

201335016A

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(再生医療関係研究分野)

iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した
培養技術の標準化に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古江美保

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目次

I 総括研究報告

iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究	1
研究代表者 古江-楠田 美保	

II. 分担研究報告

1. インテグレーションフリーシステムを利用して樹立したヒト iPS 細胞の品質変動及び分化に及ぼす影響の解析	13
研究分担者 栗崎 晃	
2. iPS 細胞の培養・ハイスループット分化評価	22
研究分担者 大沼清	
3. 中胚葉分化誘導の標準化と評価	34
研究分担者 川端 健二	
4. iPS 細胞由来分化細胞の品質の検証	45
研究分担者 山田 弘	
5. iPS 細胞等の代謝解析	52
分担研究者 竹森 洋	
6. iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究 ..	58
分担代表者 櫻井 文教	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
IV. 研究成果の刊行物・別刷	67

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（総括）研究報告書**

I. 総括研究報告

iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究

研究代表者 古江-楠田 美保

独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部

ヒト幹細胞応用開発室 研究リーダー

研究要旨： ヒト iPS 細胞は医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年、次々と分化プロトコールが発表されている一方、同じ iPS 細胞株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多い。実験者又は研究施設が変わることによるヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。その原因の一つに培養技術が挙げられる。ピペッティングなど単純な作業を誤ることが iPS 細胞の未分化状態に影響を及ぼすことは経験上知られているが、分化誘導の再現性にどのような影響を及ぼすかなど、具体的に検証された研究はない。ISCI (International Stem Cell Initiative) はグローバルスタンダードの構築を目指したヒト幹細胞の標準化を行っているが、詳細な個々の作業までは検討していない。そこで、本研究では、iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明する。iPS 細胞の品質変動要因を明確にして培養技術を標準化することにより、その重要性を啓蒙し、創薬研究推進を図る。

研究協力者

菅一岸本 三佳：難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室 特任研究員

分担研究者

栗崎 晃：独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 幹細胞制御研究チーム 研究チーム長

大沼 清：長岡技術科学大学 生物機能工学専攻 准教授

川端 健二：独立行政法人 医薬基

盤研究所 創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

山田 弘：独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー

竹森 洋：独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト プロジェクトリーダー

櫻井 文教：大阪大学大学院 薬学研究科 分子生物学分野 准教授

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年、次々と分化プロトコールが発表されている一方、同じ iPS 細胞株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多い。実験者や研究施設が変わることによるヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。その原因の一つに培養技術が挙げられる。ピペッティングなど単純な作業を誤ることが iPS 細胞の未分化状態に影響を及ぼすことは経験上知られているが、分化誘導の再現性にどのような影響を及ぼすかなど、具体的に検証された研究はない。そこで、①(i)培養手技の違いが iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検証する (H25-28)。また、(ii)培養条件の違いによる品質変動を検証する (H26-29)。また、② iPS 細胞を研究に応用する際には、iPS 細胞そのものではなく、iPS 細胞から特定の細胞に分化した細胞が利用されるため、まず、(i)分化プロトコールを標準化し (H25-28)、(ii)個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証する (H26-29)。具体的には、3 胚葉 (神経細胞等 [外胚葉]、心筋・血球系細胞等 [中胚葉]、肝臓細胞等 [内胚葉]) への分化能の再現性に及ぼす影響を検証する。更に、分化細胞の薬剤感受性を検討することで iPS 細胞の品質変動による影響を検証する (H25-29)。なお、申請者らは、ヒト初代肝細胞に約 170 種の化合物を曝露した際の遺伝子

発現データをトキシコゲノミクスデータベースに構築する作業を既に完了しており、分化細胞の品質検証に必要な測定エンドポイントを探索する環境も整備している。

上記研究に基づき、iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明する。また、iPS 細胞の品質変動要因を明確にし、培養技術を標準化することにより、その重要性を啓蒙し、国内の iPS 細胞を用いた創薬研究の推進を図る。ISCI (International Stem Cell Initiative) はヒト幹細胞の標準化を行っており、グローバルスタンダードの構築を目指した基準を作成しているが、個々の作業の詳細な設定までは検討していない。高品質な iPS 細胞を培養するために必要な手技を詳細に検討する本研究は他に類を見ず、iPS 細胞に係る今後の創薬研究を支援し、発展させるために不可欠である。

今年度、培養技術についての基本的技術の検証については、栗崎、大沼、古江、竹森が担当する。まず、栗崎はヒト iPS 細胞を同じドナーから異なる方法にて iPS 細胞を作成し、比較の準備を行った。竹森は iPS 細胞の状態を把握するための新規評価法として代謝解析を試みた。また、大沼は、分化誘導方法は微小流体制御培養システムに、無血清・無フィーダ培養を組み合わせた分化アッセイシステムの策定を行った。また、分化細胞の品質検証は川端、山田、櫻井が担当した。詳細に

についてはそれぞれの分担報告に譲る。

B. 研究方法

① 未分化状態における品質変動の要因の検証

-培養技術-

熟練者及び初心者技術を模倣した手技により培養し、手技の違いがiPS細胞の品質に及ぼす影響を複数機関で検証を行うために、まず、ピペッティング回数による品質変動を検討した。京都大学iPS細胞研究所(山中研究室)により樹立されたヒト皮膚線維芽細胞由来iPS細胞201B7株を用いて、ピペッティング回数のヒトiPS細胞の品質に及ぼす影響を検討する方法の策定を行った。

具体的には、以下に方法を示す。

細胞は、リコンビナント・ビトロネクチン (Vitronectin XF™、STEMCELL TECHNOLOGIES 社 Cat#ST-07180) でコーティングした6ウェルプレート (グライナー社 CELLSTAR Cat#657185 浮遊性細胞培養用) を用いて、無血清培地・TeSR™-E8™培地 (STEMCELL TECHNOLOGIES 社 Cat#ST-05940) で培養を行ったヒトiPS細胞201B7細胞を用いた。継代6日目の細胞の培養液をアスピレーターで除き、1ウェルあたり1mLの剥離剤 (Gentle Cell Dissociation Reagent STEMCELL TECHNOLOGIES 社 Cat#ST-07174) を加えて、室温で6分30秒インキュベートした後、すぐに剥離剤をアスピレーターで除く。1ウェルあたり1mLのTeSR-E8培地を添加し、セルスクレーパーを

用いて細胞のコロニーをウェルの培養面から剥離させる。剥離した細胞塊を碎かないよう慎重に15mL コニカルチューブに回収し、遠心操作 (室温、300回転、1分) で細胞塊を沈殿させ、上清を除き、12mlのTeSR-E8培地に懸濁し、3本の15mL コニカルチューブに分注する。10mlピペット (ファルコン) ならびに電動ピペット (ファルコン) を用いて、各チューブの細胞懸濁液をそれぞれ2回、5回、20回ピペッティング操作を行った後、リコンビナント・ビトロネクチンをコートした6ウェルプレートに1:4、ならびに1:10の割合で細胞を播種した。

細胞が十分に接着した2日目より、自動培養観察装置 (バイオステーションCT、ニコン) を用いて、12時間毎に生細胞画像を取得した。生細胞画像の解析は、他のプロジェクトにて開発した画像解析ベータ版ソフトを用いて行った。

培地交換は2日間毎 (播種後2日目、4日目) に行い、播種後6日目に、培養液を除去し、固定剤 (4%パラフォルムアルデヒド) で室温で15分間固定を行った。PBSにて3回洗浄して固定剤を除去し、マウス抗Vimentin抗体およびウサギ抗Oct3/4抗体を用い、間接蛍光抗体法 (使用抗体は下表を参照) で染色し、Hoechst33342で核染色を行い、イメージングサイトメーターINCELL Analyzer 2000 (GEヘルスケア社) またはバイオステーションCT (ニコン) を用いて蛍光画像を取得・解析を行った。

	1次抗体	2次抗体
Vimentin	Monoclonal Anti-Vimentin antibody produced in mouse clone V9, ascites fluid (SIGMA社、V6630)	Alexa Fluor® 555 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed (ライフサイエンス社、A21424)
Oct3/4	Oct-3/4 Antibody (H-134), rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz社、sc-9081)	Alexa Fluor® 647 Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) (ライフサイエンス社、A21443)

」に従って行うほか、各研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。また、コントロール細胞として使用するヒトES細胞使用研究に関しては「ヒトES細胞の使用に関する指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた規定を遵守して研究を遂行する。動物実験については、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに各研究機関の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施するものであり、倫理審査の承諾を得て行う。これらを含めて、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については研究開始前に所定の手続きを行う。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、研究を推進する。

② 分化プロトコールの標準化と分化誘導再現性の検証

- 分化プロトコールの標準化のためのプロトコール収集-

iPS細胞から外胚葉である神経系細胞への分化プロトコールの収集を行い、収集したプロトコールを検討し、コントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコールを策定することを目標としている。H25年度は、これまで報告されているヒト多能性幹細胞から神経系への分化プロトコールを収集した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究を実施する場合には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、その他の研究は「臨床研究に関する倫理指針

C. 研究結果

① 培養技術

201B7 細胞を用いて、継代作業時のピペッティング回数之差が、播種後の細胞形態、細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。実際には、図 1-1 に示すようなウェルデザインを用いて、実験を進めた。イメージングサイトメーターによる蛍光染色画像の解析により、播種後 6 日目の細胞数、Vimentin 強陽性 (Vimentin++) 細胞、及び Oct3/4 陽性細胞 (Oct3/4+) について解析を行った (図 1-2、図 1-3)。また、生細胞画像を用いた細胞形態解析を行った (図 1-4)。

以上の結果より、播種密度であってもピペッティング回数之差によって 6 日後の細胞数や Vimentin 強陽性細胞数に大きく影響が出ることが明らかとなった。また、ピペッティング回数之差は、生細胞画像の解析によって示された、正常細胞領域と異常細胞領域が全体に占める

割合にも影響を及ぼすことが明らかとなった。これらの免疫染色解析、生細胞画像解析は、細胞継代時のピペッティング回数のような、細胞培養に影響を与える細胞培養の手法の差を数値化するのに有効であるということが示された。

② 分化プロトコールの標準化のためのプロトコール収集

神経分化プロトコールを収集し、調査した結果の一部を下表に示す。今回の調査により、これまで公表された神経分化誘導プロトコールにおいては、分化誘導に要する日数が非常に長いことや誘導神経の評価方法が多岐にわたっていること、また、再現性が比較的低いことが明らかとなった。また、誘導期間が非常に短いプロトコールにおいては、その多くが分化誘導の前段階で特定の遺伝子強発現やフローサイトメーターによるソーティングのステップが必要であった。

Reference	PMID	Targeted Cell Type	Time to Tuj1/ MAP2+ Cells	Time to Functional Synapses	Yield of Neurons	Neuronal Purity	Neuron Subtype Purity
Hu et al., 2010	20160098	Neurons	~6 weeks	12 weeks	ND	15-79%*	Mixed
Zhang et al., 2001	11731781	NPCs	4-5 weeks	ND	ND	ND	Mixed
Johnson et al., 2007	17376968	Neurons	4 weeks	7 weeks	ND	89 ± 3%*	Mixed
Chambers et al., 2009	19252484	NPCs	~3 weeks	ND	ND	82%*	Mixed
Elkabetz et al., 2008	18198334	NPCs	~3-4 weeks	ND	ND	ND	Mixed
Chambers et al., 2012	22750882	Nociceptive sensory neurons	~2 weeks	ND	ND	>75%*	>60% **
Kriks et al., 2011	22056989	Midbrain dopamine neurons	~3-4 weeks	>7 weeks	ND	ND	60%-80%**
Koch et al., 2009	19218428	NPCs	4 weeks	ND	ND	40-70%*	mixed
Espuny-Camacho et al., 2013	23395372	Cortical excitatory neurons	~3-4 weeks	>8 weeks	ND	40% *	<20%**
Wu et al., 2007	17693548	Neurons	4 weeks	~5 weeks with glia coculture	ND	70-80%*	mixed
Maroof et al., 2013	23642365	Inhibitory forebrain neurons	~3-4 weeks	~6 weeks	ND	~70% **	80%**
Nicholas et al., 2013	23642366	Inhibitory forebrain neurons	~3-4 weeks	8 weeks with glia coculture	ND	92% **	76%**
Israel et al., 2012	22278060	Neurons	~3-4 weeks	~4-5 weeks	ND	90% **	mixed
Zhang et al., 2013	23764284	Excitatory neurons	~1 week	2 weeks	~100%***	100%***	~100%***

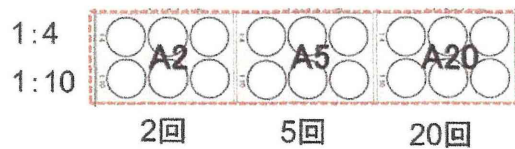


図 1-1 実際のウェルデザイン (6 ウェルプレートの使用法) 播種密度 1 : 4 または 1 : 10。継代作業時のピペッティング

回数 2 回、5 回、または 20 回。1 条件につき 3 ウェルずつ実験をおこなう。

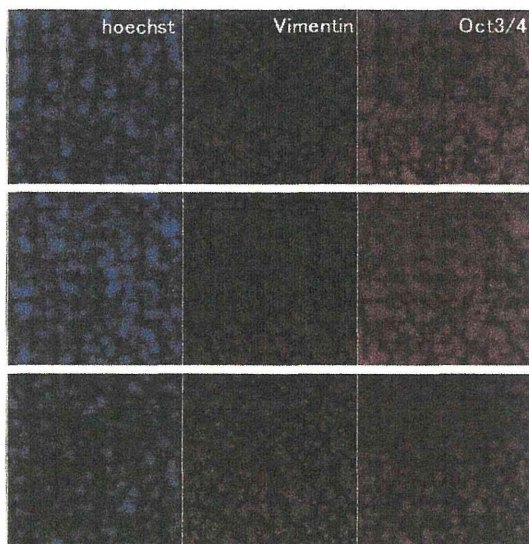


図 1-2 免疫染色画像の例

イメージングサイトメーターにより取得した蛍光画像の解析例を示す。上：ピペッティング 2 回、中：ピペッティング 5 回、下：ピペッティング 20 回。いずれも播種密度 1 : 4 のウェルの撮像範囲をすべてタイリングしたものを 1 ウェルずつ示している。

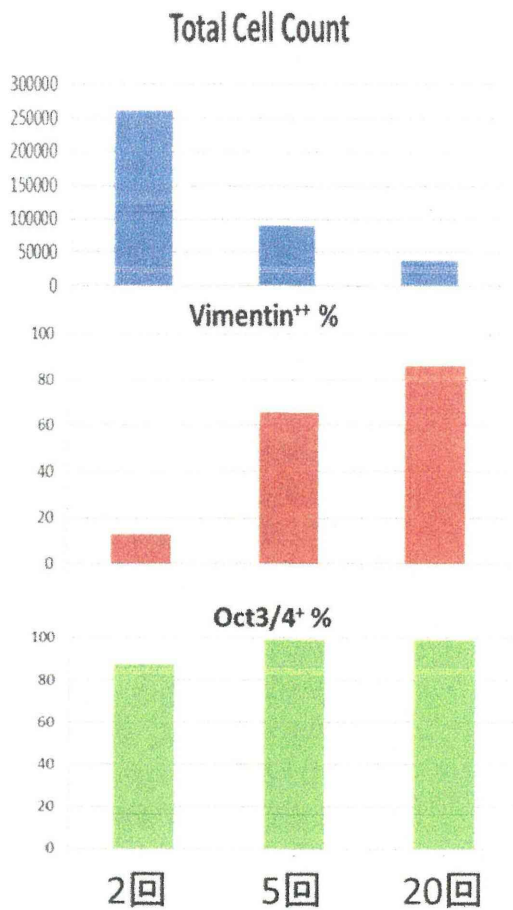


図 1-3 免疫染色解析結果
イメージングサイトメーターにより取得した蛍光画像の解析例を示す。図 1-1 の画像について解析した結果。

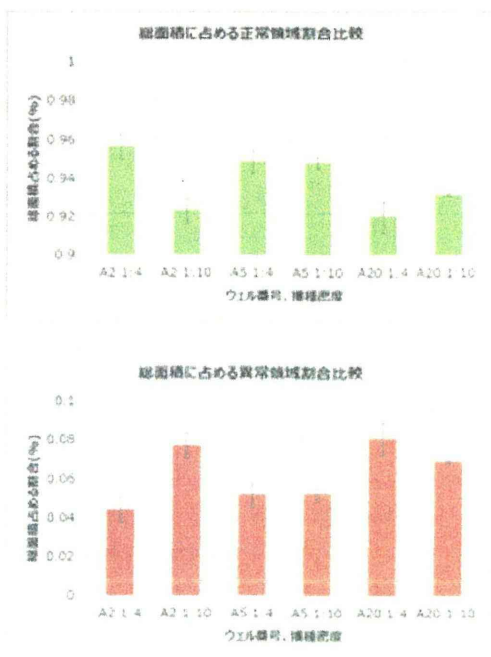


図 1-4 生細胞画像解析結果
開発した解析ソフトベータ版を使用して生細胞画像を解析し、正常な細胞形態の領域と異常な細胞形態を示す領域を自動検出した結果。グラフは 1 条件 3 ウェルの平均値と誤差で表される。

D. 考察

個人差を反映するヒト由来機能細胞を毒性評価ツール等として利用し、安全性の高い新薬の開発を目指す研究は、日本発の画期的発明を活かした、独創性の高い iPS 細胞技術を用いることで初めて可能になる。しかし、現在精力的に行われている幹細胞を用いた基礎研究の成果等が広く実用化されるためには、ヒト iPS 細胞の品質の安定性と分化効率の再現性の向上が課題となっている。従来より、ヒト ES 細胞を用いた研究の再現性が低いことが認識されており、ヒト多能性幹細胞を用いた医療、創薬利用を推進するために、国際標準化プロジェクトが推進されている。日本は、ヒト iPS 細胞作製技術や分化誘導技術開発では国際的にリードしている一方、ヒト ES 細胞研究による先行技術や経験に基づく基盤技術やノウハウの蓄積が乏しいため、英米に比べてヒト幹細胞の産業応用のための環境整備が遅れている。日本国内で iPS 細胞標準化プロジェクトは京都大学 iPS 細胞研究所において推進されているが、高い培養技術を持っていることが前提とされており、細胞自体の品質変動に注目した研究は、国内外においても行われていない。iPS 細胞の品質変動要因を明確にして培養技術を標準化し、その重要性を啓蒙することは、創薬技術開発研究において公的機関として行うべき重要な研究課題である。

実際、ピペッティングという培養において基本的な操作について、

iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検討したところ、大きな影響を与えることが明らかとなった。従来、ヒト多能性幹細胞を継代する際には、コロニーは 50～100 個程度の細胞集団に分散することが望ましいとされ、それ以上小さく分散すると、分化したり、細胞死することが知られている。しかし、ヒト ES 細胞の培養経験がない場合には、具体的にどの程度ピペッティングするとどの程度の影響を及ぼすのか、十分な理解が得られていない。そこで、実際に 2 回、5 回、20 回とピペッティングを行って、具体的な操作に結びつけて実証することが必要であると考えた。実際、日本再生医療学会における臨床医療資格認定セミナーならびに同学会におけるランチョンセミナーにて概要を説明し、その結果に多くの反響をいただいた。今後、より詳細な解析を行い、報告する予定である。

ヒト多能性幹細胞は、分化させて利用することが目的である。現状では未分化状態を維持して増幅する際の標準化に注目を集めているが、欧米ではすでに分化させてからの標準化プロジェクトが進んでいる。高効率な分化誘導法が開発されたとしても、それが産業利用されるためには、再現性が高く安定供給される必要がある。熟練者のみが供給できる方法では産業化への利用は難しい。また、使用するマテリアルや細胞株によってその効率は変わってくるため、国内で使用できる細胞株、マテリアルを使って、再現性高い分化細胞を得るための標準化が必要である。一方、低い再現性の原

因として、原材料である iPS 細胞の不安定な未分化状態があげられる。上記で述べたように品質の低下した iPS 細胞を使って分化させた場合、分化効率の低下のみならず、その分化細胞の品質にどれだけ影響があるのか、これまで検証されたことはない。品質の異なる原材料を用いて分化誘導した細胞を比較するために、分化効率が低くても高い技術を必要としない再現性の高いプロトコルを策定する必要がある。外胚葉への分化誘導法は、ニューロスフェアなど凝集体を作成して誘導する方法が一般的である。しかし、この方法はロット差が大きく、また、分化過程の形態的観察が難しい。そこで、二次元培養法で既知の組成からなる分化誘導法 UKN を選ぶこととした。この方法では、成熟した神経細胞を誘導するわけではないが、二次元で短期間に判定する方法であることから、当該研究において有用な方法であると思われる。H26 年度はこの方法の再現性やマテリアルなどを確認し、詳細なプロトコルの策定を行っていく予定である。

E. 結論

本研究において、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明するため、まずは培養の基本的技術の一つであるピペット操作によるヒト iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検討した。この検証結果は、幹細胞研究者の注目を浴びつつある。引き続き、H26 年度も検証を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, Furue MK, Mizuguchi H. HHEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin. PLoS One, 2014 Mar 20;9(3).
2. Kinehara M, Kawamura S, Mimura S, Suga M, Hamada A, Wakabayashi M, Nikawa H, Furue K.M. 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 2014 Jan 11.
3. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF β receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. Development. 2014 Jan;141(1):91-100.
4. 菅 三佳、古江一楠田 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. 実験医学別冊「ES・iPS 細胞実験スタンダード」(2014)

5. 古江一楠田美保 HUMAN SCIENCE (Vol. 24 No. 3) TOPIC III: ヒト iPS 細胞研究の海外動向 p24-27 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 (2013)
6. 川寄敏祐、川寄伸子、中尾広美、松本正悟、古江一楠田美保、豊田英尚 実験医学増刊: 第三の生命鎖 糖鎖の機能と疾患 (Vol. 31 No. 10) 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 p129-133 羊土社 (2013)

その他

7. 福田隆之、古江一楠田美保 *In vitro* 毒性・動態評価の最前線 第6章 ヒト iPS 細胞の供給と標準化 p81-87 シーエムシー出版 (2013)

2. 学会発表

国内学会：一般講演

1. 岡村美菜子、柳原佳奈、Shandar Ahmad、劉有容、平田みつひ、水口賢司、二川浩樹、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞から内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株の選択方法 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大

- 会・総会 2013年11月23-24日
東京
2. Kana Yanagihara, Yujung Liu, Ken Fukumoto, Hiroto Banko, Keiichi Takagi, Masanori Hatashima, Satoshi Terada, Miho K. Furue. Ion beam modification of Jellyfish collagen-derived biomaterial as a scaffold for culturing human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第86回大会 2013年5月30-31日 茨城(産業技術総合研究所 つくばセンター中央第一)
 3. Minako Okamura, Kana Yanagihara, Shandar Ahmad, Yujung Liu, Mituhi Hirata, Hiroki Nikawa, Kenji Mizuguti, Miho K. Furue. Prediction of hepatocytic differentiation tendency of human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第86回大会 2013年5月30-31日 茨城(産業技術総合研究所 つくばセンター中央第一)
 4. 岡村美菜子、柳原佳奈、劉有容、加藤竜司、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞株の内胚葉分化指向性を予測するための評価法の開発 第13回日本再生医療学会 2014年3月3日 京都(国立京都国際会館)
 5. 松本尚悟、中尾広美、野中元裕、川端健二、古江一楠田美保、滝尾佑人、豊田英尚、川寄伸子、川寄敏祐 ヒトiPS/ESマーカーとしての新規糖鎖認識抗体 第86回日本生化学会大会 2013年9月11-13日 神奈川(パシフィコ横浜)
 6. 三村純代、菅三佳、二川浩樹、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞の単層無血清培養下における神経分化誘導法の開発 日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会・総会 2013年11月23-24日 東京(日本歯科大学 生命歯学部 九段ホール)
- 国内学会：シンポジウム・ワークショップなど
7. 古江一楠田美保 in vitro 毒性評価系構築におけるヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の可能性 第26回動物実験代替法学会 2013年12月19-21日 京都(京都テルサホール)
 8. Miho K Furue Standardization of culture conditions for human pluripotent stem cells toward clinical application 第40回日本低温医学会 2013年11月28日 愛知(名古屋大学 野依記念学術交流館)
 9. 大沼清、藤木彩加、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、楠田一古江美保、浅島誠 ヒトES-iPS細胞の無酵素培養 細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 2013年11月25日 東京(東京大学生産技術研究所コンベンションホール)
 10. 古江一楠田美保 臨床用ヒトES/iPS細胞の培養に使える原材

料についての考え方 第14回医薬品等ウイルス安全性研究会
2013年9月28日 東京(北里大学薬学部コンベンションホール)

11. 古江 美保 再生医療に利用する細胞の品質評価の重要性
日本分析化学会第62年会 特別シンポジウム講演 2013年9月10-12日 大阪(近畿大学 東大阪キャンパス)
12. 古江-楠田美保 ヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞の可能性
第三回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 2013年9月6-7日 東京(一橋大学 一橋講堂)

II. 分担研究報告

「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

インテグレーションフリーシステムを利用して樹立したヒト iPS 細胞の品質 変動及び分化に及ぼす影響の解析

研究分担者 栗崎 晃

（独）産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 幹細胞制御研究チーム
研究チーム長

研究要旨：ヒト iPS 細胞は、ヒトの体を構成する多くの細胞を作り出す強力な多分化能から、医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年日進月歩で、様々な細胞の *in vitro* 分化プロトコルが発表される一方で、同じ結果を再現できないことが非常に多く、文書化されていない様々な重要なポイントが存在することが、実際に実験を行っている研究者の中で示唆されている。その原因の一つは培養技術であるが、それがどのように幹細胞の培養や分化に影響を及ぼすのかについては系統的に解析されておらず、未だ iPS 細胞の培養や分化にはある程度の「名人芸」レベルのテクニックが必要とされる状態にある。本研究では、培養手技の違いや培養条件の違いによる品質変動に加えて、それらが iPS 細胞から特定の細胞への分化に及ぼす影響を検証し、個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証する。これらのトラブルシューティングを系統化することにより、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、わが国の幹細胞制御技術のレベルを引き上げることを最終目的とする。本分担研究では、特にインテグレーションフリーシステムを利用してヒト iPS 細胞を樹立し、レトロウイルス法で樹立した iPS 細胞と比較しながら上記の問題点を検証していく。本年度は、まず国内外でも広く使われ出したセンダイウイルスを用いてインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞の樹立を開始したので、その進捗状況について報告する。

A. 研究目的

本研究の目的は、iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明することである。ヒト iPS 細胞は医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されて

いる。しかし、近年、次々と分化プロトコルが発表されている一方、同じ iPS 細胞株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多い。実験者又は研究施設が変わることによるヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。そこで、iPS 細胞の品質変動要因を明確にして培養技術を標準化することにより、創薬研究推進を図ることを本研究の目的とする。

2007年に京都大学山中教授らが当初発表したレトロウイルス[1]やレンチウイルス[2]を用いたヒトiPS細胞の樹立方法の他に、近年、その樹立効率の高さやゲノムへのDNAの取込みがないことから多くの施設でヒトiPS細胞の樹立に利用されてきているRNAウイルスであるセンダイウイルスを用いた樹立方法[3-5]がポピュラーな方法となりつつある。そこで本研究計画においても、過去にレトロウイルスでヒトiPS細胞が樹立された線維芽細胞と同一患者由来の線維芽細胞からセンダイウイルスを用いてヒトiPS細胞を樹立し、これら2種類の樹立方法の異なるヒトiPS細胞を元に、恒常的にiPS細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足がiPS細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明する。特に本分担研究では、このセンダイウイルスを用いてヒトiPS細胞から樹立を行い、他の研究者に細胞を配布する。また、培養条件や様々な培養技術を合わせて比較し、品質変動の状況を複数機関で検証することでヒトiPS細胞の未分化状態における品質変動の要因の検証を行う。

B. 研究方法

初年度の平成25年度は、インテグレーションフリーな方法でヒトiPS細胞を樹立し、同じヒト線維芽細胞株からレトロウイルス4因子で樹立さ

れたヒトiPS細胞とて比較検討する細胞材料を作製するため、4因子を搭載した2種類のセンダイウイルスベクターを用いて、ヒトiPS細胞の樹立実験を開始した。

ヒトiPS細胞の樹立

これまでにレトロウイルスベクターでOct4/Sox2/Klf4/cMycの4因子を導入してiPS細胞の樹立に用いられたヒト線維芽細胞としてTIG-114細胞が知られている。このTIG-114細胞は医薬基盤研究所・JCRB細胞バンクに登録されているため(細胞番号:JCRB0534)、JCRB細胞バンクを通じて入手した。TIG-114細胞の培養には、EMEMに10%FBS及びペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で5%CO₂、37°Cで培養した。

また、ヒトiPS細胞の樹立に必要なマウス線維芽細胞はリプロセル(株)から購入した。ヒトiPS細胞の維持培養に必要なマウス線維芽細胞株(SNL76/6)は大日本住友製薬(株)から購入した。これらのマウス線維芽細胞の培養にはDMEM(low glucose)に10%FBS及びペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で5%CO₂、37°Cで培養後、マイトマイシンC処理してフィーダー細胞として利用した。

(Day0) 12 ウェルプレートディッシュの各ウェルに2x10⁵個の

TIG-114 細胞を播種した。

(Day1) 0.1%ゼラチン水溶液でコートした 12 ウェルプレートディッシュの各ウェルに 1.9×10^5 細胞となるよう MMC-MEF を播種した。また、TIG-114 細胞に MOI=3 のタイターで Oct4/Sox2/Klf4/cMyc の 4 因子を発現するセンダイウイルスを感染させ、室温で 2 時間放置した後、一晚 5%CO₂、37°C で培養した。

(Day2) 感染させた TIG-114 細胞を PBS でリンスした後、TrypLE で細胞を剥離し、前日に用意しておいた MMC-MEF に播種し、5%CO₂、37°C で培養した。

(Day3) 感染させた TIG-114 細胞の培地をヒト ES 細胞用の培地 (D-MEM/F12, 20% KSR, 0.1 M 2-mercaptoethanol, MEM non-essential amino acids, 5ng/mL bFGF にペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培地) で培養し、1-2 日ごとに培地を交換した。

(Day14) 感染後 2 週間程経過し、十分な大きさのコロニーが出現した頃に PBS でリンス後、TrypLE で細胞を継代し、0.1%ゼラチン水溶液でコートした 6 ウェルプレートディッシュの各ウェルに 3.8×10^5 細胞となるよう MMC-MEF を播いたものに ES 細胞培地で播種した。この時センダイウイルスを除去するための siRNA を RNAi Max (Invitrogen) を

用いて導入し、Rock インヒビターを添加して培養した。

siRNA 処理は 2 日おきに 3-4 回繰り返す行い、2 日後に培地交換した。

免疫蛍光染色

細胞を PBS でリンスした後、3.7%ホルムアルデヒド/PBS で室温 10 分固定し、PBS でリンスした後、50mM NH₄Cl/PBS を加え、室温 10 分放置した。PBS でリンスした後、0.5% NP40/PBS で膜透過処理し、さらに PBS でリンスした後、5%FBS/PBS で室温 1 時間ブロッキング処理をした。抗 SeV NP マウスモノクローナル抗体を 1/1600 に 5%FBS/PBS で希釈し、室温 30 分インキュベートした。その後、細胞を 5%FBS/PBS で 4 回洗った後、AlexaFluro594-anti mouse IgG 抗体を 1/500 に 5%FBS/PBS で希釈し、室温 15 分インキュベートした。その後、細胞を 5%FBS/PBS で 2 回洗浄し、0.1 μg/mL の DAPI/PBS 溶液で室温 10 分インキュベートした後、明視野及び蛍光観察し、画像取得した。なお、画像取得はオリンパス IX70 倒立顕微鏡に設置した Photometrics 社の CoolSNAP HQ² カメラを用い、Molecular Devices 社の MetaMorph ソフトウェアを利用して行った。

C. 研究結果

TIG-114 ヒト線維芽細胞を用いたセンダイウイルスによるヒト iPS 細胞の樹立

ヒト線維芽細胞(TIG-114)を医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクより入手し、以下の2種類のセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞の樹立を行った。図1に示したように、野生型のセンダイウイルスの名古屋株を元にいくつかの改変を行い、A、B、C、Dの4つの外来遺伝子を搭載可能にしたバージョンである[1]。本研究では Oct4/Sox2/ Klf4/cMyc の4遺伝子を挿入したベクター(KOSM)と RNA ポリメラーゼである L タンパク質をコードする配列部分の後に

未分化 ES/iPS 細胞で発現する miR302 のターゲット配列を導入して、iPS 細胞樹立後にセンダイウイルスがより除去しやすくしたバージョン(KOSM-302L)を利用し、ヒト線維芽細胞(TIG-114)の iPS 細胞化を行った。

センダイウイルスを MOI=3 で感染させた後、3日目の細胞を固定し、センダイウイルス特異的タンパク質の一つ NP に対するマウスモノクローナル抗体で免疫蛍光染色したところ、図2に示す通り、KOSMバージョンも KOSM-302Lバージョン共に、60-70%程度の感染効率を達成していることが確認された。さらに、センダイウイルス感染後1週間たったころにはマウス ES 細胞様の少し盛

Wild-type Sendai virus (Nagoya strain)

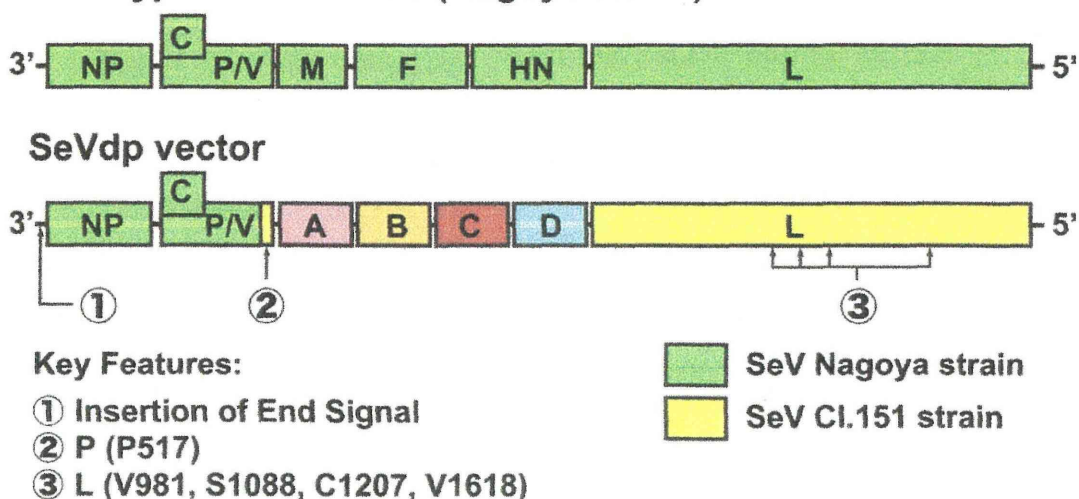
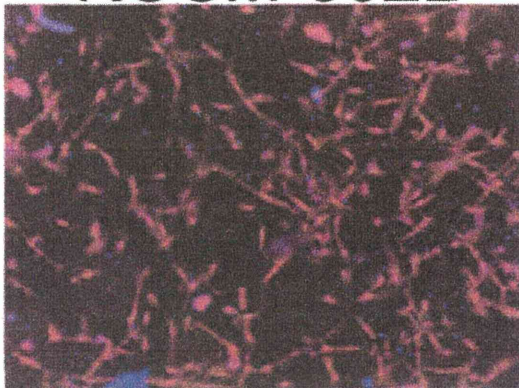
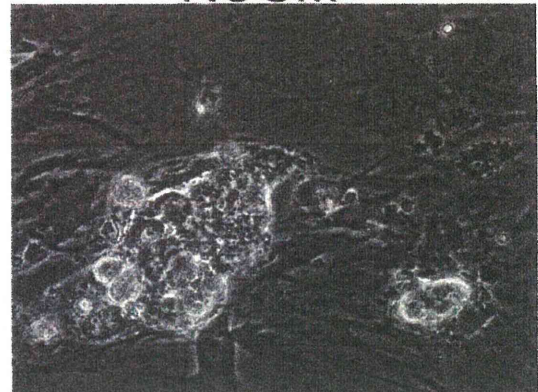


図1. センダイウイルスベクターの構造。(上) 野生型のセンダイウイルス (名古屋株) の構造。(下) 不要タンパク質コード領域の除去と①-③の改変を行い、A-Dの4つの外来遺伝子を発現しうるように改変したセンダイウイルスベクター。(参考文献3より引用)

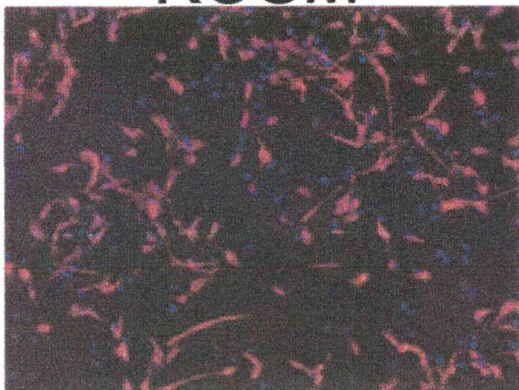
KOSM-302L



KOSM



KOSM



KOSM-302L



図2. ヒト線維芽細胞へのOct4/Sox2/Klf4/cMyc 4 因子発現センダイウイルスの感染効率 2種類のセンダイウイルスを用いてMOI=3でTIG114細胞を感染させ、翌日固定し、センダイウイルスを認識する特異的抗体で免疫染色した(赤)。DAPI(青)で核を染色している。いずれのウイルスでも60-70%程度の感染効率が確認された。

図3. TIG-114細胞をセンダイウイルスで感染させた後、1週間後に出現した初期マウスES細胞様のコロニーの形態。

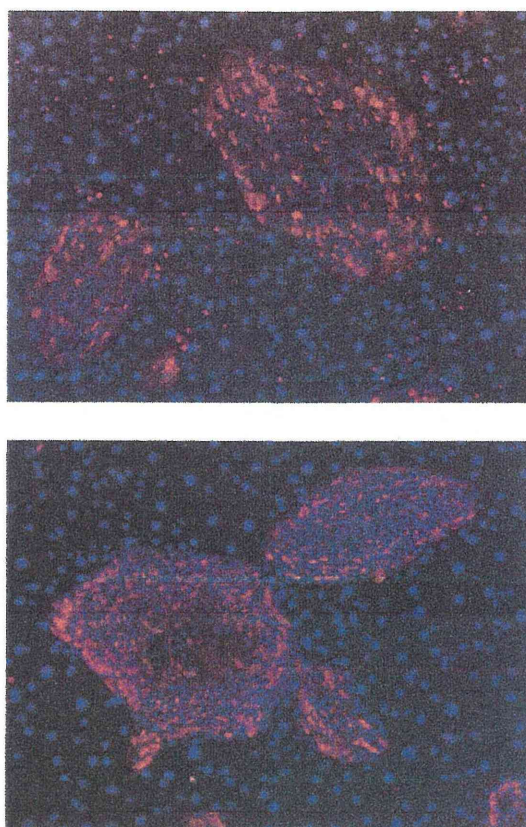


図4. siRNAをトランスフェクションして出現したヒト iPS 細胞様のコロニー。センダイウイルスで4因子を導入後、出現したコロニーを含む細胞集団を新しい MMC-MEF 上に播種し直し、約1.5か月後に観察した際のヒト iPS 細胞。細胞は Tra-1-60 抗体 (赤) とセンダイウイルス特異的 NP 抗体 (緑)、DAPI (青) で染色した。センダイウイルス特異的な緑色のシグナルは観察されず、全てヒト iPS 細胞のコロニーは siRNA によりセンダイウイルスが除去できていることが確認された。

り上がったコロニーの形成が KOSM 及び KOSM-302L いずれのウイルスで感染させた場合においても観察された (図3)。センダイウイルス感染後2週間後に継代し、センダイウイルスの L ポリメラーゼに対する siRNA を2日おきに数回トランスフェクションしたところ、形態が扁平な典型的ヒト iPS 細胞様のコロニーが出現し、Tra-1-60 陽性のコロニーであることが確認された。また、これらのコロニーはセンダイウイルス特異的な NP タンパク質を認識する抗体で全く染まらず (図4)、siRNA 処理することで、多くのヒト iPS 細胞コロニーをセンダイウイルスフリーの状態に樹立できたことを確認した。これら扁平なヒト iPS 細胞を各ウイル

スについて、7クローンずつピックアップして継代しており、これらの細胞を増殖させ安定に維持できるよう現在、増殖継代しつつストック作製を進めている途中である。

倫理面の配慮

ヒト iPS 細胞は、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。また、ヒト TIG-114 細胞は医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクよりより所定の手続きを経て入手した。なお、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 iPS 細胞の導入、ヒト iPS 細胞から除核卵への