

201306014B

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 23 年度～ 25 年度 総合研究報告書

研究代表者 古江 - 楠田 美保

平成 26 (2014) 年 5 月

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 23 年度～ 25 年度 総合研究報告書

研究代表者 古江 - 楠田 美保

平成 26 (2014) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書目次

目次

I. 総合研究報告

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	3
研究代表者 古江 - 楠田 美保	

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	61
研究分担者：水口 賢司	
2. iPS 細胞を認識する新規抗体を用いた評価技術の策定	92
研究分担者：川崎 敏祐	
3. FACS 解析・バイオインフォマティクス解析	102
研究分担者 大沼 清	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	123
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	127
-----------------	-----

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）総合研究報告書

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

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。

研究協力者

菅一岸本 三佳：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 特任研究員

研究分担者

水口賢司：独立行政法人医薬基盤研究所 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

川寄敏祐：立命館大学 総合理工学研究機構 教授

大沼清：長岡技術科学大学 生物機能工学専攻 准教授

**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、ウィルス検査、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（文献1、2）、長

期に継代を行う事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きている。海外では、国際幹細胞バンクイニシャティブ（ISCT）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した（文献4、5）。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

ヒト幹細胞バンク運営の基盤システムの設計により、再生医療など臨床に資するヒト幹細胞の資源化における品質管理の基盤が整備され、バンクの設置と運営を円滑に行うことが可能となり、ヒト幹細胞の再生医療などへの実用化が促進される。

## B. 研究方法

ヒトES細胞、iPS細胞は従来の細胞と同様の資源化工程を使うことができない。ヒトES/iPS細胞は、その細胞増殖の速度が遅く、自発的な分化

能も有することから分化細胞を取り除きながら細胞を増殖させ、また、幹細胞ならではの特性検査も必要となる。一方、継代とともにゲノムが不安定なることが知られており、限られた継代数内に資源化することが望ましい。効率良く細胞を増殖させ、特性検査、品質検査を行って、保存を行うために、作業工程表を作成するとともに、評価法についても効率的に行う必要がある。そこで次の項目について研究を行った。

## 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、平成 23 年度に策定を行った。国際ヒト幹細胞バンキングイニシャティブ(ISCBI)や海外におけるヒト幹細胞バンクでは、品質評価法についてバンク間での連携が必要であることが提唱されており、その資料を調査した。それらの資料をもとに、国際幹細胞イニシャティブで使用された未分化ならびに早期分化マーカー遺伝子群のプライマーペアがすでに固定化されたマルチウェルプレートに cDNA を入れて解析を行う RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array システムを用いて、遺伝子の発現プロフィールの解析を行った。検査方法策定の

ための解析対象は、正常染色体を有する ES/iPS 細胞株群、染色体異常クローン群、胚性がん(EC)細胞株群とした(図 1)。解析結果は、分担研究者である水口賢治によりバイオインフォマティクスの手法を用いた解析を行った。

平成 24 年度には、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 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)を検査対象としてきた。Pluripotency 遺伝子 PCR アレイ (Applied Biosystems TaqMan<sup>®</sup> Human Stem Cell Pluripotency Array) を用いて解析し、データの蓄積を行った。

平成 25 年度には、3 株のヒト iPS 細胞株; JCRB1341 iPS-TIG120-3f7、JCRB1363 iPS-TIG120-4f1 及び NIHS0693 UTA-SF2-2 (以上 JCRB Cell Bank)、2 株のヒト ES 細胞株; KhES-4 及び KhES-5 (京都大学より分与)を追加し、同様の手法で遺伝子発現プロフィール解析を行い、昨年度までに蓄積したデータと合わせて、遺伝子発現プロフィールの細胞株間の相違や個々の細胞株の特性を示す遺伝子等について検討した。

細胞種	細胞株	JCRB 細胞番号	樹立者/寄託機関/作製方法
EC	2102Ep.cl.2A6		Prof. Andrews, The University of Sheffield, UK
	NCR-G3	JCRB1168	
ES	H9	NSCB (USA)	Prof. Thomson, The University of Wisconsin-Madison
	khES-1 khES-3		Prof. Nakatsuji, Kyoto University, JAPAN
iPS	201B7 201B2 201B2 subclone		Prof. Yamanaka, CiRA, Kyoto University, JAPAN
	Tic Dotcom Squeaky Toe Lollipop	JCRB1331 JCRB1327 JCRB1329 JCRB1338 JCRB1336	Dr. Umezawa, et al., National Center for Child Health and Development, JAPAN. These cell lines are derived from human fetus lung cells (MRC-5), infected with recombinant retroviruses expressing the four factors (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc).
	iDMC-03 iDMC-13		Dr. Kanemura, et al., Osaka National Hospital, National Hospital Organization, JAPAN. These cell lines are derived from human decidua-derived mesenchymal cells.
Neuroblastoma	NB(TU)1-10 SCCH-26 GOTO TGW	JCRB0154 JCRB0106 JCRB0612 JCRB0618	神経芽細胞腫
PNET	TASK1	JCRB0139	Primitive Neuroectodermal cell 原始神経外胚性腫瘍
MSC	UE7T-13	JCRB1154	Mesenchymal stem cells 間葉系幹細胞

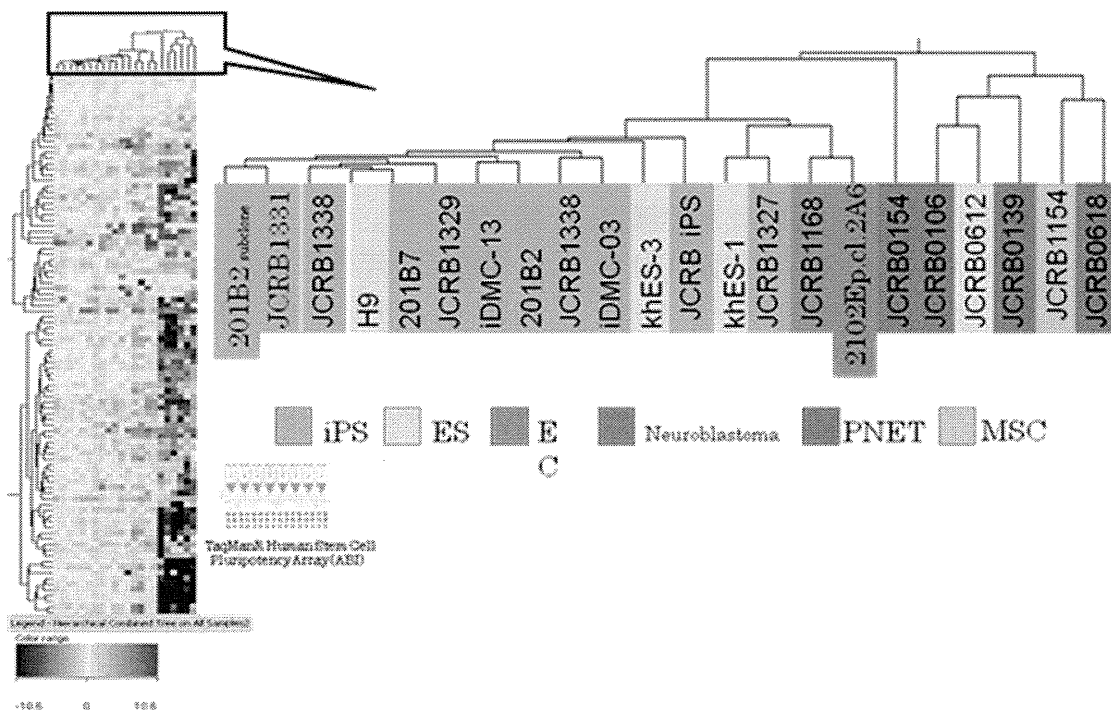


図1 遺伝子プロファイル解析

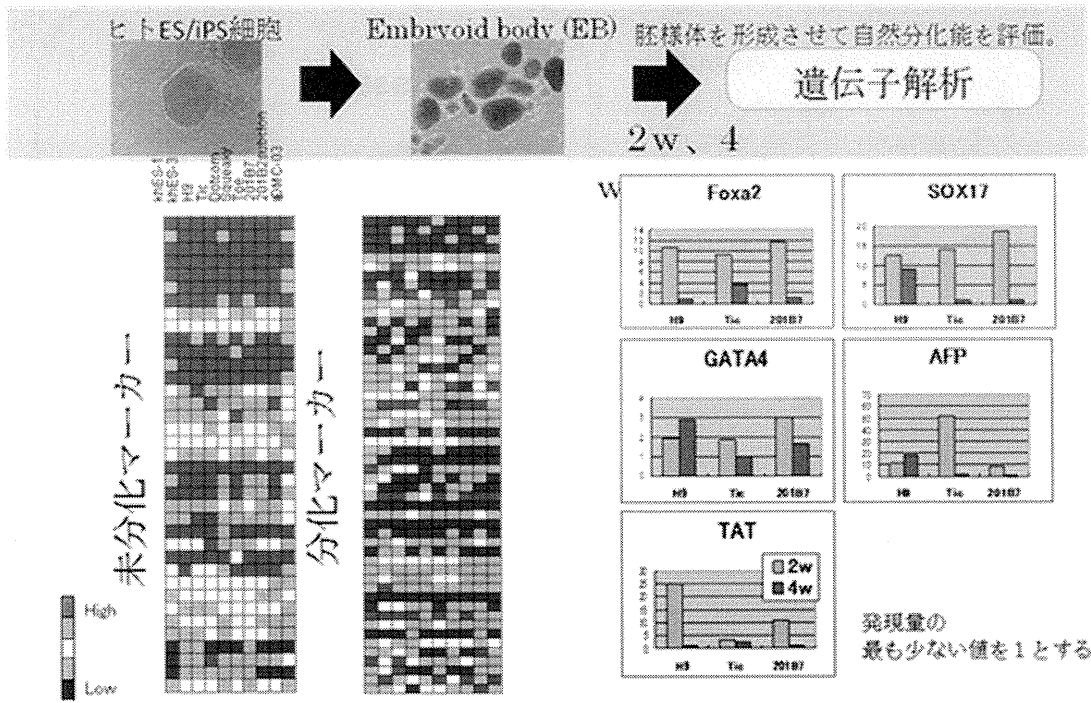


図2 *in vitro* 分化能評価



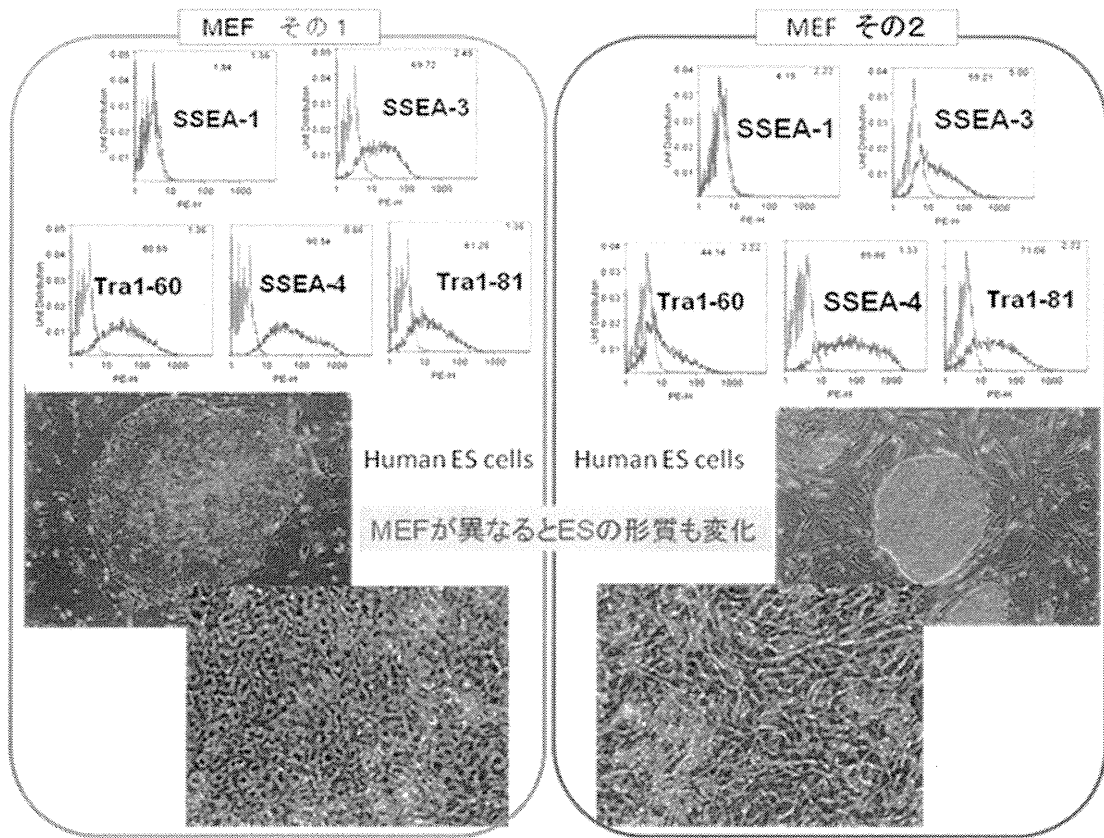
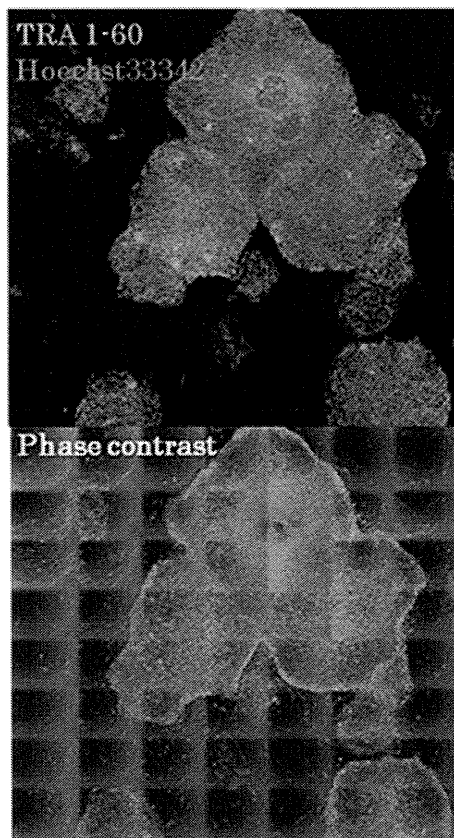
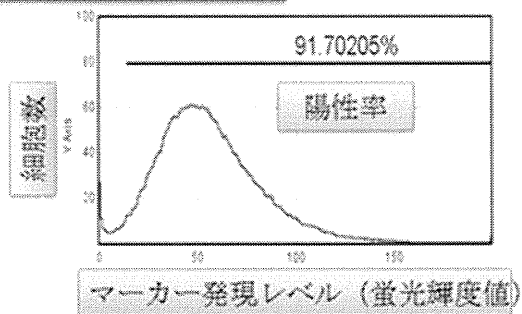


図 3. 異なる MEF によるヒト ES/iPS 細胞の品質変動



イメージングサイトメトリー



フローサイトメトリー (FACS解析)

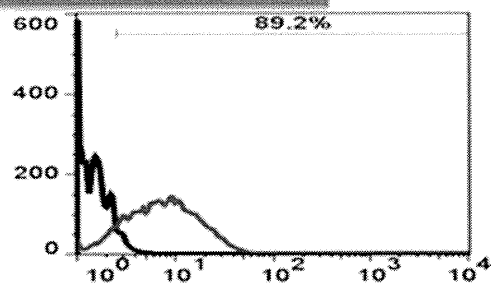


図 4. イメージアナライザーによる細胞表面マーカー発現プロフィール解析

【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/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1331](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1331)

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・屋名	Homo
種名	sapiens	性別	M
年齢・月齢	14 week fetus	細胞識別情報	available
(病) 原発組織名		病歴情報	
転移の有無 (Y/N)	No	(病) 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
ライノPDL		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	registered	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 Dotocom の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1327](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1327)

細胞番号(JCRB)	JCRB1327	細胞名	Dotocom
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
(病) 原発組織名		病歴情報	
転移の有無 (Y/N)	No	(病) 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
類似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]
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 JCRB1437 iPS-TIG-114-4f1 の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1437](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1437)

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
タリシ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 CaCl2, 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)

HPS0063 : 201B7	
特性(英)	Human iPS cell line. HPS0002 and HPS0076 are 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、HPS0076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)を導入して樹立。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。 健康人由来細胞 - iPS細胞 - 皮膚
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+1 mM CaCl <sub>2</sub> +PBS(-), 0.1% gelatin coated dish
継代密度	1.3-6
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(20)
個体識別	OK
メモ	DAP213 : Medium+2M DMSO+1M Acetamide+3M Propyleneglycol, feeder : SNL 76/7 (X-rays5000R or MMC) 1.5-2.5x10 <sup>6</sup> 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 TERMS and CONDITIONS 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)。

f

【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://www.wicell.org/home/stem-cell-lines/order-stem-cell-lines/wa09-feeder-dependent.cmsx>

## 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	<a href="#">Pass</a>
Identity by STR	WCD-TE-005	Identical to parent MCB	<a href="#">Pass</a>
Mycoplasma	WCD-TE-001	No contamination detected	<a href="#">Pass</a>
Karyotype by G-Banding	WCD-TE-003	Normal Karyotype	<a href="#">Pass</a>

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](#)

【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 JCRB1493（NIHS0693）UTA-SF2-2 の細胞情報】

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

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VSV-Gレトロウイルスベクターを用いて導入後、ヒトES細胞様コロニーを無フィーダー培養したもの	hESF9a	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 JCRB1341 iPS-TIG120-4f3 の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1341](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1341)

細胞番号(JCRB)	JCRB1341	細胞名	iPS-TIG120-3f7
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, TIG120由来	プロフィール	Human iPS cell line which was generated from adult human skin fibroblast cell line (JCRB0542: TIG-120).
別名		動物名	human
系統名		学名・属名	Homo
種名	sapiens	性別	F
年齢・月齢	6	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, and KLF4 (in pMXs retroviral vectors)	細胞寿命	infinite
ウイルス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 CaCl2, 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	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 JCRB1363 iPS-TIG120-4f1 の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1363](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1363)

細胞番号(JCRB)	JCRB1363	細胞名	iPS-TIG120-4f1
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, TIG120由来	プロフィール	Human iPS cell line which was generated from adult human skin fibroblast cell line (JCRB0542: TIG-120).
別名		動物名	human
系統名		学名・属名	Homo
種名	sapiens	性別	F
年齢・月齢	6	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
カイシ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 CaCl2, 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			

アレイに含まれる遺伝子のリストは表 1 に示した。

アレイ名	Human Stem Cell Pluripotent PCR array (幹細胞の同定、分化、増殖に関与する 84 遺伝子の発現プロファイルを解析する)
アレイ遺伝子	BRIX, CD9, COMMD3, CRABP2, DNMT3B, EBAF, FGF5, FOXD3, GABRB3, GAL, GBX2, GDF3, GRB7, IFITM1, IFITM2, IL6ST, IMP2, KIT, LEFTB, LIFR, LIN28, Nanog, NODAL, NR5A2, NR6A1, PODXL, POU5F1, PTEN, REST, SEMA3A, SFRP2, SOX2, TDGF1, TERT, TFCP2L1, UTF1, Xist, ZFP42, FGF4, NOG, CDX2, CGB, EOMES, KRT1, GCM1, DDX4, SYCP3, COL1A1, COL2A1, RUNX2, HBB, HBZ, ACTC, NPPA, DES, MYF5, MYOD1, T, WT1, CD34, CDH5, FLT1, PECAM1, GCG, IAPP, INS, IPF1, PAX4, SST, TAT, AFP, FN1, FOXA2, GATA4, LAMA1, LAMB1, LAMC1, PTF1A, SERPINA1, SOX17, GFAP, HLXB9, ISL1, NES, NEUROD1, OLIG2, PAX6, SYP, TH
コントロール遺伝子	ACTB, RAF1, CTNNB1, GAPD, EEF1A1, 18S

## (ii) 未分化マーカータンパクのプロフィール解析

従来使用されている糖鎖認識抗体 SSEA3、SSEA4、tra-1-60、tra-1-81 は EC 細胞を免疫原として得られたものであり、必ずしも iPS 細胞/ES 細胞に特異的な成分を認識するものではない。分担研究者である川寄 敏祐とともに開発した EC と ES/iPS 細胞を判別できる抗体なども含めて、評価方法を検討した。

近年、細胞表面マーカープロフィール解析については、免疫染色法による解析が注目されていることから、IN Cell Analyzer 2000（現有）によるイメージングサイトメトリー解析とフローサイトメトリー（FACS）解析を比較する。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%パラフォ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。この比較解析は分担研究者である大沼清とともにやり、遠隔地の研究機関

（長岡技術科学大：新潟県長岡市から医薬基盤研：大阪府茨木市）における検査サンプル送付時の取扱い方法等についても検証した。

## 2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

研究目的にあった細胞を検索するためには、それに必要な細胞情報がデータベース化され、適切な検索システムが必要不可欠である。しかし、現状では、細胞名のリストがあるだけである。そこで、研究用のヒト幹細胞を対象として、細胞登録とデータ登録のための基盤設計を行うために、海外での実態について調査した。特に、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。

## 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 細胞の資源化工程において、適切なタイミングで検査を行い、凍結保存を行う必要がある。また、株間の差も大きいため、様々な工程が予測され、細胞株によって臨機応変に対応できるよう工程を