核移植などにより個体を発生させる研究、ヒトへのヒトｉＰＳ細胞の移植、ヒトｉＰＳ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）は行っていない。

本研究は、法令及び、独立行政法人 産業技術総合研究所の所内規定を遵守し、外部委員を含む産総研所内のヒト由来試料倫理委員会で審査を経た上で、限られた研究員が利用できる専用の実験室内で行った。また、本研究で使用したセンダイウイルスでヒト iPS 細胞を樹立する実験を行うに当たっては、上記の産総研所内のヒト由来試料倫理委員会でヒト線維芽細胞 TIG-114 細胞の使用、ヒト iPS 細胞の培養・樹立の計画を申請し承認済みであり、また、産総研所内の組換え DNA 実験委員会でセンダイウイルスを用いてヒト iPS 細胞を樹立する計画は承認済みである。さらに、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、研究を行った。

D. 考察

これまでのところ、KOSM及びKOSM-302Lのいずれのウイルスで感染させた場合においても、NP陰性のインテグレーションフリーの扁平なヒトiPS細胞が多数確認されており、各ウイルスを感染させた細胞から７株ずつピックアップして培養し、継代・増殖を進めつつ、ストック作製を進めている。なお、KOSM-302Lはもともと樹立後のヒトiPS細胞からセンダイウイルスを除去しやすくするため設計したベクターであるが、これまでのところsiRNAのトランスフェクションなしで容易にセンダイウイルスを除去することには成功しておらず、本方式のみでウイルスフリーのヒトiPS細胞の樹立を簡便に行うには至っていない。また、現在のところ、１５継代後の現在でも未だヒトiPS細胞の形態は十分安定したものではなく、ところどころ自発的に分化した細胞集団が見えており、今しばらく完全なヒトiPS細胞の樹立の完了には時間がかかると思われる。しかしながら，センダイウイルスでヒトiPS細胞を樹立する際にはわりと一般的に見られる現象であり、いずれにしてももう少し維持培養しながら様子を見る必要があると考えている。

E. 結論

初年度の平成 25 年度は、まず本研究に必要な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。産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センターのプロトコルに従い、既にレト

ロウイルスによりヒト iPS 細胞が樹立されているのと同一のヒト繊維芽細胞からインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞を作製中であり、これにより種々の品質変動要因による影響を検証する細胞材料が整備できつつある。しかしながら、均一な未分化状態を維持しながらヒト iPS が安定して増殖するようになるためには、しばらく継代して様子を見て、樹立した細胞の性状を慎重に解析する必要がある。引き続き継代培養を行いつつ、iPS 細胞が安定した後、様々な解析を行い信用できる株を来年度選択する予定であるが、本年度は、まずは未分化幹細胞マーカーを発現するセンダイウイルスフリーのヒト iPS 細胞株を多数樹立し保存したところまでは達成しており、当初の計画どおり順調に研究が進行している状況にある。

F. 参考文献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.* Cell, 2007. **131**, 861-72.

2. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.* Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1720.

3. Nishimura K., et al., *Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming.* J Biol Chem. 2011 **286**, 4760-4771.

4. Nishimura T., et al., *Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation.* Cell Stem Cell. 2013 **12,** 114-126.

5. Wakao H, et al., *Expansion of functional human mucosal-associated invariant T cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation.* Cell Stem Cell. 2013 **12,** 546-558.

G. 研究発表

1. 原著論文

1) 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)

2. 学会発表

1) 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・無フィーダー培養”、日本再生医療学会（京都国際会館、京都、2014 年 3 月 4 日-6 日）

2) 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)

3) 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)

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

iPS 細胞の培養・ハイスループット分化評価

研究分担者　大沼清

長岡技術科学大学・工学部・生物系

准教授

研究要旨：ヒト iPS 細胞の創薬応用を目指した研究が進んでいる。しかし、ヒト iPS 細胞の培養は難しく、経験則に基づいた様々な培養法が試されているが、各培養方法の良し悪しの具体的な検証がなされていない。そこで本分担研究では、iPS 細胞の未分化維持に於ける品質変動の評価と、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価を行う。平成 25 年度は、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を用い、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養と初期分化の制御に成功した。今後は、様々な分化アッセイでの使用を検討する。

A. 研究目的

再生医療や創薬の実用化へ向けたヒト誘導多能性幹（iPS）[1, 2]を用いた研究が世界中で盛んである。実用化にあたり、品質の管理が大きな問題となっている[3]。ヒトiPS細胞は同じ人が同じプロトコルで培養していても状態が変わる事がある。ましてや、別のグループが別のプロトコルで培養した場合、その状態は大きく異なる。そのような状態で分化実験を行っても再現性が取れない。本分担研究では、iPS細胞の未分化維持に於ける品質変動の評価と、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価を行う事である。本年度は、特に微細加工技術を用いたハイスループットの分化評価の予備実験を進めた。

現状のヒトiPS細胞の培養や薬剤アッセイにはマルチウェルプレートが良く使われる。しかし、これには大きな問題が２つある。１つが、コストである。ヒトiPS細胞の培地は高価である。一般的な細胞を培養するために多用されるウシ胎児血清（FBS）の代わりに、ヒトiPS細胞の培養では血清を精製して様々な成分を補った血清代替物（KSR）や様々な精製タンパク質等を用いる。そのため、培地の価格が数倍になる。更に、分化するときには、サイトカインや小分子化合物、特殊な細胞接着コートなどを用いるが、それらは上記培地の数倍～10倍近くの値段のものもある。2つ目の問題は、細胞環境の制御問題である。通常の培養皿を用いた場合、1日1回の培地交換時

に培養状態が大きく変わる。また、細胞同士の相互作用があるため、ある部分は神経系へと分化し、別の部分は中胚葉方向へ分化するなど、非常に不均等な状態となる。以上の様に、マルチウェルを使う培養方法には、コスト問題と制御問題が有る。

微細加工を用いれば、この2つの問題の解決できる[4, 5]。コスト問題は、単純に培養器を縮小すれば良い。培養面積が半分になれば、細胞接着コートのコストが半分、必要な培地のコストも半分になる。培養環境の制御問題に関しては、常に培地を灌流[1]するシステムを用いることにより解決が可能となる。更に、無血清・無フィーダ培養を併用することにより、血清やフィーダなどから供給される未知因子が排除できるため、培養の制御がより厳密なものとなる。

本年度は、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価の基礎実験として、作製したプロトタイプを用い、ヒトiPS細胞の無血清・無フィーダ培養を試みた。

B. 研究方法

ヒトiPS細胞のKSR-MEF培養

ヒトiPS細胞を維持培養一般的に行われている培養法に準じた[1, 6, 7]。ヒトiPS細胞201B7株[1]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。特別断りのない限り、実験には201B7細胞を使用した。細胞の培養は以下の通り。D-MEM/F12にKSR、2-mercaptoethanol、MEM非必須アミノ酸、bFGF、ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培地(KSR培地)を用いて、フィーダ細胞(MEF)上で培養した。インキュベータは37 ℃、5% CO^2に設定した。継代は、培養皿から培地を除き、ヒトiPS細胞解離液（CTK溶液[6]）を加えて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加えてピペッティングし、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細胞を元の培養皿の1/6～1/3量を播種した。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、同じインキュベータで培養した。フィーダ細胞は、継代3～4回目のMEFをmitomycin Cで90分間処理し、翌日に10%DMSO入りの培養液で凍結保存し、それを解凍して0.1%ゼラチンコート培養皿に播種したものを使用した。

ヒトiPS細胞の無血清・無フィーダ培養

微小流体制御培養システムを用いた全ての実験で、ヒトiPS細胞をKSR-MEF培養から、無血清・無フィーダ培養に移した後、少なくとも1回以上継代培養してから実験

[1] 灌漑のように、常に培養部へと新鮮な培養液を供給し、古い培養液を流し出すこと。環流（環のように流れる）ではない。

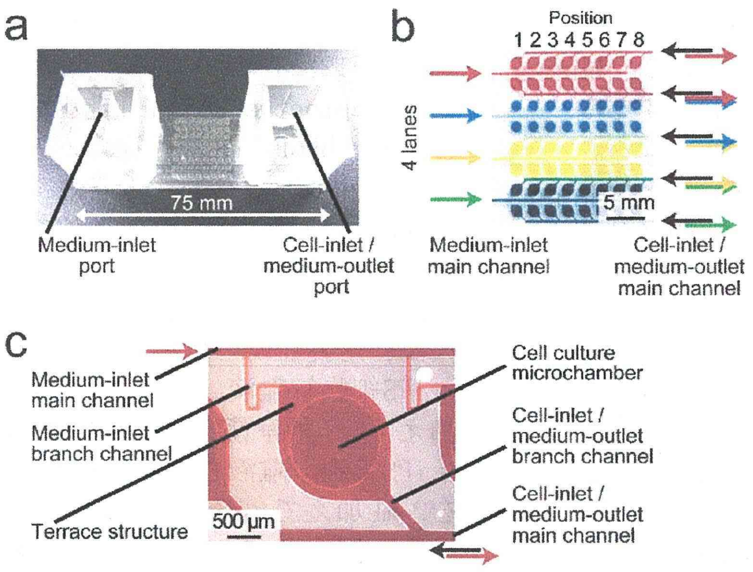

図 1:微小流体制御培養システム。全体像（a)、64個の細胞培養部を色素で染め分けたもの（b)、1つの細胞培養部（c)。

a) 全体はスライドガラスの上に乗っている。左に培養液を入れるリザーバ、右に廃液を貯めるリザーバがあり、中央に細胞培養部がある。培養液は左から右へと流れる。

b) 64の細胞培養部拡大。

c) 一つの細胞培養部の拡大。左上から培養液が流入し、右下へと流れ出す。

に使用した。無血清培養（ESF9a）の組成は以下の通り。基礎培地はhESF-Gro medium（Cell Science & Technology Institute、宮城)。これに以下を添加した。10 μg/mL ウシ膵臓由来インスリン(Sigma I-5500)、5 μg/mL ヒトアポトランスフェリン（Sigma T-1147)、10 μM 2-メルカプトエタノール(Sigma M-7522)、10 μM エタノールアミン（Sigma E-0135)、 20 nM セレン酸ナトリウム（Sigma S-9133)、 0.5 mg/mL の脂肪酸不含のウシ血清アルブミンのフラクションVに結合した4.7 μg/mL のオレイン酸（Sigma O-3008)、100 ng/mL ブタの腸粘膜由来のヘパリン・ナトリウム塩(Sigma H-3149)、10 ng/mL 塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF、Wako)、 2 ng/mL ヒトアクチビン A（338-AC R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)。

培養皿は、2 μg/cm^2のファイブロネクチンでコートした［7, 10]。継代はまず、培養皿からhESF-9a培地を除き、0.2-0.5 unit/mL dispase、hESF-9a培地から成る解離液を0.5 mL加え5分間37度で静置した。その後、解離液を除きhESF-9a培地を2 mL加えてピペッティングした後、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、hESF-9a培地を1 mL加えた. 1 μg/cm2 ファイブロネクチンコート培養皿にhESF-9a培地を4 mL、5 μM ROCK inhibitorを加え、ヒトiPS細胞懸濁液を0.2 mL加え、播種した。播種2日後から毎日培地を交換した。

微小流体制御培養システムの作製

微細フォトリソグラフィで鋳型を作り、2液混合の熱硬化性のシリコーンゴムPDMSで模りした[4, 5]。

鋳型作りは、UV露光によりパターンをUV硬化樹脂のSU-8に転写する工程を4サイクル行った。各サイクルはSU-8をシリコンウェハにス

ピンコートし、ソフトベーク後、マスクアライメント露光装置(MODEL K310P100S)を用いてUV露光し、ポストベークした。その後、乳酸エチルに浸けてパターン以外のフォトレジストを除去し、イソプロパノールで洗い、窒素ガスで乾燥し、tridecafluoro-1、1、2、2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilaneで疎水化した。

PDMSでの模りの方法は以下の通り。10/1 (w/w)で混合したPDMSプレポリマーと硬化剤を上述の鋳型に流し、オーブンで120℃、2時間加熱し、微小流体制御培養器を模った。模った培養器と蓋の平板はエタノールで洗浄後、乾燥し、プラズマリアクターPR500 (ヤマト科学株式会社、Tokyo、Japan)を用いてO_2プラズマで処理して接着した(Duffy et al.、 1998)。培養液・廃液を貯め置くリザーバもPDMSで作製した後、エタノールで洗浄後、乾燥後、未硬化のPDMSを接着剤として用いて接着した。

微小流体制御培養システムによるヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダー培養

ヒトiPS細胞を無血清・無フィーダ培養した培養皿から培地を除き、PBSで2回洗浄し、0.02% EDTA-PBSを加えて10分間静置した。そこに培地を1 mL加えてピペッティングして一細胞レベルまで分散した後、300 ×g、3分間遠心して回収した。5 μM ROCK inhibitor を添加したESF-9a培地を加えて、4.2×10^5 cells/mL細胞懸濁液を調整した。

微小流体制御培養システムは1 μg/cm^{2}のファイブロネクチンでコートした。そこに細胞懸濁液を5 kPaの加圧によって細胞懸濁液を導入した。1日後に細胞が接着したことを確認してから、電磁弁制御装置 (エンジニアリング・システム株式会社、 Nagano、 Japan)と高性能調圧器PR4102 (ジーエルサイエンス株式会社、 Tokyo、 Japan)から成る灌流培養装置を用いて灌流培養を行った。

微小流体制御培養システム内での免疫染色

微小流体制御培養システムの培養液リザーバに、0.5 mM カルシウム入り、0.5 mM マグネシウム入りPBS (PBS++) を各リザーバに400 μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。4% Formalin Solutionを各リザーバ150 μL加えて30 kPa加圧し、室温で20分間静置して細胞を固定した。固定後、PBS++を各リザーバ400 μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS++を各レーン150 μL加えて30 kPa加圧し、室温で90分静置し、透過、ブロッキングを行った。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS++でそれぞれ希釈し1次抗体を各リザーバ150 μL加えて30 kPa加圧し、4℃で12時間以上静置した。PBS++を各リザーバ400 μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS++でそれぞれ希釈した2次抗体を各リザーバ150 μL加えて30 kPa加圧し、アルミ箔で被った箱に入れ、室温で3時間静置した。DAPIを0.2% Triton X-100、

10 mg/mL BSA-PBS++で希釈し、各レーンリザーバ　μL加えて30 kPa加圧し、アルミ箔で被った箱に入れ、室温で30分静置した。その後、PBS++を各リザーバ400　μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄し、オールインワン顕微鏡を用いて観察した。1次抗体はウサギポリクローナル抗Oct-3/4抗体（1/500)、マウスモノクローナルIgM抗SSEA-1抗体(1/1000)を用い、2次抗体は抗マウスIgM抗体（1/500)、抗ウサギIgG抗体（1/2000)を用いた。

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ｉＰＳ細胞の導入、ヒトｉＰＳ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ｉＰＳ細胞の移植、ヒトｉＰＳ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

微小流体制御システムでのヒトiPS細胞の無血清・無フィーダ培養

ヒトiPS細胞を無血清・無フィーダ培養条件下において、微小流体制御培養システム内で未分化維持培養が可能であるか、更にそれに必要な培地の量を調べた。無血清・無フィーダ培養したヒトiPS細胞を微小流体制御培養システムに導入して静置し、1日後に細胞が生着していることを確認した後、1日1回の培地交換、1日3回の培地交換、12.5 μL/時の灌流培養、50 μL/時の灌流培養の4つの培地交換条件で4日間培養した。

ヒトiPS細胞の未分化マーカOCT3/4で免疫染色したところ、全ての培地交換条件においてほとんどの細胞が陽性であったことから、未分化維持が可能であることが分かる。ところが、細胞数を計測して24ウェルで培養したときと比較したところ、1日1回、1日3回の培地交換では細胞数が有意に少なかった。それに対し、灌流培養した条件下では24wellで培養したときに比べて有意差は認められなかった。以上の結果から、微小流体制御培養システムを用い、灌流培養することにより、未分化なヒトiPS細胞の培養が可能であること、更に細胞の状態を変えることなく培地の交換速度を変えられることが分かった。

微小流体制御培養システムにおけるヒトiPS細胞の分化誘導

次に、このシステムを使い分化

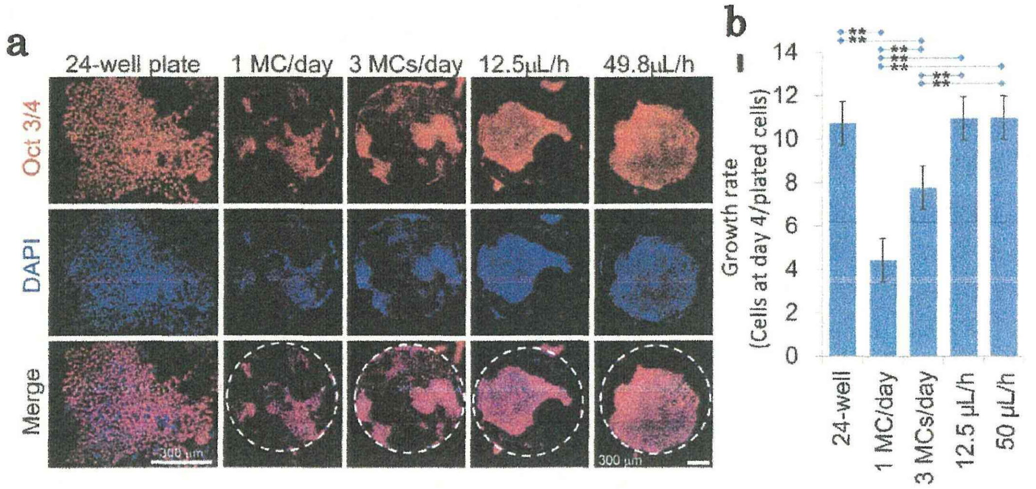

図 2：微小流体制御培養システムを用い、ヒトiPS細胞を培養液の交換頻度を変えて無血清・無フィーダ培養した。a)左から24ウェルのマルチウェルプレート上での培養（コントロール)。1日1回、1日3回、12.5 μL/時、50 μL/時の培地交換をした。3日後にOCT3/4で免疫染色した。青色はDAPIによる核染色。b)細胞の増殖の比較。

誘導が可能かどうかを調べた。分化には、胚胎外組織の方向へ分化誘導する因子として知られている骨形成因子４ (BMP-4) を用いた。無血清・無フィーダ培養したヒトiPS細胞を微小流体制御培養システムに導入して静置し、1日後に細胞が生着していることを確認した後、4種類の培地へと交換した。4種類の培地は、未分化維持培地 (hESF-9a)、bFGFなどの未分化維持因子を除いた培地 (hESF-6)、分化を誘導するためにhESF-6に低濃度 (10 ng/mL) のBMP-4 を入れた培地 (+10 BMP)、分化を誘導するためにhESF-6に高濃度 (50 ng/mL) のBMP-4 を入れた培地 (+50 BMP) を灌流した。

各培地に交換した後、3日間灌流培養をした。位相差顕微鏡で観察したところ、未分化維持条件ではヒトiPS細胞は通常の形態（核が大きく、細胞質が小さく、コンパクト）だったが、分化誘導培地内では細胞が大きく伸展して明らかに分化した形態となった（**図 2a PhC**)。未分化マーカのOCT3/4、初期分化マーカのSSEA1で免疫染色を行った結果、未分化維持培養条件ではほとんどの細胞がOCT3/4陽性（赤）かつSSEA1陰性であったのに対し、分化誘導培地ではOCT3/4陰性かつSSEA1陽性（緑）の細胞が多かった（**図 2a**)。以上の結果を定量するため、各細胞におけるOCT3/4とSSEA1の蛍光量を、無血清維持状態を基準にグラフ化したところ、BMP-4を加えることにより、未分化維持マーカOCT3/4陽性の蛍光（赤）が減少し、初期分化マーカSSEA1陽性の蛍光（緑）が増加していることが明らかとなった（**図 2b**)。同様の結果が、別のヒトiPS細胞株である253G1を用いた実験でも得られた。

これらの結果より、無血清・無フィーダ条件下において、微小流体制御培養システムでヒトiPS細胞の未分化維持培養と分化誘導できたことが示唆される。

D. 議論

本年度は、ハイスループット分化評価の基礎実験として、微小流体制御培養システムを作製し、ヒトiPS細胞を無血清・無フィーダ培養した。その結果、培養液の交換速度を変えても未分化性は変わらなかったが、灌流培養した時にはマルチウェルと同様の増殖率を示した。また、分化誘導培地では未分化維持マーカが減少し、初期分化マーカが上昇した。以上より、この微小流体制御培養システムはヒトiPS細胞を用いた分化アッセイに使えることが示唆される。

ヒトiPS細胞培養におけるコスト問題は、培地の使用量を抑えることが一つの解決策となる。本実験では。本実験において、12.5 μL/hの灌流速度で3日間の灌流培養時に使用した培地は1チャンバー当り56.25 μLである。それに対し、96ウェルプレートを用いて行った場合、必要な分化誘導培地を1日200 μLとすると3日間で1ウェル当り600 μL必要である。そのため我々の方法を用いたとき、96ウェルプレートよりも培地使用量が1/11とかなり少ない。したがって、コスト問題の解決に向けて1歩前進したといえる。

ヒトiPS細胞培養における制御

問題に関しては、常時培養液を流し続ける灌流培養により制御できること予想された。本実験では、1日1回と3回の間歇的な培養に比べ、灌流培養をした場合は細胞の増殖が速いことを示した。通常の細胞培養では、培地交換は1日1回であり、その交換毎に古い培地から新しい培地に変化する。すなわち、通常の細胞の培養条件は、徐々にグルコース等の栄養の濃度が減少し、アンモニア等の不要物が増していき、それが突然元の状況に戻る、ということが24時間周期で繰り返されることになる。それに対して灌流培養の場合は常に一定の培養条件を保つことができるため、培養のより良い制御が可能だ。

また本研究では無血清・無フィーダ培養で、ヒトiPS細胞の未分化維持と分化誘導できることを示した。血清やフィーダ細胞を用いず、高純度に生成されたタンパク質などを用いた培養である。実験では、ヒトiPS細胞の未分化維持に必要なbFGF等を除去して分化誘導因子であるBMP4を添加した結果、優位な差が観察された。すべての組成が明らかであるため、培養条件と細胞状態との間に1対1対の応付けが可能となる。

E. 結論

本分担研究では、微細加工技術を用いたプロトタイプのシステムを用いて、ハイスループット分化評価の基礎実験を行った。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、ヒト iPS 細胞の未分化維持と分化誘導に成功した。今後は、様々な分化アッセイを試みる予定である。

F. 参考文献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.* Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
2. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.* Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
3. 古江- 楠田, 美保., *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.
4. Sugiura, S., et al., *Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay.* Biotechnol Bioeng, 2008. **100**(6): p. 1156-65.
5. Yoshimitsu, R., et al., *Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions.* Biotechnology and Bioengineering, 2014. **111**(5): p. 937-947.
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. 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.
8. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.* Nature biotechnology, 2007. **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. Kusuda Furue, M., et al., *Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium.* In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010.
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. Kanamoria, 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)

G. 研究発表

1. 原著論文

1) Yamada R, Hattori K, Tachikawa S, Tagaya M, Sasaki T, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K, Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ-globulin.″ Journal of Bioscience and Bioengineering. (2014 Mar 18. E-pub ahead of print)

2. 学会発表

1) 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）

2) 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）

3) 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-globurin と Vitronectin を使った無血清/無フィーダ培養でのヒ

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)

4) 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-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)

5) 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)

6) 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)

7) 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)

8) 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)

9) ○Ryotaro Yamada 、 Koji Hattori、 Motohiro Tagaya、 Toru Sasaki 、 Shinji Sugiura 、 Toshiyuki Kanamori 、 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

10) ○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

11) 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)

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

中胚葉分化誘導の標準化と評価

研究分担者　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

研究要旨：本研究は、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液細胞等）への分化プロトコールを標準化し、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・検証することを目的とする。平成 25 年度は、iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化プロトコールの収集を行い、適切なプロトコールの抽出を試みた。その結果、胚様体形成法を用いることにより、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞を分化誘導可能であったことから、胚様体形成法は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となり得る可能性が示された。

研究協力者

田代克久　　(独)医薬基盤研究所

山口朋子　　(独)医薬基盤研究所

A. 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells；ヒト iPS 細胞）は自己複製能と多分化能を有しており、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞は再生医療や創薬研究などへの応用が期待されている。近年、様々な分化誘導法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く、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。そこで本研究では、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液細胞等）への分化プロトコールを標準化し、種々のヒト iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化効率を測定することにより、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・検証することを目指す。平成 25 年度は、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液前

駆細胞等）への分化プロトコールの標準化へ向け、まずは分化プロトコールの収集を行った。また、収集したプロトコールを基に、ヒトiPS細胞から血管内皮細胞および血液前駆細胞へ分化誘導を試みた。

B. 研究方法

B-1. ヒトiPS細胞の培養

ヒトiPS細胞株201B7（京都大学、山中伸弥教授から供与）、Tic（JCRB Cellbank から供与；JCRB Number：JCRB1331）は 5 ng/mL の fibroblast growth factor 2（FGF2：片山化学）を含む ReproStem 培地（ReproCELL）を用いて、マイトマイシンC処理済のマウス胎児線維芽細胞（mouse embryonic fibroblast：MEF）上で培養した。ヒトiPS細胞株は4-5日ごとに0.1 mg/ml dispase（Roche）を用いて継代、またはコロニーのピックアップにより継代した。

［血管内皮細胞］

B-2. 血管内皮細胞への分化誘導①（単層培養法（分散法））

単一細胞へ解離したヒト iPS 細胞を用いて血管内皮細胞への分化誘導を行った。実験は下記に従って行った。まず、分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9（Cell Science & Technology Institute）で培地交換した。次に、Accutase（Millipore）を用いてヒト iPS 細胞を回収後、100 ng/ml Activin A（R&D systems）及び 10 ng/ml の bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地（6因子［10 μg/ml human recombinant insulin、5 μg/ml human apotransferrin、10 μM 2-mercaptoethanol、10 μM ethanolamine、10 μM sodium selenite、0.5 mg/ml fatty acid free bovine albumin（全て Sigma）］を含む hESF-DIF 培地［Cell Science & Technology Institute］）に懸濁後、マトリゲル（BD Biosciences）でコーティングした細胞培養用 12 ウェルプレートの各ウェルに 1 x 10^5 個/ウェルで播種したのち、2日間培養した。その後、50 ng/ml BMP4（R&D Systems）、10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地にて 4 日間培養した。分化誘導6日目に細胞を回収し、付属のサプリメントおよび 20 ng/mL の vascular endothelial growth factor（VEGF：Peprotech）を加えた EGM-2 培地（Lonza）にてその後の培養を行った。

B-3. 血管内皮細胞への分化誘導②（単層培養法（コロニー法））

コロニー状のヒト iPS 細胞を用いて血管内皮細胞への分化誘導を行った。実験は下記に従って行った。マトリゲルにてコーティングした 12 ウェルプレートにヒト iPS 細胞をコロニー状で播種し、10 ng/mL の FGF2 を含む MEF の培養上清にて 2－3 日培養した。分化開始日に 4 mM L-グルタミン、100 ng/mL の Activin A を含む RPMI1640 培地（Sigma）にて置換し、24 時間培養した。その後 4 mM L-グルタミン、100 ng/mL の Activin A、0.2%FBS を含む RPMI1640 培地でさらに 1 日培養した。

分化誘導2−5日目に4 mM L-グルタミン、50 ng/mL BMP4、2% FBSを含むRPMI1640培地にて培養し、その後、20 ng/mL VEGFを加えたEGM-2培地（Lonza）にて培養した。

B-4. 胚様体（embryoid body：EB）形成法による血管内皮細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞から血管内皮細胞への分化誘導は以下の方法で行った。Accutaseを用いてヒトiPS細胞を回収後、20 ng/mL BMP4、2 ng/ml Activin A、10 μM Rho-associated coiled-coil forming kinase（ROCK）inhibitor（Y-27632：Wako）を含むStemPro-34培地（StemPro-34 Nutrient Supplement（Life Technologies）、50 μg/ml Ascorbic acid（Sigma）、450 μM 1-thioglycerol（MTG；Sigma）、2 mM L-Glutamine（Life Technologies）、120 μg/ml streptomycinおよび200 μg/ml penicillinを含むStemPro-34 Serum Free Medium（Life Technologies））に懸濁後、96穴Lipidure-coatプレート（Thermo Scientific）の各ウェルに2×10^4個の細胞を播種しEBを形成させた。2日間培養後、中胚葉へと分化させるために20 ng/mL BMP4および5 ng/ml VEGFを含むStemPro-34培地に置換してさらに2日間培養し、培養4日目に20 ng/mL BMP4、5 ng/ml VEGFおよび5 μM transforming growth factor（TGF）β inhibitor（SB431542；Wako）を含むStemPro-34培地で2日間培養した。培養6日目にEBを回収し、20 ng/ml VEGF、2 ng/ml FGF2および5 μm SB431542を含むStemPro-34培地で置換し、3−4日間（培養9−10日間まで）ペトリディッシュ上で培養した。また、目的の細胞集団をセルソーターにより分離し、100 ng/ml Endothelial cells growth supplement（ECGS：Sigma）、100 ng/ml heparin（Sigma）および20 ng/ml FGF2を含むStemPro34培地に懸濁した後、5×10^4 cells/well（48 well）の密度で20 μg/cm^{2}の濃度でフィブロネクチンをコートしたプレートに播種した。その後、2日おきに培地を置換しながら接着培養を行い、血管内皮細胞を誘導・増幅した。

B-5. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離

培養6日目および9日目のEBを回収し、Cell dissociation buffer（Life Technologies）を加えて37℃で15分反応させた後、ピペッティングにより単細胞に解離させた。その後、allophycocyanin（APC）標識抗ヒトCD34抗体（clone 581；BioLegend）およびphycoerythrin（PE）標識抗ヒトVE-Cadherin抗体（clone 16B1：eBioscience）を4℃、遮光で40分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS含有PBSで再懸濁し、フローサイトメーター（BD LSRFortessa II；BD Bioscience）を用いてCD34発現（+）VE-Cadherin+細胞の割合を解析した。セルソーターにて細胞分離作業を行う場合は、0.25% trypsin/EDTA（Life

Technologies）によりEBを単細胞に解離した後に、APC標識抗ヒトCD34抗体を反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS含有PBS で再懸濁し、セルソーター（SONY SH-800）にてCD34+ 細胞を分離した。

B-6. マトリゲルを用いた管腔形成能の評価

48 wellプレートに100 µlのマトリゲル（Matrigel Matrix 2270588 ; BD Bioscience）溶液を加えて37℃、1時間静置することにより、プレートをコーティングした。接着培養して増幅させた細胞を0.25 % trypsin/EDTA にて回収し、10 ng/ml VEGFを含む培地に懸濁し、1 x 10^5 cells /well の細胞数で播種した。37℃、16時間培養後に顕微鏡下で細胞を観察した。

B-7. アセチル化LDLの取り込み能の評価

接着培養した CD34+ 細胞を、終濃度10 µg/ml AlexaFluor 488 acetylated LDL (Life Technologies) を含む培地で置換し、37℃、4 時間培養後に蛍光顕微鏡（BIOREVO BZ-9000 ; キーエンス）にて観察した。

［血液前駆細胞］

B-8. 血液前駆細胞への分化誘導①（支持細胞との共培養法）

分化誘導開始の前日に 50 Gy の放射線を照射し増殖を止めた OP9 細胞あるいは C3H10T1/2 細胞株をゼラチンコートした 10 cm 培養皿に 7 x 10^5 個で播種し、フィーダー細胞として用いた。iPS細胞は、5-10 x 10^4 個/10 cm 培養皿となるようにフィーダー細胞上に播種した。細胞の播き直しは行わず、50 ng/ml VEGF 含有培地を9日目までは3日毎、9日目から15日目まではは 2 日毎に交換することにより血液前駆細胞を分化誘導した。

B-9. EB 形成による血液前駆細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞をAccutaseにより培養ディッシュから剥離し、10 µM Y27632を含むEB形成培地［50 µg/ml Ascorbic acid、450 µM MTG、付属のサプリメントを加えたmTeSR (Stem Cell) ］中でピペッティングすることにより単細胞に解離した。その後、1 x 10^6 個のiPS細胞と前日放射線処理した 6 x 10^5 個 C3H10T1/2 細胞を 1 ng/ml ActivinA、10 ng/ml BMP4、10 µM ROCK inhibitor を含むEB形成培地に懸濁し、ペトリディッシュに播種した。2日後（Day 2）、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF を含む EB 分化培地［50 µg/ml Ascorbic acid、450 µM MTG、2 mM L-Glutamine、インスリントランスフェリン（Life Technologies）を加えた IMDM（Sigma)］に置き換えた。その2日後（Day 4）、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10 µM SB431542を含むEB分化培地で半分培地を交換し、更に2日培養した。分化誘導から6日目（Day 6）に、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、20 ng/ml stem cell factor（SCF; Pepotech）、20 ng/ml Thrombopoietin（TPO; Peprotech）を含むEB分化培地に培地を交換した。2日後

（Day 8）に半分培地交換を行い、血液前駆細胞の誘導を行った。

B-10. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離

Sac 法により分化誘導した細胞は、ピペッティングを繰り返すことで機械的に嚢状構造体を崩し、40 μm セルストレイナーを通して、嚢状構造体内部の血液細胞のみを回収した。EB 形成法により分化誘導した細胞は、培養 8 日目の EB を回収し、Cell dissociation buffer（Life Technologies）を加えて 37℃で 15 分反応させた後、ピペッティングにより単細胞に解離させた。その後、APC 標識抗ヒト CD34 抗体および fluorescein isothiocyanate（FITC）標識抗ヒト CD43 抗体（clone 1G10; BD Biosciences）を氷上、遮光で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、フローサイトメーター（BD LSRFortessa II ; BD Bioscience）を用いて CD34 陽性 CD43 陽性細胞の割合を解析した。セルソーターにて細胞分離作業を行う場合は、上述した方法でサンプルを調製し、セルソーター（SONY SH-800）にて CD34+CD43+ 細胞を分離した。

B-10. コロニーアッセイ

B-10. の方法により回収した CD34+CD43+ 血液前駆細胞は、MethoCult H4435 メチルセルロース培地（rhSCF; rhGM-CSF; rhG-CSF; rhIL-3; rhIL-6; rhEPO を含む）（Stem Cell）に懸濁し、35mm 培養皿に播種した。37℃、5% CO_2 インキュベーターで 14 日間培養を行い、顕微鏡下で形態学的に識別しコロニー形成細胞（colony-forming cell; CFC）を分類・計数・観察した。

C. 研究結果

C-1. ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から、安定的で再現性の高い血管内皮細胞への分化誘導法を開発するため、無血清培地を用いることとした。簡便に実験を行える単層培養法にて分化誘導を行った。まず始めにヒト iPS 細胞を単細胞に解離させ、各種サイトカインを含む培地中で血管内皮細胞への分化誘導を試みたところ、血管内皮細胞マーカーである VE-Cadherin を発現する細胞が一部得られた。しかし、細胞のプレートへの接着が実験間で大きくばらつき、毎回同様の結果を得ることが出来なかった（データ略）。そこで次に、コロニー状のヒト iPS 細胞を分化誘導開始時に用いて実験を行った。本手法は、まず、ヒト iPS 細胞をコロニー状でマトリゲル上に播種し、2-3 日増殖させた後に培地交換を行うことで分化を開始する手法であり、ヒト iPS 細胞から肝細胞を分化させる際に汎用されている手法である。Activin A 存在下で培養し、中内胚葉系細胞を誘導した後に BMP4 により中胚葉・血管内皮細胞様細胞の誘導を試みた。その結果、本手法においても、VE-Cadherin 陽性細胞を得ることが可能であったが、再現性良く血管内皮細胞を誘導することが出来なかった（データ略）。