

& Dモデルを探る」第1回, 東京, 2013.6.20

21. 水口賢司, 創薬支援のためのデータ統合とデータベース開発, 東北大学大学院情報科学研究科、仙台, 2013.7.10

22. 水口賢司, Computational and systems approaches to early stage drug discovery, 九州大学 生体防御医学研究所附属生体多階層システム研究センター, 福岡, 2013.9.25

23. 水口賢司, データ統合とネットワーク解析による創薬初期研究の支援, 第3回シスメックスプロテインカンファレンス、東京, 2013.10.18

24. 水口賢司, データ統合とネットワーク解析による創薬支援, 第9回 霊長類医科学フォーラム, つくば, 2013.11.14

25. 水口賢司, 創薬の初期研究におけるデータ統合:ターゲットと安全性の評価, 第345回 CBI学会研究講演会, 東京, 2014.1.9

26. 水口賢司, ‘アジュバントゲノミクス’に向けた統合データベースの現状, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21

27. Ahmad S., Ito J., Mizuguchi K., An integrated map of

influenza-virus life-cycle host factors and their predicted micro-RNA regulators for bottom-up bio-marker discovery, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21

28. 伊東純一, Ahmad S., Tripathi L., 石井健, 水口賢司, インフルエンザワクチンが誘発する発熱」の予測へ向けた血清中マイクロ RNA マーカーの探索, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21

29. 水口賢司, データベースは、創薬初期でのターゲット評価と安全性の予測に役立つか?, 「創薬研究におけるバイオデータベース講習会」(第三回データベース講習会@大阪(池田)), 大阪, 2014.1.24

30. 水口賢司, 計算生物学によるシステムの理解から創薬へ, 京都大学理学部, 京都, 2014.2.18

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

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・管理するため、イメージングサイトメトリー(I-FACS)解析に着目した。昨年度までの研究で、FACS 解析と I-FACS 解析での結果を比較した結果、非常に強い相関が得られた。今年度に於いては、異なる 3 つの細胞株を用いて複数回の実験を行い、同様の結果が得られた。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統一的に測定できる品質管理法の作業工程が策定できた。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。特に日本に於いては目覚ましく進んでいる。昨年は、再生医療推進法が成立した。また、網膜色素変性症の治療を目的とした臨床試験が理化学研究所を中心に開始された。ヒトiPS細胞より網膜の細胞を分化



図 1: FACS 解析と顕微鏡観察と I-FACS 解析

誘導し、それをシート状に加工して移植する計画である。更には、日本製薬工業協会（製薬協、東京都中央区、手代木功会長）は昨年（2013年）、ヒトiPS細胞を用いた薬剤の安全性評価ツール検証のためのコンソーシアム（ヒトiPS細胞応用安全性評価コンソーシアム）を立ち上げ、約40社が参加している。

このようなヒト幹細胞を用いた実用化の流れの中で、品質の管理が大きな問題となっている[4]。ヒトPS細胞は分化し易いため、同じ研究者が培養していても、1回の継代で状態が大きく変わってしまい、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頻繁に起こる。2014年3月に京都で行われた日本再生医療学会に於いても、細胞の品質管理、標準化などに関して多くの発表があった。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]。

本研究課題では、FACS解析と顕微鏡観察との両方の利点を併せ持つイメージングサイトメトリー（I-FACS）を利用し、遠隔地のヒトiPSユーザーの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（図1）。I-FACSは顕微鏡観察とFACS解析は相補うような形の解析法で近年注目されている。培養細胞

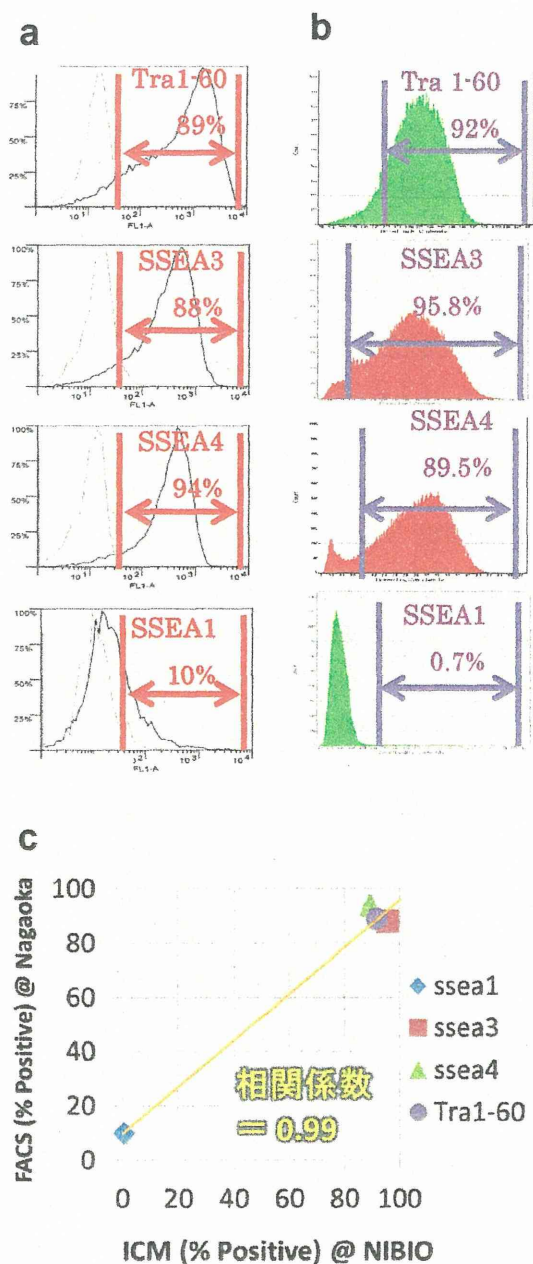


図2：昨年度の実験。培養施設（長岡技術科学大学）でのFACS解析結果と、検査施設（医薬基盤研）に於けるI-FACS解析結果の比較。培養施設に於いて培養したヒトiPS細胞をFACS解析した結果（a）と、その姉妹培養した細胞を固定して検査施設に送付してI-FACSで解析した結果（b）と、両者の比較（c）。

を剥がさずに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。細胞を剥がさず空間情報を保ったまま解析するため、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となる。

昨年度は、主に3項目に関して検討した。1)固定ヒトiPS細胞の送付、2)フィーダー細胞の除去、3)上記1) 2)の方法を用いて実際にヒトiPS細胞のTic株を培養し、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で解析した。両者の結果を比較・解析した結果、強い相関が得られた(図2)。

本年度は、同様の実験を3種の細胞株(ヒトiPS細胞のTic株、201B7株、253G1株)を用い、統計的な解析ができるように実験を繰り返すと共に、データの解析方法、特に閾値の変化による結果の違いに関して検討した。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の培養

昨年度と同様、ヒト iPS 細胞の培養法は、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]。ヒト iPS 細胞 201B7 株[2]と 253G1 株[8]は理研 BRC 細胞バンク(つくば、茨城)より、ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて入手した。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、フィーダ細胞(MEF)上で 37 °C、5% CO₂ 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[5])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、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 培地に 5 μM ROCK inhibitor[9]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

細胞を送付する際、気泡の混入し、細胞が破壊ないようにするため、昨年度確立した以下の方法を使用した。手短に述べる。hiPS細胞を培養している6ウェルプレートから培地を除き、カルシウム、マグネシウム入りのリン酸緩衝溶液 (PBS+/+) で2回洗浄した後、カルシウム、マグネシウム入りの4%ホルマリン溶液を各ウェルに500 μ l加えて室温で20分間静置して固定した。PBS+/+で2回洗浄した後、各ウェルをPBS+/+で満たし、気泡が残らないように容器全体をプラスチックパラフィンフィルム (パラフィルム、Pechiney Plastic Packaging Company, Menasha, WI, USA) で覆い、その上からプレートの蓋で押さえ、更に蓋をパラフィルムで固定した。6ウェルプレートは緩衝材で覆い、ダンボールに詰め、宅配便で冷蔵 (4度) で送付した。

未分化状態でのヒト iPS 細胞のフローサイトメトリ解析方法の検討

FACS解析の手順も昨年度と同様、以下の通り [6]。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1ml加えてインキュベータで15分間静置した。1mg/ml BSA-PBSを加え、ピペッティングして細胞懸濁液を15mlチューブに移した。このチューブを400 \times g、3分間遠心し、上清を除き、500 μ l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 \times 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1mg/ml BSA-PBSで調製した。細胞懸濁液を20 μ lずつ15mlチューブに移し、10mg/ml BSA-PBSで1/50に希釈した一次抗体 (下記) を20 μ l加えた。これらの一次抗体を加えた15mlチューブはアルミ箔で遮光し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。一次抗体を除去するため、チューブにPBSを4ml加え、600 \times g、3分間遠心して上清を除いた。一次抗体を反応させたチューブには10mg/ml BSA-PBSで1/250に希釈したAlexa Fluor 488標識二次抗体を20 μ l加えた。さらに、各チューブにPE標識した抗feeder抗体 (130-096-094、Milteny Biotec K.K.) を加えた。これは、フィーダー細胞を標識・除去し、ヒトES・iPS細胞のみを解析するために加えた。15mlチューブはアルミ箔で遮光し、4 $^{\circ}$ Cで30分間静置した。二次抗体を除去するため、チューブにPBSを4ml加え、600 \times g、3分間遠心して上清を除いた。各チューブに1mg/ml BSA-PBSを500 μ l加えた。その後、JSANセルソーター (ベイバイオサイエンス株式会社、兵庫) を用いて、フローサイトメトリ解析を行った。

ヒトES/iPS細胞の未分化マーカーとして以下の4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)。抗 Oct3/4 抗体 (rabbit polyclonal IgG, Cat# sc-9081, SantaCruz1, 1/500)。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)

データ解析

FACS 解析データと I-FACS 解析データの比較をするため、マイクロソフトエクセル、及びバイオインフォマティクスの分野をはじめ、工学などの幅広い分野で使われている統計解析用のオープンリソースのフリーソフトの R を使用した (<http://www.r-project.org/>)。

倫理面の配慮

ヒト iPS 細胞は、JCRB 細胞バンク (医薬基盤研究所) 及び、理研細胞バンク (理化学研究所) より所定の手続きを経て入手した。文部科学省からの通知 (平成 20 年 2 月 21 日付、19 文科振第 852 号) にある禁止事項 (着床前のヒト胚へのヒト iPS 細胞の導入、ヒト iPS 細胞から除核卵への核移植などにより個体を発生させる

研究、ヒトへのヒト iPS 細胞の移植、ヒト iPS 細胞を導入した着床前の動物胚からの個体産生、生殖細胞の作製) は行わなかった。

全研究は、法令及び、長岡技術科学大学の内規を遵守し、所定の手続きと審査を経た上で、専用の実験室内で行った。更に、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。

C. 研究結果

FACS 解析と I-FACS 解析データの所見

今年度は 3 つの細胞株 (201B7 株、253G1 株、Tic 株) で、それぞれ 3 回以上実験を行った。201B7 株[2]、253G1 株[8]は京都大学でレトロウイルスによる遺伝子導入で樹立された株で、前者は 4 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC)、後者は 3 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4) を使用している。Tic 株[7]は成育医療センターに於いてレトロウイルスによる 4 遺伝子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC) を遺伝子導入して樹立された株である。

ヒト PS 細胞の未分化性を FACS と I-FACS で検査するため、ヒト ES・iPS 細胞の未分化マーカーとして広く使われている Stage specific Embryonic Antigen 3 (SSEA3)、SSEA4、Tra 1-60 の 3 種類に加え、より正確性を期すために転写因子の Oct3/4 も未分化マーカーを用いた。また、初期分化マーカーとして SSEA1 を用いた。培養施設（長岡技科大）では同じ細胞を 10cm 培養皿、6 ウェルプレートで培養し、10cm 培養皿の方は FACS 解析を行い、6 ウェルプレートは固定・透過した後診断施設（医薬基盤研究所）に送付し I-FACS 解析を行い、両者の結果を比較した。

3 株で行った結果を一見して分かる通り、3 つの細胞株でほぼ同様の結果が得られている（図 3）。4 つの未分化マーカー（OCT3/4、SSEA3、SSEA4、TRA-1-60）の値が、横軸（検査施設における I-FACS）と縦軸（培養施設における FACS）の両方が大きい値をとっている（グラフ右上に点が集中している）。それに対し、初期分化マーカーの SSEA1 が横軸・縦軸共に低い値をとっている（グラフ左下に点が集中している）。以上の事から、全ての細胞に於いて、FACS、I-FACS 解析の両方において未分化性が高いことが確認できた。

細かくデータを見ると、FACS、I-FACS データの間で違いも見られた。4 つの未分化マーカーに関しては、横軸の値が全て 80%以上であるのに対し、縦軸の値は 80%以下の点が多く、

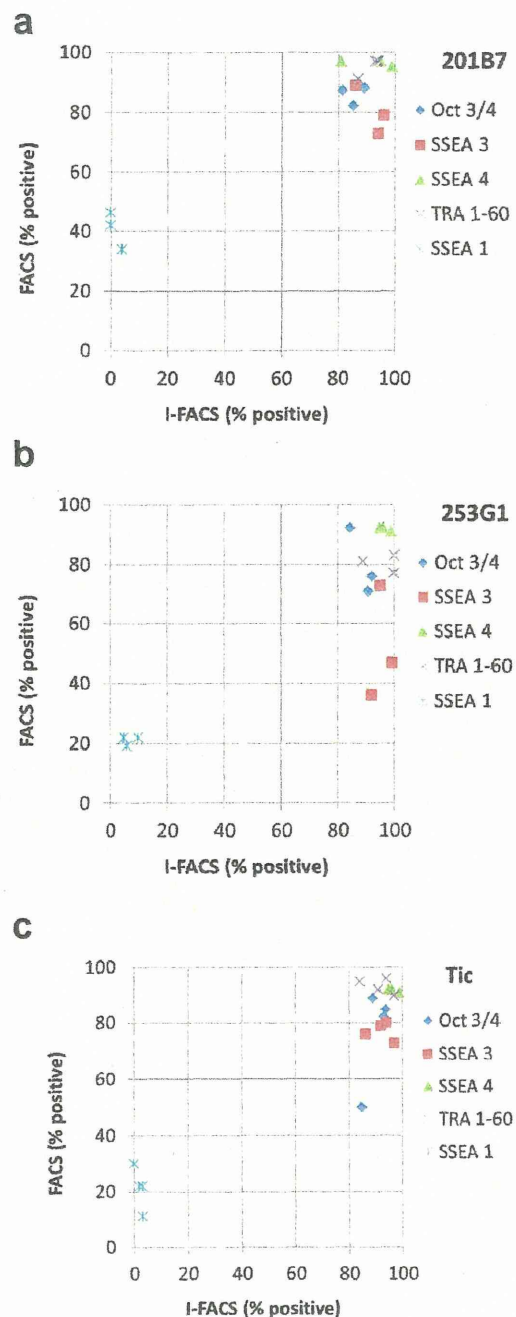


図 3： 3 つのヒト iPS 細胞株での、培養施設（長岡技科大）における FACS 解析結果と、検査施設（医薬基盤研）に於ける I-FACS 解析結果の比較。使用した細胞は、京都大学山中研の 201B7 株 (a)、253G1 株 (b)、及び成育医療センターの Tic 株 (c)。縦軸、横軸はそれぞれ FACS 解析、I-FACS 解析した各マーカーの陽性率。SSEA1 は初期分化マーカーでその他は未分化マーカー。

中には 40%を下る点もみられる。また、SSEA1 の結果に於いては、横軸の値が全て 10%以下であるのに対し、縦軸の値はほとんどが 10%以上であり、中には 40%以上の点もみられる。以上のことから、検査機関での I-FACS 結果（縦軸）は培養機関における FACS 結果（縦軸）に比べて、未分化率が安定して高い値を示している事が示唆される。

更に、細胞株間でも違いが観察された。201B7 株（図 3a）は SSEA1 の横軸の値より縦軸の値が高めだったことから、培養機関における FACS 解析では初期分化マーカーの発現率が高く見積もられたことになる。また、253G1 株（図 3b）は SSEA3 の横軸の値より縦軸の値が低めであったことから、培養機関における FACS 解析では未分化マーカーの一つの発現率が低く見積もられたことになる。ただし、これらの細胞は別々の時期に培養し、解析されたため、必ずしも細胞の個性を表しているのではないかもしれない。

総合して示唆されることは、I-FACS の解析結果は安定している事である。

FACS 解析と I-FACS 解析データの相関

FACS 解析と I-FACS 解析の結果を比較するため、図 3 に示したデータを元にピアソンの相関係数を算出した（図 4）。各実験の中で 5 つのマーカー

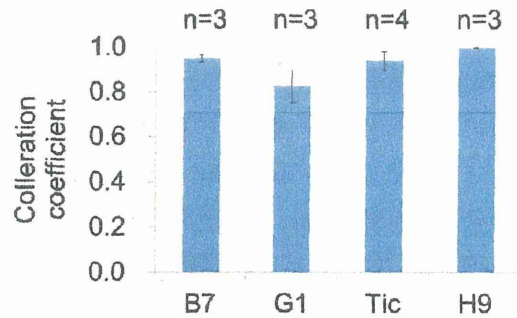


図 4 : FACS 解析と I-FACS 解析の相関。4 つの細胞株で行っている。201b7 株 (B7)、253G1 株 (G1)、Tic 株、それとヒト ES 細胞の H9。H9 に関しては、医薬基盤研内で培養され、更に FACS 解析と I-FACS 解析の両方が行われた。

ーから相関係数を計算し、その値を平均した。その結果、201B7、253G1、Tic の全ての株で相関係数の平均値が 0.8 以上であった。相関係数は、今回のデータの様に、2 つのデータを比較する場合に用いられる指標で、両データが比例関係に近いほど 1 に近くなり、ランダムの場合 0 に近づく。3 つの株で 0.8 以上であったため、強い相関がある（比例関係に近い）と言える。以上の結果より、異なる機関で培養・送付しても途中で細胞状態が変化せず、適切に診断が行われることが明らかとなった。

閾値の問題

FACS 解析を実際に行う際に良く問題になるのが、ゲートの取り方である。理想的には、特異的抗体を用いない陰性コントロール（図 5a 青）と、特異的抗体を用いたデータとの蛍光

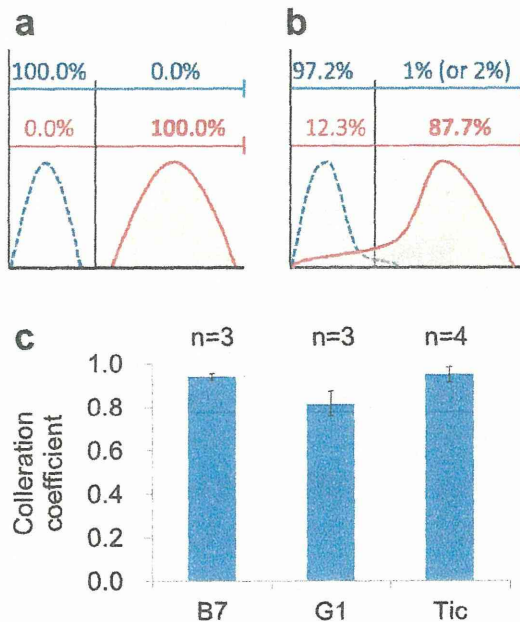


図 5: FACS のゲート (閾値) の問題。横軸が各細胞のシグナル強度、縦軸が細胞の割合。A: 陰性コントロール (青) と、特異的抗体を使用したデータ (赤) が、完全に分離している場合 (A) と、分離していない場合 (B) の模式図。ポジティブ率はそれぞれの右下部 (100%と 96.4%)。

シグナル (図 5a 赤) が完全に分離する (片方が 100:0、もう片方が 0:100) 条件で測定し、その間に閾値を設ければ良い (図 5a)。しかし、実際には分布のすそ野が広がり、両者が完全に分離できない場合がほとんどである (図 2、図 5b)。そのため、適当な基準を元にポジティブ率を算出する。そのため、閾値をどこに設定するか任意性があり、結果の値も変わる。特に、別々の装置で測定してその陽性率に偏りがないかどうか判定する場合、閾値の取り方により結果が逆転することも予想される。

今回は閾値を少し変えてみて、どの

くらい影響が有るかを確かしてみた。具体的には陰性コントロールの陽性率を I-FACS の解析では 1%とし、FACS 解析の時には 1% (図 4) と 2% (図 5c) の両方で比較してみた。その結果、FACS の結果のみ 2%としたときには相関係数が若干減少したものの、ほぼ同様の結果が得られた。

以上の事から、測定する機関に於いて閾値が多少ずれても、大まかな結果は変化しない事が示唆された。

D. 考察

本研究では、幹細胞バンクに於いて、様々な施設におけるヒト PS 細胞の状態を、統一的・定量的に検査・管理することを目標とし、異なる施設で培養した細胞を送付し、FACS 解析と I-FACS 解析した比較した。昨年確立した実験プロトコルの元、3つの細胞株でそれぞれ 3 回以上実験を繰り返した。その結果、どの株でも安定して強い相関が得られたことから、本研究で確立した手法は異なる施設で培養した細胞を同一基準で検査できる事を示唆する。

複数の細胞株で複数回の実験

ヒト多能性幹細胞は安定しない。全ての細胞に分化できる能力を持つが、この能力は細胞の状態の変化し易さ、つまり不安定に繋がる。実際、同じ手法で培養していても培養状態が大きく変化することがある。更に、細胞株

により未分化状態や分化し易さに大きな違いがある。そのため、単一の細胞株だけで調べるのではなく、複数の細胞株を使って調べるのが通例となっている。

昨年度は1細胞株のみを用いて実験系を確立し、今年は3株で複数回行った。その結果、実験回毎にバラつきが観測され、更に細胞株ごとにも結果が異なった。この結果は細胞の株の違いを反映している可能性と、異なるときに行った実験であるから違う可能性があり、どちらであるかは今回の実験だけでは判断できない。

ただし、複数回行った実験結果はいずれも同じような傾向にあった。FACSの結果とI-FACSの結果が強く相関していたため、このバラつきは実験誤差の範囲内として許容することができる事が示唆される。単一のマーカーを使って診断する事はエラーが出やすいが、今回の様に複数のマーカーを用い、複合的に診断することにより、細かい違いがキャンセルされ、安定した結果が得られると期待できる。

閾値の問題

今回は異なる機械（FACSとI-FACS）を用い、異なる施設（長岡技術科学大学と医薬基盤研究所）に於いて解析を行った。FACS解析ではどの領域をネガティブとし、どの領域をポジティブと判断するかに任意性がある。解析する細胞や抗体によっては少しの閾値のズレで結果が大きく変わる事もある。今回は閾値を少し変化

させた時に結果が大きく変わらない事から、我々の作成したプロトコルが適切に働いていることが示唆される。

E. 結論

本研究では、異なる施設（長岡技術科学大学と医薬基盤研究所）間で細胞を送付し、更に一般に普及しているFACS解析と、これまでに本研究課題で代表者らが構築したI-FACS解析との比較を、3つの細胞株で複数回実験して比較した。その結果、どの細胞株でも高い相関が得られた。従って、遠隔地での細胞培養施設に於いて、一般的な試薬・設備・方法で細胞を固定・送付し、医薬基盤研でそれを解析することにより、細胞状態を的確に診断できる事が示された。以上の事から、ヒトPS細胞を少量の試料・低コストで測定できる品質管理法を策定できたと言える。

F. 参考文献

1. Thomson, J.A., et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
2. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
3. Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
4. 古江-楠田, 美., 日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化: その 2 分化能の評価. *組織培養研究*, 2009. **28**(2/3/4): p. 129-133.
5. Suemori, H., et al., Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **345**(3): p. 926-32.
6. Hayashi, Y., et al., Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS ONE*, 2010. **5**(11): p. e14099.
7. Fukawatase, Y., et al. Characterization of newly established induced pluripotent stem cells from human embryonal lung fibroblast, MRC-5. in *Ann. Meeting. of the Biochemistry(81st) and Molecular biology(31st)*. 2008. Japan.
8. Nakagawa, M., et al., Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, 2008. **26**(1): p. 101-106.
9. Watanabe, K., et al., A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(6): p. 681-6.
10. Yamada, R., K. Hattori, S. Tachikawa, M. Tagaya, T. Sasaki, S. Sugiura, T. Kanamori and K. Ohnuma* (2014). "Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ -globulin." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (In Press)
11. Katsuto Takakura, Takahiro

Yamamoto, Kensuke Kurihara, Taro Toyota, Kiyoshi Ohnuma, and Tadashi Sugawara*, Spontaneous Transformation from Micelle to Vesicle Associated with Sequential Conversions of Comprising Amphiphiles within Assemblies, Chem Commun

12. Yoshimitsu, R., Hattori, K., Sugiura, S., Kondo, Y., Yamada, R., Tachikawa, S., Satoh, T., Kurisaki, A., Ohnuma, K.*, Asashima, M., Kanamori, T. (2013). Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, (2013 Nov 13. Epub ahead of print)
13. K. Hattori, R. Yoshimitsu, S. Sugiura*, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamori, Masked Plasma Oxidation: Simple Micropatterning of Extracellular Matrix in a Closed Microchamber Array, *RSC Advances*, 3, 17749-17754, (2013)
14. Ohnuma, K., Assays of traditional drugs using human neurons derived from pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters*, (2013 Nov 21. E-pub ahead of print)

G. 研究発表

1. 原著論文

- 1) Yamada R, Hattori K, Tachikawa S,

Tagaya M, Sasaki T, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K, Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ -globulin." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (2014 Mar 18. E-pub ahead of print)

2. 学会発表

1. 吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、近藤祐樹、山田遼太郎、太刀川彩保子、佐藤琢、栗崎晃、大沼清、浅島誠、金森敏幸、“マイクロチャンバーアレイチップによるヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダ培養”、日本再生医療学会（京都国際会館、京都、2014年3月4日-6日）
2. 近藤裕樹、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、金森敏幸、大沼清、“hiPS 細胞の細胞塊を培養するための灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ”、化学とマイクロシステム（兵庫県立先端科学技術支援センター、兵庫、平成12年9月29日～30日）
3. 山田遼太郎、服部浩二、多賀谷基博、佐々木徹、杉浦慎治・金森敏幸、大沼清、“プラズマ処理による、 γ -globulin と Vitronectin を使った無血清/無フィーダ培養でのヒト iPS 細胞パターン作成”細胞アッセイ技術の現状と将来

- (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay) (Tokyo, 25 Nov 2013)
4. 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-古江美保、浅島誠、” ヒト ES・iPS 細胞の無酵素培養”、細胞アッセイ技術の現状と将来 (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay) (Tokyo, 25 Nov 2013)
 5. 近藤裕樹、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、金森敏幸、大沼清、” hiPS 細胞の細胞塊を培養するための灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ”、細胞アッセイ技術の現状と将来 (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay) (Tokyo, 25 Nov 2013)
 6. 吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、栗崎晃・浅島誠、大沼清、金森敏幸、” マイクロチャンバーアレイチップを用いたヒト iPS 細胞培養”、細胞アッセイ技術の現状と将来 (Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay) (Tokyo, 25 Nov 2013)
 7. K. Hattori, R. Yoshimitsu, S. Sugiura*, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamori, MASKED PLASMA OXIDATION METHOD AS A SIMPLE MICROPATTERNING OF EXTRACELLULAR MATRIX IN A CLOSED MICROCHAMBER ARRAY, micro TAS 2013 (Messe Freiburg, Freiburg, GERMANY, 27-31 October 2013)
 8. R. Yoshimitsu, K. Hattori, S. Sugiura, Y. Kondo, T. Satoh, A. Kurisaki, M. Asashima, K. Ohnuma*, and T. Kanamori MICROFLUIDIC PERFUSION CULTURE OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL IN MICROCHAMBER ARRAY CHIP, micro TAS 2013, (Messe Freiburg, Freiburg, GERMANY, 27-31 October 2013)
 9. Ryotaro Yamada (M2 学生・登壇), Koji Hattori², Motohiro Tagaya³, Toru Sasaki⁴, Shinji Sugiura², Toshiyuki Kanamori², Kiyoshi Ohnuma*, Patterning of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Patterned Plasma Treatment on a PDMS Surface Followed by Composite Protein Adsorption, 24th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2013) 12 Nov 2013 Nagoya University 口頭
 10. Ohnuma K* , Motility Control of Neuronal and Human iPS Cells under Serum- and Feeder-Free Culture Condition, Mini Symposium at The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13) 口頭
 11. Ohnuma, K, Fujiki, A, Koike, S, Hayashi, Y, Ito, Y, Onuma, Y, Chan, T, Michiue, T, Furue, M K., Asashima,

M, ENZYME FREE PASSAGE OF
HUMAN PLURIPOTENT STEM
CELLS, International Society for
Stem Cell Research (ISSCR
2013)(Boston, MA, USA, 14 June
2013)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
福田隆之、 古江一楠田 美保	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	In vitro 毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	日本	2013	81-87
川寄敏祐、	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	門松健治 遠藤玉夫 岡 昌吾 北川裕之	実験医学増刊：第三の生命鎖 糖鎖の機能と疾患 Vol.31 No.10	羊土社	日本	2013	129-133
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	末盛博文	実験医学別冊「ESiPS細胞実験スタンダード」	羊土社	日本	2014	44-52

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
古江一楠出美保	ヒトiPS細胞研究の海外動向 TOPICIII	HUMAN SCIENCE ヒューマンサイエンス振興財団	24 (3)	24-27	2013
Watanabe H, et al.	HHEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin	PloS One	9(3)	DOI: 10.1371/journal.pone.0090791	2014
Kinehara M, et al.	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		doi:10.1089/scd.2013.0424.	2014
Takayama K, et al.	CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision.	Development	141	91-100	2014
Chioko Nagao C, et al	Prediction of Detailed Enzyme Functions and Identification of Specificity Determining Residues by Random Forests	PLoS ONE	9(1)	doi:10.1371/journal.pone.0084623	2014
Yamada, R et al.	Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ-globulin.	Journal of Bioscience and Bioengineering.		doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.009	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

第6章 ヒト ES, iPS 細胞の供給と標準化

福田隆之*¹, 古江-楠田美保*²

1 はじめに

1998年にアメリカ・ウィスコンシン大学の Thomson ら¹⁾によって初めてヒト胚性幹細胞 (human Embryonic Stem Cells: ヒト ES 細胞) が樹立された。樹立後, ヒト ES 細胞は希望する研究者らに配布されたが, 多くの研究者が培養できず, ヒト ES 細胞の培養トレーニングがセッティングされた。その後, 英国, オーストラリア, シンガポール, イラン, イスラエル, スウェーデンなどで次々とヒト ES 細胞が樹立され, 日本では2003年に京都大学の中辻・末盛らが国内で初めてヒト ES 細胞の樹立を行った²⁾。しかし, 日本ではヒト ES 細胞は, 倫理的な問題等により規制が厳しく, それほど多くの研究者が取り扱ってこなかった。2006年に京都大学の山中らによってマウス人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) が作製され³⁾, 翌年にヒト iPS 細胞の作製が⁴⁾, Thomson ら⁵⁾ と同日に発表された。それ以後, 日本のみならず, 世界中の多くの研究室や企業でヒト iPS 細胞が作製され, ヒト iPS 細胞を用いた研究が精力的に進められ, 日々, ヒト ES/iPS に関連する論文が報告されている。

2 ES/iPS 細胞の標準化

1998年以後, 多くのヒト ES 株が樹立されたが, 株間の形質に大きな差があり, ヒト ES 細胞の研究をグローバルに進めていくためには, 世界的な標準化が必要であると早くから認識されていた。2003年に第一回国際幹細胞フォーラム (The International Stem Cell Forum) がパリで開催され, アメリカやイギリス, フランス, ドイツ, 日本など21カ国 (後に22カ国) が参加し, 助成金が集められた。それを受けて2005年から, イギリスのシェフィールド大学 P. W. Andrews とオーストラリアの当時モナッシュ医学研究所 M. Pera (現・メルボルン大学) がリーダーとなって, 国際幹細胞イニシアティブプロジェクト (The International Stem Cell Initiative: ISCI)⁶⁾ が進められている。まず59株のヒト ES 細胞を集めて, テラトーマ形成, 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解析, PCR アレイを用いた未分化マーカー

*1 Takayuki Fukuda (御医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室 特任研究員)

*2 Miho K. Furue (御医薬基盤研究所 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)

一遺伝子発現解析、胚様体作成法により分化させた際の遺伝子発現解析、インプリンティング遺伝子解析、X染色体不活性化などについて、解析方法と結果を2007年に発表した⁷⁾。これらのヒトES細胞において、共通する遺伝子発現や表面抗原がある一方、分化マーカー遺伝子の発現やX染色体不活性化が株によって異なることが明らかとなった。さらに、2011年には、ヒトES細胞125株と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た結果が発表された⁸⁾。

米国内では、NIH幹細胞ユニットが、研究者が目的とする研究に適する株を適切に選択できるよう標準化を行っている。ブッシュ政権下で承認されていた21株のヒトES細胞に加えて、iPS細胞ならびに間葉系幹細胞を含めて、遺伝子解析、表面抗原発現プロファイル解析、免疫染色、胚様体形成、また、特定の方向への分化誘導プロトコルを用いて分化能を検証し、そのプロトコルとデータを公開している⁹⁾。また、米国心臓・肺・血液研究所(The National Heart, Lung, and Blood Institute; NHLBI)の前駆細胞生物コンソーシアム(Progenitor Cell Biology Consortium; PCBC)は、幹細胞ならびに前駆細胞のバイオロジーの理解を深め、心臓、肺、血液の疾患の診断と治療へ応用するために、米国内の多くの大学が連携し、共同研究を推進している。コンソーシアムは、前駆細胞の同定と評価、分化誘導法、再生医療の新規ストラテジーの確立の3つの目標を掲げ、9つの多岐にわたる研究分野についてバーチャルハブが作られている。

3 各国における幹細胞バンク

ES/iPS細胞の基礎研究のみならず臨床への応用を進めるために、ES/iPS細胞を貯蔵や分譲する機関として、各国で幹細胞バンクが設立されている(表)。米国では、ウイスコンシン大学の研究ファンドWisconsin Alumni Research Foundation (WARF)が2000年に設立した非営利組織WiCell Research Instituteは、Wisconsin International Stem Cell Bank (WISC bank)を運営し、現在、ヒトES細胞株やiPS細胞株を世界中に提供している。以前は、NIHとWiCellが連携してナショナルステムセルバンクを開設していたが、現在は閉鎖され、NIHでは細胞承認・登録と標準化が行われている。マサチューセッツ医科大学のヒト幹細胞レジストリーならびにバンク(Massachusetts Human Stem Cell Bank)は、ブッシュ政権下に政府に承認された株以外のヒトES細胞の情報を収集し研究者に情報提供していた。オバマ政権となりヒトES細胞研究に対する政策が変更され、広くヒトES細胞株の使用が承認されつつあるため閉鎖が決定し、さらに基金の中断により、2012年12月に停止している。英国では、2002年に幹細胞の貯蔵と提供による幹細胞研究の促進のため、UK stem cell bankが設置された¹⁰⁾。その活動が評価され、2005年には政府が主導で設立された英国幹細胞イニシアティブ(UKSCI)は、官民コンソーシアム、幹細胞バンクの機能強化を提言した。UK stem cell bankのG. Stacyをリーダーとして、国際ネットワークの構築などを実施し、幹細胞バンクの国際連携International stem cell banking initiative (ISCBI)でも主導的な役割を担っている¹¹⁾(高田, 2011#4408)。スペインでは、バルセロナの

第6章 ヒトES, iPS細胞の供給と標準化

表

国	分譲・管理機関	各機関のホームページ
イギリス	UK Stem Cell Bank (USCB)	http://www.ukstemcellbank.org.uk/
スペイン	Stem Cell Bank of Barcelona (BLCB)	http://www.cmrb.eu/banco-lineas-celulares/en_index.html
アメリカ	Harvard Stem Cell Institute (HSCI), iPS core facility	http://www.hsci.harvard.edu/
アメリカ	Wisconsin International Stem Cell (WISC) Bank	http://www.wicell.org/
アメリカ	Stanford University, Center for HESC Research and Education	http://hesc.stanford.edu/research/corefacility/distributions.html
シンガポール	Singapore Stem Cell Bank	http://www.sccc.a-star.edu.sg/stemCellBank.php
日本	Riken Bioresource center (RBC)	http://brc.riken.jp/#news
日本	National Institute of Biomedical Innovation JCRB Cell Bank	http://cellbank.nibio.go.jp/english/
台湾	Taiwan Stem Cell Bank	http://www.tscb.bcrf.firdi.org.tw//index.do
韓国	Korea Stem Cell Bank (KSCB)	http://kscb.co.kr/cell/eng/main/main.php
中国	National Engineering and Research Center of Human Stem Cell bank	http://www.hescbank.cn/ew/index.asp
オーストラリア	Genea Stem Cells	http://www.geneastemcells.com.au/Home

国	主な研究機関	各機関のホームページ
オーストラリア	Stem Cell Australia	http://www.stemcellsaustralia.edu.au/
ドイツ	Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT)	http://bcrt.charite.de/home/

国	レジストリーと管理機関	各機関のホームページ
EU 連携	European Human Embryonic Stem Cell Registry	http://www.hescreg.eu/
アメリカ	NIH Human Embryonic Stem Cell Registry (NIH)	http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm
イギリス	UK Stem Cell Line Registry (USCB)	http://www.ukstemcellbank.org.uk/
日本	Stemcell knowledge&Information portal	http://www.skip.med.keio.ac.jp/index.html

国	ネットワーク	各機関のホームページ
カナダ	Stem Cell Network	http://www.stemcellnetwork.ca/index.php?page=home&fil=eng

再生医療センター (CMRB) 内にあるバルセロナ幹細胞バンク (BLCB) が設置され、胚性幹細胞の維持や特性評価を行っており、臨床応用を目的とした培養条件の最適化も行っている。オーストラリアでは、オーストラリア幹細胞センター (Australia Stem Cell Center : ASCC) が、2009年に幹細胞技術の応用研究を支援するため国立幹細胞施設 StemCore を設立し、さらに2011年に ASCC の後続組織である国立幹細胞基盤 (NSCFA) が設立され、幹細胞テクノロジーの発展に寄与している。近年では、メルボルン大学などから新しく設立されたステムセルオーストラリアに、南カリフォルニア大学から戻ってきた M. Pera がリーダーとして着任し、幹細胞の研究と臨床への応用研究を行っている。