

**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 細胞の医療・創薬への応用研究が加速しているが、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。培養した施設から検査施設への試料の送付方法、フィーダー細胞の除去法、FACS 解析と I-FACS 解析の比較方法等を検討・策定した。策定した方法に基づき、長岡技科大に於いて培養・FACS 解析した結果と、姉妹培養を医薬基盤研究所へ送付して I-FACS 解析した結果との間に強い相関がみられたので、この方法が有用であることが示唆された。本研究により、様々な施設で培養している細胞を幹細胞バンクに送付し、統一的な基準で測定・評価できる品質管理法の作業工程が策定できた。

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、京大山中教授による iPS 細胞の樹立成功後、目覚ましく進んでいる。そんな中、2013年に再生医療推進法が成立し、産学官一体となり推進する体制

が整った。理化学研究所では網膜色素変性症の治療を目的として、ヒト iPS 細胞より網膜の細胞を分化誘導し、それをシート状に加工して移植する臨床試験を開始している。創薬応用に関しては、日本製薬工業協会（製薬協、東京都中央区、手代木功会長）が昨年（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)を立ち上げた。このコンソーシアムには現在、約40社が参加している。このように、ヒトES/iPS細胞を用いた医療・創薬応用へ向けた研究・開発が急ピッチで進行中だ。

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]。

ヒトPS細胞の未分化性維持の状態を日常的に管理する手法として一般的に使用される方法が2つある。一つは単純に顕微鏡を用いて形態を観察することで、もう一つは未分化マ

ーカーを免疫蛍光染色してFACS(フローサイトメトリ)で陽性細胞の割合を算出する事である(図1)。

細胞の形態を位相差顕微鏡で観察することは、細胞の品質管理の上で非常に基礎的、かつ重要な方法である[4]。実際、顕微鏡下で細胞を観察しながら、未分化な形態をしている細胞のみを選別したり、分化により形態が変化した細胞を除去する事は日常的に行われている。ヒトPS細胞は未分化性を維持するのに不適切な操作をすると、数日内に細胞が分化してその形態が変化する。そのため、細胞の形態を観察することによりその状態を日常的に把握することは非常に重要となる。顕微鏡観察では固定操作などをせずに細胞を生きのまま、手軽に検査できるという利点がある。更に、熟練の培養技術者になると、様々な定量的試験では検知できないレベルの微妙な変化を見てとる事ができるようになる。一方、定性的で、技術者の経験や技能に大きく左右される点が欠点である。

それに対しFACS解析は技術者の経験等に左右され難く、定量的な結果が得られる[5]。FACS解析するとき

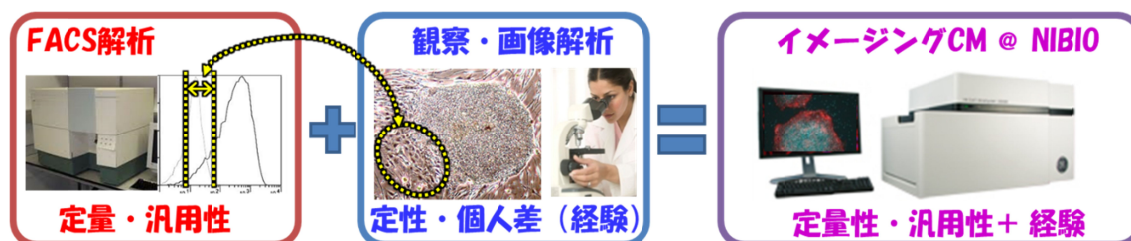


図 1: FACS 解析と顕微鏡観察と I-FACS 解析

は、一度培養皿から剥がして細胞を1細胞レベルまで分散した後、免疫蛍光染色し、それを流しつつレーザー光を当てて1細胞毎の蛍光量を定量的かつ高速（1秒に数千細胞）に測定できる。しかし、FACSにも欠点がある。それは細胞を培養皿から剥がして分散するため、培養しているときの形態を失ってしまうことにある。

以上のように顕微鏡観察とFACS解析は相補うような形になっている。この両者を合わせたものが、イメージングサイトメトリー解析法（I-FACS）である（**図 1**）。培養細胞を剥がさずに免疫蛍光染色し、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。細胞を剥がさずに形態を観察できるように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だ。

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**）。具体的には、培養したヒトPS細胞の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、両者の結果を比較・解析する。細胞バンクに於ける熟練の培養技術者が定量性と経験の両面から診断することにより、様々な施設での培養状態を

統一的に判断できる方法論が確立する。

2012年度には、主に3項目に関して検討した。1）固定ヒトiPS細胞を損なうことなく送付する方法の検討、2）共培養しているフィーダー細胞を除きヒトiPS細胞だけを解析する方法、3）ヒトiPS細胞の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で解析した結果の比較をした。

2013年度は、前年度に確立した方法を用い、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

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℃、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 [6]) 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の方法を検討した。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 μl 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

i) 使用する抗体の選定

ヒト ES/iPS 細胞の未分化マーカー抗体は多数販売されている。汎用性のある解析方法を策定することが目的であるため、代表的なマーカーを選んだ。抗体染色の簡便さ・迅速さを考えたとき、細胞表面マーカーが適している。実際、ヒト ES/iPS 細胞用の細胞表面マーカーが数多く市販されている。そこで以下の 3 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)。また、細胞内転写因子のマーカーとして一般的な Oct3/4 (rabbit polyclonal IgG、Cat# sc-9081, SantaCruz1, 1/500) も用いた。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を使用した。抗 Stage specific Embryonic Antigen 1 (SSEA1) 抗体 (mouse monoclonal IgM, Cat# sc-21702, Santa Cruz, 1/100)

ii) フィーダー細胞の除去法

本実験では広く一般的に行われているフィーダー細胞を用いた培養法方を用いているため[1] [6] [2]、ヒト ES・iPS 細胞の解析をするためにはフィーダー細胞と区別して解析する必要がある。色々な方法があるが、FACS 解析をする上での簡便性を考え、

FACS の散乱光パラメータ (FSC と SSC) を用いる方法と、PE 標識した抗 feeder 抗体 (130-096-094、Milteny Biotec K.K.) の使用を検討した。

iii) 作業手順

FACS 解析の手順は一般に行われている方法を用いた[5]。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 1 ml 加えてインキュベータで 15 分間静置した。1 mg/ml BSA-PBS を加え、ピペッティングして細胞懸濁液を 15 ml チューブに移した。このチューブを 400 × g、3 分間遠心し、上清を除き、500 μl 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 × 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 1 mg/ml BSA-PBS で調製した。細胞懸濁液を 20 μl ずつ 15 ml チューブに移し、10 mg/ml BSA-PBS で 1/50 に希釈した一次抗体 (下記) を 20 μl 加えた。これらの一次抗体を加えた 15 ml チューブはアルミ箔で遮光し、4 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 × 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 10 mg/ml BSA-PBS で 1/250 に希釈した Alexa Fluor 488 標識二次抗体を 20 μl 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。15 ml チューブはアルミ箔で遮光し、4 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 × g、3 分間遠心して上清を除いた。各チューブに 1 mg/ml BSA-PBS を 500 μl 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。

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 i P S 細胞の導入、ヒト i P S 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 i P S 細胞の移植、ヒト i P S 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

本研究では、様々な施設で培養している細胞の品質評価法を定める事が目的である。具体的には図 2 に示すよう、細胞を 10cm 培養皿と 6 ウェルプレートに分け、10 cm培養皿は FACS 解析機、6 ウェルプレートは固定・送付して I-FACS で解析する。こうすることにより、正しく解析が行えるかどうかテストし、作業手順を確立する。

固定ヒト iPS 細胞の送付

初めに、長岡技術科学大学（以下、培養施設）においてヒト iPS 細胞を培養し、それを医薬基盤研（以下、検査

施設）で検査をするため、送付方法を検討した。

図 3 に示すよう、ヒト PS 細胞を培養している 6 ウェルプレート を PBS+/+ で満たした。その上から空気が入らないように：1) プレートの蓋をする：2) パラフィルムで中蓋をし、その上からプレートの蓋をする、の 2 つの方法を試みた。その結果、1) 直接蓋をした場合は気泡が混入してしましたが、2) パラフィルムで中蓋として液面を覆ってから蓋をした場合は気泡が混入しなかった。こうしてパラフィルムの中蓋を使用して密閉した培養容器を更にパラフィルムで包み、液が漏れないようにしてから宅配便（冷蔵）で送付した結果、培養容器

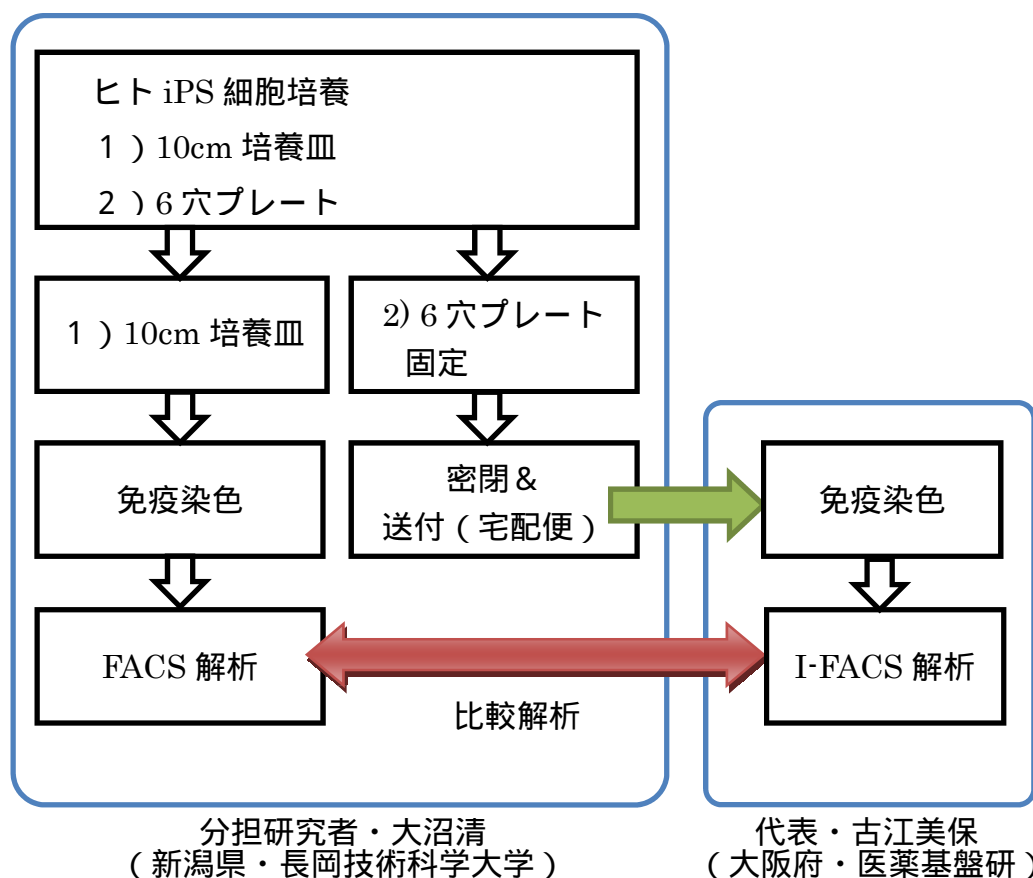


図 2: 研究の流れ

内に空気が混入することが無く、細胞も剥がれることなく、培養施設（新潟県長岡市）から診断施設（大阪府茨木市）へと 10 回以上に送付に成功しており、失敗は 1 度も無かった。従って、パラフィルムを用いた細胞の送付法が適していることが分かった。

以上の実験に基づき、下記の様に固定・送付の操作手順を定めた。

hiPS 細胞の固定・送付操作手順

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

PBS^{+/+}を除き、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

4% ホルマリン溶液を除き、再度 PBS^{+/+}で 2 回洗浄

ウェルを PBS^{+/+}で満たし、気泡が残らないように容器全体をパラフィルムで覆い、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（**図 3**）。

6 ウェルプレートは緩衝材で覆い、ダンボールに詰めて

宅配便で冷蔵（4 度）で送付。

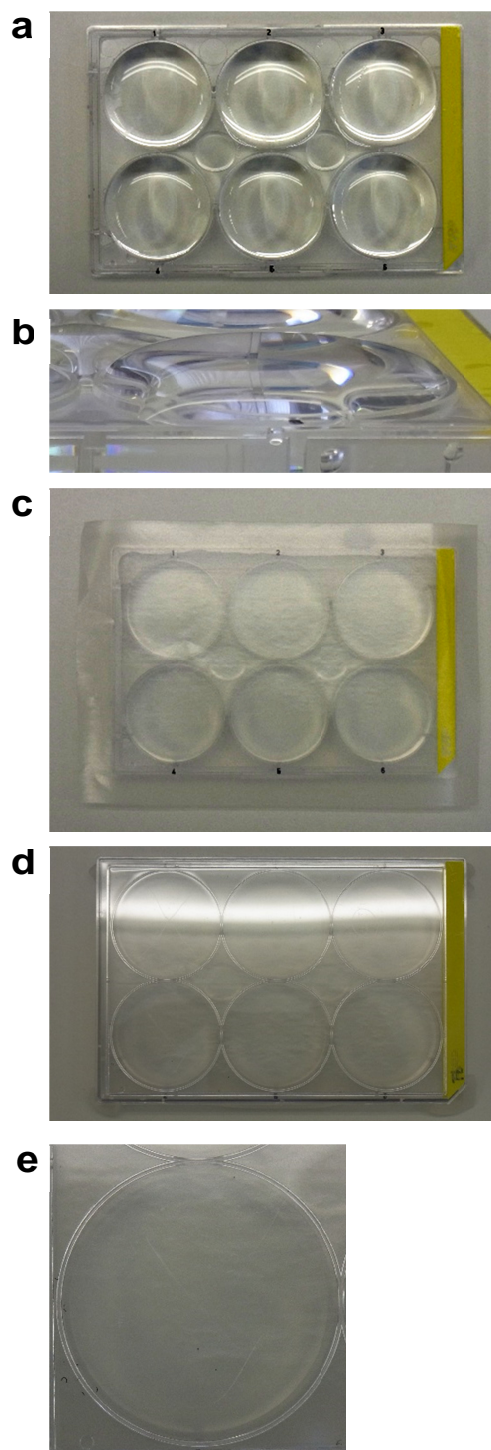


図 3： パラフィルムによる密閉。

ab: PBS を満たした 6well プレート。**a**：上から見た写真。**b**：横から見た写真。PBS が表面張力で山盛りになっている。**c**：気泡が入らないように PBS の上にパラフィルムを被せた。**de**：蓋をした後。拡大図（**e**）。泡が混入していない。

フィーダー細胞の除去

最初に検討したのは、ヒト ES・iPS 細胞と共培養しているフィーダー細胞の影響を取り除く事である。一般的なヒト PS 細胞の培養に於いて使用されるフィーダー細胞は未分化マーカーを発現していないため、これが混入すると、未分化細胞の陽性率が見かけ上低下するという問題がある。

このフィーダーの混入問題を解決するため、当初は散乱光を用いて分離することを検討した。フィーダー細胞とヒト iPS 細胞は大きさや内部構造が違うため、前方散乱光 (FSC) や側方散乱光 (SSC) の値が異なり、無染色で両者を区別できると期待された。

固定しない生のヒト iPS 細胞とフィーダー細胞を FACS 解析した結果、FSC と SSC を基準に分離できたが、固定細胞では分離が難しかった。更に、長岡技科大と医薬基盤研にある装置の違いから定量的な判断基準を設けることが困難である事が解った。以上の事から、FACS の散乱光 (FSC, SSC) を基準にフィーダー細胞を分離して解析することは断念した。

そこで、最近販売されたマウス繊維芽細胞に特異的な抗原を認識する抗体、抗 Feeder 抗体を試してみた。その結果、高効率 (77%) でフィーダー細胞を区別することに成功した (図 4)。以上のより、フィーダー細胞とヒト PS 細胞の区別には、抗 feeder 抗体は感度、使い良さ、定量性共に申し分ないことが明らかとなった。

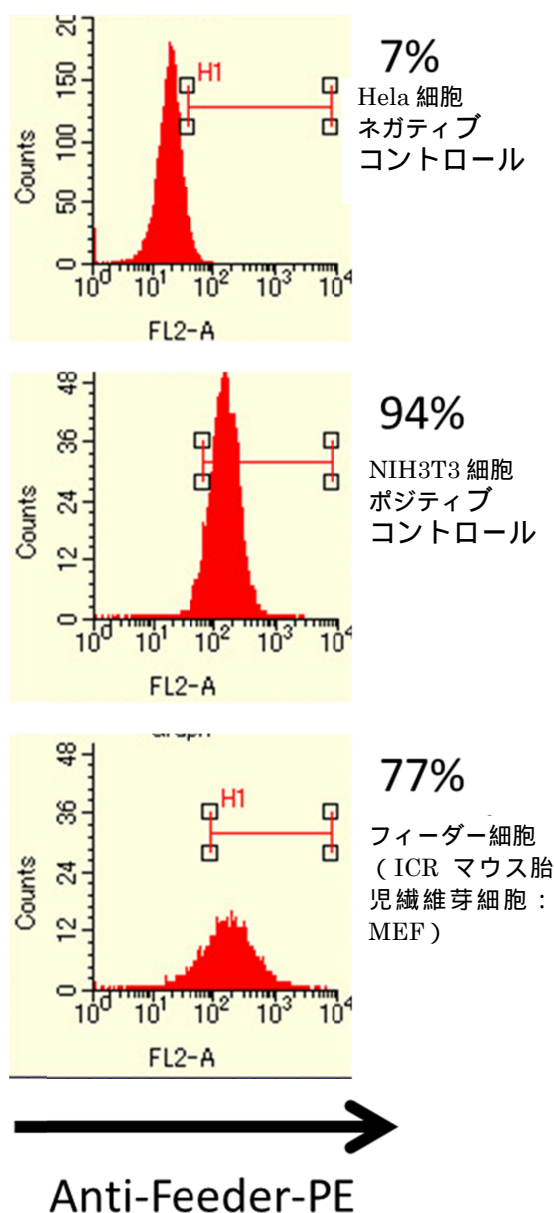


図 4: 抗 Feeder 細胞抗体のテスト。ネガティブコントロールのヒト子宮頸癌由来の細胞株の HeLa 細胞での陽性率は 7%、ポジティブコントロールのマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 での陽性率は 94%、ヒト PS 細胞用のフィーダーとして用いた ICR マウス胎児由来の繊維芽細胞 MEF の陽性率は 77%。

FACS 解析と I-FACS 解析

ヒト PS 細胞の未分化性を FACS と I-FACS で検査するため、細胞表面糖タンパク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 種類の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・透過した後に診断施設に上記の方法で送付し I-FACS 解析を行った (図 2)。細胞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 Tic 株[7]を使用した。

培養施設に於いて行った FACS 解析の結果より、未分化マーカーの 3 種類が全て 88%以上陽性であったのに対し、初期分化マーカーの発現が 10%以下であったことから、適切に未分化維持ができていていること示唆された (図 5a)。また、姉妹培養した 6well プレートを検査施設へと送り I-FACS を行った結果、FACS 解析と同様に、未分化マーカーが 89%以上陽性であったのに対し、初期分化マーカーの陽性率は 1%以下であった (図 5b)。

FACS 解析と I-FACS 解析の結果を比較するため、ピアソンの相関係数を算出したところ 0.99 となり、非常に強い相関がある事が明らかとなった (図

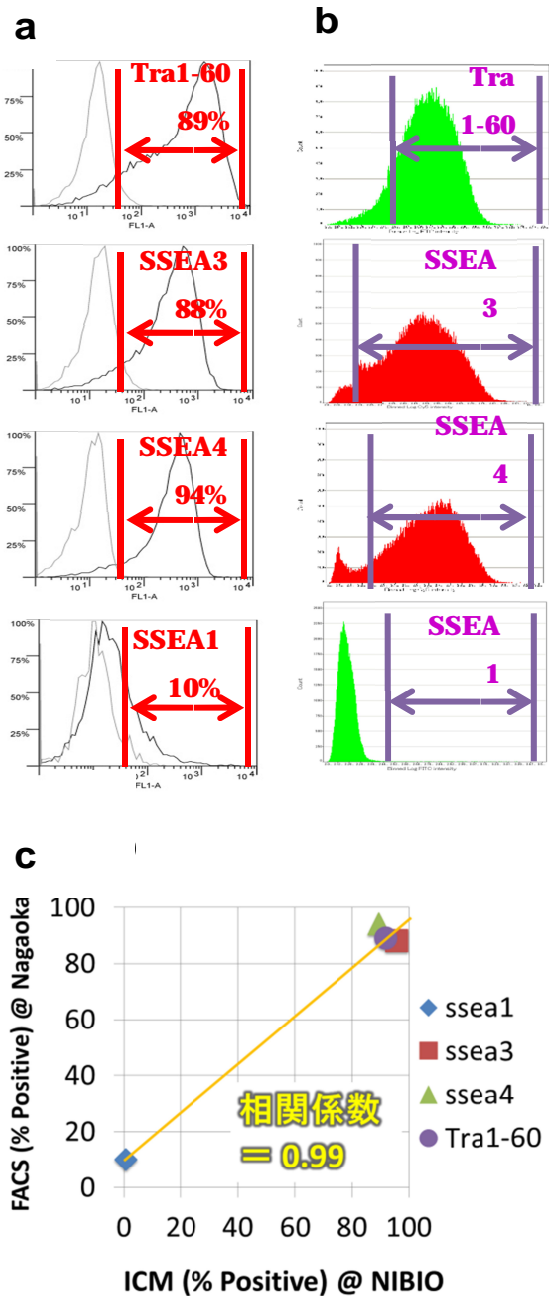


図 5： 培養施設（長岡技術科学大学）での FACS 解析結果と、検査施設（医薬基盤研）に於ける I-FACS 解析結果の比較。培養施設に於いて培養したヒト iPS 細胞を FACS 解析した結果 (a) と、その姉妹培養した細胞を固定して検査施設に送付して I-FACS で解析した結果 (b) と、両者の比較 (c)。

5c)。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。

3つの細胞株でのFACS解析データとI-FACS解析データの所見

前述の方法の妥当性をより詳細に検討するため、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。

ヒトPS細胞の未分化性をより確実にFACSとI-FACSで検査するため、SSEA3、SSEA4、Tra 1-60、SSEA1に加え、未分化なヒトES/iPS細胞で発現する転写因子のOct3/4の解析も追加した。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・透過した後に診断施設(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6)。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

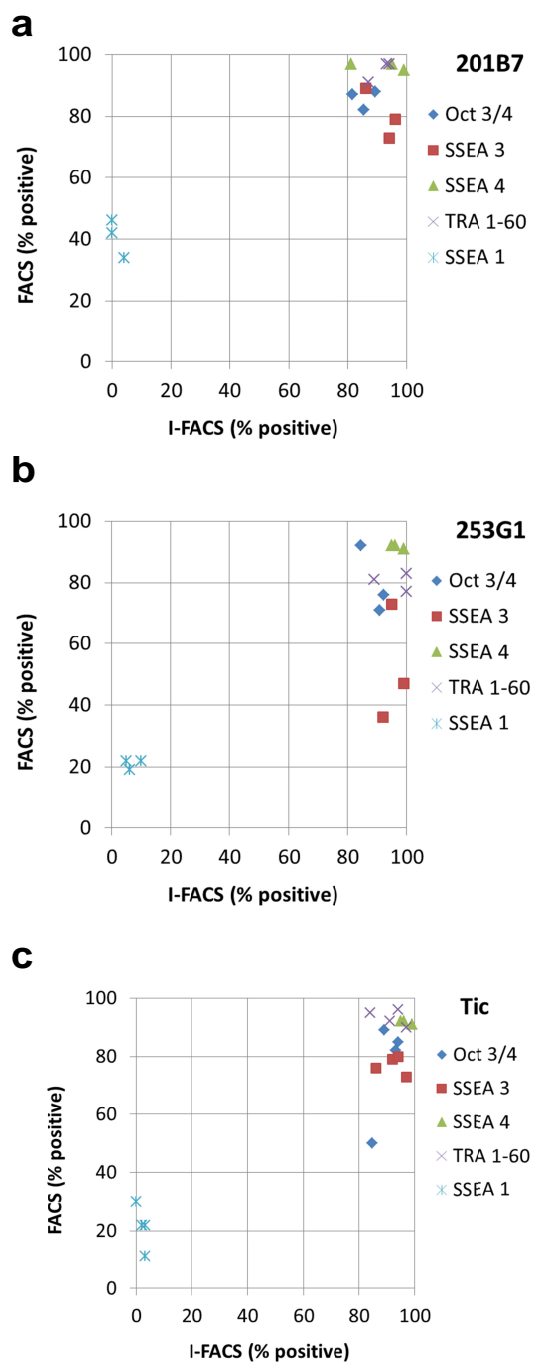


図6: 3つのヒトiPS細胞株での、培養施設(長岡技科大)におけるFACS解析結果と、検査施設(医薬基盤研)に於けるI-FACS解析結果の比較。使用した細胞は、京都大学山中研の201B7株(a)、253G1株(b)、及び成育医療センターのTic株(c)。縦軸、横軸はそれぞれFACS解析、I-FACS解析した各マーカーの陽性率。SSEA1は初期分化マーカーでその他は未分化マーカー。

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、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 6a) 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 6b) 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

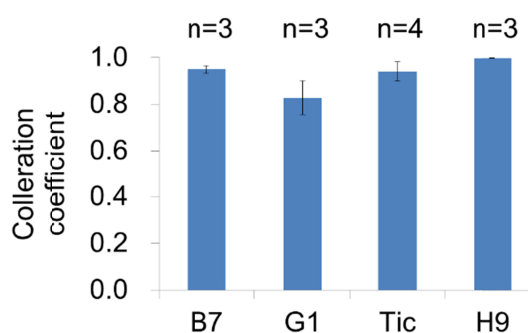


図 7: FACS 解析と I-FACS 解析の相関。4 つの細胞株で行っている。201b7 株 (B7)、253G1 株 (G1)、Tic 株、それとヒト ES 細胞の H9。H9 に関しては、医薬基盤研内で培養され、更に FACS 解析と I-FACS 解析の両方が行われた。

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。

3 つの細胞株での 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 6 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 7)。各実験の中で 5 つのマーカ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 に近付く。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

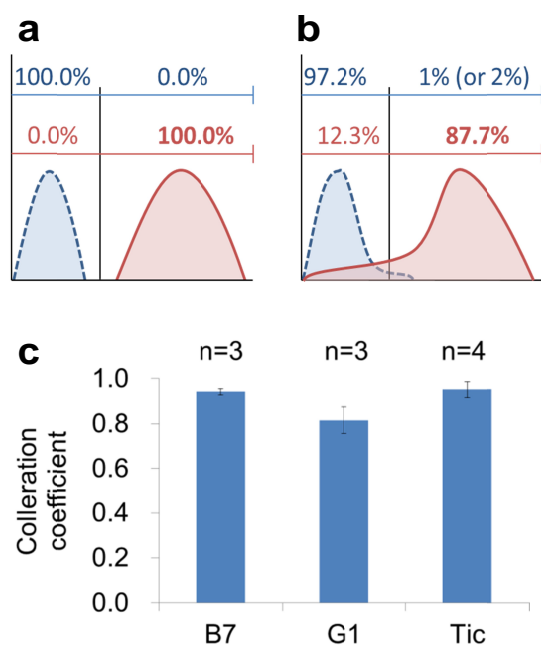


図 8 : FACS のゲート (閾値) の問題。横軸が各細胞のシグナル強度、縦軸が細胞の割合。A : 陰性コントロール (青) と、特異的抗体を使用したデータ (赤) が、完全に分離している場合 (A) と、分離していない場合 (B) の模式図。ポジティブ率はそれぞれの右下部 (100% と 96.4%)。

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 8a 青) と、特異的抗体を用いたデータとの蛍光シグナル (図 8a 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 8a)。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 5、図 8b)。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認してみた。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 7) と 2% (図 8c) 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

本研究の目標は、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・管理することである。初年度は、異なる施設で培養した細胞を送付し、フィーダー細胞を除去し、FACS 解析と I-FACS 解析した結果を比較するプロトコルを確立した。2013 年度は前年度に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。

細胞の送付方法

細胞を送付するには大きく分けて 4 つある。細胞を生きたまま送付する、接着したまま固定・透過などをしてから送付する、細胞を剥がして分散してから送付する、ライセート等を送付するである。本研究では、I-FACS を用いて細胞の形態も観察する事を主軸にしているため、後者の 2 つの様に細胞を回収すると形態が失われて解析ができなくなる。そこで、生きたままか、固定・透過してからかのどちらかになる。

当初は、生きたままの細胞を送ることも考慮した。細胞を受けとった医薬基盤研で生きたままの細胞の状態を顕微鏡観察し、統一的な方法で固定、染色し、診断できれば確実だ。しかし、

ヒト ES 細胞は生きたまま他の施設へ送付することはレギュレーション違反である。また、送付が可能な細胞でも、発送や受け取りのタイミング、輸送途中の温度管理、細胞の増殖状況などを考慮した場合、輸送途中で細胞の状況が大きく変化する可能性が高い。以上の理由から生きたまま送付する案は却下した。

そこで本研究では細胞培養施設で細胞が培養皿に接着した状態で固定して送付する手法を用いた。一般の宅配便業者を利用したり、特殊な設備を用いない等、どの施設でも使用できる事を念頭にプロトコルを策定した。特に、培養皿の中に気泡が混入すると、輸送途中に細胞を傷つけるため、これを抑える工夫を行った結果、パラフィルムを内蓋として活用することで解決できた。パラフィルムは生命系の研究をするほとんど全てのラボで使われているため、本プロトコルは非常に汎用性が高く、確実な方法である。

フィーダー細胞の除去

今回、細胞の状態を定量的に解析するため、フィーダー細胞の影響を取り除く事を検討した。一般的なヒト PS 細胞の培養に於いて使用されるフィーダー細胞が混入し、見かけ上、未分化細胞の陽性率が低下する。

最初は無染色の方法を試みた。フィーダー細胞とヒト PS 細胞は大きさや内部構造が異なるため、前方散乱光 (FSC) や側方散乱光 (SSC) の値が異なり、無染色で両者を区別することは可能

だ。しかし、生細胞では区別が難しかったこと、更には統一的な数値基準が策定し難いため、使用を断念した。

次に抗 Feeder 抗体の使用して染色し、FACS 解析したところ、十分な検出感度が得られる事が解った。この抗体は PE 標識されているので、青色の励起光を用いて赤色蛍光で観察することができるため、青色の励起光を用いて緑色蛍光で観察する一般的な抗体染色で頻繁に使う色素と干渉しない点も良い。また顕微鏡観察にも使えるため、I-FACS での利用も可能である。以上のより、フィーダー細胞とヒト PS 細胞の区別には、抗 feeder 抗体は感度、使い良さ、定量性共に申し分ないことが明らかとなった。

FACS と I-FACS の比較法の検討

FACS と I-FACS 解析した結果、同じような傾向のデータが採れた。ただし、染色方法や操作の仕方や、閾値の選び方などにより解析結果は変わる。実際、今回の解析結果の個別の解析値を見ると、FACS 解析と I-FACS 解析の間に 10% 近い違いがある事が解る。しかし、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、結果として両者の解析結果の間に、0.99 という非常に強い相関がある事が明らかとなった。以上の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。

複数の細胞株で複数回の実験

上述の 1 細胞株のみを用いて確立し

た実験系の妥当性を、3 株で複数回実験して検証した。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からは判断できない。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. 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.
6. 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.
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. 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

11. 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)

12. 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)

13. Ohnuma, K.*, Assays of traditional drugs using human neurons derived from pluripotent stem cells. Neuroscience Letters, (2013 Nov 21. E-pub ahead of print)

14. Tadashi Ninomiya*, Toru Hiraga, Akihiro Hosoya, Kiyoshi Ohnuma, Yuzuru Ito, Masafumi Takahashi, Susumu Ito, Makoto Asashima, Hiroaki Nakamura, "Enhanced Bone-forming Activity of Side Population Cells in the Periodontal Ligament" Cell Transplantation (In Press)

15. Shiho Oeda, Yohei Hayashi, Techuan Chan, Minoru Takasato, Yuko Aihara, Koji Okabayashi, Kiyoshi

Ohnuma, Makoto Asashima, Induction of Intermediate Mesoderm by Retinoic Acid Receptor Signaling from Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells, Int J Dev Biol, In Press (2012)

G . 研究発表

1 . 原著論文

1) 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)

2 . 学会発表

2) 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）

3) 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)

4) 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/無フィード培養でのヒト 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)

5) 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)

6) 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)

7) 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)

8) 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)

9) 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)

10) ○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

11) 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

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, Kiyosshi 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