

201335012A

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
(再生医療関係研究分野)

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を  
保持した保存体制の確立

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成26(2014)年 3月

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
(再生医療関係研究分野)

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を  
保持した保存体制の確立

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 江良 択実

平成26(2014)年 3月

## 目 次

I. 平成 25 年度研究班名簿	3
II. 総括研究報告 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立 江良 択実	4
III. 分担研究報告	
1. 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した 保存体制の確立 糸 昭苑	9
2. 画像定量解析による iPS 細胞の品質評価の確立 斉藤 典子	12
3. 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した 保存体制の確立 白木 伸明	15
4. 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した 保存体制の確立 松本 志郎	17
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
V. 研究成果の刊行物・別刷	22

平成 25 年度 厚生労働省  
 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(再生医療関係研究分野)

臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

	氏名	所属等	職名
研究代表者	江良 択実	熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野	教授
研究分担者	桑 昭苑	熊本大学 発生医学研究所 多能性幹細胞分野	教授
	斉藤 典子	熊本大学 発生医学研究所 細胞医学分野	准教授
	白木 伸明	熊本大学 発生医学研究所 多能性幹細胞分野	助教
	松本 志郎	熊本大学 医学部附属病院 総合周産期母子医療センター	助教



## 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究代表者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授

### 研究要旨

iPS 細胞は多分化能を持ち、試験管内増幅が可能で、長期保存にも耐えうることから、必要な細胞を誘導して移植医療へ応用する研究が進んでいる。本研究では、1) 臨床に用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。平成 25 年度は、他機関より、樹立方法、保存期間、継代数の異なるヒト iPS 細胞を入手し保存管理を行うと同時に iPS 細胞に、継代方法、細胞源や樹立方法が与える影響について、コロニー形成能を中心に解析した。1) 理化学研究所バイオリソースセンターへ保存してあるヒト iPS 細胞を収集した。2) ROCK inhibitor の iPS 細胞コロニー形成に与える影響を解析した結果、ROCK inhibitor の添加は継代時の分散処理後に行うことで iPS 細胞コロニー形成率を有意に上昇させることが分かった。3) センダイウイルスベクターとプラスミドベクターの方法で作成した iPS 細胞の方がコロニー形成能力が低いことが明らかとなり、これらの方法がより安全性が高いことが示唆された。

### 研究分担者

桑 昭苑

熊本大学発生医学研究所 教授

斉藤 典子

熊本大学発生医学研究所 准教授

白木 伸明

熊本大学発生医学研究所 助教

松本 志郎

熊本大学医学部附属病院 助教

分化能力を持っている。試験管内での無制限な増幅が可能であり、長期保存にも耐えうる。この利点を生かし、多能性幹細胞から必要な細胞を誘導し、移植医療へ応用する研究が進んでいる。しかし、誘導した細胞の持つ機能や治療効果については未だ不明な部分も多く、加えて、未分化細胞の混入による腫瘍形成の問題も存在する。実際の臨床現場でこれらの問題が起こった時や予期せぬトラブルが生じた場合、用いた細胞と同じロットの細胞を使って、様々な方向からトラブルの原因を検証できる体制の構築は必須である。本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。

平成 25 年度は、他機関より、樹立方法、保存期間、継代数の異なるヒト iPS 細胞を入手し

### A.研究目的

私達の体の発生、維持、修復に関わる体性幹細胞は医学的にも重要な治療ツールである。しかし、採取が困難であったり、数が少なかったり、試験管内増幅法が確立していなかったり等の理由から医療への応用は限られた幹細胞に留まっている。

iPS 細胞は、すべての体細胞になれる優れた

保存管理を行うと同時に iPS 細胞に、継代方法、細胞源や樹立方法が与える影響について、コロニー形成能を中心に解析する。

## B.研究方法

### 1. 臨床研究に用いる iPS 細胞の収集と保存

国内の研究機関（理研 BRC と国立成育医療センター等）から樹立方法、保存期間、継代数が異なる iPS 細胞株を入手し保存管理を行う。

### 2. iPS 細胞の機能・発癌に影響を与える因子の検討

継代時の細胞状態、特に Rho-associated coiled-coil forming kinase inhibitor (ROCK inhibitor) の有無がどのように iPS 細胞の増殖能力やコロニー形成能に影響を与えるかを調べる。ROCK inhibitor 処理は、継代時の (i)分散処理前、(ii)分散処理中、(iii)分散処理後の3つに分け、ROCK inhibitor である Y-27632 (Tocris) を最終濃度 10  $\mu$ M になるよう培地に添加し、1 週間培養し、ALP 染色にてコロニーの検出を行う。

### 3. 作製方法の違う健常者由来 iPS 細胞間での分子生物学的、細胞生物学的解析

染色体に取り込まれずに遺伝子発現を行うセンダイウイルスベクターを使って、健常者由来線維芽細胞と血液細胞から iPS 細胞を樹立する。樹立後は、iPS 細胞であることを確認するために、一連の検査（コロニー形態、アルカリフォスファターゼ染色、Nanog 等の免疫染色、qRT-PCR 法にて未分化マーカー発現検査）、さらに染色体検査、分化能と奇形腫形成能を調べる iPS 細胞であることを確認する。このようにして樹立した iPS 細胞を異なる方法にて樹立した iPS 細胞（レトロウイルスベクターやプラスミド等）と比較し、前述の方法に従ってコロニー形成に与える影響について解析する。

(倫理面への配慮)

#### 1) 倫理審査等

本研究は、申請者らが所属する機関の倫理審査委員会の承認を得て行う。申請者らは、正常および疾患由来 iPS 細胞を樹立し研究することについてはすでに所属機関の倫理委員会にて承認済みであり、利益相反自己申告書も提出済みである。他機関からの iPS 細胞の受け入れは、他機関の倫理委員会の承認後、細胞由来の個人の同意のもと作製されたことを確認して受け入れる。

#### 2) 人権擁護上の配慮

また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、細胞提供者が特定される個人情報公表されないことない。本研究のために特別に用意した番号（記号）によって管理し、年齢・性別・培養条件の付帯情報については、申請者の所属機関にて管理を行う。iPS 細胞は熊本大学発生医学研究所内にあるヒト幹細胞培養室に設置する超低温フリーザーと液体窒素タンクにて管理する。この部屋へは許可された研究者のみ暗証番号キーにて入室できる。また発生医学研究所に隣接する共用棟には平成 24 年度に新たにヒト ES/iPS 細胞培養室を新設した。ここでは、培養ができるほか、同様に液体窒素タンクにて iPS 細胞を保存できる。ここへの入室は、許可を受けた研究者が渡されるカードキーによってのみ可能である。iPS 細胞の培養と細胞ストックの作製は記録を義務づける。細胞ストックチューブにはバーコードを取り付け、コンピューターにて管理を行う。細胞は由来の個人が特定できない記号によって再標識される。以上より、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

#### 3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取については、研究目的・予想される成果、情報の保護、予想される不利益等を

同意書に記述している内容に準じて、研究担当者からの十分な説明の後、同意（インフォームド・コンセント）を得て行う。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、細胞提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。iPS 細胞等を提供していただく研究者との間では MTA（必要に応じて共同研究契約）を締結するが、その際個別に知的財産権について話し合うこととする。

## C. 研究結果

### 1. 臨床研究に用いる iPS 細胞の収集と保存

理化学研究所バイオリソースセンターへ保存してあるヒト iPS 細胞、201B7（レトロウイルスベクターにて作成）、409B2, 454E2（両細胞ともプラスミドにて作成）を入手し、保存体制を整える標準となる細胞と位置づけ、増幅後 1 部の保存を開始した。201B7, 409B2 は健常者の皮膚由来線維芽細胞から樹立した細胞株であり、これに対して、454E2 は健常者の歯髄から樹立した iPS 細胞である。

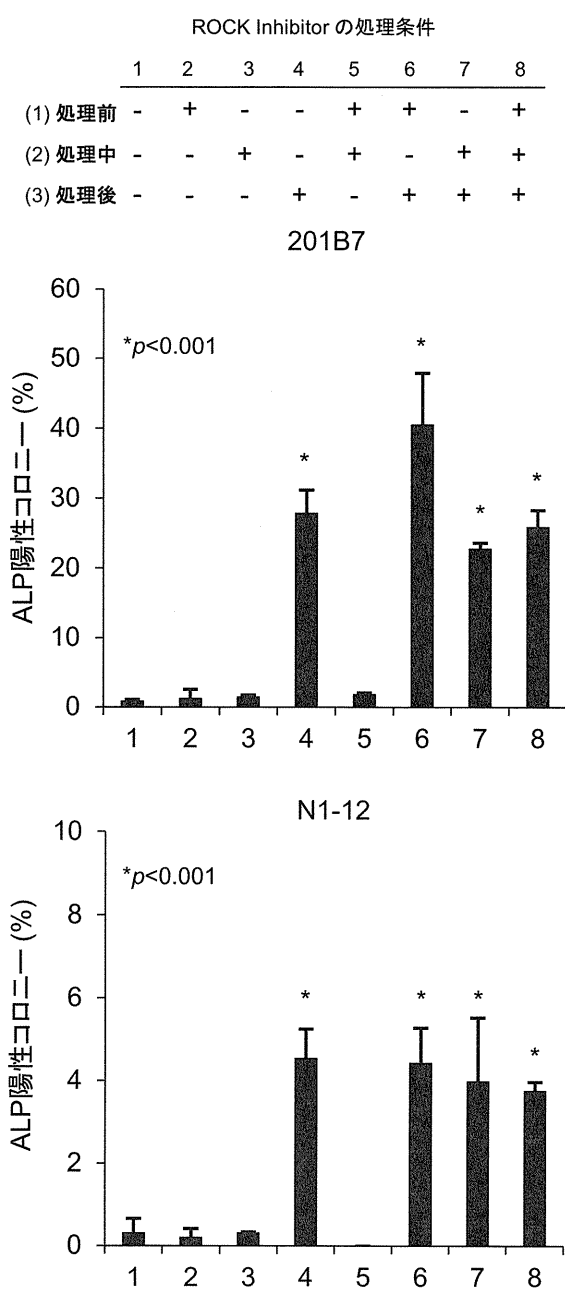
### 2. ROCK inhibitor の iPS 細胞コロニー形成に与える影響

継代直後の iPS 細胞の ALP 陽性のコロニー形成に与える ROCK inhibitor の効果を検討するため、ROCK inhibitor 処理条件を継代時の (1) 分散処理前、(2) 分散処理中、(3) 分散処理後の 3 つに分け、合計 8 通りの条件を検討した（図 1）。分散処理後の iPS コロニー形成率は、分散処理前、分散処理中のコロニー形成率に比べて、有意に高い値を示した。この傾向は、レトロウイルスにて樹立された iPS 細胞株、201B7、私たちが独自にセンダイウイルスベクターを用いて樹立した iPS 細胞株 N1-12 の両方とも見られた。したがって、作成方法がどの方法でも見られる iPS 細胞すべてに通じることと示唆され、ROCK inhibitor の添加は、継代時の分散処理後に行うことで iPS 細胞コロニー形成率を有意

に上昇させることが分かった。

しかしながら、センダイウイルスベクターにて私たちが作成した iPS 細胞株 N1-12 は、レトロウイルスベクターを用いて作成した 201B7 と比較して、形成されたコロニー数が少なかった。コロニーの形成能力は試験管内のがん化の指標としても使われることから、この差がどのような因子で規定されるかを解析することは重要である。

図1 ROCK Inhibitor処理とコロニー形成能



### 3. コロニー形成能力と細胞増殖力との関係について

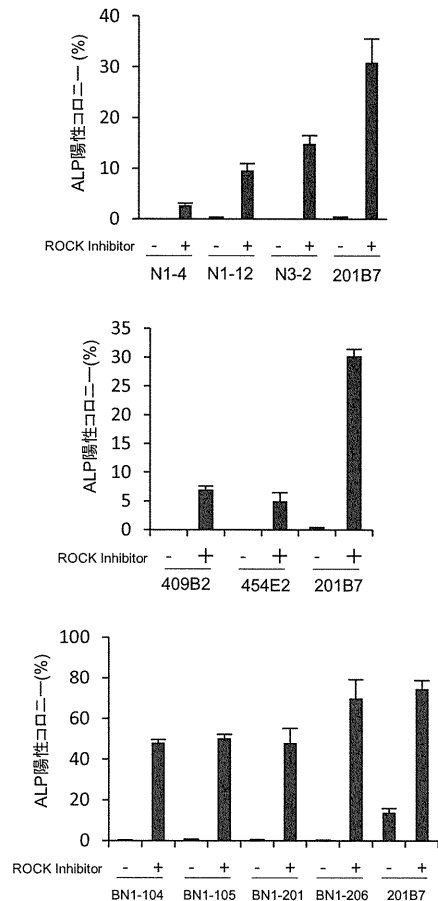
上述の2つのiPS細胞株で見られた違いは細胞増殖力の違いが影響している可能性がある。そこで、2つの細胞の増殖に違いがないか調べた。その結果、2つの細胞株のdoubling time (DT)は201B7 が69.1時間、N1-12 が69.2 時間であり、ほぼ同じ増殖速度であることが分かった。以上より、iPS 細胞株201B7 とN1-12 では増殖スピードに差はなく、コロニー形成能力の違いは他の因子が関与していることが判明した。

### 4. 由来が異なる iPS 細胞のコロニー形成能力について

コロニー形成能力の違いが見られたiPS細胞株は、由来は同じであるが、作成方法が異なる。そこで、iPS 細胞の由来や誘導方法の違いにより、分散処理後のコロニー形成率に違いがあるかについて検討を行った (図 2)。センダイウイルスベクターを用いて作成した健常者皮膚線維芽細胞由来iPS 細胞株N1-4、N1-12、N3-2、健常人末梢血由来iPS 細胞株BN1-104、BN1-105、BN1-201、BN1-206を用いて比較すると、N1-4、N1-12、N3-2では、コロニー形成率は、201B7 と比べ有意に低い割合を示したのに対して、BN1-104、BN1-105、BN1-201、BN1-206 では、有意さはあるものの201B7 と近い形成率を示した。また、エピソード・プラスミドベクターを用いて誘導した健常者皮膚由来線維芽細胞より作成したiPS 細胞株409B2 と健常者歯髄細胞より誘導した454E2 では、ROCK inhibitor 処理後のコロニー形成数は低くN1-12 と近い数字を示した (図 2)。以上の結果から、分散処理後のiPS コロニー形成率はiPS 細胞の誘導方法や由来により、異なる割合を示すことが分かった。血液由来のiPS 細胞では、一般的に高く、線維芽細胞由来のiPS 細胞では、ホスト細胞の遺伝子に全く影響を与

えない樹立方法であるセンダイウイルスベクターとプラスミドベクターの方法で作成したiPS細胞の方がコロニー形成能力が低いことが明らかとなった。

図2 由来や誘導方法の異なるiPS細胞のコロニー形成能



### D. 考察と結論

1. 平成 25 年度は理研バイオリソースセンターからの細胞を提供していただき、その安全性への実験を行うことができた。今後、他の研究施設からの提供も促進して行う予定である。
2. ROCK inhibitor については、継代時の分散後に処理することが最も強く iPS 細胞のコロニー形成力を高めることができた。今後そのメカニズムを解析する。
3. 試験管内でのコロニー形成能力はがん化能力を測定する指標として使われることもある。したがってコロニー形成能力が高い iPS 細胞株



は安全性について注意深くその発ガン性を検討する必要がある。今回の結果にてソースとなる細胞の遺伝子に傷をつけることなく作成できる方法（プラスミドベクターやセンダイウイルスベクター）にてコロニー形成能力が低かった点は、これらの方法がより安全な iPS 細胞を作る上で優れていることを示唆している。

4. 一方、血液細胞から作られている iPS 細胞については、実験に用いたすべての細胞株のコロニー形成能力が、作成方法は同じで他の細胞から作成した iPS 細胞と比較して高かった。このことは血液細胞から作成した iPS 細胞が他の細胞から作成した iPS 細胞よりもより腫瘍化の活性が高い可能性を示している。今後は、この結果を確認していく実験を追加してこの結果の正確さを確立していく予定である。

#### **E.健康危険情報**

該当なし。

#### **G.研究発表**

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

##### 1. 論文発表

特になし。

##### 2. 学会発表

江良択実 iPS 細胞と再生医療 第14回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 2013年9月28日 東京

#### **H.知的所有権の取得状況（予定を含む）**

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

特になし。

## 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究分担者 糸昭苑 熊本大学・発生医学研究所・多能性幹細胞分野・教授

### 研究要旨

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。研究分担者である糸は、平成 25 年度においては iPS 細胞の特性解析に利用する簡便な内胚葉分化の方法について検討した。検討の結果、支持細胞である M15 細胞と凍結保存培地を利用することにより簡便かつ再現性のよい内胚葉分化誘導方法を構築できた。

### A.研究目的

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。研究分担者である糸は、平成 25 年度においては iPS 細胞の特性解析に利用する簡便な内胚葉分化の方法について検討した。

### B.研究方法

ヒト iPS 細胞株は標準株として 201B7 株および Toe 株を用いて検討を行った。内胚葉分化に関しては、支持細胞である M15 細胞（白木ら、*Stem Cells*, 2008）を用いた。分化誘導培地はあらかじめ大量に作成し、使用する分ごとに個分注して -80℃に保存した。分化状態に関しては RT-PCR 解析、免疫染色、フローサイトメトリー解析を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

### C.研究結果

本研究では、個々の iPS 細胞株の内胚葉分化指向性を調べる目的で簡便な内胚葉分化の方法について検討した。当初はマトリゲルや Fibronectin といった細胞外マトリックスをコー

ティングしたデッシュを用いて内胚葉分化を行っていたが、実験回ごとの分化誘導効率に若干のバラつきがあり、iPS 細胞の特性解析手法としては問題があると考えられた。

そこでより安定した結果を得ることを目的として、支持細胞である M15 細胞を用いた内胚葉分化を試みた。検討の結果、実験回ごとのバラつきが少なくなり、特性解析に耐えうると判断した。続いて、実験回ごとの分化効率のバラつきの原因として培地の劣化等が考えられたため、凍結保存培地を採用した。具体的には、1 バッチとして 500ml の分化培地を作成し、個分注を作成し凍結保存し、使用する際に融解して利用した。その結果、実験回ごとのバラつき低下とともに培養液の作成という煩雑な作業が一度で終了することで分化培地作成時の人的ミスリスク軽減にも成功した。

### D.考察

本年度は、支持細胞である M15 細胞と凍結保存培地を利用することにより、再現性のよい内胚葉分化誘導方法を構築できた。今後は、構築した方法を用いて個々の iPS 細胞株について内胚葉分化指向性を検証する。

### E.結論

M15 細胞と凍結保存培地の利用により簡便か

つ再現性のよい内胚葉分化誘導方法を構築できた。

## F.健康危険情報

該当なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M, Kume S\*. 2014. VMAT2 identified as a regulator of late-stage  $\beta$ -cell differentiation. *Nat Chem Biol*. 10(2):141-8.

Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S\*. 2013. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 26(Pt 23):5391-9.

Iwashita H, Shiraki N, Sakano D, Ikegami T, Shiga M, Kume K, Kume S\*. 2013. Secreted cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of the pluripotent stem cells. *PLoS One*. 8(5):e64291.

Ogaki S, Shiraki N, Kume K, Kume S. 2013. Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cells*. 31(6):1086-96.

Umeda K, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Higuchi Y, Tokieda K, Kume K, Mitani K, Kume S\*. 2013. Albumin gene targeting in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vector to monitor hepatic differentiation. *Stem Cell Res*. 2013. 10(2):179-94.

坂野大介 糸 昭苑、膵  $\beta$  細胞・膵島の再生研究 2014 『Recent studies in regeneration of pancreatic  $\beta$  cells』 最新医学 69 巻、36-41.

白木伸明、糸 昭苑、2013、第 2 章 iPS 細胞・ES 細胞の開発応用、『再生医療・細胞培養の開発と市場』シーエムシー出版、東京、14-23

白木伸明、糸 昭苑、2013、ES/iPS 細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発、Dojin News、149 1-6

坂野大介 糸 昭苑、2013. 幹細胞から  $\beta$  細胞を誘導するシグナル、『膵島のバイオロジーの新たな展開』Diabetes Frontier vol 24, 544-549.

山添太士、白木伸明、佐々木裕、糸 昭苑、2013. 肝臓の再生医療、日本医師会雑誌 vol 142, no. 4, 791-795.

勝本恵一 糸 昭苑、2013. 膵臓の初期発生機構の解明と再生医療への応用、特集『膵  $\beta$  細胞の発生生物学と再生医療の応用』内分泌・糖尿病・代謝内科 Vol 36 No. 3, 169-175.

大垣総一郎 糸 昭苑、2013. 消化器幹細胞：膵上皮『Surgery Frontier』Vol.20, 70-72.

### 2. 学会発表

糸昭苑 「多能性幹細胞から膵  $\beta$  細胞への分化誘導」第 13 回日本再生医療学会総会『iPS 細胞、ES 細胞の生物学の進歩と再生医療応用』シンポジウム 平成 26 年 3 月 6 日京都（招待講演）

糸昭苑 「多能性幹細胞を用いた膵  $\beta$  細胞への分化誘導研究」「第 3 回細胞再生医療研究会」2013 年 7 月 27 日神戸（特別講演）

糸昭苑 「多能性幹細胞を用いた膵  $\beta$  細胞の発生再生研究」内分泌代謝学サマーセミナー、2013 年 7 月 12 日 由布院（招待講演）

大垣総一郎、白木伸明、桑和彦、桑昭苑「Wnt シグナルと Notch シグナルが ES 細胞から腸上皮細胞への分化を促進する」第 65 回日本細胞生物学会 2013 年 6 月 19 日、名古屋.

Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, Kikawa K., Endo F., M., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S. Screening of small compounds to promote differentiation of mouse ES cells to functional pancreatic  $\beta$  cells. ISSCR Boston、June 12-15, 2-13, 2013. (ポスター)

Kume, S. Screening for low molecular compounds that potentiate beta cell differentiation. Canada- Japan Stem Cell Workshop ISSCR 2013, Boston. June 13, 2013.

Yamazoe T, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume, S. Chemical genetic identification of molecules that potentiate hepatic maturation of human iPS-derived hepatocytes, ISSCR Boston、June 12-15, 2-13, 2013 (ポスター)

Kume, S. Signals guiding pluripotent stem cells into pancreatic beta cells. Beta Cell Workshop 2013 Kyoto April 24, 2013 (招待講演)

#### H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- |          |      |
|----------|------|
| 1.特許取得   | 該当なし |
| 2.実用新案登録 | 該当なし |
| 3.その他    | 該当なし |

## 画像定量解析による iPS 細胞の品質評価の確立

研究分担者 斉藤 典子 熊本大学 発生医学研究所 准教授

### 研究要旨

iPS 細胞の作成過程では、正常にリプログラムされたものと不完全なものが混在する。これらを生きたままの状態での識別可能とすることは、その後の疾患治療、薬剤スクリーニング、病態解明モデルの確立を含めた応用に重要である。本研究では、機械学習を用いた画像解析により、リプログラム細胞の状態を評価する方法を確立することを目的としている。

本研究ではまず、機械学習に必要な正常および非 iPS 細胞のコロニー画像を多数取得し、画像ライブラリーを構築した。これを用いてパターン認識ソフトウェア (wndchrm) で画像解析を行ったところ、正常 iPS と非 iPS を 80%以上の精度を持って正確に分類する条件を設定した。由来が異なる正常 iPS 細胞どうしの分類は不可能である一方、非 iPS 細胞同士は多様なリプログラミング異常を反映して、お互いに形態が異なることが示された。これらの結果から、適切な形態画像ライブラリーを構築することにより、正常な iPS 細胞に共通する形態特徴を抽出・統計解析ができ、iPS 細胞状態の客観的評価が可能であることが示唆された。

### A.研究目的

iPS 細胞は、体細胞に山中 4 因子 (OSKM; *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *cMyc*) を導入することで作成される人工多能性幹細胞である。その形成過程では、正常にリプログラムされた細胞コロニーを、不完全なものから分離する必要がある。正常 iPS 細胞を生きた状態で非侵襲性に識別可能とすることは、その後の安定した研究・臨床応用に重要である。本研究では、機械学習を用いた画像解析により、iPS 細胞の状態を評価する方法を確立することを目的とし、リプログラム細胞の品質管理・保持に貢献する。

### B.研究方法

ヒト繊維芽細胞および正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) に、センダイウイルスベクターを用いて OSKM 因子を導入し、リプログラム細胞株を樹立した (15B2、2B7、1H、2H、3H、4H)。それぞれについて、未分化状態を示す *stemness* 遺伝子群の発現を qRT-PCR および免疫染色で調べた。また、胚様体を形成させ、三胚葉の分化能を調べ、それぞれの細胞株が正常な iPS かあるいは、不完全なリプログラム

による非 iPS であるかを判定した。並行して、標準的なヒト iPS 細胞株として、201B7、253G1 を維持・培養した。

これらの細胞株について、まず、生きたコロニーの状態での位相差画像を取得 (各 60 枚づつ) し、画像ライブラリーを作製した。次に、多目的パターン認識ソフトウェア (wndchrm; Shamir L et al., *Source Code Biol. Med.* 3; 1-13, 2008) を用いて機械視覚 (マシンビジョン)、機械学習を経て、iPS 細胞と非 iPS 細胞を精度高く分類するクラシファイアーを構築した。

(倫理面への配慮)

該当なし

### C.研究結果

センダイウイルスベクターにより因子を導入して樹立した細胞株のそれぞれについて、未分化状態を示す *stemness* 遺伝子群の発現と、三胚葉への分化能を調べたところ、1H、2H、3H、4H が正常 iPS 細胞で、15B2、2B7 が非 iPS 細胞であることがわかった



(図1)。

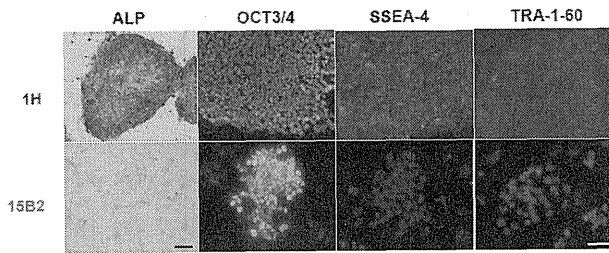


図1. センダイウイルスベクターを介したOSKM 因子の導入による細胞のリプログラム 1H 細胞株は stemness 遺伝子を発現する正常な iPS 細胞であるが、15B2 細胞株は、正常にリプログラムされなかった非 iPS であると判断した。

これらと、標準的なヒト iPS 細胞株 (201B7、253G1) を維持培養し、生きたコロニーの状態での位相差画像を各 60 枚ずつ取得し、画像ライブラリーを作製した。さらに、多目的パターン認識ソフトウェア wndchrm (wndchrm; Shamir L et al., Source Code Biol. Med. 3; 1-13, 2008) を用いて形態の類似度を測定したところ、iPS 細胞と非 iPS 細胞では 80% 以上の分類正解度で分類するクラシファイアーを構築できた。一方、正常 iPS 同士では、ほぼランダムな分類正解率 (分類精度) を示し、細胞の由来や確立の手法にかかわらず、共通した形態特徴を持つことが示唆された (図 2)。

興味深いことに、正常 iPS 細胞は、由来細胞の種類や、導入因子の数 (3 または、c-myc をのぞく 4 因子)、導入方法 (ウイルスベクターの種類) によらず、ほぼ類似した形態であることが定量的に示されたものの、非 iPS 細胞は、同じ細胞由来、作製方法を用いても、形態はそれぞれに固有のものであった。

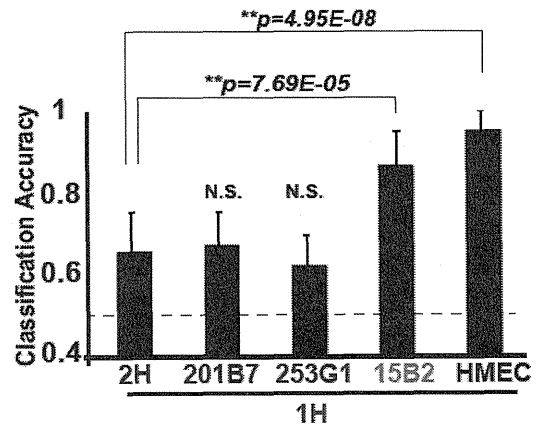


図2. wndchrm による、正常 iPS (1H) と、その他の細胞株のコロニー形態の分類精度の測定 形態が類似している場合は分類精度 (Classification accuracy) が 0.5、異なる場合は、1.0 となる。正常 iPS である 1H は、その他の正常 iPS (2H, 201B7, 253G1) と分類が困難 (CA; ~0.6) であるが、非 iPS (15B2) や、リプログラム前の HMEC から容易に分類可能 (CA; >0.8 80% 以上の分類精度) であった。

#### D. 考察

本研究より、リプログラミングの過程で、細胞は特異的な形態変化を示すことが示された。それにより、適切な形態特徴を抽出・統計解析することにより iPS 細胞状態の客観的評価が可能であることが示された。現在のところ、分類精度は 80% 程度であり、さらに頑強なクラシファイアーの確立がもめられる。これは、細胞株の種類を増やす、画像取得条件 (倍率や画像取得部位の選択など) を検討することで可能であると思われる。

また、正常にリプログラムされたものに共通する形態特徴を抽出することは、今後の課題である。現在までの研究結果においては、正常と非正常 iPS の違いは、コロニー全体の形態ではなく、個々の細胞内構造の形態に由来する可能性が高い。発生、分化/脱分化、疾患などの細胞リプログラミングの過程では、遺伝子の発現プロファイルが変化するとともに、核構造がダイナミックかつ特徴的に変動する。細胞核の形態変化は、病理診断においてがんを含む疾患の診断に用いられることから、細胞状態を評価する優れた指標と考えられる。正常 iPS と非 iPS の核内構造の変化を定量解析することに価値があると思われる。

## E. 結論

本研究により、生細胞のコロニー画像を多量に取得し、機械学習を施すことにより、一定の精度をもって、正常な iPS 細胞と非 iPS 細胞を非侵襲性に分類することが可能であることが示された。今後さらにその精度を高めるとともに、細胞核などに焦点を絞って、正常と非 iPS 細胞で顕著に異なる形態特徴を追求してゆく。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

原著論文:

Sasai, N., Saitoh, N., Saitoh, H. and M. Nakao. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. *PLoS ONE* 8 (7): e68478, 2013.

邦文単行本:

斉藤典子、松森はるか、モハメドオサマアブダラ、藤原沙織、安田洋子、中尾光善. 核内コンパートメントの生物学的意義、羊土社 イラストで徹底理解する エピジェネティクスキーワード事典 牛島俊和・眞貝洋一 編 p91-p98, 2013.

斉藤典子、徳永和明、松森はるか、中尾光善. 核内ボディの構造・機能・形成機序、化学同人バイオサイエンスシリーズ11、染色体と細胞核のダイナミクス-DNAを操る細胞の仕組み- 平岡泰・原口徳子 編p147-p165, 2013.

### 2. 学会発表

斉藤典子、松森はるか、坂本智代美、中尾光善 核スペckルの形成機序と遺伝子発現制御における機能 (第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ「クロマチンと核構造のインタープレーが織りなす生命現象」 2013年12月5日 兵庫県 神戸ポートアイランド)

富田さおり、斉藤典子 (発表者)、モハメドオサマアブダラ、藤原さおり、松森はるか、中尾光善 乳が

ん細胞の核内非コードRNA *Eleanor* を介した *ESR1* 遺伝子座の制御 (第31回 染色体ワークショップ・第12回 核ダイナミクス研究会合同開催 2013年11月27日 神奈川県箱根町湯本)

斉藤典子、松森はるか、モハメド オサマ アブダラ、藤原さおり、中尾光善. 核スペckルと核小体の形成機序と機能 Molecular mechanisms of nuclearspeckle and nucleolus formations (第86回日本生化学会大会・シンポジウム 細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能 平成25年9月11日 神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜)

斉藤典子、松森はるか、Ilya G Goldberg、中尾光善. 機械学習を用いた細胞核構造形成の解析 Morphometric analysis of nuclear structures by machine learning-pattern recognition (第65回日本細胞生物学会シンポジウム かたちの数理計測生物学 平成25年2013年6月20日 愛知県 名古屋市 ウィンク愛あいち)

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- |           |      |
|-----------|------|
| 1. 特許取得   | 特になし |
| 2. 実用新案登録 | 特になし |
| 3. その他    | 特になし |

## 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究分担者 白木伸明 熊本大学・発生医学研究所・多能性幹細胞分野・助教

### 研究要旨

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。研究分担者である白木は、これまでに必須アミノ酸であるメチオニンがヒト iPS 細胞の未分化性維持および分化を制御することを明らかにしており、本研究ではそのメカニズムについて検討を行った。検討の結果、メチオニンは糖代謝全般に影響を与えることが確認され、ヒト iPS 細胞の未分化維持におけるメチオニンの重要性を明らかにした。

### A.研究目的

本研究では、1) 臨床に実際用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、が研究の目的である。

研究分担者である白木は、培養液組成に着目して研究を行っており、これまでに必須アミノ酸であるメチオニンがヒト iPS 細胞の未分化性維持および分化を制御することを明らかにした（白木ら、*Cell Metabolism*, in press）。未分化ヒト iPS 細胞において培地中からメチオニンを5時間除去することでメチオニン代謝が止まることによるメチオニン代謝物でメチル基供与体として働く S-アデノシルメチオニン(SAM)の細胞内濃度が顕著に減少し、P53 蛋白の発現上昇およびヒストン H3K4 トリメチル修飾の減少が起こることがわかっている。本研究では、その詳細なメカニズムについて検討し、iPS 細胞の未分化維持機構の解明を目的とした。

### B.研究方法

ヒト iPS 細胞株の標準株である 201B7 およびヒト iPS 細胞としては標準株である 201B7 株および 253G1 株を用いて検討を行った。未分化維持に関しては、CSTI7 培地(細胞科学研究所)を用

いた。未分化維持培地からメチオニンを除去した特注培地（細胞科学研究所）を用いて、メチオニンが未分化維持に与える影響について検討した。メチオニン除去 48 時間には顕著な細胞死が確認できることから、除去 5, 24 時間後の各種代謝物の変化を調べた。

(倫理面への配慮)  
該当なし

### C.研究結果

未分化 iPS 細胞をメチオニン除去培養することによりメチオニン代謝経路が顕著に抑制されることは以前の検討でも明らかとなっていたが、それに加えて解糖系および TCA サイクルも影響を受けていた。

### D.考察

未分化維持におけるメチオニンの重要性を確認できたが、メチオニンによる糖代謝制御のメカニズムは不明であり、次年度以降の更なる解析が必要である。

### E.結論

メチオニンはヒト iPS 細胞の未分化維持状態における代謝を制御する。

## F.健康危険情報

該当なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

Sakano D, Shiraki N, Kikawa K, Yamazoe T, Kataoka M, Umeda K, Araki K, Mao D, Matsumoto S, Nakagata N, Andersson O, Stainier D, Endo F, Kume K, Uesugi M, Kume S\*. 2014. VMAT2 identified as a regulator of late-stage  $\beta$ -cell differentiation. *Nat Chem Biol*. 10(2):141-8.

Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S\*. 2013. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci*. 26(Pt 23):5391-9.

Iwashita H, Shiraki N, Sakano D, Ikegami T, Shiga M, Kume K, Kume S\*. 2013. Secreted cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of the pluripotent stem cells. *PLoS One*. 8(5):e64291.

Ogaki S, Shiraki N, Kume K, Kume S. 2013. Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cells*. 31(6):1086-96.

Umeda K, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Higuchi Y, Tokieda K, Kume K, Mitani K, Kume S\*. 2013. Albumin gene targeting in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vector to monitor hepatic differentiation. *Stem Cell Res*. 2013. 10(2):179-94.

白木伸明、糸 昭苑、2013、 第 2 章 iPS 細

胞・ES 細胞の開発応用、『再生医療・細胞培養の開発と市場』シーエムシー出版、東京、14-23

白木伸明、糸昭苑、2013、ES/iPS 細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発、Dojin News、149 1-6

### 2.学会発表

白木伸明、ES/iPS 細胞から内胚葉組織への分化誘導方法の開発、第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2013 年 11 月 23 日(仙台) 招待講演

白木伸明、2013 年、ES/iPS 細胞の分化における細胞外環境の役割、日本アミノ酸学会第 7 回学術大会、2013 年 11 月 2 日(熊本) 特別講演

白木伸明、2013 年、ヒト ES/iPS 細胞の内胚葉分化における細胞外環境の役割 レギュラトリーサイエンス学会第 3 回学術大会 2013 年 9 月 7 日(東京) 招待講演

大垣総一郎、白木伸明、糸和彦、糸昭苑「Wnt シグナルと Notch シグナルが ES 細胞から腸上皮細胞への分化を促進する」第 65 回日本細胞生物学会 2013 年 6 月 19 日、名古屋.

Sakano, D., Shiraki, N., Kataoka, Kikawa K., Endo F., M., Kume, K, Uesugi, M. and Kume, S. Screening of small compounds to promote differentiation of mouse ES cells to functional pancreatic  $\beta$  cells. ISSCR Boston, June 12-15, 2-13, 2013. (ポスター)

Yamazoe T, Shiraki N, Uesugi M, Kume K, Kume, S. Chemical genetic identification of molecules that potentiate hepatic maturation of human iPS-derived hepatocytes, ISSCR Boston, June 12-15, 2-13, 2013 (ポスター)

## H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 特になし
- 2.実用新案登録 特になし
- 3.その他 特になし

## 臨床研究に活用する iPS 細胞の安定性・安全性を保持した保存体制の確立

研究分担者 松本 志郎

熊本大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター 助教

### 研究要旨

本研究では、1) 臨床に用いる iPS 細胞を収集・保存し、緊急時にすみやかに細胞を解析できるシステムの構築 2) iPS 細胞を安定にかつ安全に維持・保存する方法の開発、を主たる目的としている。

本分担研究者の研究室では、臨床の患者を対象として造血幹細胞移植および肝臓移植を総計 500 例程度実施してきた。特に、希少難病である先天代謝異常症を対象とした調査・研究・治療ガイドライン作成などを厚生労働省研究班の一員として実施してきた背景がある。その中で、次世代に期待される研究として、細胞移植治療があげられており、患者家族会、厚生労働省研究会などで研究会を開き、広く海外からも専門家を招き、実施可能な土台の確立を目指してきている。細胞移植の臨床応用には、細胞の精度を維持し、治療効果を安定させ、安全な細胞を供給する必要がある。本分担研究室では、難病患者を西日本を中心として診療を行ってきた実績があり、特に成人難病と異なり、新生児・乳幼児を中心とした患者を取り扱うため、成人とは異なる注意点が必要となる。よって、安全かつ安定的な採取法の実施、分離・培養・保管・搬送の改良を行った。

### A.研究目的

本分担研究では、患者から iPS 細胞の起源となる臨床サンプルを安全かつ安定的に採取し、保存運搬する方法の確立・改良を目的として実施した。特に、当施設で扱う患者は新生児・乳幼児が大部分であり、成人とは異なる注意点（脆弱な皮膚、易感染、サンプル採取量が少ないなど）が多数存在し、新生児・小児に使用可能で一般的に利用可能な方法の確立が必要不可欠である。本年度は、新生児から iPS 細胞を作出するために必要なサンプリングの方法の確立を実施した。

### B.研究方法

場所は熊本大学医学部附属病院小児科外来もしくは小児科病棟で実施した。対象が小児であることから、説明はご両親を対象に行い、倫理委員会の承諾を得た説明文書および同意書を提示し、同意を得た。同意が得られたのちに処置を行った。

皮膚生検の処置方法については、当科外来にて診断のために過去に実施された方法の中から、①メスによるバイオプシー法、②パンチバイオプシー法、を用いた方法について後方視的に比較検討した。次に、分離された血液サンプルもしくは皮膚生検サンプルについて迅速かつ臨床の現場で実現可能な分離・培養方法について検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

患者情報の管理ならびに患者サンプルを用いた iPS 細胞の研究については、熊本大学倫理委員会の承認を得ている。また、各患者家族もしくは本人より倫理委員会の許可を得た同意書を用いて同意を得たうえで研究を行っている。収集された患者サンプルは熊本大学医学部附属病院臨床研究棟内のセキュリティーキーによりコントロールされているオートロック式の鍵により施錠



されている研究室内のディープフリーザに保存される。ディープフリーザにも施錠が施されている。また、患者情報については、インターネットに接続されていない独立したデスクトップコンピュータ内に保存され、IDとパスワードによるロックを必要とする。さらに、患者情報は当施設でのみ連結可能な暗号化処理を施し、共同研究施設へ提供される。

### C. 研究結果

#### 1. 新生児・乳幼児におけるサンプリング方法の検討

当施設で過去5年間に診断目的で皮膚生検を実施した患者について安全かつ家族にとって心理的に受け入れ可能である方法を検討した。当施設で5年間に皮膚生検をされた小児・新生児の数は25例（男児11例、女児14例）であった。皮膚生検の時期は、新生児期3例（男児1例、女児2例）、乳児期13例（男児3例、女児10例）、幼児期以降10例（男児7例、女児3例）であった。これらの患者のなかで皮膚生検後に後遺症を残した症例は①メスを用いたバイオプシー法、②パンチバイオプシー法のいずれの方法であっても、一人もいなかった。皮膚生検サンプルから繊維芽細胞の採取の成功率は、①メスを用いたバイオプシー法で100%、②パンチバイオプシー法で78%であった。また、パンチバイオプシー法では新生児の皮膚は深く潰瘍を形成し、瘢痕化した例が1例あり、新生児早期に実施する場合は注意が必要と考えられた。

#### 2. 皮膚サンプルからの繊維芽細胞分離

ヒト皮膚繊維芽細胞の分離には、0.2%トリプシンと0.02%EDTAの混液で、37°Cの温度にて新生児では10分、乳児期以降では30分間攪拌して分離し、遠心・洗浄後に10%FBS含有DMEMを用いた培養法を用いる条件が最も多くの繊維芽細胞をえることが判明した。

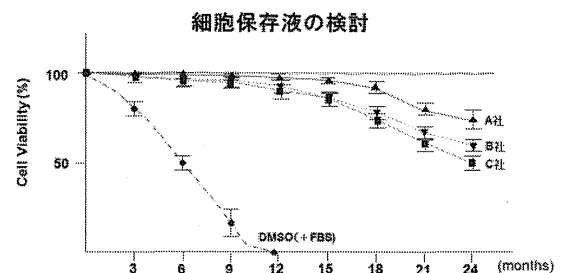
#### 3. 末梢血単核球分離法

日本人新生児の場合、通常3kg～4kgの体重

が想定される。研究のための採血の場合、3ml程度の量が許容できる最大量と考えられる。これは一見少ない量に思えるが、3kgの子供の3mlは単純計算で体重50kgの成人の50ml採血にあたることを想像されたい。我々はこの新生児血液3mlから単核球を分離し、研究代表者の江良教室によりiPS細胞を作出することに成功した。さらに、より迅速に短時間で清潔に単核球を分離するために単核球分離用のキット（BD Vacutainer CPT）を用いて単核球の分離を行った。その結果、従来のフィコール法と比較して、単核球の収量は約15%増加し、分離時間は1時間以上短縮され、細胞の生存率は変わらなかった。

#### 4. 保存方法

iPSの保存方法は日々新しい変更が施され、改善が図られているため比較検討が困難である。よって、当研究室では、本研究開始以前より代謝異常症の患者の皮膚生検および保存の経緯から、皮膚繊維芽細胞の保存状態を市販の保存液を用いて比較検討した。その結果、保存液Aが最も保存状態が良いことが判明した。



市販の細胞保存液を使用した場合の幹細胞の生存率を比較検討した。その結果、A社保存液が最も生存率が高かった。

### D. 考察

乳幼児をはじめとした小児の生体サンプル採取の実施には、①安全性の確立、②確実性、③汎用性、④微量であること、が重要と考えられる。臨床の現場で、実際に応用可能であるレベルに達するには、必要であろうと我々臨床家が想定するベストの方法を考案した。また、いったん採取された皮膚サンプルから繊維芽細胞が分離されないケースが存在した。これについては、①消毒

液の混入、②細菌のコンタミネーション、③表皮のみの分離、④過剰な全処理などいくつかの要因が考えられたが、特に新生児の場合と学童期の小児の皮膚構造は大きく異なるため、サンプリングから前処理についても留意が必要であると考えられた。また、我々の研究室では長期的に患者皮膚繊維芽細胞を保存してきた経験から市販の保存液を用いた保存方法の比較検討を実施したが、これについては、いずれの会社も1年未満の保存期間であれば有意な差は認められず、長期保存を行う場合は、1年に1回は解凍・培養して細胞のクオリティーをチェックし、再保存が望ましいと考えられた。

## E. 結論

乳幼児にも安全に受け入れ可能な皮膚生検方法と末梢血単核球分離方法を検討した。パンチバイオプシー法は経験に関係なく比較的容易に皮膚採取が可能であるが、新生児の場合はサンプル量が多くなりすぎて潰瘍形成につながる可能性があり、注意が必要と考えられた。また、末梢血単核球については、新生児も含めて小児全般で市販のキットを用いた分離が時間を短縮し、労力を削減でき、収量を上げることができた。また、皮膚繊維芽細胞の保存は、保存液Aが安定的に皮膚細胞を保存できたが、比較検討した3社の保存液では、1年以内の生存率には有意差はなく、1年に1回程度、解凍培養してクオリティーをチェックし、再保存することが望ましいことが示唆された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Akiko Yamamoto, Kimitoshi Nakamura, Shirou Matsumoto, Masanori Iwai, Yosuke Shigematsu,2 Go Tajima, Miyuki Tsumura,

Satoshi Okada, Hiroshi Mitsubuchi<sup>1</sup> and Fumio Endo. VLCAD deficiency in a patient who recovered from ventricular fibrillation, but died suddenly of a respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics International* 2013 Dec; 55(6):775-8.

2. Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, Yorifuji T, Kasahara M, Horikawa R, Endo F. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J Hum Genet.* 2013 May;58(5):285-92.

### 2. 学会発表

1) Shirou Matsumoto, Takumi Era, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo. In vitro modeling of methylmalonic acidemia (MMA) using patient specific induced pluripotent stem cells. The 3rd ACIMD and the 55th Annual Meeting of JSIMD, Nov. 29. 2013.

2) Ken Momosaki, Shirou Matsumoto, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Toshika Okumiya, Fumio Endo. Newborn screening for Pompe disease in a Japanese region. The 3rd ACIMD and the 55th Annual Meeting of JSIMD, Nov. 28. 2013.

3) Rieko Sakamoto, Shirou Matsumoto, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo. Improvement of development, growth and QOL of the patients of methylmalonic acidemia after liver transplantation. The 3rd ACIMD and the 55th Annual Meeting of JSIMD, Nov. 28. 2013.

## H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得 特になし