

[凍結 作業手順書]

細胞凍結 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	EGC(210ZEP)NTERA2					
	hESC:	KhES-1	KhES-3	H1	H9	HES3	HES4				
	hiPSC:	201B7	201B2								
		Tic	Squeaky	Dotcom	Toe	Lolipop	UTA-1	UTASF2-2	IPS(Foreskin)		
細胞の状態	前記 月 日		分化した細胞が多い		よくわからぬがコンフルエント		サブコンフルエント				
	細胞がほとんど		細胞がほとんど		細胞がほとんど		細胞がほとんど				
写真	x40 ()		x100 ()		x200 ()		ファイル格納場所				
機器	遠心機		37℃ 湯浴		CO2インキュベーター						
medium	最大増地	Lot Kce	EB (-2No)		Lot EB(-)	mitoSR	Lot:	Variance			
	成育増地	Lot Sp	EB+2ME		Lot EB(+)	DMEM+FB	Lot:	EC			
	hESF8	Lot FE	Condition Med		Lot CMC:	FGF-2	Lot:				
	hESF8	Lot EB	Condition Med		Lot CMB:	ectv n	Lot:				
	hESF-FX	Lot FX	Condition Med		Lot CMI:	PDGF	Lot:				
	hESF-Dif	Lot Dif	PBS		Lot:	ROCK inhibitor	Lot:				
	必要量	増地	ml	37℃ 湯浴		分					
用率添加因子	FGF-2	10ng/ul	x ()	microL	最終濃度:	ng/ml	DMSO	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:TEM	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 プラスコ	75cm プラスコ	60mm Dish	90mm Dish	Variance						
	Well plate	24well plate	24well plate								
洗浄/増地交換	1回目 PBS	ml/each	1回目増地	ml/each	Variance						
	2回目 PBS	ml/each	2回目増地	ml/each							
副懸液処理	ml/each				Variance						
	処理時間	室温	~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		コロニーがほとんど浮き上がった		コロニーがほとんど変化しない						
	剥離液吸引除去		x ()								
分散	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 ()					
	scraper	x ()									
回収	チューブに回収	直接次の培養等に接種		Variance							
	遠心速度	200rpm (100)	300rpm (200)	700rpm (500)	1000rpm (700)	1200rpm (800)					
遠心時間	1min		2min		3min		5min				
	上清を除去										
細胞数計測	調製	10%DMSO 増地	ml	pipetting	x ()		Variance				
	ヘモサイトメーター	()	microL	mix with trypanblue	()	microL	()	cells/ml			
	コールターカウンター	()	microL	()	cells/ml						
	QEカウンター	()	microL	()	cells/ml						
	10%DMSO 増地	ml/each	濃縮精度								

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。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。また、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れ、研

究を進めている。

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ァイルの解析を行うためのプロトコルを策定し、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。また、細胞株によって発現量が大きく異なる遺伝子が複数存在することが明らかとなった。これらの遺伝子の特徴を理解し、ヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現プロファイル解析を行っていくことが重要である。

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ァイル解析は、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。本研究で、イメージアナライザーによって、フローサイトメトリーと同等の解析を行うことが可能であることが明らかとなった。イメージアナライザーによる解析の場合、プレートに播種された細胞を固定して 4℃で保存し、数週間の期間、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。この二施設間でのやりとりは、複数株について複数回行い、いずれも良好な結果が得られた。従って、イメージアナライザーを用いた解析は、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. 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。H23 年度、H24 年度と比較しても、疾患特異的 iPS 細胞株や遺伝子操作で作成した亜株（例：GFP 発現細胞や特定の遺伝子を欠失した細胞）を含む細胞株など大幅に増加しており、樹立方法や培養条件などもバラエティーに富むものになっている。このような状況に対応可能な細胞登録システムの構築が必要である。

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、このようなリプログラム法や維持培養条件をトレースできるようにすることが重要である。今後は細胞バンクと樹立機関との情報交換を推進し、互換性の

あるデータベースを構築しておく必要がある。このことは、海外の細胞登録機関へ情報提供して研究を推進するためにも必須である。

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

ヒト ES/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。本研究では、細胞培養工程表、品質評価工程表ならびに、各培養工程の作業手順書を策定した。この作業手順書には、詳細な作業手順が記載され、どのような培養技術・手順をもってすれば良好に細胞を培養できるかという品質維持技術についても具体的にわかりやすく示している。今後は、この培養手順書を含む本研究成果を活用し、様々な施設において様々な培養技術者がヒト ES/iPS 細胞を安定に培養できるよう情報提供に努めていきたい。

無フィーダーで、既知の組成からなる無血清培養条件を用いる方が、従来のフィーダー細胞と KSR を用いた培養に比べて、ロット差なく培養維持できるものの、高度な培養の技術も必要であり、些細な操作が品質に影響を与える。今後、さらに安定した培養条件が開発されるとともに、それら培養条件に特有の品質維持技術を作業手順書に記載することによ

り、より安定して培養を行うことが可能となり臨床応用などに資する細胞の資源化が効率化されると考えられる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞としての幹細胞特性検査などを効率的に行うためには、さまざまな工程を考える必要がある。海外のヒト幹細胞バンクにおいて、複数機関から資源化工程についての研究論文が発表されているが、このような研究が重要であることを再認識した。本研究で策定した資源化のための培養・品質評価工程表は、実際に日本で樹立された複数のヒト iPS 細胞株を資源化することが可能であったことから、汎用性のあるものを確立することができたと言える。しかし、ヒト iPS 細胞は樹立方法や培養方法、細胞そのものの特性など株間の差が大きく、また、今後さらにバラエティーに富んだ樹立方法、培養方法が確立されていくことから、実際に資源化を行った際に作業工程表に合わなくなることも予想される。本研究を基盤にして、樹立機関との意見交換を推進できることを願う。

F. 健康危険情報

特筆すべき事項はなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, Furue MK, Mizuguchi H. HHEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin. PLoS One, 2014 Mar 20; 9(3).

2. Kinehara M, Kawamura S, Mimura S, Suga M, Hamada A, Wakabayashi M, Nikawa H, Furue K.M. Protein Kinase C-induced Early Growth Response Protein-1 Binding to SNAIL Promoter in Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells and Development 2014 Jan 11.

3. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. Development. 2014. 141(1):91-100.

書籍

4. 菅 三佳、古江一楠田 美保、GMP に準拠した細胞プロセッシングにおける無血清培地組成の考え方. 実験医学別冊「ESiPS 細胞実験スタン

ダード」(2014) in press

5. 福田隆之、古江一楠田美保 *In vitro* 毒性・動態評価の最前線 第6章 ヒト iPS 細胞の供給と標準化 p81-87 シーエムシー出版(2013)

6. 川寄敏祐、川寄伸子、中尾広美、松本正悟、古江一楠田美保、豊田英尚実験医学増刊：第三の生命鎖糖鎖の機能と疾患 (Vol. 31 No. 10) 第1章 作動原理と疾患、生命現象とのかかわり 新規 iPS/ES マーカー抗体とその応用 p129-133 羊土社 (2013)

その他

7. 古江一楠田美保 HUMAN SCIENCE (Vol. 24 No. 3) TOPIC III : ヒト iPS 細胞研究の海外動向 p24-27 公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団 (2013)

2. 学会発表

【国際学会】

〈一般講演〉

1. Risako Jouto, Megumi Matsumoto, Hiroto Sasaki, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Miho Kusuda-Furue, Ryuji Kato.

Morphology-based PSC culture protocol evaluation. 5th Annual Symposium of Stem Cell Society Singapore(SCSS) 2013.11.18-19 Singapore(Biopolis)

2. Mika Suga, Hiroaki Kii, Takayuki Uozumi, Yasujiro Kiyota, Miho K Furue. A noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. STEM CELLS IN TRANSLATION(ISSCR) 2013.9.15-18 Florence, Italy

3. Megumi Matsumoto, Hiroto Sasaki, Risako Joto, Mika Suga, Masaki Kinehara, Kana Yanagihara, Yasujiro Kiyota, Kei Kanie, Hiroyuki Honda, Miho Kusuda-Furue, Ryuji Kato. Image-based irregular iPS colony detection for intelligent automated cell culture. ISSCR 11th 2013.06.12-15 Boston, USA

4. Masaki Kinehara, Suguru Kawamura, Daiki Tateyama, Mika Suga, Hiroko Matsumura, Sumiyo Mimura, Mitsuhi Hirata, Kana Yanagihara, Miho K. Furue. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. ISSCR 11th 2013.06.12-15 Boston, USA

【国内学会】

(一般演題)

1. 岡田光加、城戸理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム評価法 化学工学会 第 79 年会 2014 年 3 月 19 日 岐阜 (岐阜大学柳戸キャンパス)
2. 岡村美菜子、柳原佳奈、劉有容、加藤竜司、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞株の内胚葉分化指向性を予測するための評価法の開発 第 13 回日本再生医療学会 2014 年 3 月 3 日 京都 (国立京都国際会館)
3. 古江一楠田美保 in vitro 毒性評価系構築におけるヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の可能性 第 26 回 動物実験代替法学会 2013 年 12 月 19~21 日 京都 (京都テルサホール)
4. Miho K Furue Standardization of culture conditions for human pluripotent stem cells toward clinical application 第 40 回日本低温医学会 2013 年 11 月 28 日 愛知 (名古屋大学 野依記念学術交流館)
5. 三村純代、菅三佳、二川浩樹、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞の単層無血清培養下における神経分化誘導法の開発 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会 2013 年 11 月 23-24 日 東京 (日本歯科大学 生命歯学部 九段ホール)
6. 岡村美菜子、柳原佳奈、Shandar Ahmad、劉有容、平田みつひ、水口賢司、二川浩樹、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞から内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株の選択方法 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会 2013 年 11 月 23-24 日 東京
7. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 iPS 細胞の創薬応用にむけた画像評価法 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2013 年 11 月 10 日 三重 (鈴鹿医療科学大学 白子キャンパス)
8. 古江一楠田美保 臨床用ヒト ES/iPS 細胞の培養に使える原材料についての考え方 第 14 回医薬品等ウイルス安全性研究会 2013 年 9 月 28 日 東京 (北里大学薬学部コンベンションホール)
9. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、古江美保、加藤竜司 iPS 細胞培養手技標準化のための形態評価モデル 化学工学会 第 45 回秋季大会 2013 年 9 月 16-18 日 岡山 (岡山大学 津島キャンパス)

10. 松本尚悟、中尾広美、野中元裕、川端健二、古江一楠田美保、滝島佑人、豊田英尚、川寄伸子、川寄敏祐
ヒト iPS/ES マーカーとしての新規糖鎖認識抗体 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11-13 日 神奈川 (パシフィコ横浜)

11. 古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞の可能性 第三回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 2013 年 9 月 6~7 日 東京 (一橋大学 一橋講堂)

12. Miho Furue-Kusuda, Takeki Tsutsui, Ken Kataoka Professional training for cell culture “Programs for beginners to experts” 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30~31 日 茨城 (独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター)

13. Kana Yanagihara, Yujung Liu, Ken Fukumoto, Hiroto Banko, Keiichi Takagi, Masanori Hatashima, Satoshi Terada, Miho K. Furue. Ion beam modification of Jellyfish collagen-derived biomaterial as a scaffold for culturing human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30-31 日 茨城 (産業技術総合研究所 つくばセンター中央第一)

14. Minako Okamura, Kana

Yanagihara, Shandar Ahmad, Yujung Liu, Mituhi Hirata, Hiroki Nikawa, Kenji Mizuguti, Miho K. Furue. Prediction of hepatocytic differentiation tendency of human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30-31 日 茨城 (産業技術総合研究所つくばセンター中央第一)

(シンポジウム・ワークショップ等)

15. 古江一楠田美保 再生医療に求められる細胞培養 第 1 回 再生医療資格認定セミナー 2014 年 3 月 3 日 京都 (国立京都国際会館)

16. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 画像情報処理を用いた iPS 細胞品質管理 予防早期医療センター第四回ワークショップ 2014 年 1 月 29 日 愛知 (名古屋大学 野依学術記念交流会館)

17. 古江一楠田美保 Q uality stability of human stem cells in cell banking 再生医療イノベーションシンポジウム 2014 年 1 月 14~15 日 大阪 (大阪大学中之島センター)

18. 古江一楠田美保 セミナー ヒト多能性幹細胞について 大阪ハイテクノロジー専門学校 2013 年

12月12日 大阪

19. 大沼清、藤木彩香、太刀川彩保子、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、楠田一古江美保、浅島誠 ヒト ES-iPS 細胞の無酵素培養 細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 2013年11月25日 東京（東京大学生産技術研究所コンベンションホール）

20. 城戸理紗子、松本恵、蟹江慧、佐々木寛人、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 画像情報処理を用いたiPS細胞培養プロトコルの定量化 細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 2013年11月25日 東京（東京大学生産技術研究所コンベンションホール）

21. 古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞の特性とその応用の可能性 長浜バイオ大学セミナー 2013年10月30日 滋賀（長浜バイオ大学）

22. 古江 美保 再生医療に利用する細胞の品質評価の重要性 日本分析化学会第62年会 特別シンポジウム講演 2013年9月10～12日 大阪（近畿大学 東大阪キャンパス）

23. 古江一楠田美保 再生医療に求められる細胞培養 第1回 再生医

療資格認定セミナー2014年3月3日 京都（国立京都国際会館）

24. 古江一楠田美保 Quality stability of human stem cells in cell banking 再生医療イノベーションシンポジウム 2014年1月14-15日 大阪（大阪大学中之島センター）

25. 古江一楠田美保 セミナー ヒト多能性幹細胞について 大阪ハイテクノロジー専門学校 2013年12月12日 大阪

26. 古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞の特性とその応用の可能性 長浜バイオ大学セミナー2013年10月30日 滋賀（長浜バイオ大学）

27. Miho Furue-Kusuda, Takeki Tsutsui, Ken Kataoka Professional training for cell culture “Programs for beginners to experts” 日本組織培養学会 第86回大会 2013年5月30-31日 茨城（独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター）

II. 分担研究報告

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

ゲノム解析技術や各種ハイスループット実験技術の進展に伴い、医学生物学のいずれの分野においても大規模データの取り扱いが日常的なものとなり、コンピュータ解析が必須となっている。扱われるデータの種類は、遺伝子発現、相互作用ネットワーク、タンパク質立体構造など多種多様だが、それらの解析には、データベース技術や統計学、機械学習（コンピュー

タがデータから自動的にルールを抽出し学習する技術の総称)などの共通技術が用いられ、これらの基本技術に支えられ、生物情報からの知識抽出を目指す分野一般を広い意味でバイオインフォマティクスと呼ぶことが多い。

本研究では、各種 ES/iPS 細胞を特徴付けるために遺伝子発現情報を用いるが、その最初の段階では、膨大なデータ点（例えば、細胞株数×遺伝子数×実験条件）から何らかのパターン

を見いだせるかどうかという探索的な解析が重要な役割を果たす。階層的クラスタリングは、その目的のために一般的に広く用いられる手法であり、データ点のある共通の特徴を持つ部分集合（クラスタ）に分割する。例えば、各サンプルについて、特定の一群の遺伝子の発現量（測定値の組）を「遺伝子発現プロフィール」と呼ぶことにすると、2つのサンプル間でどの程度遺伝子発現プロフィールが似ているかを定義できるので、近い発現プロフィールを持つサンプルから順番に繋げていくことで、クラスタを構築することができる。

これらのクラスタリング結果の可視化のために、本研究ではヒートマップを用いる。これは、データを行列の形に整理し（例えば、行が遺伝子で列がサンプル）、データ値を色で表したものである。クラスタリングの結果に従って行と列の順序を入れ替えることにより、似た値を持つデータ点が近接し、視覚的に部分集合を識別することができる。

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ィー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ィール解析

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ィール解析が行われた。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ヤティブ (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 Δ CT 値である。我々は、まず、 Δ 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 Δ CT 値を用いて解析を進めた。

階層的クラスタリングは、R 統計ソフトウェア (http://www.r-project.org) の hclust 関数で実行し、距離としてユークリッド距離を使用、average-linkage のクラスタリングを行った。ヒートマップは、R による gplot パッケージ中の heatmap2 関数により作成した。

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。そこで、このバイオインフォマティクス解析においては、 Δ 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 Δ CT 値の算出を行った。

遺伝子発現プロファイル解析

これまでに、このサンプルごとの Δ 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ァイ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ァイル解析を行った。

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、遺伝子発現プロファイル解析が行われた。遺伝子発現プロファイルは 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。

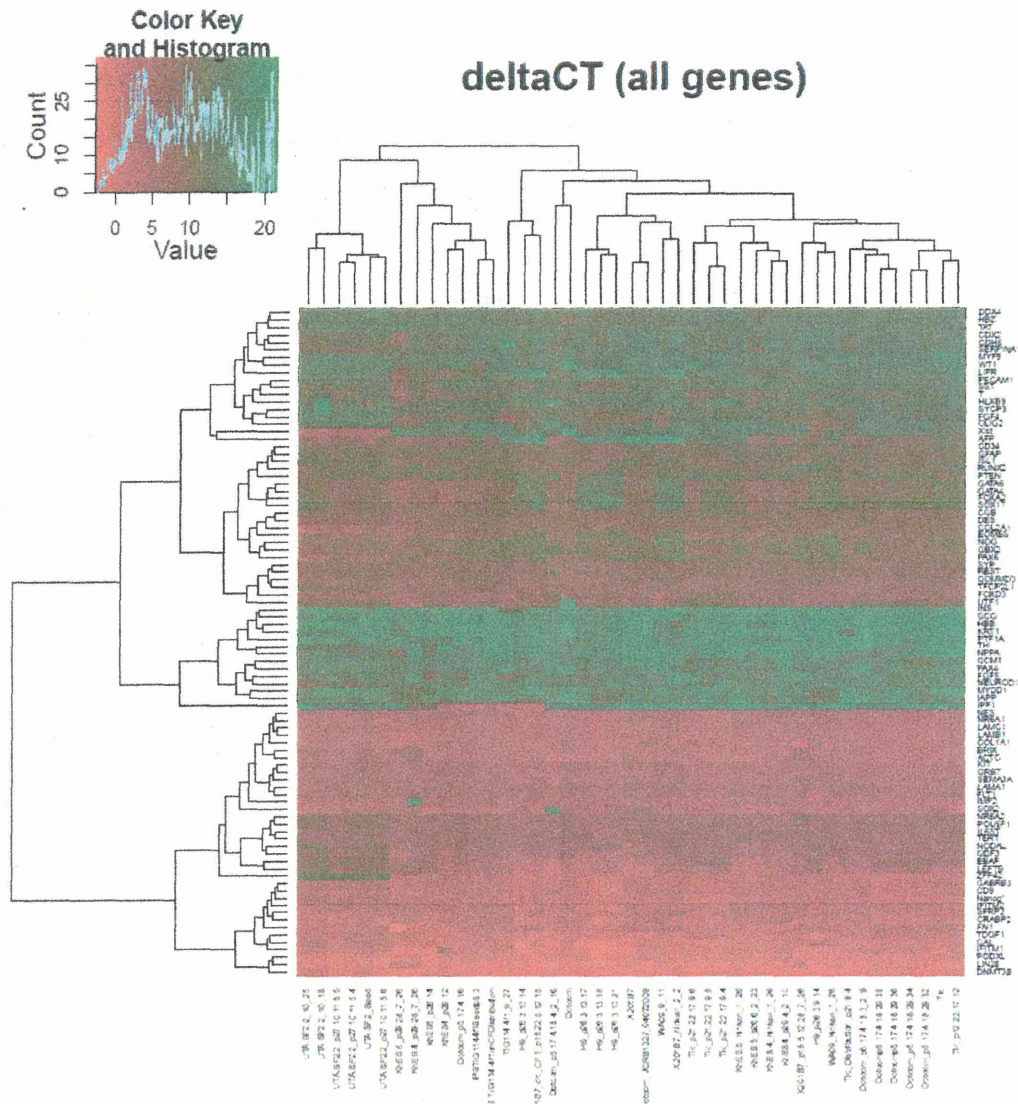


図1 遺伝子発現プロフィール解析例 (ヒートマップ)

32 サンプル (8 細胞株) について 90 遺伝子の発現量を ΔCT 値で示したものの。各サンプル (横軸) について、遺伝子発現プロフィールの類似度をユークリッド距離によって定義し、階層的クラスタリングを行なうと共に、各遺伝子 (縦軸) についてサンプル群による発現パターンで階層的クラスタリングを行なった。

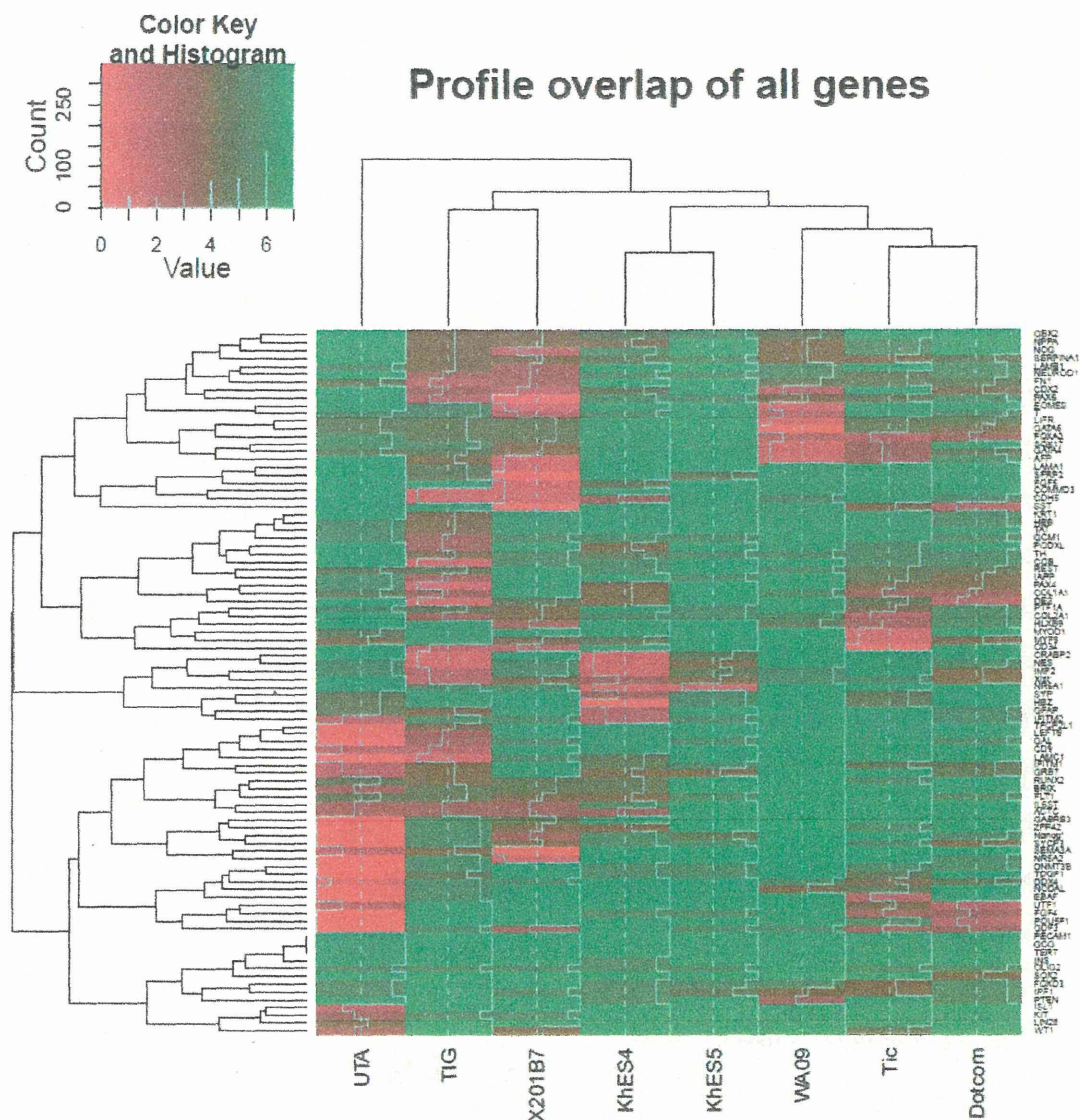


図2 各細胞株を特徴付ける遺伝子発現パターンの比較

まず 8 つの各細胞株毎に、各遺伝子の発現量の分布を計算した。次に、各細胞株と各遺伝子に対して、発現量分布の 25%-75%の範囲が別の細胞株の対応する範囲と重なる場合には 1 を重ならない場合には 0 を与えた。最後に、他の全ての細胞株との比較でこの数を足し合わせたものを元の細胞株と遺伝子に割り当てた (最小が 0 で最大が 7。この数を「細胞株非特異的発現量」と呼ぶ)。ヒートマップは、細胞株非特異的発現量を示したもので、遺伝子と細胞株のそれぞれについて、階層的クラスタリングを実行している。

D. 考察

図2から、限られた少数の遺伝子のみが、細胞株に特異的な発現分布を示すことがわかった。特に、UTAは他の細胞株に比べて、より多くの特異的な遺伝子を持っている。また、DotcomとTicは、この解析による遺伝子発現パターンの観点からは極めて類似していることが示された。(但し、分化マーカーとして知られているGCM1、LAMB1、NESの発現量分布は、Ticに特異的である。)さらに、KhES4とKhES5は同じクラスタに入ることが示された。

本報告には示していないが、同様の解析を特定のマーカー遺伝子のみについて行なったところ、各細胞株(特にUTA)を特徴付ける遺伝子のほとんどは、分化マーカーであることが分かった。

本研究で新たに定義した「細胞株非特異的発現量」は、各遺伝子の発現量分布がどの程度、細胞株に固有かを定量化した点がユニークだと考えられる。これまでに報告された類似の解析のほとんどが、細胞株ペアの比較にとどまるのに対して、この量を用いることで、3つ以上の細胞株についての特徴を解析することが可能になった。

但し、ここで定義した「細胞株非特

異的発現量」は、その遺伝子の発現量の大小を示しているわけではない点に注意する必要がある。特異的な遺伝子として同定されたものが、各細胞株でどのような発現量を示すかは元のデータに戻って調べねばいけない。

本研究では、遺伝子の数に比べてサンプル数は比較的少ない(各細胞株に3-5サンプル)ため、発見された遺伝子発現パターンが細胞株を十分に代表できているかどうかについては、今後の実験で検証していく必要があるだろう。そのためにも、本研究で得られた網羅的な遺伝子発現情報などのデータを蓄積し、将来の解析と組み合わせられる形で整理しておくことが重要である。

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。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

F. 健康危険情報

特筆すべき事項はなし。

参考論文

[1] Tang C. K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Dessailly B.H., Kuroda E., Akira S., Mizuguchi K., Coban C., Ishii K., The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant, *PLoS One*, 8(3):e60038. 2013

[2] Dessailly BH, Dawson NL, Mizuguchi K, Orengo CA., Functional site plasticity in domain superfamilies, *Biochim Biophys Acta*, 1834(5):874-89, 2013

[3] Tripathi L., Kambara, H., Chen Y. A. , Nishimura Y., Moriishi, K., Okamoto T., Morita, E., Abe, T., Mori, Y., Matsuura, Y., Mizuguchi K., Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach, *Journal of Proteome Research*, 12(6):2537-51, 2013

[4] Fujita J., Miyazaki Y., Hirose M., Nagao C., Mizohata E., Matsumoto Y., Mizuguchi K., Inoue T., Matsumura H., Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of FtsA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 69(Pt 8):895-8, 2013

[5] Nystrom J., Igarashi Y., Ito M., Morita M., Nakatsu N., Yamada H., Mizuguchi K., Toxygates: interactive toxicity analysis on a hybrid microarray and linked data platform, *Bioinformatics*, 1;29(23):3080-6, 2013

[6] Yoshimaru T., Komatsu M., Matsuo T., Chen Y. A., Murakami Y., Mizuguchi K., Mizohata E., Inoue T., Akiyama M., Yamaguchi R., Imoto S., Miyano S., Miyoshi Y., Sasa M., Nakamura Y., Katagiri T.,

Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells, *Nat Commun*, 4:2443, 2013

[7] Andrabi M., Mizuguchi K., Ahmad S., Conformational changes in DNA-binding proteins: Relationships with precomplex features and contributions to specificity and stability., *Proteins*, in press

[8] Hobro A. J., Standley D.M., Ahmad S., Smith N.I., Deconstructing RNA: optical measurement of composition and structure., *Phys Chem Chem Phys*, 15(31):13199-208, 2013

[9] Takemura N., Kawasaki T., Kunisawa J., Sato S., Aayam L., Kobiyama K., Aoshi T., Ito J., Mizuguchi K., Karuppuchamy T., Matsunaga K., Miyatake S., Mori N., Tsujimura T., Satoh T., Kumagai Y., Kawai T., Standley D., Ishii K., Kiyono H., Akira S., Uematsu S., Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome, *Nature Communications*, in press

[10] 水口賢司, 創薬支援のデータベースとバイオインフォマティクスに

よるデータ統合, *SAR News*, 24:2-6, 2013

G. 研究発表

1. 学術論文発表

1. Nagao C., Nagano N., Mizuguchi K., Prediction of detailed enzyme functions and identification of specificity determining residues by random forests, *PLoS One*, 9(1):e84623. 2014

2. 学会発表

【国際学会：一般講演】

1. Ahmad S., Mizuguchi K., Global gene co-expression patterns improve consistency between experimentally detected host factors crucial for influenza virus life cycle, *Keystone Symposium on Advancing Vaccines in the Genomics Era*, Rio de Janeiro, Brazil, 2013.11.1

2. Ito J., Ahmad S., Ishii K., Mizuguchi K., A Comprehensive Analysis of miRNA Expression Profile in Human Serum Collected from Type-A Influenza Vaccine Clinical Trial, *Keystone Symposium on Advancing*

Vaccines in the Genomics Era,
Rio de Janeiro, Brazil, 2013.11.2

3. Shirai H., Ikeda K., Yamashita K., Tsuchiya Y., Sarmiento J., Liang S., Mizuguchi K., Morokata T., Higo J., Standley D.M., Nakamura H., High-resolution modeling of antibody structures by a combination of bioinformatics, expert knowledge, and molecular simulations., Antibody Engineering and Therapeutics Conference, Huntington Beach, CA, USA, 2013.12.8

【国内学会：一般講演】

4. 岡村美菜子, 柳原佳奈, Ahmad S., 劉有容, 平田みつひ, 二川浩樹, 水口賢司, 古江一楠田美保, ヒト多能性幹細胞から肝細胞に優れた細胞株を予測するための評価方法の開発, 第86回日本組織培養学会年会, 大阪, 2013.5.30

5. 木田博, 濱野芳匡, 井上義一, 水口賢司, Tripathi L., 広瀬雅樹, 矢野幸洋, 多田康子, 西川博嘉, 坂口志文, 熊ノ郷淳, 特発性非特異的間質性肺炎における疾患特異的自己抗体の検索, 第16回間質性肺炎細胞分子病態研究会, 東京, 2013.8.24

6. 五十嵐芳暢, Nystrom J., 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxygates, トキシコゲノミクスデータと linked data の統合解析プラットフォーム, トーゴの日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.4

7. 伊藤真和吏, 森田瑞樹, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 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横断検索システム Sagace, トーゴの日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.5

8. 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 2013, 東京, 2013.10.5

9. 藤田純三, 宮崎祐満, 廣瀬未果, 長尾知生子, 溝端栄一, 松本佳巳, 水口賢司, 井上 豪, 松村浩由, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)由来 FtsA の結晶化, 平成 25 年度日本結晶学会年会及び総会, 熊本, 2013.10.12

10. Andrabi M., Mizuguchi K., Ahmad S., DNA-binding-induced conformational changes in protein, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 2013.10.28

11. 池田和由, 伊東純一, 水口賢司,

富井健太郎, PoSSuM Updates and Integration With ChEMBL For Application of Drug Reuse, CBI学会 2013 大会, 東京, 2013.10.28

12. Ahmad S., Mizuguchi K., Sequence-based prediction of interacting residue-pairs in proteins to integrate prediction of partners and binding sites, 日本バイオインフォマティクス学会 2013 年年会 (JSBi 2013), 東京, 2013.10.29

13. 土屋裕子, 水口賢司, Analysis of antibody-antigen interactions and prediction of their complex structures, CBI学会 2013 大会, 東京, 2013.10.29-30

14. 長尾知生子, 長野希美, 水口賢司, A random-forest based method that can predict detailed enzyme functions and also identify specificity determining residues, CBI学会 2013 大会, 東京, 2013.10.29

15. 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司, Applications of an integrated data warehouse system in to investigate complex biological systems, CBI学会 2013 大会, 東京, 2013.10.29

16. 田端桂介, 有本大, Tripathi L., 水口賢司, 森田英嗣, フラビウイ

スタンパク質と宿主因子の相互作用ネットワーク解析, 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 神戸, 2013.11.9

17. 岡村美菜子, 柳原佳奈, Ahmad S., 劉有容, 平田みつひ, 水口賢司, 二川浩樹, 古江・楠田美保, ヒト多能性幹細胞から肝細胞内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株, 日本口腔組織培養学会, 日本歯科大学 東京, 2013.11.23

18. 伊藤真和吏, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂手龍一, 水口賢司, 生命科学分野の横断検索サービスとセマンティック・ウェブ, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.6

【国際学会：招待講演】

19. 水口賢司, Data integration and protein network analysis for early stage drug discovery, Structural Life Science 7th International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS), 札幌, 2013.7.31

【学会以外のセミナー、講演会等】

20. 水口賢司, 医薬基盤研における創薬支援データベースの開発, シリーズ研究講演会「薬づくりの新しいR