

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

12) 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)

13) 大沼清、藤木彩加、小池怜、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、古江-楠田美保、浅島誠、“ヒト ES・iPS 細胞の無酵素培養” 日本再生医療学会 2013 年 横浜 O-55-3 口演「ES/iPS 培養法 2」

14) Ryosuke Yoshimitsu, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, Serum- and feeder-free culture condition for human iPS cells on microchamber array chip, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (The university of tokyo, Tokyo) Dec 10, 2012, Poster

15) Ryotaro Yamada, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, Patterning for human iPS cells by adsorption mixture of proteins on plasma-patterned PDMS surface, Symposium on New Technology for Cell-

based Drug Assay (The university of tokyo, Tokyo) Dec 10, 2012, Poster

16) Shougo Nakamura, Atushi Maruyama, Yuichi Wakamoto, Shin-ichi Sakai, Bayar Hexig, Toshihiro Akaike, Kiyoshi Ohnuma, Perfusion device to observe of single ES cells, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (The university of tokyo, Tokyo) Dec 10, 2012, Poster

17) Atsushi Maruyama, Yuichi Wakamoto, Shogo Nakamura, Tatsuo Michiue, Shin-ichi Sakai, Bayar Hexig, Toshihiro Akaike, Kiyoshi Ohnuma, Single-cell-based analysis of differentiation of mouse ES cells (マウス ES 細胞分化の単 1 細胞解析), 第 50 回 日本物理学会年会 (名古屋大学、愛知県)、2012 年 9 月 22 日、口頭発表

18) Ryosuke Yoshimitsu, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, ECMcoating on polydimethylsiloxane for hiPSCs culture (hiPSCs 細胞培養のための polydimethylsiloxane への細胞外基質コート)、第 50 回 日本物理学会年会 (名古屋大学、愛知県)、2012 年 9 月 22 日、ポスター

19) Ryotaro Yamada, Koji Hattori, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, Kiyoshi Ohnuma, Patterning for human iPS cells by adsorption mixture of proteins on PDMS surface (PDMS 基盤表面上でのタンパク質混合物の吸着による hiPS

細胞のパターニング)、第 50 回 日本
物理学会年会 (名古屋大学、愛知県)、
2012 年 9 月 22 日、ポスター

20) Shougo Nakamura, Atushi Maruyama,
Yuichi Wakamoto, Shin-ichi Sakai, Bayar
Hexig, Toshihiro Akaike, Kiyoshhi
Ohnuma, Perfusion device to observe of
single ES cells、第 50 回 日本物理学
会年会 (名古屋大学、愛知県)、2012 年
9 月 22 日、ポスター

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	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
柳原佳奈、 古江-楠田 美保	第二章 2の6 幹細胞技術：標準化に向けて	一般財団法人日本規格協会	幹細胞技術の標準化—再生医療への期待	一般財団法人日本規格協会	日本	2012	P143-154
川寄敏祐、 川寄伸子、 中尾広美、 松本正悟、 古江-楠田 美保、豊田 英尚	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)	羊土社	日本	2013 /6	P129-133
福田隆之、 古江-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 /9	P81-87
菅三佳 古江-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	羊土社	日本	2014 /2	P44-52

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
平田みつひ、 その他	日本におけるヒトES、iPS細胞研究 標準化：その3 品質管理	Tiss. Cul t. Res. Commun	30	137-14 9	2011
Takayama K, et al.	Efficient and delective generati on of two distinct endoderm li neages from human ES and iP S cells by differentiation stage- specific SOX17 transduction	PLoS O ne	6	e21780	2011
Nonaka M, et al.	Dendritic cell-specific intercellu lar adhesion molecule 3-grabbi ng non-integrin (DC-SIGN) rec ognizes a novel ligand, Mac-2- binding protein, characteristica lly expressed on human colorec tal carcinomas.	J. Biol. Chem.	286	22403- 22413	2011
Hirano M	Role of interaction of mannan- binding protein with meprins at the initial step of compleme nt activation in ischemia/reperf usion injury to mouse kidney.	Glycobio logy	22(1)	84-95	2011
Shofuda T, e t al.	Human Decidua-Derived Mesenc hymal Cells are a Promising So urce for the Generation and Cel l Banking of Human Induced Pl uripotent Stem Cells.	Cell Me dicine.		DOI:ht tp://dx. doi.org/ 10.372 7/2155 17911X 658918	2012
Takayama K, et al	Generation of Metabolically Fun ctioning Hepatocytes from Huma n Pluripotent Stem Cells by FO XA2 and HNF1 α Transduction.	J. Hepat ol.	57	628-63 6	2012
Nagamoto Y, et al.	The Promotion of Hepatic Matur ation of Human Pluripotent Ste m Cells in 3D Co-culture using Type I Collagen and Swiss 3T 3 Cell Sheets.	Biomater ials.	33	4526-4 534	2012
Takayama K, et al.	Efficient Generation of Function al Hepatocytes from Human Em bryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction.	Mol. The r.	20	127-13 7	2012
菅 三佳、そ の他	ヒト多能性幹細胞の命名法の国際 統一規格案について	再生医療	11	72-77	2012

三村純代、その他	マウスES細胞由来神経堤細胞の毒性評価系応用への可能性	日本組織培養学会	30	159-168	2012
Lokesh P. Tripathi, et al.	Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28 γ Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study	J Proteome Res.	11 (7)	3664-3679	May 31, 2012
Kinehara M, et al.	Protein Kinase C Regulates Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal.	PloS One	8	1-13	2013
Kawabe K, et al.	A novel antibody for human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures.	Glycobiology.	3	322-36	2013
Takayama K, et al.	3D Spheroid Culture of hESC/hPSC-derived Hepatocyte-like Cells for Drug Toxicity Testing.	Biomaterials.	2013 Feb; 34(7)	1781-9	2013
古江一楠田美保	TOPICIII : ヒトiPS細胞研究の海外動向	HUMAN SCIENCE	(Vol. 24 No. 3)	p24-27	2013
Shiho Oeda, et al.	Induction of Intermediate Mesoderm by Retinoic Acid Receptor Signaling from Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells, Int J Dev Biol,	J. Dev. Biol	57	383-389	2013
Watanabe H, et al.	HHEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin	PloS One		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 TGF β receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision.	Development	141	91-100	2014

Chioko Naga o*, Nozomi Nagano, Ken ji Mizuguchi	Prediction of Detailed Enzyme F unctions and Identification of Specificity Deter mining Residues by Random Forests	PLoS ONE	9(1)	doi:10. 1371/jo urnal.p one.00 84623	January 8, 2014
Yamada, R et al.	Control of adhesion of human in duced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsil oxane coated with vitronectin an d γ -globulin."	Journal of Biosci ence and Bioengi neering.		doi: 1 0.1016/ j.jbiosc. 2014.0 2.009	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

2.6 幹細胞の実用化のための培養技術の標準化における課題

2.6.1 培養技術の標準化の必要性

2.6.1.1 はじめに

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は細胞治療へ応用が期待されている。一方、分化細胞を原材料とする製剤やワクチン作成、薬効・毒性評価などスクリーニングツールとしての利用など創薬分野にも広く期待されている。実用化には、細胞の品質を確保し、安定的に大量供給できることが重要である。ヒト ES/iPS 細胞株は株間により細胞特性が異なり¹⁾、細胞そのものを標準化するのは難しい。一方、培地や足場材料などの培養環境や培養記録を整備することでヒト ES/iPS 細胞培養技術を標準化し、安定的に細胞を供給することは可能だろう。本節では、ヒト ES/iPS 細胞の実用化に向けた培養技術の標準化と体制作りについて概説する。

2.6.1.2 培養技術の標準化の必要性

ヒト ES/iPS 細胞は株間の差も大きいですが、癌細胞や体細胞などと比べて、デリケートで高品質を維持することは大変難しいいたために、培養技術の差による品質の違いも大きい^{2),3)}。ISCI (International Stem Cell Initiative) プロジェクトでは、日本を含めた世界 11 か国の研究者らが共同でヒト ES 細胞株の特徴を比較し、ヒト ES 細胞研究の標準化が進められている¹⁾。2011 年には、19 か国 38 研究室からヒト ES 細胞 125 株とヒト iPS 細胞 11 株を集めて比較分析を実施し、ゲノムの変化などについての発表がなされた⁴⁾。これまでもヒト ES 細胞^{5),6)}、およびヒト iPS 細胞^{7),8)} のゲノム不安定性が報告されている。倍加速度が速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可能性が予測されており、比較的小さな (25 cm² 前後まで) 培養器で培養することが望ましいとされている⁹⁾。筆者らも、京都大学や独立

行政法人国立成育医療研究センターなどと連携を持ち、各種ヒト ES/iPS 細胞株の比較解析を行っている。ヒト ES/iPS 細胞の品質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¹⁰⁾。培養技術の標準化が実用化に向けて重要である。

2.6.2 培養液

2.6.2.1 培養液の問題点

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 (Mouse Embryonic Fibroblast, MEF) として使用し、ウシ血清、あるいは代替血清 (KnockoutTM-Serum Replacement, KSR) と線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)¹¹⁾ 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、KSR は組成が公開されておらず、動物由来成分を含むためロット差がある。さらに、培養維持した細胞には動物由来成分であるシアル酸・N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) が確認される¹²⁾。病原体をできるだけ排除し、安定した品質を得るためには、未知の成分を含まず、精製された成分からなる無血清培養が望ましい。近年、ヒト幹細胞における培養液の重要性がようやく理解され、し烈な無血清培地開発競争が生じている。

2.6.2.2 defined medium

(1) 無血清培養とは

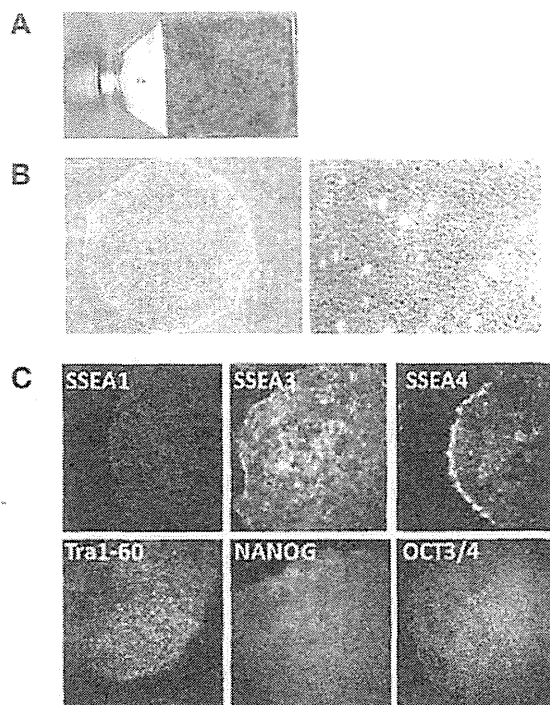
無血清培養とは、既知の成分よりなる培地を用いた chemically defined serum-free culture¹³⁾ であり、単に血清を除いた基礎培地のみによる培養ではない。血清には細胞増殖因子、分化促進因子、接着因子やホルモンだけでなく、未知の因子やプリオンやウイルスなどの病原体を含んでいる可能性がある。1975年に、ゴードン・H・サトウ (Gordon H. Sato) 博士^{14), 15)} が血清の役割とは、それに含まれるホルモン、増殖因子、接着因子などが細胞の増殖を促進することであり、これらの因子を基礎培地に加えることにより血清を

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（インシュリン、トランスフェリン、プロゲステロン、セレンウム、プトレッシン）¹⁶⁾が開発された。その後、5因子（インシュリン、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+オレイン酸）に改良された^{17), 18)}。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^{19)~24)}。一方、1993年にプライス（P.J. Price）博士らによって、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²⁵⁾が開発されたが、濃度は非公開である。昨今、市販培地の組成が非公開の場合が多いが、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となるのであり、組成公開が必要不可欠である。

無血清培養においては、その細胞に必要な接着因子を添加する必要がある。また、栄養因子が最少必要量であるため、確実な培地交換が必要である。微量の毒性物質などへの感受性も高いため、精製度の高い試薬を必要とする。継代によるダメージも大きい。そのため無血清培養には様々なノウハウが必要である。

(2) ヒトES/iPS細胞用無血清培地

市販品を含めて20例近く報告されているが、既知の組成からなる培地は3グループからの報告のみである。トムソン（James A. Thomson）博士らのグループにより開発されたmTeSRTM 1²⁶⁾、TeSRTM 2と新たに2011年に開発されたE8培地²⁷⁾、また、StemPro[®]、筆者らが開発したhESF9培地^{28), 29)}、さらに動物由来成分不含培地に改良したhESF-FX（図2.6.1）である。筆者らのhESFシリーズは、必要最低限な組成からなるため、添加因子の影響が高感度に解析でき、分化因子にも従順なため分化誘導にも使用できる。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で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



A: 継代4代目のアルカリフォスファターゼ染色
 B: 継代20代目のコロニー形態(左)と強拡大(右)
 C: 未分化マーカー抗体を用いた免疫染色像

図 2.6.1 動物由来成分不含 hESF-FX 培地による
 ヒト iPS 細胞(JCRB 1331, Tic)の培養

く、トランスフォーミング増殖因子- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) ファミリーや Wnt, インシュリン増殖因子などの様々な因子が関与していることが明らかとなっているが、これらのリガンドによる細胞内シグナルがすべて未分化維持に関与しているのではなく、分化にも関与し、相互に影響を与えているためメカニズム解明を難しくしている^{28), 30)~35)}。ISCI プロジェクトにおいて、5施設が8条件の培養条件を検討した。開発者は培養可能であるにもかかわらず、2条件のみが培養可能であった (Consortium, 2010 #4387)。それでもすべての株ではなかった。その培地・株ごとのノウハウの蓄積が必要だと考えられる。現状では培養維持には、mTeSR™ 1が広く使用されている。一方、添加因子などの解析や分化誘導には hESF9 が向いている。ヒト幹細胞培養の標準化は、培養条件を一つに決めるのではなく、その目

的にあった，ロット差のない培地を適正に使用することが必要である。

2.6.3 足場材料

2.6.3.1 足場材料の問題点

未分化状態を保持するための足場として，一般的にはMEFやマトリジェルが使われている。マトリジェルはマウス肉腫由来で様々なマトリックス，増殖因子や未知の因子が含まれており，効能確認をロットごとに行う必要がある。安定した培養を行うという観点からできるだけ精製された因子を使用するのが望ましい。しかし，培地との組合せにより細胞内シグナルへ影響を与えることが予測され，それに合わせて分散法も考慮する必要がある。

2.6.3.2 非哺乳動物由来因子

医療・創薬応用に向けて，培養から人畜共通感染症の危険性を取り除く必要がある。哺乳類由来因子は極力使用せず，その代替因子の使用が望ましい。近年，リコンビナントタンパク質の開発も進んでいるが，一方，海洋系因子などが培養細胞に有効であることが徐々に見出されてきている。マリンスキャフォールド上ではヒト骨膜細胞シートや初代骨芽細胞は骨活性が向上することや，テラピアのウロコを用いた培養基材では角膜細胞の増殖が促進するなどが報告されている^{36),37)}。また，筆者らはクラゲ由来コラーゲンが間葉系幹細胞に対して有効であることを見出している³⁸⁾。現在，このクラゲ由来コラーゲンをヒトES/iPS細胞の培養技術へ応用を試みている。

2.6.4 継代法

ヒトES/iPS細胞の培養において継代がもっとも難しいと言われる。品質管理の上では継代時に単一細胞へ分散させて正確な細胞数を把握することが望ましい。しかし，ほとんどの細胞が単一では生存できない。ROCKインヒビターを使用すれば生存できるが³⁹⁾，継続的な使用により異常クローンの増殖を促進する可能性も否定できない。米英では安定性を選択し，機械的，あるい

はエチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) やコラゲナーゼなどによりコロニーを 50~100 個ぐらいの細胞集団にして継代が行われている^{39), 40)}。操作者による差も大きく、改良がもっとも必要な事項であると考えられる。

2.6.5 品質検証

2.6.5.1 培養記録

ヒト ES/iPS 細胞の培養技術を標準化するためには、忠実に培養操作を記録することが重要である。経験的な事例であるが、品質に問題が出た場合3代継代後に影響が出ることが多い。詳細に記録された培養記録から、品質低下に与えた影響を同定できることも多い。筆者らはこれらの点を踏まえた培養記録用紙を作成した(表 2.6.1)¹⁰⁾。現在、他の研究室などに記録用紙の試用をお願いしている。共通の記録用紙を使用することで、培養技術に関して共通のプラットフォームで意見交換することができ、培養技術の標準化につながると期待される。

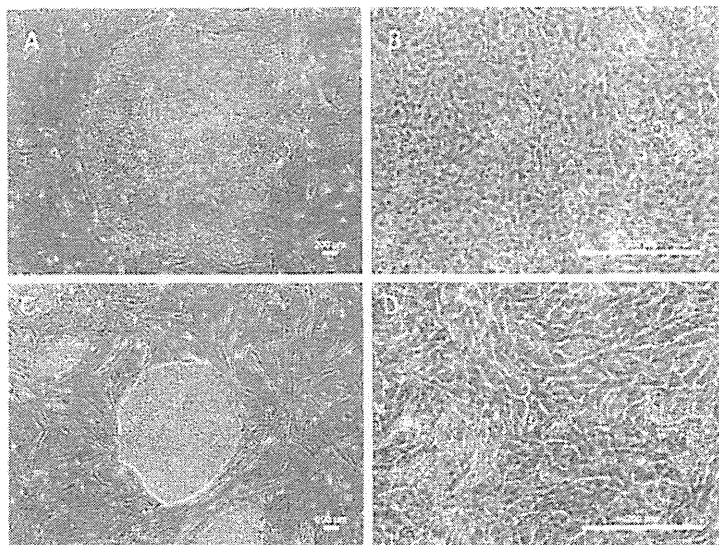
(1) 位相差顕微鏡像

現在までに多能性の根拠となる絶対的なマーカーは発見されておらず、いくつかの解析方法を用いて未分化性や多能性を同定する必要がある。その中で、形態は重要な評価基準の一つである⁴⁰⁾。未分化な ES/iPS 細胞は、細胞質がほとんどなく、丸い核を持った細胞がコンパクトに集合したコロニーを形成し、細胞間境が明瞭でない特徴的な様相を呈する。遺伝子解析などを行っていなくても、細胞の写真により異常を予測できる場合もある。コロニーの形態がわかるように弱拡大と、細胞質や核の状態がわかるように強拡大の画像を取得しておくことが重要である(図 2.6.2)。

表 2.6.1 培養記録用紙

[Tiss.Cult.Res Commun. 30:145-157 (2011) 図1より転載]

細胞継代 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	IGR	SNL			EC(2102EP)	NTERA2	
	hESC	KnES-1	KnES-3	H1	H9	HES3	HES4			
	hPSC	201B7	201B2							
Passage flo	Tic	Squaky	Dotcom	Toe	Lollipop	UTA-1	UTASF2-2	PS(Forsklin)-1		
細胞の状態	P-()	前回の継代日	月 日	今回の継代日は	予定通り	予定より早い	予定より遅い			
写真	なし	x40 ()	x100 ()	x200 ()	ファイル格納場所					
機器	遠心機	37°C 湯浴		CO2インキュベーター						
medium	添加塩	Lot: Rts	EB (-2Me)		Lot: EB(-)	mTeSR		Lot:	Variance	
	成育塩	Lot: Sp	EB+2ME		Lot: EB(+)	DMEM+FBS		Lot: EG		
	hESF8	Lot: E8	Condition Med		Lot: CMC	FGF-2		Lot:		
	hESF6	Lot: E6	Condition Med		Lot: CMB	activin		Lot:		
	hESF-FX	Lot: FX	Condition Med		Lot: CMI	PDGF		Lot:		
	hESF-DHF	Lot: Edf	PBS		Lot:	ROCK inhibitor		Lot:		
	必要量	培地	ml	37°C 湯浴		分				
用事添加因子	FGF-2	10ng/ul	x() microl	最終濃度	ng/ml		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	Dipbase	Lot: D		CTK	Lot: CTK		Variance			
	High Trypsin/EDTA	Lot: TE(H)		アキュターゼ		Lot:				
	Low Trypsin/EDTA	Lot: TE(L)								
	Media Trypsin/EDTA	Lot: TE(M)								
	STEMPRO EZ Passag* Tool									
必要量		ml								
分散枚数	25cm フラスコ	75cm フラスコ		60mm Dish		90mm Dish		Variance		
	6well plate	12well plate		24well plate						
洗浄/培地交換	1回目PBS	ml/each		1回目培地		ml/each		Variance		
	2回目PBS	ml/each		2回目培地		ml/each				
剥離液処理	ml/each		Variance							
処理時間	室温	~1分	~2分	~7分	~10分					
	37°C	~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	コロニーの半分程度剥がれた	コロニーがほとんど浮き上がった	ほとんど変化ない						
	剥離剤吸引除去	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のでスクレーパーした x()						
	scraper	x()								
回収	チューブに回収	直接次の培養器に播種		Variance						
遠心速度	200rpm (10G)	300rpm (20G)	700rpm (90G)	1000rpm (190G)	1200rpm (270G)					
	1min	2min	3min	5min						
上清を除去	Wash 培地添加		ml/each		pipetting		x()			
	緩り返し		x()							
調製	細胞浮遊液	ml		pipetting		x()				
	ヘモサイトメーター	() micro		mix with trypanblue		() micro		() cells/ml		
	コールターカウンター	() ml		()		() cells/ml				
	GEカウンター	() micro		()		() cells/ml				
容器と枚数	25cm フラスコ	x()	75cm フラスコ	x()	60mm Dish	x()	90mm Dish	x()	x()	
	6well plate	x()	12well plate	x()	24well plate	x()	x()	x()	x()	
インキュベーター	No. :		CO2濃度 :		%					



- A : ヒト ES 細胞 KhES-1 (京都大学再生医科学研究所より分配) の未分化性の良い状態の弱拡大写真
 B : A の強拡大写真
 C : A の培養時とは異なるロットのフィーダー細胞を用いて未分化性があまり高くない状態の弱拡大写真
 D : C の強拡大写真

図 2.6.2 ヒト ES 細胞の位相差顕微鏡像¹⁰⁾

[*Tiss.Cult.Res Commun.* 30:145-157 (2011), p.147 図 2 より転載]¹⁰⁾

2.6.6 実用化に向けた体制作り

移植あるいは細胞製剤用ヒト ES/iPS 細胞の培養には、医薬品 Good Manufacturing Practice (GMP) レベルが求められると言われる。しかし、細胞を完全に滅菌することは不可能であり、医薬品と同じ品質管理を行うことは不可能であることから、新しい考え方による基準作りが求められている。基準がなければ、管理されてない細胞が民間で利用されレシピエントの生命を危うくする可能性もある。未知の分野であり、どう管理をするべきなのか予測できないジレンマがある。少なくとも培養液や培養工程は明らかにして、多くの研究者により多角的に検討されるべきであると考え、様々な問題を克服して高品質の細胞を安定して供給するためには、細胞培養を技術としてだけでなく、体系的な細胞培養学として確立していく必要があるのではないだろうか。

2.6.7 細胞培養士の認定制度の確立

品質のよい幹細胞を維持するためには、高い培養技術を有する技術者が必要である。技術者を育てるには、培養に熟練した指導者が必要である。しかし、幹細胞を培養するためにはまず、基本的な培養技術・知識を身につけておく必要がある。日本組織培養学会は、細胞培養における基盤的技術の講習会を開催し、細胞培養士の資格を授与するとともに、指導者認定制度も立ち上げている(図 2.6.3)。ヒト幹細胞の実用化のためには、細胞培養学に基づいた基本的な培養技術の標準化を図る必要がある。

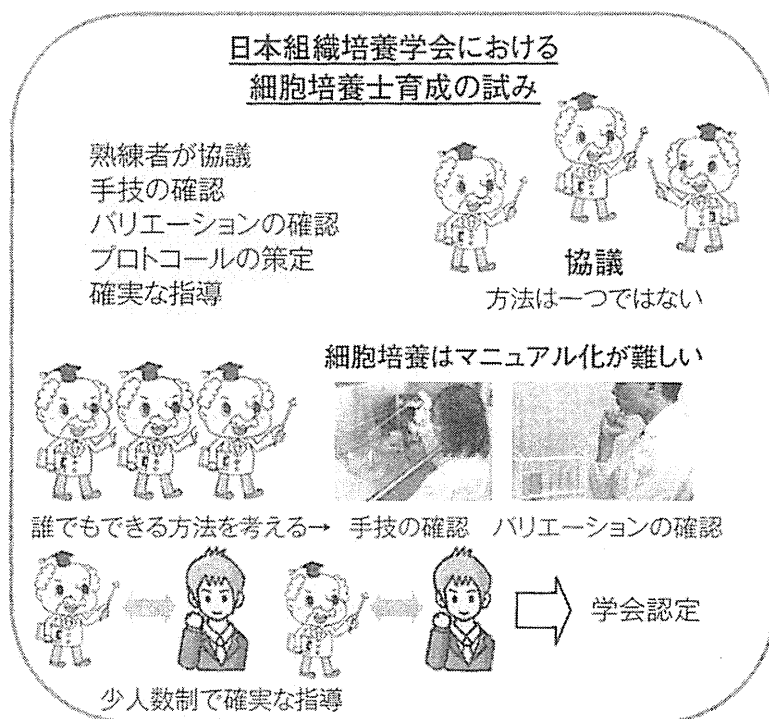


図 2.6.3 細胞培養士の認定制度

2.6.8 おわりに

現時点においては、ヒト ES/iPS 細胞はその樹立の方法や培養条件のみならず、培養技術が研究室により異なるために、結果が追試できないことも多い。実用化においては、ヒト ES/iPS 細胞の細胞特性を深く理解し、培養技術・品

質評価を定義することで世界中どこでも誰が行っても同じように細胞を調製できることが重要である。国内外において2012年現在、ヒト多能性幹細胞の臨床試験が開始されつつある。実用化に向けて、ロット差のない組成の明らかな培地を用い、培養工程の正確な記録を行うことにより、培養技術の標準化を進めていく必要がある。

参考文献

- 1) Adewumi, O., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*.
- 2) Furue, M.K. (2008). Standardization of human embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell research in Japan. *Tissue Culture Research Communications* 27:139–147.
- 3) Furue, M.K. (2009). Standardization of human embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell research in Japan: How to detect differentiation potency of human ES/iPS cells. *Tissue Culture Research Communications* 28:129–133.
- 4) Amps, K., et al. (2011). Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol* 29(12):1132–1144.
- 5) Draper, J.S., et al. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22(1):53–54.
- 6) Baker, D.E., et al. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 25(2):207–215.
- 7) Ramos-Mejia, V., et al. (2010). iPSC lines that do not silence the expression of the ectopic reprogramming factors may display enhanced propensity to genomic instability. *Cell Res* 20(10):1092–1095.
- 8) Kinoshita, T., et al. (2011). Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407(2):321–326.
- 9) Olariu, V., et al. (2010). Modeling the evolution of culture-adapted human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 4(1):50–56.
- 10) Hirata, M., et al. (2011). Quality control for human embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cells on the bench. *Tissue Culture Research Communications* 30:145–157.
- 11) Amit, M., et al. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 70(3):837–845.

- 12) Hayashi, Y., et al. (2010). Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS One* 5(11): e14099.
- 13) Barnes, D. and G. Sato (1980). Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22(3):649–655.
- 14) Sato, G. (1975). Biochemical Actions of Hormones. *Academic* pp.391–396.
- 15) Hayashi, I. and G.H. Sato. (1976). Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature* 259(5539):132–134.
- 16) Bottenstein, J., et al. (1979). The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol* 58:94–109.
- 17) Sato, J.D., Kawamoto, T., Okamoto, T. (1987). Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro. *J Exp Med* 165(6): 1761–1766.
- 18) Sato, J.D., et al. (2002). Specific cells and their requirements. in *Basic Cell Culture: A Practical Approach, 2nd Edn.*, J.M.Davis, Editor., Oxford University Press, England. pp.227–274.
- 19) Furue, M., et al. (1994). Primitive neuroectodermal tumor cell lines derived from a metastatic pediatric tumor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 30A(12):813–816.
- 20) Furue, M. and S. Saito. (1998). Hepatocyte growth factor regulates activin bA mRNA in submandibular gland. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34:520–523.
- 21) Furue, M., et al. (1999). Effects of hepatocyte growth factor (HGF) and activin A on the morphogenesis of rat submandibular gland-derived epithelial cells in serum-free collagen gel culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35(3):131–135.
- 22) Furue, M., M. Asashima, and R. Hata (2000). Establishment of RSMG-2 cell line derived from male rat submandibular gland in serum-free defined culture. *Tissue Culture Res. Commun* 19:199–202.
- 23) Furue, M., et al. (2001). Activin A induces expression of rat Sel-11 mRNA, a negative regulator of notch signaling, in rat salivary gland-derived epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 282(3):745–749.
- 24) Furue, M., et al. (2005). Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41(1-2):19–28.
- 25) Brewer, G.J., et al. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B 27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35(5):567–576.
- 26) Ludwig, T.E., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24(2):185–187.
- 27) Chen, G., et al. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 8(5):424–429.

- 28) Furue, M.K., et al. (2008). Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36):13409–13414.
- 29) Na, J., Furue, M.K., Andrews, P.W. (2010). Inhibition of ERK 1/2 prevents neural and mesendodermal differentiation and promotes human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cell Res*
- 30) Vallier, L., Reynolds, D., Pedersen, R.A. (2004). Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol* **275**(2):403–421.
- 31) James, D., et al. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* **132**(6): 1273–1282.
- 32) Pebay, A., et al. (2005). Essential roles of sphingosine-1-phosphate and platelet-derived growth factor in the maintenance of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **23**(10):1541–1548.
- 33) Dvorak, P., Hampl, A. (2005). Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol* **43**(4):203–208.
- 34) Avery, S., Inniss, K., Moore, H. (2006). The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* **15**(5):729–740.
- 35) Ding, V.M., et al. (2011). Tyrosine phosphorylation profiling in FGF-2 stimulated human embryonic stem cells. *PLoS One* **6**(3): e17538.
- 36) Kawase, T., et al. (2009). Osteogenic activity of human periosteal sheets cultured on salmon collagen-coated ePTEE mesh. *Materials in medicine* **21**:731–739.
- 37) Lin, Z., et al. (2011). In vitro Evaluation of Natural Marine Sponge Collagen as a Scaffold for Bone Tissue Engineering *International Journal of Biological Sciences* **7**: 968–977.
- 38) 柳原佳奈, 寺田聡, 番戸博友, 猪爪優子. (2011). 特願 2011-167665. 幹細胞の分化誘導法.
- 39) Watanabe, K., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **25**(6):681–686.
- 40) Initiative, T.I.S.C.B. (2009). The International Stem Cell Banking Initiative. *Stem Cell Rev and Rep* **5**:301–314.

<発生・再生>

17. 新規 iPS/ES マーカー抗体とその応用

川崎敏祐，川崎伸子，中尾広美，松本尚悟，古江-楠田美保，豊田英尚

ヒト iPS (induced pluripotent stem) 細胞をマウスに免疫して iPS/ES (embryonic stem) 細胞表面マーカー認識抗体 R-10G を得た。既存のマーカー抗体である TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-4 などと異なり，ヒト EC (embryonal carcinoma) 細胞 (胎児性がん細胞) には結合しないため，ヒト iPS/ES 細胞の品質管理，細胞集団選別試薬として有効である。R-10G はこれまで免疫学的に検出することができなかった低硫酸化ケラタン硫酸を認識する抗体であり，免疫沈降法，ウエスタンブロット，免疫組織染色などで，これまで見落とされていた低硫酸化ケラタン硫酸の検出に有効なツールとなることが期待される¹⁾。

はじめに

細胞表面の糖鎖は分化・発生のさまざまな段階において多様に変化する。糖鎖認識抗体はこれらの変化を鋭敏に察知するプローブである (GlycoEpitope DB)²⁾。幹細胞研究においても，ヒト iPS/ES 細胞の表面マーカーとして汎用されている³⁾⁴⁾。すなわち，SSEA-3, SSEA-4 のエピトープはグロボシリーズの糖脂質であり，TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2, GCTM343 のエピトープはプロテオグリカンの一種ケラタン硫酸である。しかしながら，ここで注意しなければならない

のは，これら既存の抗体のほとんどが EC (embryonal carcinoma) 細胞 (胎児性がん細胞) を免疫原として得られたものであることである。これらは，EC 細胞表面マーカー検出抗体として開発されたものが，iPS/ES 細胞にも陽性であることを利用しているのであり，iPS/ES 細胞に特異的な成分のみを認識するものではない。このような背景のもと，われわれは，ヒト iPS 細胞を免疫原としてヒト iPS 細胞特異的なマーカー抗体を得ることを目的として研究を進め，以下に述べるような新規な糖鎖認識抗体を得ることができた。

■ 抗体の作製

免疫原としては，無フィーダー無血清培養した iPS 細胞 Tic (JCRB1331) を用い，マウスの腹腔あるいは皮下に注射した。1 カ月後にリンパ節および脾臓リンパ球細胞を採取し，マウスミエローマ細胞 (P3U1) と PEG 法により細胞融合した。融合細胞を HAT 培地で培養し，得られたハイブリドーマの培養上清を，iPS 細

[キーワード&略語]

iPS 細胞，ES 細胞，糖鎖エピトープ，ケラタン硫酸，ポドカリキシン

EC 細胞：embryonal carcinoma cells

ES 細胞：embryonic stem cells

iPS 細胞：induced pluripotent stem cells

Production and Characterization of Novel iPS/ES Marker Antibodies

Toshisuke Kawasaki¹⁾/Nobuko Kawasaki¹⁾/Hiromi Nakao¹⁾/Shogo Matsumoto¹⁾/Miho Kusuda-Furue²⁾/Hidenao Toyoda³⁾ : Research Center for Glycobiotechnology, Ritsumeikan University¹⁾/Department of Disease Bioresources Research, National Institute of Biomedical Innovation²⁾/College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University³⁾ (立命館大学糖鎖工学研究センター¹⁾/医薬基盤研究所難病・疾患資源研究部²⁾/立命館大学薬学部³⁾)