臨床用ヒト幹細胞バンクのためのガイドラインを作成中である。国内事情を鑑みたヒト幹細胞バンクの基盤設計が急務である。

具体的には、下記の3つの観点から研究を推進する。

- ① 効率的な品質管理を行うための基盤技術の策定
- ② 細胞登録システムの基礎設計案の作成
- ③ 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

## B. 研究方法

## 1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

### (i) 遺伝子解析

未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性を明らかにするため、遺伝子発現プロフィール解析を行った。その検査方法については、H23 年度に策定を行った国際幹細胞イニシャティブ (ISCI) にて用いられた Human Stem Cell Pluripotency PCR アレイを用いた方法

を用いて行った。

対象は、厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 NIHS0693 UTA-SF2-2、JCRB1331 Tic、JCRB1327 Dotocom、JCRB1437 iPS-TIG-114-4f1、コントロールとして京都大学 iPS 細胞研究所より供与されたヒト iPS 細胞 201B7、京都大学ヒト ES 細胞 KhES-1(京都大学より分与)、ウィスコンシン大学ヒト ES 細胞 H9(Wicell Bank より分譲)を用いた。

【遺伝子プロフィール解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 NIHS0693 UTA-SF2-2 の情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/cellinfo/ips/u-tokyo\\_ipslist/](http://cellbank.nibio.go.jp/cellinfo/ips/u-tokyo_ipslist/)

資源化に備えて、無血清・無フィーダー培養条件、hESF9a 培地を用いた培養工程における品質管理方法及び作業手順書を策定した。

| 細胞番号     | 細胞名       | 樹立者 | 寄託機関 | 性状      | ドナー情報            | 作成方法  | 使用培地  | 分譲条件            | 分譲受付開始 |
|----------|-----------|-----|------|---------|------------------|---|-------|-----------------|--------|
| NIHS0693 | UTA-SF2-2 | 浅島誠 | 東京大学 | ヒトES細胞様 | 46才, 女性, 皮膚線維芽細胞 | Human OCT3/4、Human SOX2、Human KLF4、Human c-MYCをレトロウイルスベクターを用いて導入後、ヒトES細胞様コロニーをフィーダー細胞上で培養後、無フィーダー培養へ適応させたもの | hESF9 | 国内の大学・公的研究機関・企業 | 分譲準備中  |

【遺伝子プロフィール解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1331 Tic の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/serch\\_res\\_det.cgi?DB\\_NUM=1&ID=6176](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/serch_res_det.cgi?DB_NUM=1&ID=6176)


JCRB1331 Tic

細胞情報

|            |  |          |   |
|------------|--|----------|---|
| 細胞番号(JCRB) | JCRB1331   | 細胞名      | Tic   |
| 生物種(日本語)   | ヒト   | 組織名(日本語) | ヒトiPS   |
| コメント(日本語)  | ヒトiPS細胞, MRC-5由来   | プロフィール   | Human iPS cell line derived from human fetus lung cells (MRC-5), infected with recombinant retroviruses expressing the four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc).                                       |
| 別名         |  | 動物名      | human   |
| 系統名        |  | 学名・属名    | Homo  |
| 種名         | sapiens  | 性別       | M   |
| 年齢・月齢      | 14 week fetus  | 細胞識別情報   | available   |
| (癌)原発組織名   |  | 病歴情報     |   |
| 転移の有無(Y/N) | No   | (癌)転移組織名 |   |
| 遺伝的性質      | Human iPS cell line derived from human fetus lung cells (MRC-5), infected with recombinant retroviruses expressing the four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc).            | 細胞寿命     | infinite  |
| クライシSPDL   |  | 形態       | ES-like   |
| 一般性状       |  | 細胞分類     |   |
| 細胞樹立者名     | Umezawa, A.  | 細胞寄託者    | Umezawa, A.   |
| 分譲時制限      |  | コメント     |   |
| 入手年        | 2008   | 培養培地     | human ES medium   |
| 継代方法       | Subculture once a week by Physical method or enzyme-treatment method. (Cells were maintained on mouse primary embryonic fibroblast feeder cells inactivated with mitomycin C.) | 継代時細胞数   |   |
| 人種         |  | 炭酸ガス濃度   | 5%  |
| 登録状況       | preparing  | 採取組織名    | fetus lung  |
| ウイルス検査     | tested   | 検出ウイルス   | GAPDH(+), CMV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-), BKV(-), JCV(-), ADV(-), HBV(-), parvoB19(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-), HPV18(-)[-negative, +/-positive, nt/not tested, GAPDH is positive control] |
| 組織型        |  |          |   |

【遺伝子プロフィール解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1327 Dotcom の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?DB\\_NUM=1&ID=6160](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?DB_NUM=1&ID=6160)

JCRB1327 Dotcom 

細胞情報

|            |  |          |   |
|------------|--|----------|---|
| 細胞番号(JCRB) | JCRB1327   | 細胞名      | Dotcom  |
| 生物種(日本語)   | ヒト   | 組織名(日本語) | ヒトiPS   |
| コメント(日本語)  | ヒトiPS細胞, MRC-5由来   | プロフィール   | Human iPS cell line derived from human fetus lung cells (MRC-5), infected with recombinant retroviruses expressing the four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc). |
| 別名         |  | 動物名      | human   |
| 系統名        |  | 学名・属名    | Homo  |
| 種名         | sapiens  | 性別       | M   |
| 年齢・月齢      | 14 week fetus  | 細胞識別情報   | available   |
| (癌)原発組織名   |  | 病歴情報     |   |
| 転移の有無(Y/N) | No   | (癌)転移組織名 |   |
| 遺伝的性質      | Human iPS cell line derived from human fetus lung cells (MRC-5), infected with recombinant retroviruses expressing the four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc).            | 細胞寿命     | infinite  |
| クラインスPDL   |  | 形態       | ES-like   |
| 一般性状       | Gene Expression (OCT4, SOX2, NANOG, TERT): Positive, ALP: Positive, Immunostaining (OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, Tra 1-60): Positive, Teratoma: Positive.                        | 細胞分類     | transformed   |
| 細胞樹立者名     | Umezawa, A.  | 細胞寄託者    | Umezawa, A.   |
| 分譲時制限      |  | コメント     |   |
| 入手年        | 2008   | 培養培地     | human ES medium   |
| 継代方法       | Subculture once a week by Physical method or enzyme-treatment method. (Cells were maintained on mouse primary embryonic fibroblast feeder cells inactivated with mitomycin C.) | 継代時細胞数   |   |
| 人種         |  | 炭酸ガス濃度   | 5%  |
| 登録状況       | preparing  | 採取組織名    | fetus lung  |
| ウイルス検査     | tested   | 検出ウイルス   | CMV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-), BKV(-), JCV(-), ADV(-), parvoB19(-), HBV(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-), HPV18(-) [-/negative, +/positive]              |

【遺伝子プロフィール解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1437 iPS-TIG114-4f1 の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?DB\\_NUM=1&ID=6564](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?DB_NUM=1&ID=6564)

(なお、京都大学 CiRA プロトコールにて培養を行って資源化したものは JCRB1437.01 として分譲を行っている。)

**JCRB1437 iPS-TIG114-4f1** Order

細胞情報

|            |  |          |   |
|------------|--|----------|---|
| 細胞番号(JCRB) | JCRB1437   | 細胞名      | iPS-TIG114-4f1  |
| 生物種(日本語)   | ヒト   | 組織名(日本語) | ヒトIPS   |
| コメント(日本語)  | ヒトIPS細胞, TIG114由来  | プロフィール   | Human iPS cell line which was generated from adult human skin fibroblast cell line (JCRB0534: TIG-114).   |
| 別名         |  | 動物名      | human   |
| 系統名        |  | 学名・属名    | Homo  |
| 種名         | sapiens  | 性別       | M   |
| 年齢・月齢      | 36-year-old  | 細胞識別情報   | available   |
| (癌)原発組織名   |  | 病歴情報     |   |
| 転移の有無(Y/N) | No   | (癌)転移組織名 |   |
| 遺伝的性質      | Transgene: Human OCT3/4, SOX2, KLF4, and c-MYC (in pMXs retroviral vectors).   | 細胞寿命     | infinite  |
| クライスPDL    |  | 形態       | human ES-like   |
| 一般性状       |  | 細胞分類     | transformed   |
| 細胞樹立者名     | Yamanaka, S.   | 細胞寄託者    | Yamanaka, S.  |
| 分譲時制限      | 1) Academic research purpose only. 2) Conclude a MTA with Kyoto Univ.  | コメント     |   |
| 入手年        | 2009   | 培養培地     | Primate ES cells medium (ReproCELL) supplemented 4 ng/mL bFGF.  |
| 継代方法       | Cells are treated with the solution consisted by 0.25% Trypsin, 0.1 mg/mL collagenase IV, 1mM CaCl <sub>2</sub> , and 20% KSR. | 継代時細胞数   |   |
| 人種         |  | 炭酸ガス濃度   | 5%  |
| 登録状況       | registered   | 採取組織名    | skin  |
| ウイルス検査     | tested   | 検出ウイルス   | CMV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-), BKV(-), JCV(-), ADV(-), parvoB19(-), HBV(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-), HPV18(-) [-/negative, +/positive, nt/not tested] |
| 組織型        |  |          |   |



【遺伝子プロフィール解析を行った京都大学 iPS 細胞研究所より供与されたヒト iPS 細胞 201B7 の細胞情報】

[http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell\\_no=HPS0063&type=1](http://www2.brc.riken.jp/lab/cell/detail.cgi?cell_no=HPS0063&type=1)

細胞材料の融解方法 (HPS以外・HPS) ・ 培地・試薬一覧 ・ 細胞データ項目の読み方 ・ 略語一覧

|                        |   |
|------------------------|---|
| HPS0063 : 201B7        |   |
| 特性(英)                  | Human iPS cell line. HPS0002 is derived from the same patient. Order Form ( C-0042, C-0034). Please see CiRA , Kyoto University if you are a researcher at a for-profit organization. |
| 特性(日)                  | ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞株。HPS0002と同一人由来。レトロウイルスベクターにより4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入。以前の提供番号はHPS0001。提供依頼書式 (C-0041、C-0028)。営利機関は、iPSアカデミアジャパン株式会社から配布。                                 |
| 動物種                    | human   |
| 人種                     | Caucasian   |
| 性別                     | Female  |
| 年齢                     | 36 years  |
| 組織                     | skin  |
| 外来遺伝子                  | pMXs-Oct3/4, -Sox2, -Klf4, -c-Myc, pLenti6/UbC/V5-DEST, mouse Slc7a1  |
| 形態                     | ES-like   |
| 接着性                    | Yes   |
| 培地                     | Primate ES Cell Medium+4ng/ml human basic FGF   |
| 抗生物質                   | Free  |
| 培養最適温度                 | 37°C  |
| CO <sub>2</sub> 濃度 (%) | 5%  |
| 継代方法                   | 0.25% trypsin+0.1% collagenase type IV+20% KSR+1mM CaCl <sub>2</sub> +PBS(-), 0.1% gelatin coated dish  |
| 継代密度                   | 1:3-6 split   |
| 継代頻度                   | subculture : once/4-6days. medium change : every day  |
| クローニング有無               | Yes   |
| 細胞寿命                   | infinite  |
| マイコプラズマ                | -   |
| 核型                     | 46XX(30)  |
| 個体識別                   | OK  |
| メモ                     | DAP213 : Medium+2M DMSO+1M Acetamide+3M Propyleneglycol, feeder : SNL 76/7 (X-rays:5000R or MMC) 1.5-2.5x10 <sup>6</sup> (6) cells/100mm dish   |
| 樹立者                    | Yamanaka, Shinya  |
| 寄託者                    | <a href="http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/">http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/</a>   |
| 使用条件(英)                | Attach <b>TERMS and CONDITIONS</b> to MTA (C-0034). Order Form ( C-0042, C-0034).   |
| 使用条件(日)                | 別紙1を提供同意書(C-0028)に添付すること。提供依頼書式 (C-0041、C-0028)。  |

【遺伝子プロフィール解析を行った Wisconsin International Stem Cell (WISC) Bank より分譲  
をうけたヒト ES 細胞 WA09 H9 の細胞情報 NIH registered line】

[http://ordering.wicell.org/index.php?products\\_id=219&mCoA=2&id=97&option=com\\_oscommerce  
&osMod=product\\_info&Itemid=192&osCsid=0f4d8546414d9e999532ce81af75622](http://ordering.wicell.org/index.php?products_id=219&mCoA=2&id=97&option=com_oscommerce&osMod=product_info&Itemid=192&osCsid=0f4d8546414d9e999532ce81af75622)

**WA09** (Feeder Dependent) NIH Registered Line

**Product Information**

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Product Description     | WA09 (H9)  |
| Cell Line Provider      | WiCell Research Institute (Madison, WI, USA)                                 |
| Lot Number              | 9  |
| Date Frozen             | 4 June 2005  |
| Passage Number          | 27   |
| Culture Method          | <a href="#">Protocol III-Thawing</a> ; <a href="#">Protocol IV-Splitting</a> |
| Cryopreservation Method | <a href="#">Protocol VI-Freezing</a>   |

The following testing specifications have been met for the specified product lot:

| Test Description               | Test Method | Test Specification        | Result |
|--------------------------------|-------------|---------------------------|--------|
| Post-Thaw Viable Cell Recovery | WCD-TE-004  | Cells recover from thaw   | Pass   |
| Identity by STR                | WCD-TE-005  | Identical to parent MCB   | Pass   |
| Mycoplasma                     | WCD-TE-001  | No contamination detected | Pass   |
| Karyotype by G-Banding         | WCD-TE-003  | Normal Karyotype          | Pass   |

Approved by NSCB Quality Assurance

If the current lot is not available at the time of shipment, a different lot from the same line will be shipped.

This lot was produced by WiCell. Cells distributed by the National Stem Cell Bank (NSCB) are intended for research purposes only. They are not intended for use in humans. This cell line is not known to harbor any agents known to cause disease in healthy adult humans. However, appropriate safety precautions should be taken when handling any cell line derived from human sources. The recipient is responsible for the safe storage, use, and handling of the cells. The NSCB is not responsible for the any damages or injuries resulting from the use of these cells.

Please visit the [technical service](#) portion of the website for assistance with your hES cells. The knowledgeable technical support staff can assist with embryonic stem cell culture concerns, training and any other customer service concerns you may encounter.

**Historical Certificates of Analysis (CoA) for WA09**

[WA09-WB0143](#)

[WA09-MCB-01](#)

[WA09-DL-11](#)

[WA09-DL-08](#)

[WA09 \(H9\) DL-7](#)

[WA09 \(H9\) DL-5](#)

[WA09 \(H9\) DL-4](#)

[WA09-DL-02](#)

[WA09 \(H9\) Lot 12](#)

[WA09 \(H9\) Lot 11](#)

[WA09 \(H9\) Lot 8](#)

[WA09 \(H9\) Lot 10](#)

[WA09 \(H9\) Lot 9](#)

[BACK](#)

表 1 遺伝子プロファイル解析に用いた PCR アレイ Human Stem Cell Pluripotency Array (Applied Biosystems)に含まれる遺伝子のリスト

| 遺伝子分類                                | 遺伝子数 | 遺伝子名 (Human Gene Symbols)   |
|--------------------------------------|------|---|
| Expression in undifferentiated cells | 6    | NANOG, POU5F1, TDGF1, DNMT3B, GABRB3 and GDF3   |
| Maintenance of pluripotency          | 3    | NANOG, POU5F1 and SOX2  |
| Correlation to stemness              | 33   | BRIX, CD9, COMMD3, CRABP2, EBAF, FGF4, FGF5, FOXD3, GAL, GBX2, GRB7, IFITM1, IFITM2, IL6ST, IMP2, KIT, LEFTB, LIFR, LIN28, NODAL, NOG, NR5A2, NR6A1, PODXL, PTEN, REST, SEMA3A, SFRP2, TERT, TFCP2L1, UTF1, Xist and ZFP42  |
| Differentiation markers              | 50   | ACTC, AFP, CD34, CDH5, CDX2, CGB, COL1A1, COL2A1, DDX4, DES, EOMES, FLT1, FNI, FOXA2, GATA4, GATA6, GCG, GCM1, GFAR, HBB, HBZ, HLXB9, IAPP, INS, IPF1, ISL1, KRT1, LAMA1, LAMB1, LAMC1, MYF5, MYOD1, NES, NEUROD1, NPPA, OLIG-2, PAX4, PAX6, PECAM1, PTF1A, RUNX2, SERPINA1, SOX17, SST, SYCP3, SYP, T, TAT, TH and WT1 |
| Controls                             | 6    | ACTB, RAF1, CTNNB1, GAPD, EEF1A1, I8S   |

全 96 遺伝子の発現を測定できる。96 遺伝子中 6 遺伝子はコントロールの候補遺伝子、40 遺伝子はヒト幹細胞の未分化維持に関連する特徴的な遺伝子、50 遺伝子は分化マーカーである。これらの遺伝子のリストは、国際幹細胞イニシャティブ(ISCI)にて選定され、実際の解析に用いられたものと同じである。

## (ii) 未分化マーカータンパクのプロフィール解析

ヒト多能性幹細胞のマーカータンパクの発現について2つの手法を用いて解析を行い、その結果を比較した。手法1として、コーニング社製25cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコを用いて培養後、細胞を分散し、Tra-1-60、SSEA-3、SSEA-4、SSEA-1などの抗体と反応させて免疫染色を行い、フローサイトメトリーによる解析を行った。手法2として、同じロットの細胞をBD社製6ウェルプレートにて培養した細胞を4%パラホルムアルデヒドにて室温で固定し、免疫染色を行ってイメージアナライザーにてプロフィール解析を行った。手法1、手法2による解析結果の比較を行った。

## 2. *in vitro*における多分化能評価方法の開発

ヒト多能性幹細胞の *in vitro* における分化能評価は、一般的には、未分化細胞を凝集させ胚様体

(Embryoid body ; EB) を作製し、10%ウシ血清を含む培地を用いて10日から3カ月程度培養を行って自然分化させた後、RNAを抽出して分化マーカーの遺伝子発現を解析し、三胚葉に分化するかどうかを確認している。しかし、血清によってロット差が生じることから、分化能をロット差なく評価することが難しい。多種類のヒト iPS 細胞の三胚葉への分化能や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。今年度は、ミニマムエッセンシャルな成分からなる既知の組成の無血清培地 hESF9 培地を用いて96ウェルプレートに播種後、種々の濃度のアクチビンAならびにFGF-2を添加して3日間培養後、神経マーカーNestin, Map2 に対する抗体を用いて免疫染色を行った後、イメージアナライザーを用いて陽性率を算出するcELISAを用いて神経への分化誘導測定法の構築を行った(図1)。

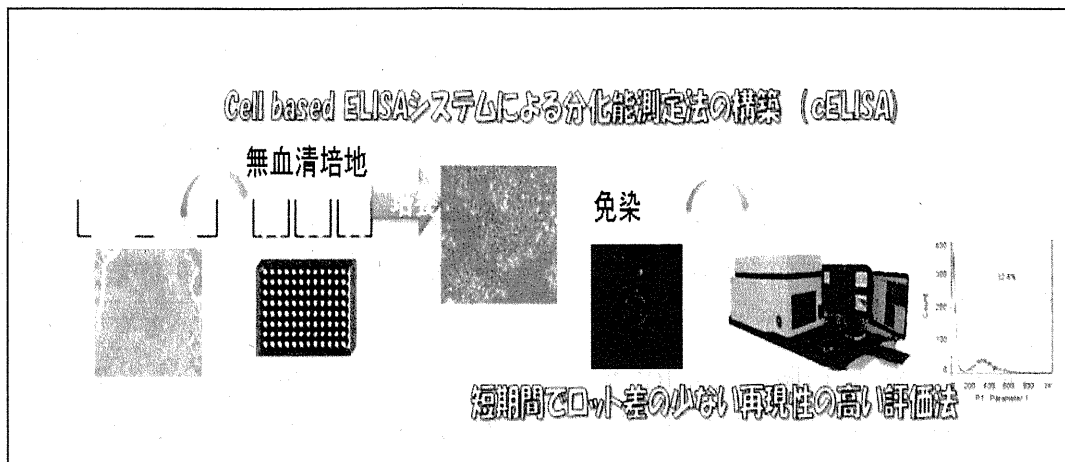


図 1

### 3. 細胞登録システムの基礎設 計案についての検討

海外のヒト幹細胞の分譲を行っている機関における細胞登録情報の収集を行った。また、細胞培養記録を継続して記載し、データ化について検討を行った。

### 4. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

(i) フィーダーを用いたヒト ES/iPS 細胞の培養に関する作業工程表ならびに作業手順書の作成

フィーダーを用いたヒト ES/iPS 細胞の解凍・培地交換、継

代、凍結について必要な準備、作業などのリストアップを行った。また、解凍・培地交換、継代、凍結について作業手順書を作成した。データベースとして応用できるようにエクセルにて作成した。

(ii) フィーダーを用いないヒト ES/iPS 細胞の培養に関する品質管理法ならびに作業手順書の作成

フィーダー細胞を用いない無血清培地を用いて培養を行う場合、その品質管理も従来の培養法を用いる場合とは異なってくる。東京大学浅島研究室にて無フィーダー・無血清にて樹立され寄託されたヒト iPS 細胞 UTA-SF2-2 の資源化に備えて、hESF9a 培地を用いた培養工程における品質管理方法

を策定した。

しかし、近年、次々と無血清培地が開発されていることから、どの培養条件にも対応できるような品質維持培養技術を策定する必要がある。そこで、これまでに報告されている既知の組成よりなるフィーダー細胞を用いない市販の TeSR2 培地、申請者が開発した既知組成よりなる hESF9a 培地、動物由来成分不含 hESF-FX 培地を用いてヒト ES/iPS 細胞の培養を 5 継代行い、評価や検査を行って、品質管理法を検討した。

### 倫理面の配慮

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析等の研究を実施する場合には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、その他の研究は「臨床研究に関する倫理指針」に従って行うほか、研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行した。また、ヒト ES 細胞使用研究に関しては「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた規定を遵守して研究を遂行した。あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な

研究については研究開始前に所定の手続きを行っている。

将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいて有効性及び安全性を確保できるよう厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従い、研究を推進した。JCRB 細胞バンクならびに難病バンク運営にかかる倫理問題について従来より研究・政策提言を行っている難病疾患資源研究部・増井徹部長と連携し、研究推進のあり方、情報公開における問題等に関する検討も行っている。「ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究」（医薬基盤研究所）については文部科学大臣確認済みである。

## C. 研究結果

### 1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

ヒト ES/iPS 細胞の培養過程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の安定性を確認するために、Human Stem Cell Pluripotency

Array を用いて、対象株について異なる継代数で複数回、解析した。それらの結果については、分担研究者・水口らとともに、バイオインフォマティク解析を行ったので、詳細については水口の項に譲る。

また、ヒト多能性幹細胞の未分化マーカータンパクの解析については、分担研究者・大沼の項に譲るが、下記図2のように、長岡技術科学大学にて培養を行った細胞を固定し、(独) 医薬基盤研究所に送付後、免疫染色を行ってイメージアナライザーにより解析を行って、長岡技術科学大学にて行ったフローサイトメ

トリーでの解析結果と比較したところ、高い相関性が得られた。フローサイトメトリーによる解析を行うためには、細胞数が必要であり、また、解析を行うタイミングも限定される。一方、細胞をプレートで培養後固定して免疫染色を行って解析を行う場合は、少ない細胞数で解析でき、また、固定後は随時解析を行うことができることから、作業効率がよい。また、輸送を行った後に解析を行うこともできることから、品質評価法として有用であることが示された。

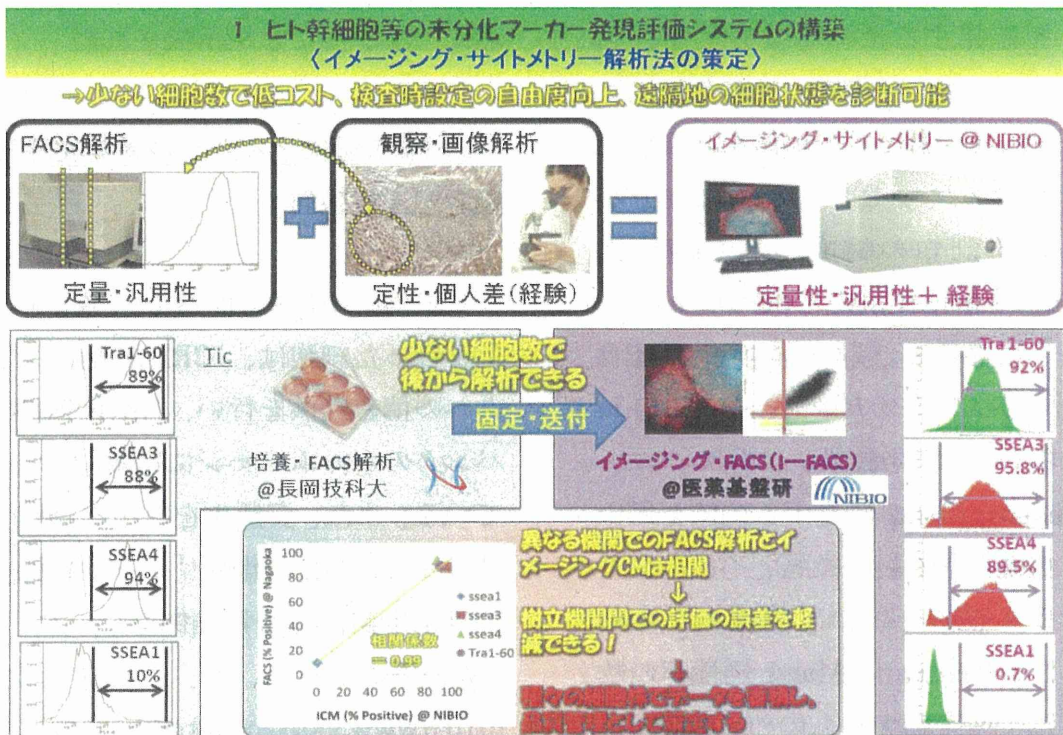


図 2

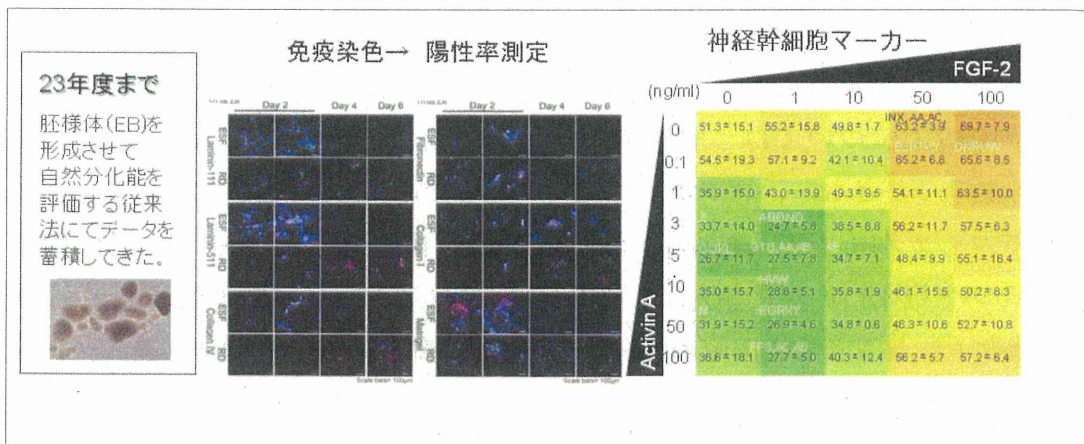


図 3

## 2. *in vitro*における多分化能評価方法の開発

H23年度は、三胚葉へ分化することを確認するための多分化能評価を行ったが、今年度は神経分化にターゲットを絞り、分化能を評価した。ミニマムエッセンシャルな成分からなる既知の組成の無血清培地 hESF9 培地を用いて 96 ウェルプレートに播種後、種々の濃度の FGF-2 ならびにアクチビン A を組み合わせ 3 日間培養後、神経マーカー Nestin, Map2 に対する抗体を用いて免疫染色を行った後、イメージアナライザーを用いて陽性率を算出した。Nestin や Map2 陽性率の数値はやや変動するものの、増殖因子による分化誘導結果についてはほ

んど変動せず、一定の結果が得られた。今回の結果から、分化能を評価する際にも、ロット差のない既知の成分からなる培養条件で分化能を評価することが、安定した品質管理につながることを示唆された。

## 3. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

ヒト幹細胞応用開発室にて資源化を行った細胞は、JCRB 細胞バンクへの情報提供を行い、JCRB 細胞バンクのホームページに掲載されている。また、資源化を行った細胞について、厚生労働省「ヒト幹細胞情報化事業」に情報提供を行った。その情報は、

<http://www.skip.med.keio.ac.jp/>

に記載されている。また、海外の細



胞バンクのサイトを収集し、ヒト幹細胞応用開発室のホームページに掲載した。

[http://www.nibio.go.jp/baiyou/myweb1\\_025.htm](http://www.nibio.go.jp/baiyou/myweb1_025.htm)

#### 4. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

(i) フィーダーを用いたヒト ES/iPS 細胞の培養に関する作業工程表ならびに作業手順書の作成

H23 年度に英国の UK Stem Cell Bank やスペインアンダルシア Stem Cell Bank などにおける分譲バンク作成工程表を参考にして、資源化工程表を策定した。その工程表を元に実際に資源化を行ったところ、それぞれの株間の特性の差により、工程表に沿って作業が行えない事例があった。そこで、特性の異なるさまざまな株に対応できるよう、また、できるだけ短い継代数で資源化できるよう作業工程を改訂した(表 2)。

従来法に基づくフィーダーを用いて培養を行うヒト ES/iPS 細胞の解凍・培地交換、継代、凍結について必要な準備、作業など作業項目を表にまとめた。また、解凍・培地交

換、継代、凍結について作業手順書をエクセルにて作成した。また、エクセルのファイルを文書化し、JCRB 細胞バンクからの iPS 細胞の分譲時に添付する取り扱い説明書として作成した(別添 1-4)。

(ii) フィーダーを用いないヒト ES/iPS 細胞の培養に関する品質管理ならびに作業手順書の作成

東京大学浅島研究室にて無フィーダー・無血清にて樹立され寄託されたヒト iPS 細胞 UTA-SF2-2 の資源化にあたり、ウシファイブロネクチンならびに hESF9a 培地を用いた培養工程における品質管理法を策定し、実際に資源化を行い、改訂を行った(表 3)。

また、市販の TeSR2 培地、申請者が開発した既知組成よりなる hESF9a 培地、動物由来成分不含 hESF-FX 培地を用いてヒト ES/iPS 細胞を 5 継代培養し、評価や検査を行った。

## D. 考察

### 1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

国内外で多くのヒト iPS 細胞が樹立され、再生医療のソース、ワクチン作製や生物製剤原料、創薬研究ツールとして実用化が期待されている。実用化に際しては、プレマスタバーク、統合的に管理するマスタバーク、実用のためのワーキングセルバンクの設置が望まれ、共用の基盤システムを構築しておく必要がある。しかしながら、ヒト ES 細胞とほぼ同じ特性を持つヒト iPS 細胞においても、絶対的なマーカーはなく、また、多分化能を持つがゆえに、未分化状態は不安定である。これまで細胞バンクにおいて資源化されてきた培養細胞は、多くが癌細胞である。細胞増殖速度も速く、解凍後の生存率も高い。しかし、ヒト iPS 細胞は癌細胞とは異なり、細胞倍加時間は遅く、解凍後の生存率も低い。また、培養過程において細胞形質が変化しやすく、実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、幹細胞特性検査などを含めた作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。そこで、実用に資するヒト幹細胞バンクに必要なデータベースの基盤設計、品質管理に必要な基盤技術の策定を行い、実用ヒト幹細胞バンクの基盤システムを設計について研究を行っている。

H23 年度に未分化マーカーや分化マーカーなど 84 遺伝子を集めた PCR アレイを用いて遺伝子プロフィールの解析を行うためのプロトコルを策定した。その方法を用いて各細胞株の未分化状態の品質管理を行うため、異なる継代数の細胞から RNA を抽出して Stem Cell PCR アレイ解析を行い、継代による未分化状態の変化を確認した。詳細については、分担研究者・水口の項にゆずるが、継代数が異なることにより発現が変動する遺伝子と、ほとんど変動しない遺伝子があることが明らかとなった。従来の培養法においては、フィーダー細胞を血清を用いて播種し、動物由来成分を含む KSR を用いて培養を行うため、ロット差により未分化・分化マーカー遺伝子発現に影響を与える可能性は大きい。しかし、実際にロット差によるものなのか、継代による分散操作によるものか、遺伝子の特性なのか、今後検討する必要がある。

ヒト iPS 細胞における未分化マーカータンパク発現のプロフィール解析は、フローサイトメトリーを用いて行われるが、機器やその操作方法、また、解析操作により、しばしば結果が異なる。詳細については、分担研究者・大沼の項にゆずるが、フロ

ーサイトメトリーによる解析のためには、多くの細胞数が必要であり、解析のタイミングも制限される。昨今、イメージアナライザーの性能が向上し、フローサイトメトリーと同等の解析を行えるようになってきた。免疫染色の場合、少ない細胞数でも解析が可能である。また、プレートに播種された細胞を固定して 4℃で保存し、ある程度の期間、保存することが可能である。凍結保存する細胞と同じロットの細胞を評価しようとする際、フローサイトメトリーによる解析の場合には、凍結と同日に行う必要があるが、免疫染色の場合には後日解析が可能であり、細胞バンクにおける実務効率が向上する。さらに、今回、分担研究者・大沼が培養を行ったものを固定後、医薬基盤研究所に送付し、同所にて免疫染色を行って解析を行うことが可能であることを示した。多様な形質をもつヒト iPS 細胞の標準化は、細胞自体を標準化するのではなく、品質評価を標準化することが先決であると考えら得る。従って、免疫染色を用いたイメージングサイトメーターを用いた解析は、特定の機関による評価を可能とし、今後、活用されるべきものと考えられる。

## 2. *in vitro*における多分化能評価方法の開発

ヒト ES/iPS 細胞の多分化能評価方法については、この分野において世界的に課題である。ヒト多能性幹細胞の分化能評価は、2つの意味を持つ。一つは、培養過程において、幹細胞の特性として三胚葉への分化能を維持しているかどうかという品質管理の観点からの評価。もう一つは、その細胞株の分化傾向を測定する意味がある。ヒト iPS 細胞は三胚葉に分化する能力を持つものの、分化する効率が異なることが報告されている。また、特定の細胞への分化プロトコルを用いた場合、ほとんどその分化が見られない場合がある。しかし、逆に特定の細胞への分化が高い場合もある。産業応用を考えた場合、必ずしも三胚葉への分化が万能である必要はなく、特定の細胞へ分化する再現性が高く、また、高い効率であることは、利便性につながる。従って、産業応用の観点から、幹細胞バンクにおいて各株の分化傾向を評価することは有用な情報として期待されることだろう。今回、ロット差のない既知の組成からなる hESF9 培地を用いて二次元培養にて分化誘導を行った

ところ、再現性高い神経分化誘導が確認できた。今後、複数株を用いて分化誘導効率を測定し、分化傾向測定法として活用できるかどうかを検討する予定である。

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くらべ、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、本事業の成果であるアデノウイ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。

### 3. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

国内外で、ヒト iPS 細胞が多数樹立され、細胞情報を登録する動きが活発化してきている。海外の幹細胞バンクから情報提供を依頼されることは多い。バンク内における細胞登録システムを国内外の他の機関と連携して情報を提供するためには、情報基盤を設計しておく必要がある。国際間で細胞を交換して研究

を推進するに当たっては、論文に掲載されている情報だけではなく、様々な情報が必要となってくる。細胞登録するに当たっては、細胞株の命名法なども重要であり、H23 年度にその概要について報告した。昨今、新しいリプログラム法や維持培養条件が次々と開発されており、論文には詳細に記載されていない場合も多い。幹細胞バンクなどにおいて資源化する際には、海外の細胞登録機関へ情報提供して研究を推進する上においては、互換性のあるデータベースを構築しておく必要がある。H25 年度からは、ヒト幹細胞情報化事業と連携して、細胞登録システムの基礎設計案についての検討を行っていく予定である。

### 4. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

ヒト iPS 細胞の培養は、従来研究ツールとして使われてきた癌細胞に比べて、培養が難しく、ちょっとしたピペット操作、培地交換のタイミング、継代時の操作時間などによりその後の品質に影響を与える。従って、小さな作業も含めて作業手順書を作成することが品質維持につながると考えられる。これらの作業