

にES・iPS細胞を安定に培養できるよう改良を進めている<sup>6)7)</sup>。未知の因子を含む培養条件を用いた研究結果を、既知の組成からなる培養条件を用いた結果へと反映させる作業は容易ではない。研究者としての立場から、ヒトES・iPS細胞が医薬品などとしてヒトの治療に使用される際の安全性・再現性を担保していく重要性について考慮すると、シーズ探索の段階からヒトES・iPS細胞の培養条件を考える必要がある。本項では、細胞治療をめざした細胞プロセッシングの構築に向けて、ヒトES・iPS細胞培養に用いるマテリアルや培地組成の考え方について提案する。

## GMPとは

医薬品のGMP (good manufacturing practice: 医薬品の製造管理および品質管理の基準に関する省令) は高品質の製品を一定の品質で反復継続的に製造していくための基準である。英国などでは、すでに再生医療製品のGMPがannex2に記載されている。①ヒトによる間違いを最小限に抑える、②細胞の汚染や品質低下を防ぐ、③高い品質を保つしくみをつくることを目的とし、細胞の培養に関係する従事者、設備、原材料、製品、試験、文書などの義務、取扱い、実施方法を管理する。このような基準は、研究室においても有用であり、将来、臨床応用を目指す可能性があるならば、基礎研究であっても臨床応用を考慮して、上述の点を充分留意し、目的に応じた培養条件を選択されたい。その他医薬品GMPを参考にして、使用するマテリアルをロットごとに品質管理していくことや、すべての作業を標準化し、詳細な手順書(SOP)を作成し、同時に培養技術者を教育し、培養技術の向上を図っていくことも重要である。

## ヒトES・iPS細胞は株間の差がある

ヒトES・iPS細胞株は細胞株間による差が大きく、培養する際はそれぞれの細胞株の特徴を理解して扱っていかなければならない。

例えば、コラゲナーゼやトリプシンなどの分散液に対する感受性が細胞株によって異なり、増殖速度や遺伝子発現、分化能などの細胞特性もバラエティーに富んでいるため、継代の方法やタイミングが株によって異なる。また、培養条件によっても感受性が変わる。一方、コラゲナーゼやトリプシンにもロット差がある。したがって、再現性ある結果を得るためには、コラゲナーゼなどのロットが変わった際は、実際に使用する細胞や培養条件を用いて分散液の活性を確認してから使用する必要がある。酵素ではないEDTA・4Naのような化学物質による細胞分散が望ましいが、細胞によってはダメージが大きい場合もある。

現状においては、すべてのヒトES・iPS細胞株に対応するユニバーサルな培養条件や培

細胞プロセッシング: 細胞を用いた治療のために使う細胞の調製、培養、加工などの工程。

EU GMPの補足文書 Annex 2 (ヒト用生物学的製剤の製造): 近年の製造技術の発展や生物学的製剤の範囲の拡大に伴い大幅に改定され、

2013年1月31日に施行された。再生医療製品を含む先進治療のための医薬製造物 (advanced therapy medicinal products: ATMPs) に対するGMPガイドラインを規定している。

養方法はなく、その株ごとに継代するタイミング、方法、培地など、その安定性を確認しながら策定する必要があり、株が異なれば培養の手順書（SOP）も別途作成することが望ましいと考えられる。

## ■ フィーダー細胞を用いる培養条件とフィーダーフリーによる培養条件

### 1. フィーダー細胞

ヒト ES・iPS 細胞を未分化状態で維持するために、従来はブタ由来のゼラチンでコーティングした培養容器とマウス胎仔由来線維芽細胞（mouse embryonic fibroblasts：MEF）を $\gamma$ 線照射やマイトマイシンC処理により不活化したものをフィーダー細胞として用いて培養してきた。その他に、ネオマイシン抵抗性（Neo<sup>r</sup>）発現ベクターおよびLIF発現ベクターを安定的に組み込んだSTO細胞（SNL細胞、あるいはSNL 76/7 STO細胞、ECACC 07032801）などもフィーダー細胞として使用されている<sup>3)</sup>。また、ヒト由来に限定した培養条件をめざしてヒト組織由来細胞もフィーダー細胞として使用される。これらのヒトまたは動物由来の細胞については、感染性物質混入のリスクが高いことなどから、研究を行ううえでも安全性に問題ないことを確認する必要がある。

### 2. フィーダーフリー

フィーダー細胞を用いた培養法では、多くのヒト ES・iPS 細胞株が安定して培養できる一方、操作が煩雑であり、また、フィーダー細胞にはロット差があるうえ、未知の因子や病原体混入の可能性がある。これらのフィーダー細胞に代わって、近年、マトリゲルなどの細胞外マトリクス（ECM）、動物由来あるいはヒト由来ピトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチンが使われている。マトリゲルは、基底膜を過剰産生する特殊なマウス腫瘍（Engelbreth-Holm-Swarm：EHS肉腫）から抽出したラミニンやコラーゲンなどの複数のECMを主成分とし、TGF- $\beta$ 、EGF、IGF、FGF-2などの増殖因子も含有する混合物である。

Ludwigらは<sup>8)</sup>、フィーダーフリーの培養に適したmTeSR<sup>TM</sup>1培地（Stemcell Technologies社）を開発する際に、マトリゲルに含まれるECMの各成分を単独、あるいは組み合わせて、どの成分がヒトES細胞の未分化維持と増殖に有効であるかを検討した。その結果、コラーゲンIV、フィブロネクチン、ラミニンおよびピトロネクチンの組み合わせが最も有効であることを見出した。さらに、Mummeryらは、mTeSR<sup>TM</sup>1培地を用いた場合には、ピトロネクチン単独でマトリゲルと同等に有効であり、その効果がインテグリン $\alpha 5\beta 1$ を介したシグナルによるものであることを報告している。宮崎らは<sup>9)</sup>、ヒトES細胞にはインテグリン $\alpha 6\beta 1$ が多く発現しており、これに特異的に作用するヒト型のラミニンのうちラミニン511がヒトES細胞の培養に有用であることを報告した。しかし、培地条件が異なるとECMの作用も異なる可能性があることに留意しなければならない。ES・iPS細胞における未分化維持機構は複雑にクロストークしており、各ECMからの刺激が必

ずしも従来の培養条件と同じように伝達されない可能性もある。著者らは、マウスES細胞の無血清培養下においてはI型コラーゲンおよびゼラチンと、ファイブロネクチンおよびラミニンでは未分化維持シグナルの伝達経路が異なることを見出している<sup>10)</sup>。ヒトES・iPS細胞においても同様のことが予測される。各ECMからどのようなシグナルがどのように伝達され、ES・iPS細胞の未分化維持あるいは分化のメカニズムに作用していくのかを培養条件ごとに詳細に解明していく必要がある。

## 基礎培地とサプリメント

### 1. 従来のヒトES・iPS細胞用培地

ヒトES細胞の培養には、従来は緩衝剤HEPESを含まない培地を使用していた。HEPESはもともと一般的な培養細胞に対して毒性があり、ロット差もあることが知られているためである。しかし、HEPESを使用しない場合には緩衝作用が弱くなり、pHの変化も大きくなる。ヒト幹細胞は、弱酸性には強いがアルカリ性には弱いので、近年はHEPESを使用している例が多い。

サプリメントとして、ウシ血清の成分は細胞の増殖に有効であるが、分化誘導因子も含まれるため、これを用いてES細胞を培養すると分化細胞も多く出現していた。また、血清による培養は染色体異常を誘引するという報告もある<sup>11)</sup>。2000年にAmitら<sup>4)</sup>によってウシ血清の代わりにKnockOut Serum Replacement™ [KSR, Gibco社 (当時)]を用いた無血清培養条件が報告されて以来、DM/F12あるいはKnockOut DM/F12などの基礎培地にKSRと線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を添加したものが使用されている。KSRは、無血清 (serum-free) であるが全組成は公表されておらず、動物由来成分を含むためロット差があり、ロットチェックが必要となる。また、解凍後2週間を超えたものは品質が保証されていない。

### 2. 無血清培養法の開発の歴史と課題

無血清培養法は、1975年にGordon H.Sato博士<sup>12)</sup>より提言された。細胞の増殖を促進するのは血清に含まれるホルモン、増殖因子、接着因子などであり、これらの因子を基礎培地に加えることにより血清を代替できるという概念に基づいている。有用な因子のみを適正な濃度で基礎培地に添加して使用することにより、再現性の高い研究結果が得られ、細胞の増殖や分化のメカニズムを解明できる<sup>13)</sup>。臨床用細胞を培養する場合に、病原体混入リスクの軽減にも通じる重要な考え方である。

1979年に、神経細胞培養用としてN2サプリメント (インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、セレンウム、ブトレッシン)<sup>14)</sup>が開発され、その後、5因子 (インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、2-メルカプトエタノール、セレン酸) あるいは6因子 (5因子にオレイン酸を加えたもの) に改良された<sup>15)</sup>。その結果、神経細胞だけでなく、さまざまな細胞の無血清培養が可能となった。一方、1993年にPriceらによって、

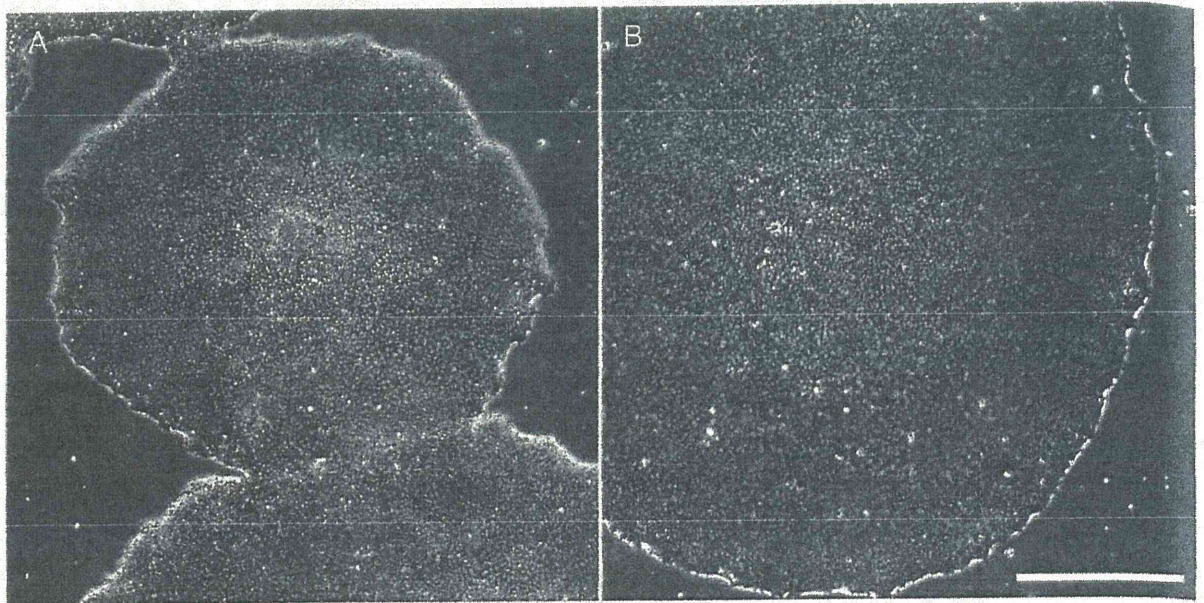


図 フィーダーフリー培養におけるヒトES・iPS細胞の位相差顕微鏡像

A) hESF-9a2i培地で培養したヒトES細胞H9. B) hESF-FX培地で培養したヒトiPS細胞Tic (JCRB1331)  
Bar=500 $\mu$ m

インシュリンを含む20因子から構成されているB27サプリメント<sup>16)</sup>が開発されたが、濃度は非公開である。現在では多くの基礎培地やサプリメントが市販されるようになったが、組成が非公開の場合も多い。既知の組成からなる培地に既知の因子を添加することにより、細胞の増殖や分化に必要な因子の要求性を正確に解析することが可能である。また、さまざまなリスクを科学的に検証するためには、全組成が明らかな培地を使用していくことが必要である。

### 3. 無血清培地に求められる組成公開

現在、すべての組成およびその濃度が公開されているヒトES・iPS細胞培養用のフィーダーフリー・無血清培地は、Thomsonらのグループにより開発されたmTeSR™1<sup>8)</sup>、TeSR™2、E8培地<sup>17)</sup>、また、STEMPRO® hESC SFM (ライフテクノロジーズ社)<sup>18)</sup>、著者らが開発したhESF9培地<sup>5)6)</sup>とhESF-FXだけであり、このうちTeSR™2、E8培地、hESF-FXは動物由来成分不含(ゼノフリー)である。また、著者らのhESFシリーズは、必要最低限の組成からなるため、添加因子の影響が高感度に解析でき、分化促進因子に対する応答性もよいため、ヒトES・iPS細胞の分化誘導にも使用できる(図)。

しかし、これらの培地を用いても、現状ではすべての細胞株を誰もが簡単に培養できるわけではない。その主な原因は、ヒトES・iPS細胞の未分化維持や分化におけるメカニズムが十分に解明されていないことによる。FGF-2だけでなく、アクチビンA、TGF- $\beta$ やWnt、IGFなどが未分化状態の維持に関与していることが明らかとなっているが、これらの因子は分化にも関与し、さらにクロストークしている<sup>19)20)</sup>。現状で広く使用されている細胞株に対して安定した未分化維持培養が行えるのはmTeSR™1と思われるが、添加因子な

どの解析や分化誘導にはhESF9が向いている。これらの培養条件には、それぞれ特徴があり、そのメリットとデメリットをふまえ、培養方法を選択する必要があるだろう。また、その培地・細胞株ごとのノウハウの蓄積が必要だと考えられる。

## 原材料の問題

培養に用いる原材料においては、動物由来成分、ヒト由来成分、植物由来成分、合成物質が挙げられる。動物由来成分であるマウス由来フィーダー細胞やウシ血清、ウシアルブミン、KSR、マウス由来マトリゲル、ブタ由来コラゲナーゼ、ブタ由来ゼラチン、ウシ由来フィブロネクチン、ウシ由来トランスフェリンなどの動物由来成分を用いる場合には、たとえ製造元のメーカーによって品質確認された市販品であっても、ロット差があり、さらに輸送経路で品質の低下が起こる可能性もあり、実際に使用する細胞を用いて生物活性の確認が必要である場合が多い。

病原体確認検査項目は企業によって異なり、不足するようであれば追加して検査する必要がある。また、動物由来成分のヒトES・iPS細胞への取り込みも懸念される。マウスフィーダー細胞とKSRを用いた従来法による培養過程で動物由来成分がヒトES細胞に取り込まれ、本来ヒトでは発現しないシアル酸を含む糖鎖成分Neu5Gc (N-Glycolylneuraminic acid) がヒトES細胞表面に発現することが報告され、大きな問題となった<sup>21)</sup>。著者らも、ヒトiPS細胞において同様にNeu5Gcが取り込まれることを報告している<sup>22)</sup>。無血清培養を数継代行えばNeu5Gcが減少することが明らかとなったが<sup>23)</sup>、どれだけ減少すれば安全なのかは不明である。また、検出されていない成分が取り込まれている可能性も否定できない。動物細胞や動物由来成分の混入がどれほど人体に影響するのか、あるいはどこまで除去すれば医薬品などとして安全と判断できるのか、臨床データの蓄積もなく、医学的にも公衆衛生学的にもまだはっきりしていない。しかし、すべての動物由来成分を植物由来成分や合成試薬などその他の由来成分に替えることは現状では不可能であり、海外での事例なども含めて、実際に臨床データを蓄積していく必要があると思われる。

ヒト由来成分の場合、輸血や臓器移植などの臨床データの蓄積があり、拒絶反応や感染性病原体の混入の可能性など起こりうるリスクは予測できる。輸血の例を見ると、1952年に初めて血清肝炎が報告されたが、B型肝炎ウイルスの検出試薬が開発され、1971年以降は輸血後肝炎が低減した。非A非B型肝炎と呼ばれていたC型肝炎も、1989年に抗体の検出試薬が開発され、血液製剤による肝炎ウイルスの感染の危険性は大幅に低下した。さらに、1997年以降、HBV、HCV、HIVに対する核酸増幅試験が用いられるようになって輸血後肝炎のリスクはかなり低減された。現行で検出できるウイルスなど病原体の確認検査を行うことにより、かなりリスクは低減されるものと思われる。

培地にかかわる上述のような問題点を解決するため、既知の物質よりなるすべての組成が明らかな無血清あるいは合成培地を用いた培養条件 (defined culture condition) は、品質管理しやすい。近年は、ヒト型のリコンビナントECMなどやりコンビナント剥離剤も市

表 培養に使う原材料について必要と考えられる安全性検査項目

使用するマテリアルの例	由来	検査対象	検査方法	検出可能な病原体例
ES・iPS細胞		一般的な株化細胞の検査項目	マイコプラズマ試験, 無菌試験, 染色体検査, 細胞認証試験	
ファイター細胞	ヒト	ヒト由来線維芽細胞	ヒト病原体	ウイルスDNA/RNA検出試験 (PBRT) ヒト免疫不全ウイルス (HIV 1/2), 成人T細胞白血病ウイルス (HTLV-I/II), A型肝炎ウイルス (HAV), B型肝炎ウイルス (HBV), C型肝炎ウイルス (HCV), EBウイルス (EBV), サイトメガロウイルス (CMV), ヒトヘルペスウイルス (HHV-6 7, 8), ヒトバルボウイルス B19, 西ナイルウイルス, レオウイルス 1, 3
				BSE (ウシ海綿状脳症) / TSE (伝達性海綿状脳症) 検査 異常プリオン
		一般的な株化細胞の検査項目	マイコプラズマ試験, 無菌試験, 染色体検査, 細胞認証試験	
MEF SNL	マウス	マウス病原体	レトロウイルス被膜の電子顕微鏡解析による検出, 細胞培養アッセイ (PG-4 S+L-), PBRT	マウスレトロウイルス, レトロウイルス様被膜
		異常なグリコフォーム	※ヒトの体内でどのような影響があるかは不明だが, ヒトES・iPS細胞に取り込まれることは明らかである	
DMEM/F12など	合成試薬	必要なし		
培地ならびにサプリメント	血清 (FBS)	ウシ	ウシ病原体	狂牛病非発生国産の使用細胞培養アッセイ (9 CFR 113) および免疫染色検出 ウシ病原体ウイルス
				BSE (ウシ海綿状脳症) / TSE (伝達性海綿状脳症) 検査 異常プリオン
	代替血清 (KSR)	動物	※組成が非公開, 動物由来成分含有	動物由来成分としてのすべての検査, ならびにリコンビナント製品と同様の検査
	ウシトランスフェリン	動物	ウシ血清に同じ	
	ヒトトランスフェリン	ヒト	ヒトフィーダー細胞に同じ	
	リコンビナント-FGF-2*, リコンビナント-アクチビンA, IGF-1*, リコンビナント-ヒト型インシュリン*, リコンビナント-ヒト型トランスフェリンなど	リコンビナント		変異原性試験 (遺伝子突然変異, 染色体異常), DNA損傷 (致死, 遺伝子発現, DNA鎖切断, DNA付加体など), 生殖細胞遺伝毒性試験 (マウス特定座位試験, 優勢致死試験, 遺伝性転座試験等), 細胞形質転換試験
ROCK阻害剤試薬	化合物	変異原性		
EDTA	化合物			
剥離剤	TrypLE	リコンビナント		
	アキュターゼ	非公開		
	ディスパーゼ	植物		
	トリプシン			
細胞外基質	ゼラチン, コラーゲン	ブタ	ブタ病原体	細胞培養アッセイ (9 CFR 113) および免疫染色検出 ウシ病原体ウイルスに準ずる
	マトリゲル	マウス	マウスフィーダー細胞 (MEF, SNL) に同じ	

使用するマテリアルの例	由来	検査対象	検査方法	検出可能な病原体例
ファイブロネクチン、ラミニン ヒトロネクチン	ヒト	ヒトフィーダー細胞と同じ		
ファイブロネクチン	ウシ	FBSと同じ		
ラミニン511 ヒトロネクチン ファイブロネクチン	リコンビナント	変異原性		

これらの検査項目は臨床用細胞培養としての承認に必要な項目としてではなく、あくまでリスクを考慮した項目を列挙した。

\*: 臨床試薬有, 文献24をもとに作成

販されている。しかし、合成試薬やリコンビナントタンパク質であっても精製過程で異種生物成分が混入する可能性もある。また、これらの試薬はアミノ酸の繰り返し配列をもつことが多く、抗原性をもつリスクがあることも考慮しておかねばならない。

どんな原材料であっても、100%安全ということはない。必要と考えられる安全性検査項目を表に挙げる。臨床応用する段階になって、安全性や再現性を担保することができなければ、基礎研究の成果が反映できない事態も起こる。将来にわたってのリスクとベネフィットを考へて、科学的証拠に基づいた情報を広く発信していかねばならない。また、培地を販売する企業の利益を守るために組成や精製方法が非公開となっている製品もしばしばある。このことは、基礎研究において科学的に現象を解明することを妨げている。医学・生命科学研究の発展のためにも、公開できる制度の整備が望まれる。

## GMPの考え方を基礎研究の現場でも活用することが重要

上述したように、ヒトES・iPS細胞は不安定で形質も変わりやすいため、未分化性や多能性の保持のみならず、染色体などを定期的に確認し、細胞そのものの品質を一定に保つ必要がある。また、培養過程を詳細に観察記録し、ヒトES・iPS細胞の形質が変化した場合には、培養過程を検証し、その原因を排除できるようにしなければならない。一定の品質を保つことこそが安定した再現性の高い実験結果を生むという事実は、何もヒトES・iPS細胞研究に限ったことではない。このような品質管理と再現性の高い実験結果を実現するワークフローは、GMPの考え方に沿ったものであり、基礎研究の現場でも活用されるべきものである。基礎研究の成果をそのまま滞りなく臨床で応用できるようにするためにも、研究者は将来を充分に見据え現場で研究に取り組むべきである。この研究分野は、未解明の部分も多いため、限りなく安全性を求めて研究を滞らせるのではなく、現在の科学水準からリスクとベネフィットのバランス、経済性を考慮して研究を進める必要があるだろう。

臨床用ヒトES・iPS細胞の培養に使用する培地成分・原材料について、「使えるか？」ではなく、「使うべきか？」を真摯に考え、研究に取り組んでいくべきではないだろうか。

#### ◆ 謝辞

本項を執筆するにあたって、京都大学再生医科学研究所末盛博文准教授、また、日本PDA製薬学会元理事松田岳彦氏に感謝の意を表す。なお、本研究は、厚生労働省厚生労働科学研究費補助金を受けて実施した。

#### ◆ 文献

- 1) Thomson, J. A. et al. : *Science*, 282: 1145-1147, 1998
- 2) Takahashi, K. & Yamanaka, S. : *Cell*, 126: 663-676, 2006
- 3) Takahashi, K. et al. : *Cell*, 131: 861-872, 2007
- 4) Amit, M. et al. : *Dev. Biol.*, 227: 271-278, 2000
- 5) Furue, M. K. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 13409-13414, 2008
- 6) Na, J. et al. : *Stem Cell Res.*, 5: 157-169, 2010
- 7) Kinehara, M. et al. : *PLoS One*, 8: e54122, 2013
- 8) Ludwig, T. E. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 24: 185-187, 2006
- 9) Miyazaki, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 375: 27-32, 2008
- 10) Hayashi, Y. et al. : *Stem Cells*, 25: 3005-3015, 2007
- 11) Loo, D. T. et al. : *Science*, 236: 200-202, 1987
- 12) Sato, G. : *Biochemical Actions of Hormones*. Academic, 391-396, 1975
- 13) Barnes, D. & Sato, G. : *Cell*, 22: 649-655, 1980
- 14) Bottenstein, J. et al. : *Methods Enzymol.*, 58: 94-109, 1979
- 15) Sato, J. D. et al. "in *Basic Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd Edn." (ed J. M. Davis), pp.227-274, Oxford University Press, 2002
- 16) Brewer, G. J. et al. : *J. Neurosci. Res.*, 35: 567-576, 1993
- 17) Chen, G. et al. : *Nat. Methods*, 8: 424-429, 2011
- 18) Wang, L. et al. : *Blood*, 110: 4111-4119, 2007
- 19) Vallier, L. et al. : *Dev. Biol.*, 275: 403-421, 2004
- 20) Avery, S. et al. : *Stem Cells Dev.*, 15: 729-740, 2006
- 21) Martin, M. J. et al. : *Nat. Med.*, 11: 228-232, 2005
- 22) Hayashi, Y. et al. : *PLoS One*, 5: e14099, 2010
- 23) Heiskanen, A. et al. : *Stem Cells*, 25: 197-202, 2007
- 24) 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 HP <http://nihs.go.jp/gaiyou/heniiden.html>



# ヒト iPS 細胞研究の海外動向



(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 研究リーダー

古江-楠田 美保

2006年に山中ら<sup>1)</sup>によりマウス人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞が発表され、瞬く間にその技術は世界中に広まった。ヒト胚性幹 (ES) 細胞は1998年に Thomsonら<sup>2)</sup>により樹立されており、日本国内でも2003年に京都大学再生医科学研究所においてヒトES細胞が樹立され<sup>3)</sup>、ヒトES細胞の研究は開始されていた。しかし、倫理的な問題も含めた規制の厳しさによりそれほど多くの研究者がヒトES細胞を使っていたわけではなかった。しかし、2007年<sup>4)</sup>にヒトiPS細胞作成が発表された後は、日本の幹細胞研究環境をがらりと変えた。国家戦略の一つとしてiPS細胞研究が10年間のロードマップに掲げられ、精力的に研究が進められるようになった。それは日本だけでなく、米国やEUにおいても戦略的に進められている。その進み方はあまりに早く、ここで記載する内容がもう数か月後には古くなっている可能性があるぐらい熾烈な国際競争となっている。

## 1—iPS細胞標準化

ヒトES/iPS細胞はこれまで研究ツールとして使用されてきたがん細胞株や不死化された線維芽細胞などの細胞とは異なる点が多い<sup>5-7)</sup>。培養技術の差により研究室間のみならず、研究者間による結果の差も大きい。また、株間の差も大きい。さらに、長期継代を行っているうちに形質が変化する。ヒトES/iPS細胞の培養技術を短期間の実習で習得するのは難しい。ヒトES細胞研究を早くから行っていた米英においても、経験のある研究室に数ヶ月滞在したり、必要なノウハウを研究者どうしのコミュニティー内で情報交換している。ヒトES細胞の場合と異なり、ヒトiPS細胞は誰もが研究を手がけることが可能であるが、ヒトES細胞研究に関する基礎知識が培われていない国内においては培養維持に苦勞している研究者も多い。

海外ではヒトES細胞を利用して研究を推進してい

くために、ヒトES細胞の標準化が必要であることが早くから認識され、2003年に国際幹細胞フォーラムが開催され、2005年より英国シェフィールド大学Andrews教授がリーダー (日本を含めた世界の研究者らが共同で推進<sup>8)</sup>) として推進しているInternational Human Stem Cell Initiatives (ISCI) プロジェクトが開始されている。2007年以降はヒトiPS細胞も加えられて標準化が進められている。ISCIでは、まず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ィール、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が行われた<sup>9)</sup>。

また、その研究結果を受けて各国の幹細胞バンクが参画するInternational Stem Cell Banking Initiative (ISCB) が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<sup>10)</sup>、その日本語訳は京都大学再生医科学研究所・高田らにより日本再生医療学会雑誌「再生医療」に掲載されている<sup>11)</sup>。2011年に、ISCIはヒト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報告されている。しかし、ヒトES/iPS細胞の特性で最も重要である分化能についての評価が難しいことが問題となっている。マウスの場合にはgermline transmissionにより全能性が証明されるが、ヒトの場合はこれを検証することができない。そのためSCIDマウス等の免疫不全マウスに細胞を移植し、テラトーマを形成され三胚葉に分化することを確認することによって多能性が検証されている。しかし、テラトーマ形成法は、実験動物の個体差、細胞移植の技術的問題、形成されたテラトーマの組織の診断が難しい、などの問題があり、標準化が難しい。トリプシンEDTAにより分散させ継代すると分化能が失われるという事例が海外の研究者の間では語り継が

れているが、長期継代の間に形質が変化して分化能が変わる可能性も指摘されていることから、分化能については複数回の検査が求められる。欧州では動物実験の規制が厳しく、*in vitro*での再現性の高い評価法開発が望まれている<sup>12)</sup>。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>13)</sup>、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>14)</sup>。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と予測されている<sup>15)</sup>。ヒトES/iPS細胞の品質検査として利用される未分化/分化マーカーの発現プロフィールは、培地やフィーダー細胞のロット、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。国内では標準株を設定してほしいという要望を聞かれるが、たとえある株を標準株と設定したとしても、その形質を維持できるわけではない。仮に、細胞バンクや樹立機関から品質検査されたものを受け取ったとしても、各自が細胞の品質管理を行う必要がある。国際的には、品質評価の方法や技術の標準化が求められている<sup>16)</sup>。

## 2—培地の開発状況

ヒトES/iPS細胞は、一般的に不活性化したマウス胎児組織由来線維芽細胞をフィーダー細胞 (MEF) として使用し、牛血清あるいは代替血清knockout-serum replacement (KSR) と線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)<sup>17)</sup>を添加した培地を用いて培養されている。フィーダー細胞とKSRを用いた培養法は多くのヒトES/iPS細胞株において安定した培養が可能であるが、動物由来成分を含むため培地間にロット差がある。さらに、培養した細胞に動物細胞表面に存在するシアル酸、Neu5Gc (N-グリコシルノイラミン酸) が確認される<sup>18)</sup>。動物由来成分の代わりにヒト由来生物材料を用いる条件も開発されているが、創薬研究や細胞治療へ応用をめざして、病原体をできるだけ排除し、再現性ある結果や安定した品質を得るために、未知の成分を含まず、生産段階から流通経路が記録された既知の成分からなる無血清培地の使用が望まれている。国内では理解されていない場合もあるが、無血清培養とは単に血清を除いた基礎培地のみによる培養ではなく、既知の成分よりなる培地を用いたchemically defined serum-free culture<sup>19)</sup>である。1975年にGordon H. Sato博士<sup>20,21)</sup>が血清の役割とはそれに含まれるホルモン、増殖因子、接着因子などが細胞の増殖を促進することであり、これらの因子を基礎培地に加えることにより血清を代替できることを提言した。1979年に神経細胞培養用としてN2サプリメント<sup>22)</sup>が開発された。その後、5因子あるいは6因子 (+オレイン酸) に改良された<sup>23,24)</sup>。その結果、神経細胞だけでなく様々な細胞の無血清培養が可能となった<sup>25,30)</sup>。一方、1993年にPriceらによってイ

ンスリンを含む20因子から構成されているB27サプリメント<sup>31)</sup>が開発されたが濃度が非公開となっている。現在、ヒトES/iPS細胞を培養するための培地は様々開発されており、海外では各自その研究目的により様々な条件を使用している。Thomsonらのグループにより2006年に発表されたmTeSR<sup>TM</sup>1<sup>32)</sup>とマトリジェルを使用している研究者は多い。また、N2サプリメントとB27サプリメントを合わせて使用する条件も報告されている<sup>33)</sup>。しかし、これらの条件は動物由来成分を含むため、動物由来成分不含に改良されたTeSR<sup>TM</sup>2、さらに新たに2011年に開発されたE8培地<sup>34)</sup>の使用が試みられ始めているようである。また、StemPro<sup>®</sup>を用いている研究者も多い。著者らが開発したhESF9培地<sup>35,36)</sup>や動物由来成分不含培地に改良したhESF-FXは必要最低限の組成からなるため、添加因子の影響が高感度に解析できる<sup>37)</sup>。これら既知の組成からなる無血清培地は、未分化状態を維持するだけでなく、再現性高い分化誘導にも使用されている。VallierらはアクチビンAを添加した無血清培地CDMを未分化維持から分化過程に使用して高効率な肝細胞への分化誘導を行っている<sup>38)</sup>。また、中辻らは無血清培地と低分子化合物によりサイトカインを使用せず心筋への分化誘導に成功している<sup>39)</sup>。血清添加という万能に効く条件の代わりに、既知の成分を使用することにより再現性は確保されてきたが、培地は細分化してきている。それぞれの目的にあった培地を調整するカスタムサービスを行う企業も増えてきているようである。一つに決めるのではなく、その目的にあった培地が求められているのかもしれない。

## 3—企業の取り組み

これまでヒトES細胞の樹立は大学や研究機関で樹立されることがほとんどであった。しかし、欧米では早くから企業も取り組んでおり、欧米企業は2008年頃にはすでに創薬にiPS細胞を適用するために様々な対応を行ってきている。また、昨年末にはオクスフォード大学とファイザー、ロシュなどの製薬会社10社と23の大学が結束し、1,500株のiPS細胞株をバンキングし、今後の難病の研究と治療の開発に活用すると発表した。また、ウイスコンシン大学よりスピンアウトしたCellular Dynamics International (CDI) 社もカリフォルニア再生医療機構 (CIRM) から研究費を取得し、Buck Instituteからの施設をリースし、ヒトiPS細胞バンクを整備すると発表した。

## 4—おわりに

欧米では大学院生の研究テーマが企業との共同研究であることは珍しくなく、大学のシーズを吸い上げる機構がある。また、研究者間の交流も多いため情報の