

表 R-10G抗体のヒトiPS/ES細胞マーカー検出試薬としての評価

	R-10G	TRA-1-60	TRA-1-81	SSEA-4	SSEA-3	SSEA-1
Tic	+++	++++	++++	+++	+++	+
KhES-3	+++	++++	++++	++++	+++	+
2102Ep	+	++++	++++	+++	+++	+

InCell Analyzer 2000™を用いてR-10Gおよび既知のマーカー抗体のiPS細胞 (Tic), ES細胞 (KhES-3), EC細胞 (2102Ep) への結合性を解析した。文献1をもとに作成

注) SSEA-1はマウスiPS/ES細胞認識抗体でありヒトiPS/ES細胞を認識しない

胞を固定化したウェルプレートに加えて反応させTic細胞に結合するハイブリドーマ29株を得た。次に、これらのハイブリドーマ上清について、EC細胞の一種である2102Ep細胞への結合性を調べた。数種のハイブリドーマ上清は、iPS細胞表面を強く染色したが、2102Ep細胞をほとんど染色しなかった。すなわち、本研究の目的としたiPSとEC細胞とを区別するiPS/ES特異的モノクローナル抗体が得られた。このうちハイブリドーマR-10Gの培養上清は、Tic細胞抽出物をSDS-PAGEした後のウエスタンブロットにおいて、高分子領域にブロードではあるが明瞭なバンドを示したので、まず、このハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体R-10Gについて性質を解析した。

2 R-10Gは新規なiPS/ES細胞の表面マーカー検出抗体である

R-10Gのヒト由来iPS細胞株 (Tic), ES細胞株 (KhES-3) およびEC細胞株 (2102Ep) に対する結合性を、従来のマーカー検出抗体 (以下、マーカー抗体と記す) であるTRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3, SSEA-4, SSEA-1の結合性と比較した。表に示すようにR-10GはiPS細胞株 (Tic), およびES細胞株 (KhES-3) によく結合するが、EC細胞株 (2102Ep) にはわずかししか結合せず、優れたiPS/ES細胞の表面マーカー検出抗体であることが示された。これに対し、従来のiPS/ES細胞の表面マーカー抗体であるTRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3, SSEA-4はiPS細胞株, ES細胞株のみならずEC細胞株ともよく反応した¹⁾。

3 R-10Gにより明らかにされた未分化iPS細胞の多様性

R-10Gにより蛍光染色した培養iPS細胞のレーザー

共焦点像をTRA-1-60, TRA-1-81による染色像と比較して図1に示した。R-10Gは、核染色されるほとんどのiPS (TO-PRO3陽性) 細胞に、程度の差はみられるものの結合している (緑色)。TRA-1-60 (図1A, 赤色), TRA-1-81 (図1B, 赤色) も同様にほとんどのiPS細胞に結合している。しかし、R-10GとTRA-1-60あるいはR-10GとTRA-1-81の染色像をマージさせると、一部の細胞では両者のエピトープが同一場所あるいはごく近傍にほぼ等量存在し、黄色として観察されるが、ほとんどの細胞ではどちらかのエピトープが優位に発現していた。1つのiPS細胞コロニーを構成する未分化状態の細胞群が多様な表面抗原を発現していることにはいささか驚いたが、糖鎖が細胞表面の変化を鋭敏に察知するプローブであることを改めて実証したと考えている。このような糖鎖の変化がゲノムをはじめとする細胞内成分のどのような変化を表しているのか、細胞の分化の程度や方向性などの相違を示しているのかなど興味をもたれる。

4 iPS細胞のR-10G抗原はポドカリキシンである

iPS細胞表面のR-10G結合抗原タンパク質は250kDa以上の高分子領域に幅広く拡散した単一バンドを示した。そこで、R-10G抗体カラムクロマトグラフィーにより本抗原を精製し、ウエスタンブロットのバンドの位置に相当するタンパク質バンドを切り取り、そのトリプシン分解物をLC/MS/MSにかけ分析した (国立医薬品食品衛生研究所, 川崎ナナ博士のご協力による)。その結果、本抗原は、ポドカリキシン (podocalyxin) と同定された¹⁾。ポドカリキシンは、腎臓の糸球体上皮細胞 (足細胞) に見出された膜貫通型の糖タンパク質である⁵⁾。最近、TRA-1-60, TRA-

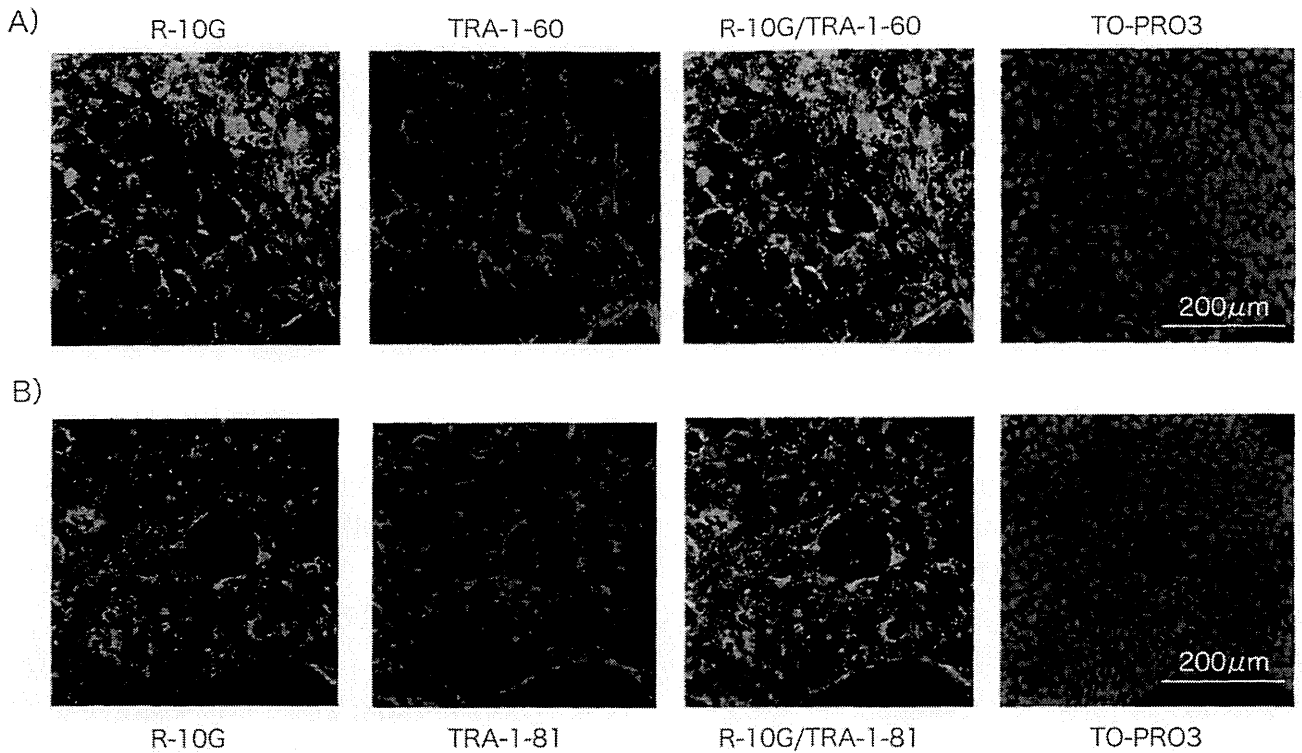


図1 R-10G エピトープのヒト iPS 細胞表面での局在性

A) 培養Tic細胞をR-10G (緑) およびTRA-1-60抗体 (赤) で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
 B) R-10G (緑) およびTRA-1-81抗体 (赤) で二重染色

1-81のコアタンパク質もポドカリキシンポリペプチドであると報告されている⁶⁾。すなわち、R-10G, TRA-1-60, TRA-1-81は同一ポリペプチド上に発現している異なったエピトープを認識する抗体である (図2)。

5 R-10G エピトープは低硫酸化ケラタン硫酸である

R-10G 抗原タンパク質のエピトープの解析は、まず、本抗原タンパク質を各種グリコシダーゼで消化し、消化処理前後の変化をSDS-PAGE, ウェスタンブロットにより解析する方法で行った。その結果、本抗原は、PNGase F, ノイラミニダーゼ, α 1-2および α 1-3/4フコシダーゼ, コンドロイチナーゼABC, ヘパリナーゼ, ヘパリチナーゼ消化によっては、ウェスタンブロットの位置および濃度に変化がみられないのに対して、ケラタナーゼ, ケラタナーゼII, エンド- β -ガラクトシダーゼで消化すると、R-10G 陽性バンドは完全に消失した。後の3つの酵素はいずれもケラタン硫酸を分解する酵素であることから、エピトープはケラタン硫酸であると結論された。ケラタン硫酸は-3Gal β

1-4GlcNAc β 1-の2糖の繰り返し構造から構成されている。通常、GlcNAc 残基の6位は硫酸化されている。Gal 残基の6位は硫酸化されている場合 (A) と、されていない場合 (B) がある。(A) の繰り返し構造をもつ場合を高硫酸化ケラタン硫酸、(B) を低硫酸化ケラタン硫酸と便宜的に呼ぶことにする。上記の一連のケラタン硫酸分解酵素は異なる基質特異性を持ち、異なった結合部位で、ケラタン硫酸を分解することが知られているので、これらの性質を利用してケラタン硫酸の構造の概略を知ることができる (図3)。すなわち、本エピトープはエンド- β -ガラクトシダーゼにより容易に消化されたが、このことはほとんどのGal 残基の6位は硫酸化されていないことを示唆している。次に、より直接的な証拠を得るために、本抗原タンパク質をケラタナーゼIIで消化し、消化物をポストカラム検出法を用いたイオンペア逆相 HPLCで分析した⁷⁾。その結果、ほとんどすべての分解物がGal-GlcNAc (6S) の2糖であることが示された¹⁾。したがって、本エピトープを構成するケラタン硫酸は、ガラクトース残基の硫酸化の度合いの低い、いわゆる低硫酸化ケラ

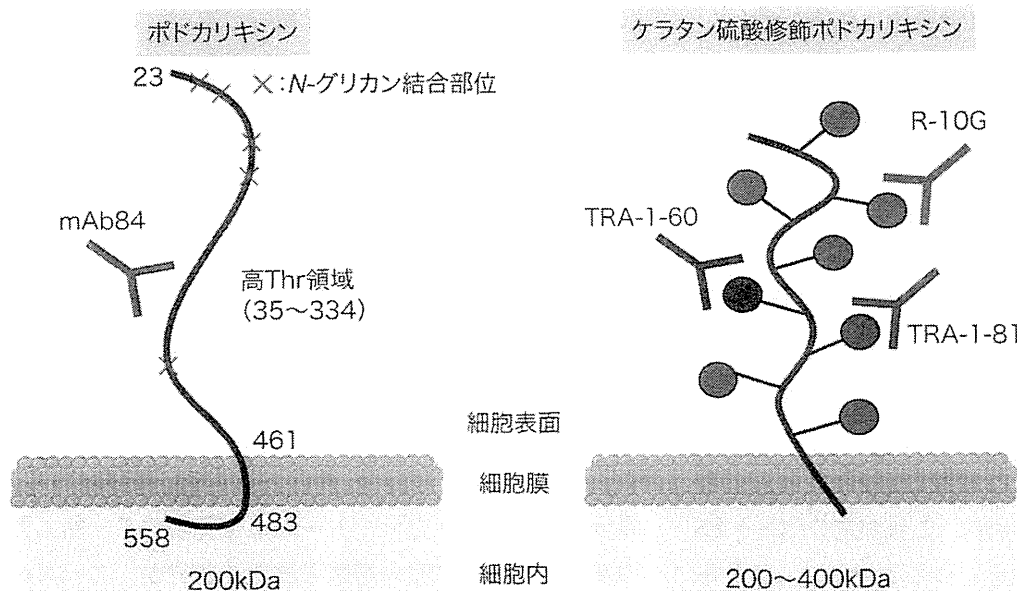


図2 ポドカリキシン分子上の多分化能細胞性エピトープ
一部は文献1をもとに作成

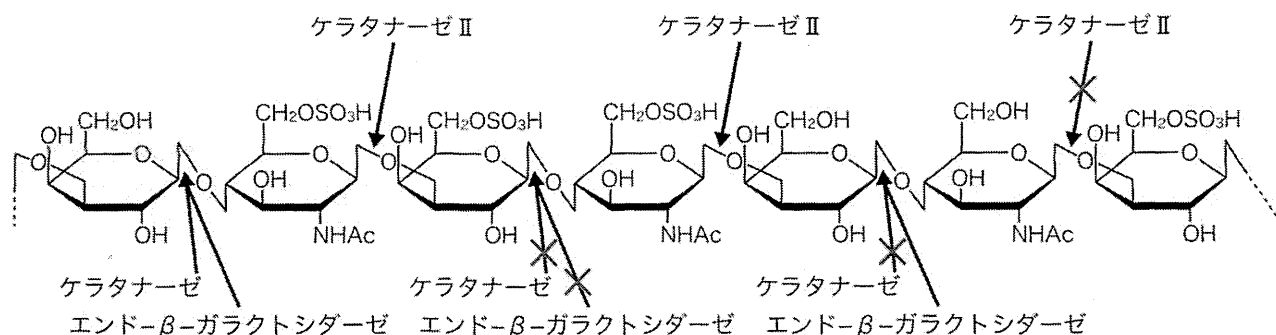


図3 ケラタン硫酸の構造と各種ケラターゼ分解酵素の基質特異性

図中、X印のついた矢印(基質切断部位)では酵素反応が進まないことを示す。文献1をもとに作成

タン硫酸であることが明らかとなった。

なお、ケラタン硫酸を認識する抗体はいくつかすでに市販されている。なかでも5D4抗体はケラタン硫酸の同定によく利用されている。5D4は高硫酸化ケラタン硫酸を認識するとされており⁷⁾、R-10Gとは異なる特異性をもつと予想された。実際、5D4はヒトiPS細胞に対して結合性を示さなかった。また、R-10Gおよび5D4はいずれもウシ角膜由来のケラタン硫酸と結合するが、5D4の結合はサメ軟骨由来の高硫酸化ケラタン硫酸の添加により顕著に阻害されるのに対し、R-10Gの結合はほとんど影響を受けなかった。すなわち、両者は同じケラタン硫酸認識抗体ではあるが、その性質は大きく異なっている¹⁾。

このように、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。

⑥ 脳組織に発現するR-10G エピトープ

iPS/ES細胞の表面マーカー抗体は、必ずしもiPS/ES細胞のみを染色するというわけではない。同一の、あるいは交差反応性を示すエピトープが、胎児あるいは成体組織に検出されることもまれではない。例えば、TRA-1-81は、乳管、胃、小腸、大腸などに発現していることが知られている⁸⁾。そこで、R-10Gについてヒト組織アレイ(18組織、成人/胎児)を用いて組織染色で体内分布を調べてみた。その結果、成人の脳・小脳にiPS/ES細胞に匹敵する染色がみられたが、その他には胎児肝臓がわずかに染色されたのみであった。すなわち、R-10Gエピトープの体内分布は既存のiPS/ES細胞マーカー抗体に比べても非常に限定されて

おり、多分化能細胞と脳組織に特徴的に発現している。なぜ、このような特徴的な分布を示すのか、多分化能細胞と脳組織でのそれぞれのエピトープ糖鎖の構造、生物学的役割の解明が期待される。

7 抗体による多分化能細胞の選択的除去

最近、ヒトES細胞を免疫原としてモノクローナル抗体が作製されている (mAb84, SSEA-5)。このうちのmAb84はポドカリキシンのポリペプチド部分をエピトープとするといわれているが (図2)、R-10Gと同様に、ヒトES細胞を認識するがEC細胞を認識しない⁹⁾。mAb84 (IgM) の特色は、これが未分化ヒトES細胞に対して細胞傷害活性をもつことである。再生医療を臨床応用するための今後の課題として、細胞の均一性や安全性等の品質の確保、がん化の可能性の排除などがあげられている。これらの課題の解決のために、iPS/ES細胞マーカー抗体が役立つと期待されている。すなわち、未分化型細胞が特定の細胞系譜に分化するプロセスで、もし未分化型細胞が残存すると、これらは潜在的に、好ましくないがんを形成する可能性がある。そこで、このような試料中に残存する未分化型細胞を破壊する活性をもつ抗体はがん化の可能性の排除に有効であると考えられる。mAb84が注目されているのはこのような理由によるものである。

SSEA-5はH型血液型抗原Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β -Rを認識する抗体である¹⁰⁾。本抗体で標識し、FACS (fluorescence-activated cell sorting) にかけて分画することにより、がんの発生確率を大幅に減らすことができると報告されている。

さて、われわれは、R-10G抗体の性質がほぼ明らかになったので、現在2番目のヒトiPS/ES細胞特異的モノクローナル抗体の解析を進めている。詳細については、別の機会に紹介したいが、この2番目の特異的モノクローナル抗体はヒトiPS細胞の膜糖脂質をエピトープとし、mAb84同様に未分化多能性細胞を傷害する活性をもつ。今後の研究の展開に興味もたれる抗体である。

おわりに

R-10Gとは異なるがよく似た認識特異性をもつTRA-1-60, TRA-1-81抗体について少し付け加えたい。iPS細胞に含まれるTRA-1-60およびTRA-1-81

エピトープは一連のケラタン硫酸分解酵素により分解を受けることから、これらの抗体もケラタン硫酸認識抗体と思われる。また、これらのエピトープが5D4エピトープを含まない多分化能細胞に発現していることから、R-10G同様に低硫酸化ケラタン硫酸を認識する抗体であると考えられる。しかし、TRA-1-60についてはシアル酸がエピトープであるとの報告がある一方^{11) 12)}、最近の糖鎖マイクロアレイを用いた実験では、TRA-1-60, TRA-1-81ともにGal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAcを最小のエピトープとすると報告されている¹³⁾。いまだ研究の余地の多い領域である。多分化能細胞の分化マーカーとして発現する一連の低硫酸化ケラタン硫酸の構造と機能の研究が、これらの糖鎖の生物学的役割の解明につながることを期待している。

文献

- 1) Kawabe, K. et al. : *Glycobiology*, 23 : 322-336, 2013
- 2) GlycoEpitope DB <http://www.glyco.is.ritsumei.ac.jp/epitope/>
- 3) Adewumi, O. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 25 : 803-816, 2007
- 4) Wright, A. J. & Andrews, P. W. : *Stem Cell Res.*, 3 : 3-11, 2009
- 5) Kerjaschki, D. et al. : *J. Cell Biol.*, 98 : 1591-1596, 1984
- 6) Schopperle, W. M. & DeWolf, W. C. : *Stem Cells*, 25 : 723-730, 2007
- 7) Mehmet, H. et al. : *Eur. J. Biochem.*, 157 : 385-391, 1986
- 8) Andrews, P. W. et al. : *Hybridoma*, 3 : 347-361, 1984
- 9) Choo, A. B. et al. : *Stem Cells*, 26 : 1454-1463, 2008
- 10) Tang, C. et al. : *Nat. Biotechnol.*, 29 : 829-834, 2011
- 11) Andrews, P. W. et al. : *Recent Results Cancer Res.*, 123 : 63-83, 1991
- 12) Badcock, G. et al. : *Cancer Res.*, 59 : 4715-4719, 1999
- 13) Natunen, S. et al. : *Glycobiology*, 21 : 1125-1130, 2011

<筆頭著者プロフィール>

川崎敏祐 : [教育歴] 京都大学薬学研究科博士課程卒業, 薬学博士。[職歴] 1969年~2005年京都大学薬学研究科助手, 助教授, 教授。この間, 米国 NIH (NIAMDD) 留学 (1974~'76年)。2005年~立命館大学総合科学技術研究機構糖鎖工学研究センター。[研究領域] 糖鎖生物学, 生化学。[研究内容] 内在性糖鎖認識タンパク質 (動物レクチン) の生体防御および癌細胞認識に関する研究。脳神経系特異的糖鎖抗原の構造と機能に関する研究。ヒト多分化能細胞の表面マーカー糖鎖抗原の構造と機能に関する研究。

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・ウイスコンシン大学の 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 ①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 ①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.ssc.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.bcrc.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&hl=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。

日本国内では、公的バンクとして理化学研究所バイオリソースセンター（理研 BRC）と医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから iPS 細胞が提供されている。理研 BRC には、主に疾患特異的な iPS 細胞が寄託されており、JCRB 細胞バンクは品質管理法や評価法を開発しつつ、創薬研究へ応用可能な iPS 細胞のバンキングを目指している。公的バンクに登録されていない細胞株については、樹立を行っている京都大学再生科学研究所、京都大学 iPS 細胞研究所、また、国立成育医療センターから直接分与されている。

一方で、iPS 細胞を大量に作製して、医薬の評価や再生医療に応用するための研究とした巨大プロジェクトが始まっている。ハーバード大学幹細胞研究所のリサーチプログラムの一つである iPS Core Facility では、iPS 細胞作製を受託し、iPS 細胞の供給を行っている。カリフォルニア再生医療機構（CIRM）から 3230 万ドルの助成金を受けた Cellular Dynamics International（CDI）は、11 疾患 3000 人から 9000 株の iPS 細胞を構築する計画である。また、ヨーロッパでは、StemBANCC プロジェクトと称して、5 カ年の幹細胞の研究を推進するプロジェクトを開始しており、11 カ国 35 研究機関と 35 企業が産学連携で、500 人から 1500 株の iPS 細胞を構築し、新しい医薬や治療法の開発を目指している。

4 ヒト ES/iPS 細胞レジストリー

世界中で多くのヒト ES 細胞が樹立され、現在では 1000 種類以上とも言われ、iPS 細胞も含めると数千株以上とも言われている。細胞株の相互利用のため、データベースバンク体制の整備・登録（レジストリー）が構築されている（表）。米国では、2001 年オバマ政権となって新しくヒト ES 細胞研究のガイドラインが策定され、NIH は各ヒト ES 細胞株がガイドラインに沿うかどうか検討し、承認したヒト ES 細胞株をヒト ES 細胞登録（NIH Human Embryonic Stem Cell Registry）している。登録された細胞は NIH の研究費を使った研究で使用可能とされている。英国では Stem Cell Bank 運営委員会の管理している UK 幹細胞株登録（UK Stem Cell Line Registry）によって、英国内で使用可能な 218 種類の細胞株の情報が提供されている。EU は、バルセロナ幹細胞バンク（BLCB）とベルリン-ブランデンブルグ再生治療センター（BCRT）、UK 幹細胞バンクが連携し、ヨーロッパヒト胚性幹細胞登録（European Human Embryonic Stem Cell Registry）を作成し、hES 細胞を 690 株、hiPS 細胞を 52 株を登録している。韓国では、hES 細胞の登録が法律として整備され、現在は 60 種類以上の細胞株が登録されている。

この登録の際に浮き上がってきた問題が、細胞の命名法である。異なる研究機関で樹立された別個の細胞に全く同じ名前を命名する例や、混同しやすい名前が含まれている例が散見された。そのため、ヒト ES/iPS 細胞の国際的な相互利用に向けて、細胞登録における命名法の統一規格が求められている。日本において、国内細胞バンクが整備される 1984 年以前は、日本組織培養学会が細胞株を認定して JTC の番号を付与して登録する事業を実施していた。公的バンクが整備され、細胞の品質管理が進んできている昨今、培養細胞のクロスコンタミネーションが明らか

となってきた。樹立した細胞株は、できるだけ公的バンクに寄託し、細胞の品質が確認されたものを研究に使用することが望ましい。公的バンクに寄託されれば、各バンクで細胞登録番号が付与され、混乱は防げる。しかし、一般名で論文検索された場合にはやはり混乱が生じる。2010年の国際幹細胞学会 (ISSCR) および ISCI のワークショップで命名法について議論され、「ヒト ES/iPS 細胞株命名法および細胞登録に関する統一規格の案」として、米国科学誌「Cell Stem Cell」2011年に掲載され¹²⁾、この提案についてコメントも発表された¹³⁾。これらの状況について、著者らは2012年に概説した¹⁴⁾。相互利用するためには不可欠な細胞登録における「細胞株の命名法」に関しても標準化することが現在の重要課題であり、国内でも議論が必要である。

5 培養法の開発と標準化

Thomson らによって樹立された ES 細胞には、マイトマイシン C あるいは γ 線照射により MEF を不活性化したマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) をフィーダー細胞として、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), あるいは DMEM と F12 培地を 1 : 1 に混合した DM/F12 を基礎培地にして、20% 牛血清を加えて使用されていた¹⁾。しかし、血清成分には、ヒト ES 細胞の分化誘導や増殖阻害を行う成分が含まれていることから、近年では、KnockOut DMEM (ライフテクノロジー) の基礎培地に、代替血清 knockout-serum replacement (KSR, ライフテクノロジー) と塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を加えた条件が、世界的に標準的な使用とされている¹⁵⁾。KSR とフィーダー細胞を用いた方法は、多くのヒト ES/iPS 細胞株で安定な培養が可能であるが、KSR は動物由来成分を含んでいるため、ロット差がある。さらに、解凍後は2週間以内の品質保証しかなく、培地の管理が難しい。また、MEF のマウスの系統は樹立に使用したものをを用いることが望ましく、すべてヒト ES/iPS 細胞株について同じ系統の MEF をフィーダーとして使えるわけではない。また、MEF には多くの細胞が混在しており、品質は不安定でロットチェックが必要である。不死化線維芽細胞 STO 株は容易に増やすことができ、ロット差なく使用できるが、ヒト ES/iPS 細胞株との相性の問題や、長期間 (4日間以上) 培養できない問題点もある。

近年、ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持機構の解明が進み、従来の MEF を用いた培養方法から変わりつつある。細胞外マトリックスとして、ビトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチンなど精製された成分が使用されるが、マウス肉腫から単離した再構成基底膜成分マトリゲル (Becton, Dickinson and Company : BD) が用いられることも多い。

添加因子の影響を再現性高く正確に把握するためには、未知の成分を含まず、既知の成分からなる培地を使うべきであるという無血清培養法 (chemically defined serum-free culture) は1975年に Sato GH ら¹⁶⁾により提唱された。1979年に Bottenstein JE と Sato GH¹⁷⁾が神経細胞の無血清培養のためのサプリメント N2 を開発した。その後、Sato GH の息子の Sato JD ら^{18, 19)}によってハイブリドーマ用の無血清培地として RPMI と DMEM が 1 : 1 で混合した基礎培地

(RD) に、5 因子 (インシュリン、トランスフェリン、2-メルカプトエタノール、2-エタノールアミン、セレン酸ナトリウム) を加えた培地や、6 因子 (5 因子+オレイン酸) に改良された。一方、1993 年に、ギブコ社の Price PJ らによって²⁰⁾、インシュリンを含む 20 因子から構成されている B27 サプリメントが開発された。やがて、2006 年に Ludwig TE と Thomson らが mTeSRTM1 培地を発表し²¹⁾、現在、米国内で広く使用されている。DM/F12 を基礎培地とし、FGF-2、TGF- β 、LiCl、GABA、ピペコリン酸など既知の成分を含んだ培地とマトリゲルと併用して使用する。2007 年に、Wang L ら²²⁾ は組換え型ヘレグリン-1 β 、アクチビン A、LR3-IGF1、および FGF2 などを含む既知の組成からなる StemPro[®]hESC SFM 培地を開発した。2008 年には、筆者と Andrews PW らがマウス ES 細胞用無血清培地の基礎培地 ESF 培地²³⁾ に 9 因子のみを含む低たんぱく質培地 hESF9 を発表した²⁴⁾。さらに、動物由来成分を除き、必要最低限の組成からなる ES 細胞用培地 hESF-FX (特願 2011-019109)、hESF9_{2ai}²⁵⁾ に改良し、添加因子の影響を正確に解析できる培地として使用している。Thomson らは²⁶⁾ 2011 年に BSA やメルカプトエタノールを含まない 8 因子だけを含む低タンパク質培地 TeSRTM-E8TM を発表した。このほかにもフィーダー細胞を用いない無血清培地の開発が様々報告されているが、既知の精製された成分より構成され、成分が公開されている培地は、TeSRTM-E8TM、StemPro[®]hESC SFM と筆者らの培地 hESF シリーズだけである。

このように、ヒト ES/iPS 細胞の培養用の培地は次々と開発され、研究者らはそれぞれの研究の目的にあった培地を選択して使用している。しかし、すべての細胞株をだれもが安定して培養できるようになっていないのは、まだ十分にヒト ES/iPS 細胞の未分化維持機構が解明されていないからではないだろうか。ヒト ES/iPS 細胞の培養が標準化されるには、もう少し時間がかかると思われる。

6 求められる標準化

日本では、国家戦略として iPS 細胞研究ロードマップが策定され、再生医療や疾患モデル研究、創薬開発に応用することを目指している。国民の意識調査において、再生・細胞医療に対する期待度を、20 歳代から 70 歳代の 2900 人でアンケートを行った結果、強く期待するもしくは期待すると回答した者は、全体の 75% 以上であり、再生医療への期待が大きいことが分かる。一方で、ES/iPS 細胞のゲノム不安定性や、分化誘導の再現性など、解決すべき課題も多い。そこで、まず、我々が対処できる事としては、ES/iPS 細胞の品質管理、品質評価による標準化である。機械を用いた自動化システムにより、一定の品質管理と安定な供給を実現することができれば、再現性の高い研究成果につながり、やがては臨床応用へ発展させることも可能である。さらに、国内アカデミア、官民が連携し、活発な情報交換や国際基準の提案を行い、技術だけでなく理念の定義も標準化していくことにより、幹細胞研究が加速され、臨床応用へ道が開けるものと期待するものである。

文 献

- 1) J. A. Thomson *et al.*, *Science*, **282**, 1145-7 (1998)
- 2) H. Suemori *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 926-32 (2006)
- 3) K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, **126**, 663-76 (2006)
- 4) K. Takahashi *et al.*, *Cell*, **131**, 861-72 (2007)
- 5) J. Yu *et al.*, *Science*, **318**, 1917-20 (2007)
- 6) P.W. Andrews *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 795-7 (2005)
- 7) International Stem Cell, I., *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 803-16 (2007)
- 8) International Stem Cell, I., *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 1132-44 (2011)
- 9) B. S. Mallon *et al.*, *Stem Cell Res.*, **10**, 57-66 (2013)
- 10) L. Healy *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 1981-8 (2005)
- 11) Initiative, T. I. S. C. B., *Stem Cell Rev. and Rep.*, **5**, 301-314 (2009)
- 12) M. X. Luong *et al.*, *Cell Stem Cell*, **8**, 357-9 (2011)
- 13) H. Higashi *et al.*, *Cell Stem Cell*, **8**, 606-7 (2011)
- 14) 菅 三佳ほか, 再生医療 日本再生医療学会雑誌, **11**, 2-8 (2012)
- 15) M. Amit *et al.*, *Dev. Biol.*, **227**, 271-8 (2000)
- 16) G. Sato, *Academic*, 391-396 (1975)
- 17) J. E. Bottenstein and G. H. Sato, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **76**, 514-7 (1979)
- 18) J. D. Sato, T. Kawamoto and T. Okamoto, *J. Exp. Med.*, **165**, 1761-6 (1987)
- 19) Y. Myoken *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **25**, 477-80 (1989)
- 20) G. J. Brewer *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, **35**, 567-76 (1993)
- 21) T. E. Ludwig *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 185-7 (2006)
- 22) L. Wang *et al.*, *Blood*, **110**, 4111-9 (2007)
- 23) M. Furue *et al.*, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **41**, 19-28 (2005)
- 24) M. K. Furue *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **105**, 13409-14 (2008)
- 25) M. Kinehara *et al.*, *PLoS One*, **8**, e54122 (2013)
- 26) G. Chen *et al.*, *Nat. Methods*, **8**, 424-9 (2011)



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

菅 三佳, 古江-楠田美保

ヒトES・iPS細胞とその加工品（分化誘導した組織幹細胞や組織）などの安全性と品質を保証し、安定に供給していくことが今後の重要な課題である。病原体混入のリスクを低減させるため、また、再現性高い研究結果を得るため、できるだけ精製された成分や合成成分を用いた既知の組成からなる培養条件が求められている。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。

はじめに

ヒトES¹⁾・iPS細胞²⁾³⁾とその加工品（分化誘導した組織幹細胞や組織）などの安全性と品質をいかに保証し、これらを安定に供給していくかが、臨床応用に向けての今後の重要課題とされている。これまでに経験のない治療法であるため、さまざまなリスクが考えられる。がん化の可能性が最大の関心事ではあるが、それはすぐに解決できる問題ではないだろう。現状で解決すべき課題は、病原体混入リスクの軽減および再現性確保の2点に絞られるのではないだろうか。この2点は一見別の観点からの課題であるように見えるが、かなり共通している。

一般的なヒト株化細胞やマウスES細胞などの培養と比較すると、ヒトES・iPS細胞の培養は格段に難しい。そもそもヒトES・iPS細胞は不安定で変わりやすい性質を有しており、未分化状態のヒトES・iPS細胞を維持培養していく過程で、一部の細胞集団が自発的に分化したり、増殖の速い異常クローンが出現するなど、しばしば不均一な細胞集団となる。当然のことながら、不均一な細胞集団を使用すると結果の再現性は低下する。このことは、基礎研究を進めるうえでも、臨床・産業応用するうえでも大きな問題となっている。これまで、ヒトES・iPS細胞には、ウシ血清あるいは、血清代替成分、マウス由来フィーダー細胞を用いた培養条件が使われてきた⁴⁾。血清、血清代替成分およびフィーダー細胞には未知の因子が含まれ、ロット差がある。このような培養条件がヒトES・iPS細胞研究の再現性が低い原因の1つにもなっている。また、血清、血清代替成分およびフィーダー細胞にはウイルスや未知の病原体が含まれる可能性がある。病原体混入のリスクを低減させるため、また、再現性高い研究結果を得るため、できるだけ精製された成分や合成成分を用いた既知の組成からなる培養条件が求められている。

近年、フィーダーを用いない、既知の組成からなる培養条件が次々に報告されている。著者らも2008年にヒトES細胞用のフィーダーフリー・無血清培地hESF9を開発し⁵⁾、さら

にES・iPS細胞を安定に培養できるよう改良を進めている⁶⁾⁷⁾。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γ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^r）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³⁾。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ビトロネクチン、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-β、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⁸⁾、フィーダーフリーの培養に適したmTeSRTM1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、ラミニンおよびビ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、mTeSRTM1培地を用いた場合には、ビ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α5β1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⁹⁾、ヒトES細胞にはインテグリンα6β1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¹⁰⁾。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¹¹⁾。2000年にAmitら⁴⁾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¹²⁾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¹³⁾。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、ブトレスシン)¹⁴⁾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¹⁵⁾。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、

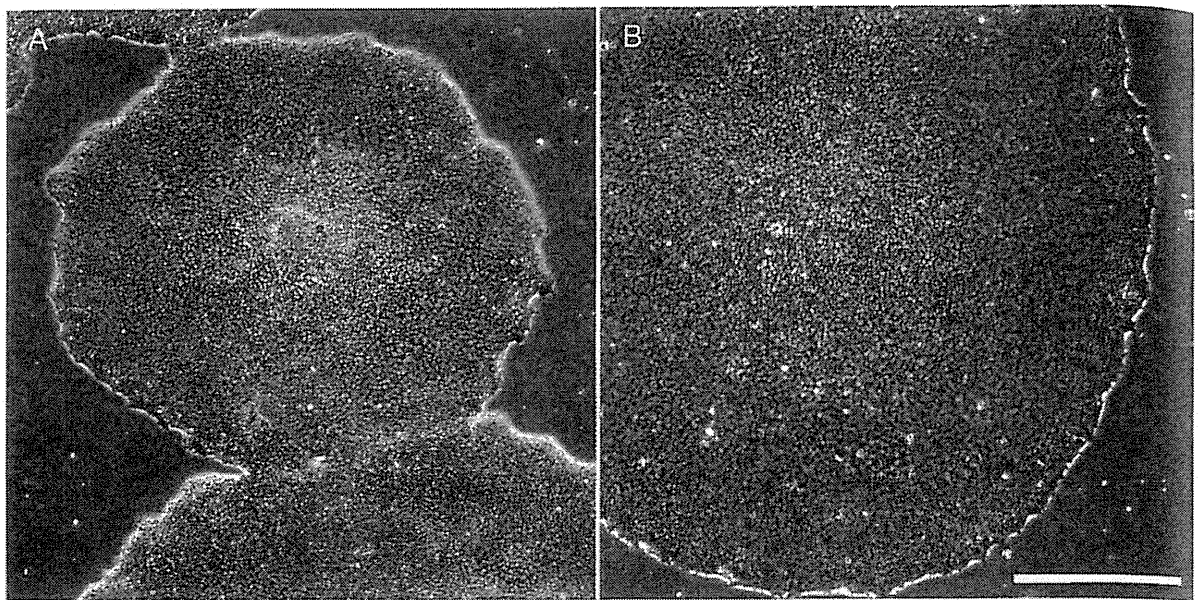


図 フィーダーフリー培養におけるヒトES・iPS細胞の位相差顕微鏡像

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 μ 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¹⁶⁾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™1⁸⁾、TeSR™2、E8培地¹⁷⁾、また、STEMPRO® hESC SFM (ライフテクノロジーズ社)¹⁸⁾、著者らが開発したhESF9培地⁵⁾⁶⁾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- β 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¹⁹⁾²⁰⁾。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²¹⁾。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²²⁾。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²³⁾、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		
フィーダー細胞	ヒト	ヒト由来線維芽細胞	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), ヒトパルボウイルスB19, 西ナイルウイルス, レオウイルス 1,3	
			ヒト病原体	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
培地ならびにサプリメント	マウス	MEF SNL	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	
			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		
	ウシ	血清 (FBS)		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				
EDTA	化合物	変異原性			
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	
	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
細胞外基質	フィブロネクチン、ラミニン、 ビトロネクチン	ヒト		ヒトフィーダー細胞に同じ
	フィブロネクチン	ウシ		FBSに同じ
	ラミニン511、 ビトロネクチン、 フィブロネクチン	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ペネフィットを考えて、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ペ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未盛博文准教授、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>