

独)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  
SOP 培養 iPS細胞継代 (on MEF)

26		各フラスコに均一になるように、細胞懸濁液を8mL/フラスコ播種する (*1)	懸濁操作は、コロニーが底に沈んでいる場合は、懸濁液の上清をピペットで取り、底にゆるやかに吹きかけて、底にあるコロニーを浮き上がらせる (コロニーを直接吸引排出すると、コロニーが必要以上に小さくなる)		
27	位相差顕微鏡	顕微鏡でコロニーの状態(大きさ、分散状態)を確認する			
28	CO <sub>2</sub> インキュベーター	CO <sub>2</sub> インキュベーターに移し、細胞が均一に分布するように、静置する前に容器を斜め20° くらいに傾けて前後にゆすり、浮遊液が動いている状態で素早く静置する			
29		CO <sub>2</sub> 濃度5%のインキュベーターで48時間静置する			

(\*1) 6well plateの場合は5mL/wellで播種する

別添4 ヒト iPS 細胞培養の作業手順書 (SOP) 培地交換作業

独)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  
SOP 培養 iPS細胞の培地交換 (on MEF)

**目的**

ヒトiPS細胞の培地交換を行う

**使用試薬・器具**

	メーカー	カタログ番号	必要量	備考	チェック
ヒトiPS細胞用培地				SOP- 使用期限は4°C 保管で1週間	
ヒトリコンビナントFGF-2 (10µg/ml)	片山化学工業	16100102		SOP-PB-M-22 解凍後4°C保管 で使用期限は2 週間	
15mL遠心管					
吸引用バスツールピペット					
各種滅菌ピペット					
各種滅菌ピペットチップ					
パラフィルム					
ピペットエイド					
ピペットマン					
37°C恒温槽					
37°C、5%CO <sub>2</sub> インキュベーター					
位相差顕微鏡					
安全キャビネット					

独)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  
SOP 培養 iPS細胞の培地交換 (on MEF)

培地交換

細胞の状況により変わるが、3日目頃から培地交換を実施する

ステップ	作業場所	作業内容	備考	チェック	所内用	
培地の準備	1	位相差顕微鏡	ヒトiPS細胞の状態を確認する			
	2	恒温槽	恒温槽を37°Cにセットし、作動させる			
	3		ヒトiPS細胞用培地の容器、遠心管をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる			
	4	安全キャビネット内	遠心管にヒトiPS細胞用培地を必要量分取する			
	5		ヒトiPS細胞用培地の容器のふたをきちんとしめ、パラフィルムでシールする			
	6	4°C冷蔵庫	ヒトiPS細胞用培地を直ちに保管場所に戻す			
	7		FGF-2の容器をアルコール噴射清拭し、安全キャビネットに入れる			
	8	安全キャビネット内	培地入り遠心管にFGF-2を必要量添加し、泡立たないよう懸濁する	FGF-2最終濃度 成育医療センター系細胞: 10ng/mL 京都大学系細胞:4ng/mL		
	9	4°C冷蔵庫	FGF-2を直ちに保管場所に戻す			
	10	安全キャビネット内	培地入り遠心管のフタをきちんとしめ、パラフィルムでシールする			
	11	恒温槽	培地入り遠心管を使用時に37°C恒温槽で5分間加温する	ヒトiPS細胞用培地は、5-10分程度温めればよいが、確実に温まっていることを確認する 必要以上に37°C恒温槽に放置しないようにする		
培地交換	12		恒温槽で加温した培地の遠心管をアルコール噴射清拭し、安全キャビネットに入れる			
	13	安全キャビネット内	培地交換をするiPS細胞播種フラスコを、CO <sub>2</sub> インキュベーターから安全キャビネットに移す			
	14		既存培地を1mL残して吸引除去し、新しい培地を5mL入れて培地交換を行う	残す既存培地と加える新しい培地の量は、細胞の状態によって変わる		
	15	位相差顕微鏡	培地交換後のヒトiPS細胞の状態を確認する			
	16	CO <sub>2</sub> インキュベーター	ヒトiPS細胞播種フラスコをCO <sub>2</sub> インキュベーターに入れる			

## 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

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：

現在は、多くのヒト ES/iPS 細胞が国内外の様々な研究所において樹立され、様々な培養方法により培養され、研究に使用されている。これらの細胞を治療目的あるいは創薬研究目的のために利用するには、詳細な細胞特性分析や培養手順の標準化が必要である。これらの細胞株の差異、及び培養条件の差異を調査するために、我々は、NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において出されたヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現解析結果について、バイオインフォマティクス分析を行った。

#### A. 研究目的

未分化状態で維持培養されたヒト ES/iPS 細胞は、Oct3/4、Nanog、Tra1-60、Tra1-81、Tra2-54、SSEA3、SSEA4 等の未分化マーカーを発現し、SSEA1 等の分化マーカーを発現しない。このことを判定する免疫染色やフローサイトメトリー(FCM)解析は、細胞の培養状態、すなわち未分化/分化状態の比較的解釈が簡単な評価方法であり、世界中で採用されている。NIBIO ヒト幹細胞応用開発室におい

ても、この評価方法が細胞の品質管理のひとつとして採用され、改良・改善を加えつつ、継続的に運用されている。しかし、免疫染色や FCM 解析では、基本的には蛋白質や糖脂質など抗体の抗原となりうる遺伝子の発現解析が可能であるが、mRNA レベルの遺伝子発現の解析が困難である。また、アフィニティーの高い抗体がある場合にのみ解析が可能であり、一度に解析できる蛋白質や糖脂質の数はある程度限られているため、網羅的に解析をすることはできない。しかし、ヒト

ES/iPS 細胞を治療目的あるいは創薬研究目的のために利用するには、詳細な細胞特性分析や培養手順の標準化が求められている。そこで、NIBIO ヒト幹細胞応用開発室では、免疫染色、FCM 解析と平行して、未分化状態で維持培養されたヒト ES/iPS 細胞の RNA レベルの遺伝子発現を網羅的・定量的に測定するために、細胞株毎、培養条件ごとに RNA サンプルを採取し、PCR アレイをおこなってきた。我々は、NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において蓄積された PCR アレイ測定結果をより詳細に解析し、細胞株の差異、及び培養条件の差異を調査することを第一の目的とし、バイオインフォマティクス解析を進めた。さらに、より迅速且つ正確で詳細な遺伝子発現プロファイル解析を進めるための解析手順を策定することを目的とし、アレイデータの取り扱い方法についての検討を行った。

## B. 研究方法

### 未分化状態でのヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現プロファイル解析

NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において、未分化状態でのヒト ES/iPS 細

胞の特性を明らかにするため、未分化維持培養をおこなったヒト ES/iPS 細胞から RNA を抽出し、Human Stem Cell Pluripotency Array (Applied Biosystems) を用い、定量 RT-PCR による遺伝子発現プロファイル解析が行われた。その検査方法は、H23 年度に策定を行った国際幹細胞イニシャティブ (ISCI) にて策定された方法と同様のものがあった。

この PCR アレイ (Human Stem Cell Pluripotency Array) において発現量が測定される遺伝子は 96 遺伝子であり、このうち 6 遺伝子 (ATCB、RAF1、CTNNB1、GAPD、EEFA1、18S) はハウスキーピング遺伝子と呼ばれる一般に発現量が変化しにくいとされる遺伝子群、残る 90 遺伝子が本来の解析対象の遺伝子群である (表 2)。各遺伝子の発現量の測定結果は CT 値 (ある一定の核酸量が測定されるまでに必要な PCR の増幅回数; 遺伝子発現量が高いと CT 値は低い) として表される。ハウスキーピング遺伝子をコントロールとしてこの CT 値に補正をかけ、サンプル間で遺伝子発現量を直接比較できるように算出したものが  $\Delta$ CT 値である。我々は、まず、 $\Delta$ CT 値を算出する際のコントロールとして適切なハウスキーピング遺伝子 3 遺伝子 (ATCB、RAF1、

GAPD) を選抜し、これらをもとに算出された  $\Delta CT$  値を用いて解析を進めた。

## C. 研究結果

### ハウスキーピング遺伝子群：

前述したとおり、ハウスキーピング遺伝子群は一般的に発現量の変化しにくいものとされている。しかしながら、ヒト ES/iPS 細胞においてはハウスキーピング遺伝子群の発現の挙動が一般細胞と異なり、必ずしも一定でないということが我々の解析によっても明らかとなった(図 1)。そこで、このバイオインフォマティクス解析においては、 $\Delta CT$  値による解析をより正確なものにするために、ATCB、RAF1、および GAPD の 3 遺伝子のみをコントロール遺伝子として取り扱うことと決定した。

### プレ解析：

NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において、ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持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、測定された。その結果について、我々はまず、上記のコントロール遺伝子を用いて  $\Delta CT$  値の算出を行った(図 2)。

### 遺伝子発現プロフィール解析

次に、対象株毎に、異なる継代数のサンプルの  $\Delta CT$  値を比較した。解析結果を視覚的にとらえ理解しやすくするために、二次元スキャッタープロット(散布図)を作成した(図 2)。このサンプルごとの  $\Delta CT$  値比較解析により、同一の細胞株、同一の培養方法によってえられた細胞サンプルであっても、継代数が異なる場合、発現量が一定している遺伝子がある一方、ある程度発現量の異なる遺伝子が存在することが明らかとなった。つまり、未分化維持培養を続けていたとしても、継代ごとに遺伝子発現プロフィールが異なるということである。我々は、このことに注目をして、より詳細にサンプル間の遺伝子発現プロフィール解析を行った。その例を図 2 に挙げる。

UTA-SF2-2 は、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 細胞である。

NIBIO ヒト幹細胞応用開発室では、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 培地を用いた無フィーダー・無血清の培養工程における品質管理法を策定し、実際に資源化をおこなっている。その過程で、品質管理の一環として、RNA サンプルを 3 回、異なる継代数で採取し、遺伝子発現プロフィール解析が行われた。遺伝子発現プロフィールは 3 サンプル間で非常によく一致し、このサンプルにおいて遺伝子発現が安定していることが明らかとなった。

一方、Dotcom は分化誘導に適しているため資源化細胞の需要も高いが、一般には安定して未分化に維持して培養することが難しいとされている。この Dotcom は未分化維持培養の過程においても、たびたび分化する傾向

があるため、資源化や研究で品質管理を行った場合に、免疫染色や FCM 解析の結果、未分化細胞の割合が通常より低い（全体の 80%以下）と判定されることがある。今回、このバイオインフォマティクス解析をおこなったサンプルは、少なくとも 80%以上未分化細胞が含まれるという細胞集団のサンプルから RNA を抽出し、遺伝子発現を測定したものであるが、個々のサンプル間の遺伝子発現プロフィールは大きく異なる場合があることが判明した。つまり、免疫染色や FCM 解析の未分化/分化マーカー発現解析のみでは判明しなかった遺伝子発現の変化が、PCR アレイによる網羅的遺伝子発現測定とバイオインフォマティクス解析を組み合わせることによって詳細に解析できたということを示している。

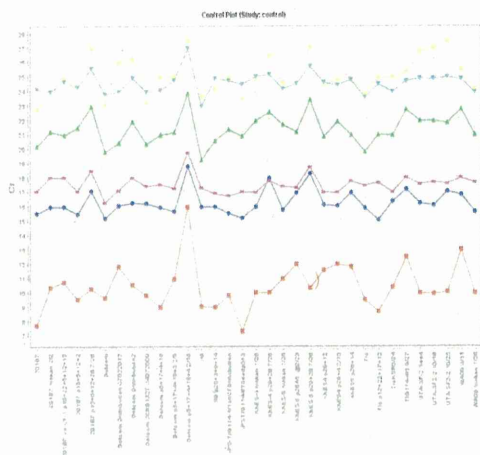


図 1 コントロール遺伝子候補の選定 各サンプルにおけるハウスキーピング遺伝子群の CT 値の比較。統計学的な解析によりコントロールにふさわしい遺伝子を選択した。

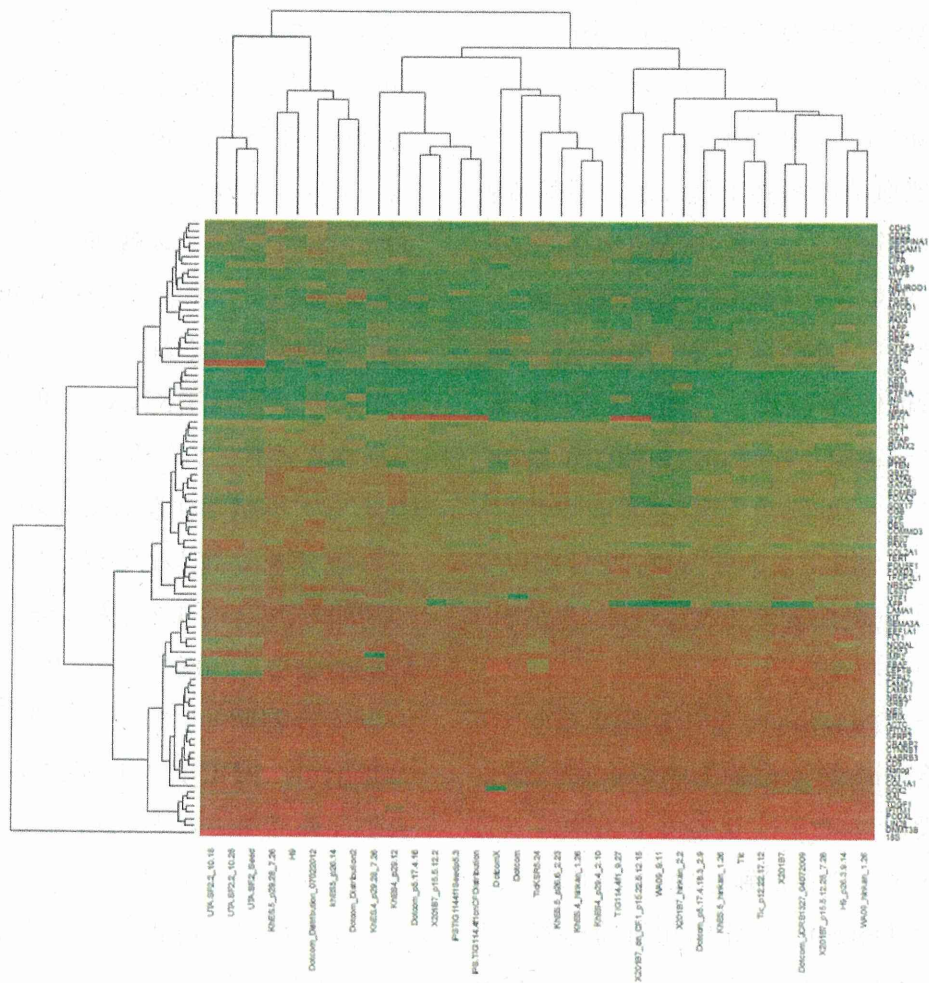


図2 遺伝子発現プロファイル解析例 (ヒートマップ)

90 遺伝子の発現量を各サンプル間で比較するとともに、その発現パターンによってサンプル群および遺伝子群のクラスタリング解析を行った。



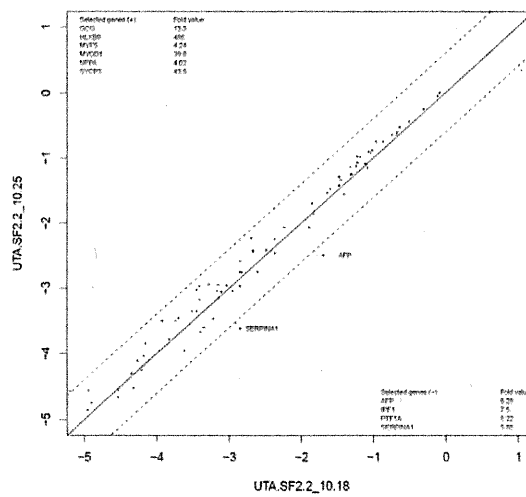
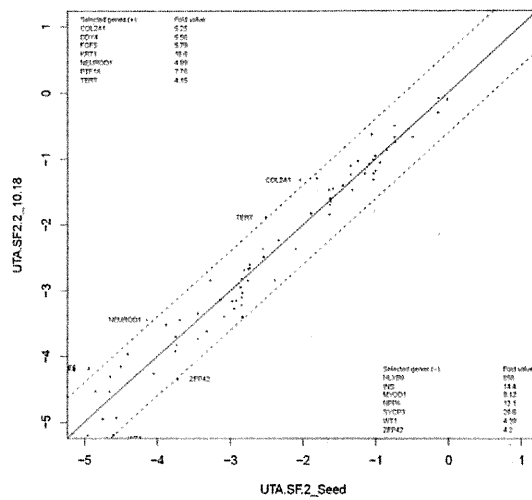
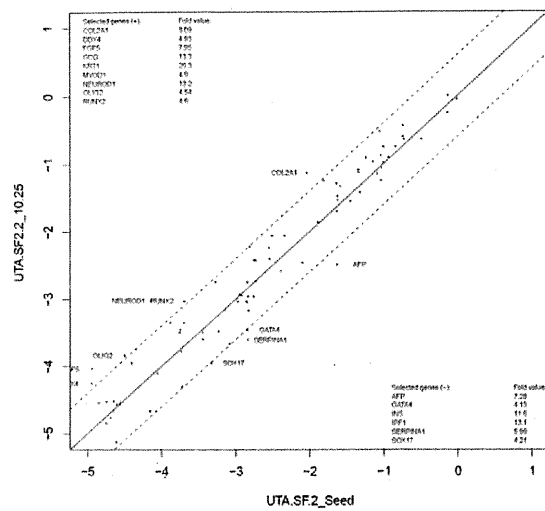


図3 UTA-SF2-2における遺伝子発現プロフィール解析例 (スキャッタープロット)



## D. 考察

以上のように、細胞株毎、サンプル毎の遺伝子発現プロフィールの比較を行うことによって、①同一細胞株、同一培養方法であっても、継代数が異なる細胞サンプルでは遺伝子発現が異なり、発現量の変化しやすい遺伝子と変化しにくい遺伝子が存在すること。②細胞株毎、あるいは培養方法毎に、遺伝子発現の安定性は異なるということが明らかとなった。

免疫染色や FCM 解析の未分化/分化マーカー発現解析のみではこのような遺伝子発現の変化を予測することは難しく、未分化維持されたヒト ES/iPS 細胞の特性を詳細に解析するためには、このような網羅的遺伝子発現解析が重要である。

継代ごとに遺伝子発現は変化するため、遺伝子発現プロフィールによって細胞株間の差異や細胞株の特性を理解するには、それぞれの細胞株の「典型的な」遺伝子発現パターンを代表するようなサンプルを選定し、解析を行う必要がある。たとえ同じ細胞株、同じ培養方法であっても、多くのサンプルの遺伝子発現量を「平均化」してしまえば、真の結果が失われる恐れがある。

今回の解析例に示したような、UTF-SF2-2 のような、無フィーダー・無血清・既知組成の培養条件下で安定に未分化維持されている細胞株は、遺伝子発現も継代ごとに変化することは少なく、非常に安定であるといえる。逆に、フィーダー細胞や KSR 等のロット差が生じやすいマテリアルを使用して未分化維持を行った場合には、Dotcom のような特に不安定な細胞株の場合には、遺伝子発現プロフィールが継代するごとに大きく変化してしまう。そのようになってしまう原因こそ未だ明らかではないが、我々の網羅的遺伝子発現解析を詳細に行い、データを蓄積していくことが、安定に未分化維持培養をするためのエッセンスを突き止める一端となるだろう。より多くの細胞株、より多くの培養条件下の細胞のサンプルを、より多く継代のポイントで採取し、遺伝子発現プロフィールを解析することが重要である。その際に、遺伝子発現プロフィールだけでなく、培養工程、培養に使用したマテリアル、染色体数や免疫染色・FCM 解析結果等の品質評価の情報をトレースできるようなセットで情報を管理していくことが、より発展した品質管理につながり、より詳細な細胞特性解析を可能にするだ

ろう。今後は、このような膨大な情報を適切に管理し、解析に役立てていくことがより一層重要になってくる。

## E. 結論

網羅的遺伝子発現測定とバイオインフォマティクス解析を組み合わせ、ヒトES/iPS細胞の株間の差異や細胞の培養の状態の微妙な差異をより正確に的確に検出できることが確認された。ヒトiPS細胞としての幹細胞特性検査の結果を効率的に解析していくためには、バイオインフォマティクス解析が不可欠である。本研究を基盤とし、ヒトES/iPS細胞を治療目的そして創薬研究目的で利用するための詳細な細胞特性分析や培養手順の標準化が推進されることを望む。

## F. 健康危険情報

特筆すべき事項はなし。

## G. 研究発表

### 1. 学術論文発表

[1] Tripathi L., Kambara H., Moriishi K., Morita E., Abe T., Mori Y., Chen Y. A., Matsuura Y., Mizuguchi K., Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study, *Journal of Proteome Research*, 11(7):3664-79, 2012

[2] Nagao C., Izako N., Soga S., Khan S. H., Kawabata S., Shirai H., Mizuguchi K., Computational design, construction, and characterization of a set of specificity determining residues in protein-protein interactions, *Proteins*, 80(10):2426-36, 2012

### 2. 学会発表

#### 【国内学会：招待講演】

1. 水口賢司, 創薬支援とバイオインフォマティクス, 第14回大阪大学医工情報連携シンポジウム, 大阪, 2012.7.25

2. 水口賢司, 創薬・疾患研究のためのデータベース開発と統合: 医薬基盤

研究所における取り組み, トーゴ  
の日シンポジウム 2012, 東京,  
2012.10.5

3. 水口賢司, 生体膜周辺のネットワ  
ークと創薬支援バイオインフォマテ  
イクス, 第34回生体膜と薬物の相  
互作用シンポジウム, 京都,  
2012.11.15

4. 水口賢司, 創薬につながるバイ  
オインフォマテイクス, 統合データ  
ベース講習会: AJACS駿河, 静岡,  
2013.1.13

【国内学会: 一般講演】

5. 長尾知生子, 長野希美, 水口賢司,  
活性部位とリガンド結合部位の情報  
を用いた酵素の機能予測法の開発,  
第12回日本蛋白質科学会, 名古屋,  
2012.6.21

6. 長尾知生子, 水口賢司, 酵素の多  
機能性に関する解析, 第50回日本  
生物物理学会年会, 名古屋,  
2012.9.22

7. 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司,  
TargetMine, a data warehouse  
system for target discovery, トーゴ  
の日シンポジウム 2012, 東京,  
2012.10.5

8. 伊藤真和吏, 森田瑞樹, 五十嵐芳  
暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂口由希,

坂手龍一, 増井徹, 水口賢司, 創薬・  
疾患研究のための生命科学分野のデ  
ータベース一括横断検索 Sagace, ト  
ーゴの日シンポジウム 2012, 東京,  
2012.10.5

9. 五十嵐芳暢, Nystrom J., 森田瑞  
樹, 伊藤真和吏, 山田弘, 水口賢司,  
Open TG-GATEs の RDF 化によるデ  
ータ統合, トーゴの日シンポジウ  
ム 2012, 東京, 2012.10.5

10. 水口賢司, 増井徹, 坂手龍一, 坂  
口由希, 五十嵐芳暢, 長尾知生子, 陳  
怡安, 伊藤真和吏, 医薬基盤研究所の  
データベースと横断探索システム  
'Sagace', 第35回日本分子生物学  
学会年会, 福岡, 2012.12.11-14

【国際学会: 一般講演】

11. Keeble G., Nystrom J., Bellgard  
M., Mizuguchi K., An Open  
Framework for Extensible  
Multi-Stage Bioinformatics  
Software, The 7th International  
Conference on Pattern Recognition  
in Bioinformatics (PRIB) 2012,  
Tokyo, Japan, 2012.11.9

12. Yoshizaki K, Tiwari P, Tripathi  
L., Ahmad S., Mizuguchi K.,  
Nishikawa-Matsumura T, Isobe T,  
Soken-Nakazawa J. S., Basic and  
Clinical Significance of Interleukin  
6 (IL-6) in AA Amyloidosis with RA,

the 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, Washington, D.C, USA, 2012.11.11

13. Ahmad S., Mizuguchi K., A sliding-probe model for predicting partner aware protein-protein interaction sites, The 23rd International Conference on Genome Informatics (GIW 2012), Tainan, Taiwan, 2012.12.13

【学会以外のセミナー、講演会等】

14. 水口賢司, 医薬基盤研究所のデータベースと創薬研究: Open TG-GATEs と TargetMine を中心として, 平成 24 年度第 3 回データベース講習会@大阪「創薬研究における統合データベースの活用」, 大阪, 2012.12.26

15. Ahmad S., Mizuguchi K., Expression profiles of stress-response genes and related miRNAs: implications for Adverse Effects Following Immunization

(AEFI), 第 6 回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2013.1.16

16. 伊東純一, 水口賢司, インフルエンザワクチン治験から得られた血清中 miRNA の発現解析, 第 6 回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2013.1.16

17. 水口賢司, 創薬に向けたバイオインフォマティクス研究について, 製薬協の研究開発委員会メンバーとの意見交換会, 東京, 2013.1.31

※一般紙・業界紙・一般向け雑誌等への掲載

1) 日刊薬業 第 13497 号, 産学官研究会 ワクチンアジュバントの DB, 14 年度にも公開へ, 2012.6.25

2) 日経産業新聞 1 面&3 面, テキストマイニングーつかめ 未来の手掛かり~つぶやき分析 インフル予測, 2012.11.21

3) 日経バイオテク RNA メール, Vol.97, Wm の憂鬱、ワクチンの副反応を miRNA で事前鑑別できるか?, 2013.1.21

## II. 分担研究報告

### 2. FACS 解析・バイオインフォマティクス解析

研究分担者 大沼清

長岡技術科学大学・産学融合トップランナー養成センター  
特任准教授

#### 研究要旨：

ヒト ES/iPS 細胞が様々な研究者により樹立・培養されているが、ヒト ES/iPS 細胞の培養は難しく、施設や担当者により細胞状態が異なるという問題がある。そこで、異なる施設における細胞の状態を、統一的・定量的に検査・管理することが必要となる。我々は異なる施設で培養した細胞を送付し、FACS 解析と、昨年度までに研究代表者らが開発したイメージングサイトメトリー (I-FACS) 解析し、その結果を解析・比較した結果非常に強い相関が得られた。従って、遠隔地での細胞状態を的確に診断することが可能である。本研究により、様々な施設で培養している細胞の状態を、幹細胞バンクにおいて少量の試料・低コストで統一的に測定できる品質管理法の作業工程の素案が策定できた。今後は多面的に検証し、実用化に向け改訂する。

#### A. 研究目的

ヒト胚性幹 (ES) 細胞[1]、誘導多能性幹 (iPS) [2, 3]を再生医療や創薬へ応用・実用化する研究が盛んである。この実用化する上での大きな問題の一つとして品質 (未分化性) の管理が挙げられる[4]。ヒト

ES細胞は非常に不安定なために、研究所毎、研究者毎に細胞の未分化性が異なる上、同じ研究者が培養していても、数日で状態が大きく変わる事が良くある。そのため、同じ細胞を、同じ培養皿と培養液を使用し、同じ手法で実験をしても、得られる

結果が大きく異なる事が起こる。幹細胞を資源としてあつかうバンク運営においては、このような研究所・研究者による違いを無くし、誰もが同じ結果が得られるような品質管理のための基準の策定が非常に重要となる[4]。

ヒトES/iPS細胞の未分化性維持の状態を日常的に管理する手法として一般的に使用される方法が2つある。一つは単純に顕微鏡を用いて形態を観察することで、もう一つは未分化マーカーを免疫蛍光染色してFACS（フローサイトメトリー）で陽性細胞の割合を算出する事である（図1）。

細胞の形態を位相差顕微鏡で観察することは、細胞の品質管理の上で非常に基礎的、かつ重要な方法である[4]。実際、顕微鏡下で細胞を観察しながら、未分化な形態をして

いる細胞のみを選別したり、分化により形態が変化した細胞を除去する事は日常的に行われている。ヒトES/iPS細胞は未分化性を維持するのに不適切な操作をすると、数日内に細胞が分化してその形態が変化。そのため、細胞の形態を観察することによりその状態を日常的に把握することは非常に重要となる。固定操作などをせずに細胞を生きたまま、手軽に検査できるという利点がある。更に、熟練の培養技術者になると、様々な定量的試験では検知できないレベルの微妙な変化を見てとる事ができるようになる。一方、定性的で、技術者の経験や技能に大きく左右される点が欠点である。



図1：FACS解析と顕微鏡観察とI-FACS解析



それに対し FACS 解析は技術者の経験等に左右され難く、定量的な結果が得られる[5]。FACS 解析するときは、一度培養皿から剥がして細胞を1細胞レベルまで分散した後、免疫蛍光染色し、それを流しつつレーザー光を当てて1細胞毎の蛍光量を定量的かつ高速（1秒に数千細胞）に測定できる。しかし、FACSにも欠点がある。それは細胞を培養皿から剥がして分散するため、培養しているときの形態を失ってしまうことにある。

以上のように顕微鏡観察とFACS解析は相補うような形になっている。この両者を合わせたものが、イメージングサイトメトリー解析法（I-FACS）である（図1）。培養細胞を剥がさずに免疫蛍光染色し、広範囲の写真を自動的に撮り、1個1個の細胞の蛍光量を定量解析する。細胞を剥がさずに形態を観察できるように顕微鏡観察と同じように熟練の技術者が細胞状態を診断できるうえ、FACS解析と同等の定量解析が可能である。

本研究では、I-FACSを用いて、細胞の培養状態を管理するためのプラットフォームを作る事を目標としている。具体的には、培養したヒトiPS細胞の一部を顕微鏡観察と

FACS解析し、一部を固定して医薬基盤研へ送付してI-FACSで解析し、両者の結果を比較・解析する。細胞バンクに於ける熟練の培養技術者が定量性と経験の両面から診断することにより、様々な施設での培養状態を統一的に判断できる方法論が確立する。

## B. 研究方法

### ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞の培養法は、広く一般的に行われている培養法に準じた[2, 5, 6]。ヒト iPS 細胞 Tic 株は成育医療センターで樹立され、医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクを通じて入手した（資源番号：JCRB1331）[7]。細胞の培養は以下の通り。D-MEM/F12 に KSR、2-mercaptoethanol、MEM non-essential amino acids、bFGF、Penicillin-Streptomycin を加えた培地（KSR 培地）を用いて、フィーダー細胞（MEF）上で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> に設定したインキュベータで培養した。継代はまず、培養皿から培地を除き、ヒト iPS 細胞解離液

(CTK 溶液[6]) を 0.5 ml 加えて、3 分間静置した。その後、ヒト iPS 細胞解離液を除き、KSR 培地を 2 ml 加えてピペッティングして細胞懸濁液を 15 ml チューブに移した。このチューブを 10 × g、1 分間遠心し、上清を除き、KSR 培地を 1 ml 加えた。MEF を培養している培養皿から MEF 培地を除き、KSR 培地を 4 ml、5 μM ROCK inhibitor[8] を加え、ヒト iPS 細胞懸濁液を 1/6 ~ 1/3 加え、播種した。継代の 2 日後から毎日、培地を交換した。MEF は、D-MEM に 0.9% Penicillin-Streptomycin、9% FBS を加えた

培地を用いてインキュベータで培養した。フィーダー細胞は、継代 3 回目の MEF を mitomycin C で 90 分間処理し、0.1% ゼラチンコート培養皿に播種し、調製した。

### ヒト iPS 細胞の送付

遠隔地に於ける培養細胞の状態の診断のために細胞を送付する必要がある。本研究では初めに、細胞を I-FACS で解析するために、細胞を固定し、送付するための方法を検討した。

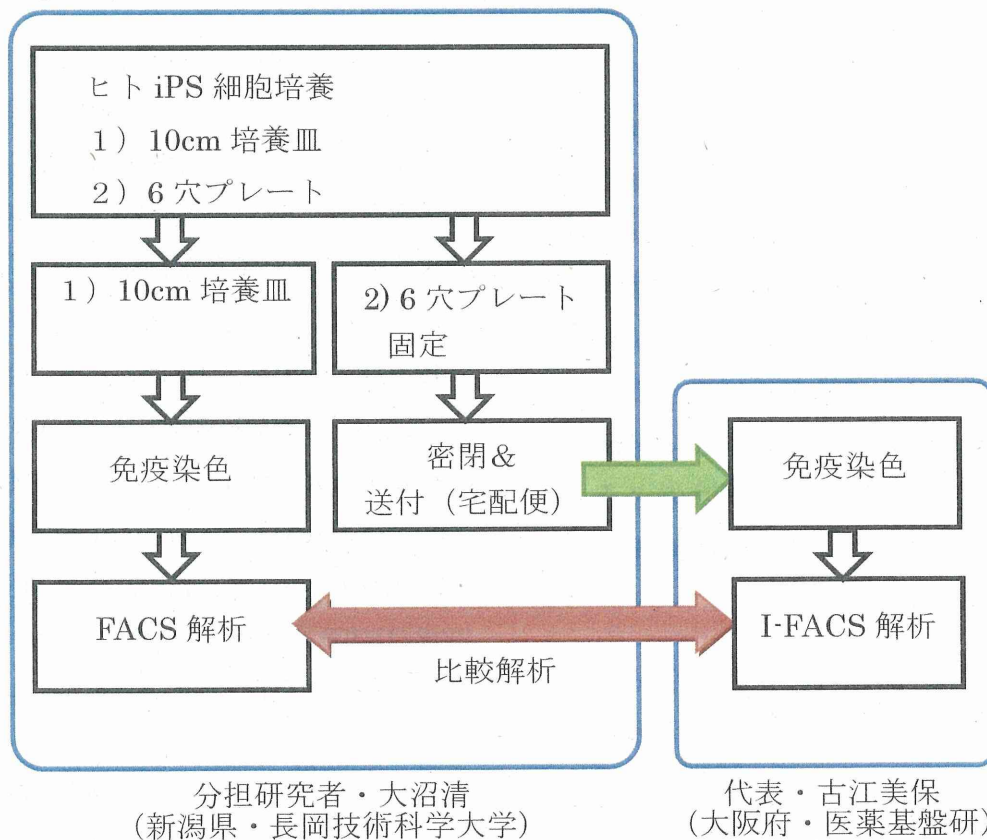


図 2： 研究の流れ

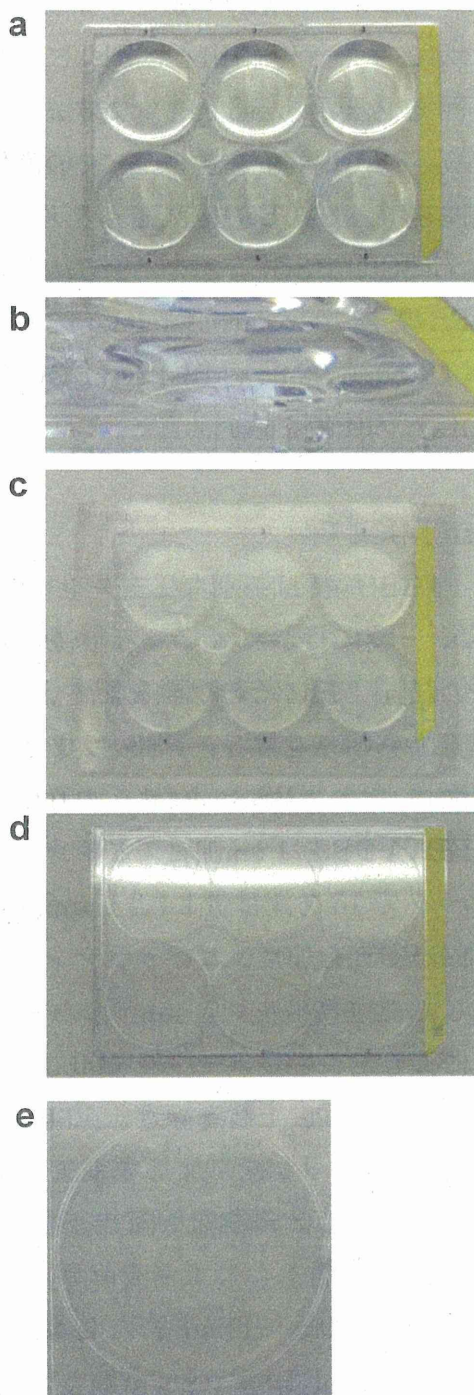


図 3： パラフィルムによる密閉。  
**ab**: PBS を満たした 6well プレート。**a** :  
 上から見た写真。**b** : 横から見た写真。  
 PBS が表面張力で山盛りになっている。  
**c** : 気泡が入らないように PBS の上に  
 パラフィルムを被せた。**de** : 蓋をした後。  
 拡大図 (**e**)。泡が混入していない。

細胞の固定には培養細胞で広く一般的に用いられている 4% ホルマリン溶液を用いた。ただし、4% ホルマリンは架橋剤としては弱い  
 ため、輸送に伴う振動で細胞が剥がれる恐れがある。更に、蓋をするときに気泡が混入することが頻繁に起きるが、気泡が細胞に当たると細胞が破壊されるという問題がある。

そこで、固定した培養細胞が、輸送途中に気泡により破損するのを防ぐため、プラスチックパラフィンフィルム (Parafilm, Pechiney Plastic Packaging Company, Menasha, WI, USA) を用いて密閉する方法を検討した。パラフィルムは良く伸び、かつ水を通さず、水溶液への溶出物も少ないため、水溶液の容器を密閉するためにバイオ関連の実験で多用されている。そこで、パラフィルムを使い気泡が混入しないように蓋をし、送付する手法を検討した。

### 未分化状態でのヒト iPS 細胞のフローサイトメトリー解析方法の検討

#### i) 使用する抗体の選定

ヒト ES/iPS 細胞の未分化マーカー

一抗体は多数販売されている。汎用性のある解析方法を策定することが目的であるため、代表的なマーカーを選んだ。抗体染色の簡便さ・迅速さを考えたとき、細胞表面マーカーが適している。実際、ヒト ES/iPS 細胞用の細胞表面マーカーが数多く市販されている。そこで以下の3抗体を使用した。抗 Stage specific Embryonic Antigen 3 (SSEA3)抗体 (mouse monoclonal IgM, clone MC-631, R&D, Cat# MAB1434, 1/100)、抗 Stage specific Embryonic Antigen 4 (SSEA4)抗体 (mouse monoclonal IgG3, Cat# sc-21704, Santa Cruz Biotechnology, 1/100)、抗 Tra 1-60 抗体(mouse monoclonal IgM, Cat# sc-21705, Santa Cruz, 1/100)。更に、分化し始めた細胞を確実に検出するために、以下の代表的な初期分化マーカーも一つ使用した。抗 Stage specific Embryonic Antigen 1 (SSEA1)抗体 (mouse monoclonal IgM, Cat# sc-21702, Santa Cruz, 1/100)

#### ii) フィーダー細胞の除去法

本実験では広く一般的に行われているフィーダー細胞を用いた培養法方を用いているため[1] [6] [2]、

ヒト ES/iPS 細胞の解析をするためにはフィーダー細胞と区別して解析する必要がある。色々な方法があるが、FACS 解析をする上での簡便性を考え、FACS の散乱光パラメータ (FSC と SSC) を用いる方法と、PE 標識した抗 feeder 抗体 (130-096-094、Milteny Biotec K.K.) の使用を検討した。

#### iii) 作業手順

FACS 解析は特別な工夫をせず、広く一般に行われている手法を用いた[5]。下記にその手順を記す。培養皿から培地を除き、PBS で2回洗浄した。PBS を除き、0.02% EDTA-PBS を1 ml 加えてインキュベータで15分間静置した。1 mg/ml BSA-PBS を加え、ピペッティングして細胞懸濁液を15 ml チューブに移した。このチューブを400 ×g、3分間遠心し、上清を除き、500 μl の4%ホルマリンを加えて室温で20分間静置した。細胞を固定後、400 ×g、3分間遠心して上清を除き、 $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$  cells/ml になるように1 mg/ml BSA-PBS で調製した。細胞懸濁液を20 μl ずつ15 ml チューブに移し、10 mg/ml BSA-PBS で1/50 に希釈した一次抗体 (抗 SSEA1 抗体、抗 SSEA3 抗体、抗