

201406028A

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古江美保

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

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

研究代表者 古江・楠田 美保.....1

II. 分担研究報告

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.....13

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.....26

中胚葉分化誘導の標準化と評価

研究分担者 川端 健二.....42

iPS細胞由来分化細胞の品質の検証

研究分担者 山田 弘.....51

iPS細胞等の代謝解析

研究分担者 竹森 洋.....59

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

研究分担者 櫻井 文教.....65

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....74

IV. 研究成果の刊行物・別刷.....76

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

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：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 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 工学部 生物系 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)、また、(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、H25 年度に引き続き、栗崎、大沼、古江、竹森が担当した。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、比較評価を開始した。古江は、未分化状態の iPS 細胞の状態を免疫染色により評価するアッセイ系を確立し、検証を進めた。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細胞内エネルギー代謝の解析を検討した。また、大沼は、細胞の継代時の操作の違いを評価する方法の検

証を行った。また、iPS細胞の分化プロトコルの策定や分化細胞の品質検証については、川端、古江、櫻井、大沼、山田が担当した。川端は、中胚葉細胞への分化プロトコルについて検証を行った。古江は、外胚葉細胞への分化プロトコルについて検証を行った。櫻井は、内胚葉細胞への分化プロトコルについて検証を行った。大沼は、微小流体制御培養システムを用いた分化誘導アッセイによるiPS細胞の比較評価について検証した。山田は、iPS細胞由来幹細胞様細胞の品質評価を開始した。詳細についてはそれぞれの分担研究報告を参照されたい。

本総括研究報告においては、古江の担当研究について報告する。① (i) 培養手技 (培養技術) の違いがiPS細胞の品質に及ぼす影響についての科学的・客観的な定量的検証方法を策定したので、その詳細を報告する。また、② (i) 三胚葉への分化プロトコルの標準化を目指し、外胚葉の分化プロトコルの標準化について検証をおこなったので、その詳細を報告する。

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 of 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、H25年度に、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。今年度は、201B7株の染色体数異常クローン株である201B7-IA株を用いて、本法による検証を行った。

具体的には、以下に方法を示す。細胞 (201B7-IA) 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。剥離した細胞塊を砕かないよう慎重に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 : 20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。検討するピペッティング回数2回、5回、または20回。1条件につき5ウェルずつ実験を実施した。

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MarkerX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IN CELL 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。

② 分化プロトコルの標準化と分化誘導再現性の検証

- 分化プロトコルの標準化のためのプロトコルの検証-

iPS細胞から外胚葉である神経系細胞への分化プロトコルの収集を行ない、収集したプロトコルを検討し、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ルを策定することを目標としている。H25年度に、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ルを収集し、調査した。これまでの調査により、公表されている神経分化誘導プロトコルにおいては、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。

今年度は、収集した神経分化プロトコルのうち、遺伝子導入操作を行わなくとも比較的短期間で神経幹細胞まで分化誘導でき、且つ比較的再現性が高いと評されるプロトコルについて、検証を行った。

具体的には、UKN1と命名された神経幹細胞分化誘導法(Krug et al. 2013, Weng et al. 2012)によるヒトiPS細胞の分化誘導を次に示すとおり実施した。

培養用の試薬は、mTeSR1及びGentle Cell Dissociation Reagent(Stemcell Technologies)、KnockOut™ DMEM/F-12、DMEM, low glucose, pyruvate、Ham's F-12 Nutrient Mixture、N2 Supplement、TrypLE™ Select、Glutamax、MEM Non-Essential Amino Acids Solution、2-Mercaptoethanol(以上、Life Technologies)、マトリゲル(Matrigel、BD Biosciences)、Noggin(R&D systems)、SB431542(TOCRIS)、Y-27632、dorsomorphin、StemSure® Serum Replacement(和光純薬)、bFGF(片山化学)を使用した。

ヒト iPS 細胞株 iPS-DF-19-9-7T はマトリゲルコーティングした培養用ウェルプレート上で mTeSR1 培地中で 37°C、5% CO₂ で維持培養した。継代播種後 2 日目より毎日培地交換をした。細胞継代は Gentle Cell Dissociation Reagent を使用して剥離し、希釈率 (スプリット) を 1 : 2 ~ 1 : 4 にして播種した。

2 重 SMAD 阻害法 (Balmer et al. 2012; Chambers et al. 2009; Weng et al. 2012) によってヒト iPS 細胞株 iPS-DF-19-9-7T の分化誘導を行った。分化誘導のスケジュールは下記の図 2 に示すとおりである。ヒト iPS 細胞を TrypLE™ Select で剥離して単一細胞とし、マトリゲルコーティングしたウェル上に 18,000 cells/cm² の細胞密度で 10 μM の ROCK 阻害剤 (Y-27632) と 10 ng/ml bFGF を含む馴化培地中に再播種した。培地は 2 日間、10 ng/ml bFGF を含む馴化培地を毎日交換した。分化は再播種の 3 日後に培地を KSR 培地 (Knockout DMEM/F12 に 15% の StemSure® Serum Replacement, 2 mM の Glutamax, 0.1 mM の MEM non-essential amino acids, 50 μM の 2-Mercaptoethanol が含まれている) に置換し、そこへ 35 ng/ml の noggin, 600 nM の dorsomorphin, 10 μM の SB-431642 を添加することで開始した。分化開始 4 日後から、KSR 培地を 25% ずつ N2 培地 (DMEM/F12 培地に 1% の Glutamax, 1.4 mg/ml の glucose, 0.1 mg/ml の apotransferrin, 25 μg/ml の insulin, 100 μM の putrescine, 30 nM の selenium, 20 nM の progesterone が含まれている) に段階的に置換した。

誘導開始後 10 日目に細胞を固定し、神経幹細胞への分化効率を判定するため、SOX2 および Nestin の免疫染色を行った。インセルアナライザー 2000 を用いて画像を取得し、SOX2 ポジティブ細胞、Nestin ポジティブ細胞、さらに SOX2/Nestin ダブルポジティブ細胞の割合を解析した。SOX2/Nestin ダブルポジティブ細胞が神経幹細胞として判定される。

(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」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。

C. 研究結果

① 培養技術

201B7-IA 細胞を用いて、継代作業時のピペッティング回数の差が、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。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、MarkerX 強陽性 (MarkerX++) 細胞、及び Oct3/4 陽性細胞 (Oct3/4+) について解析を行った (図 1)。

染色体数が正常な 201B7 細胞株とは異なり、12 番染色体がトリソミーとなった 201B7 細胞株のクローンである 201B7-IA 細胞株では、1 : 20 という非常に低い播種密度で実験を実施した場合であっても、播種 2 日目以降に非常に細胞増殖速度が増大するため、播種後 6 日目には細胞増殖が過剰に進み、オーバーコンフルエントとなった。

染色体数が正常な 201B7 細胞では同じ播種密度 (1 : 10) であってもピペッティング回数の差によって 6 日後の細胞数や MarkerX 強陽性細胞数に大きく影響が出たが (H25 年度成果として報告)、同じ実験方法では 201B7-IA 細胞株ではほとんど影響が出ないことが明らかとなった。しかしその一方で、このアッセイ方法によって、201B7-IA 細胞株のような染色体異常の起こった増殖速度に異常がある細胞を定量的且つスピーディーに検出できることも明らかとなった。

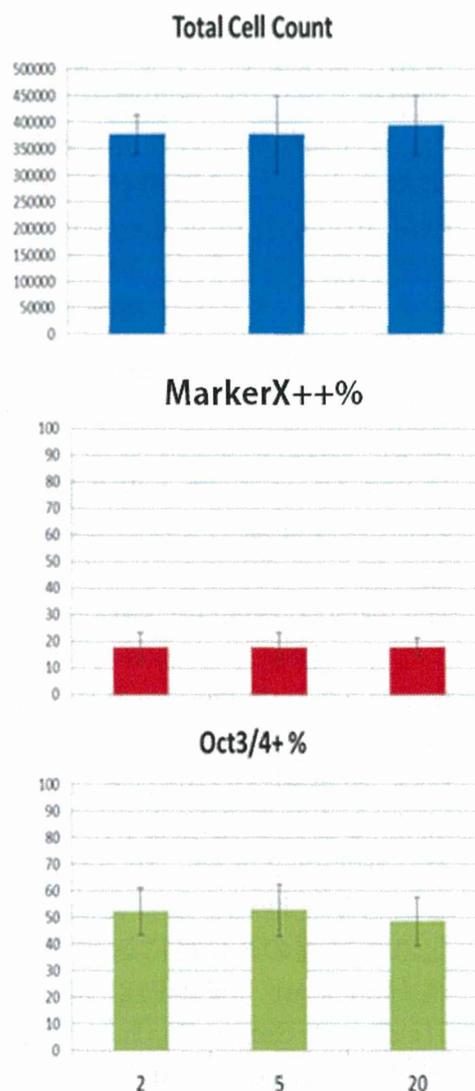
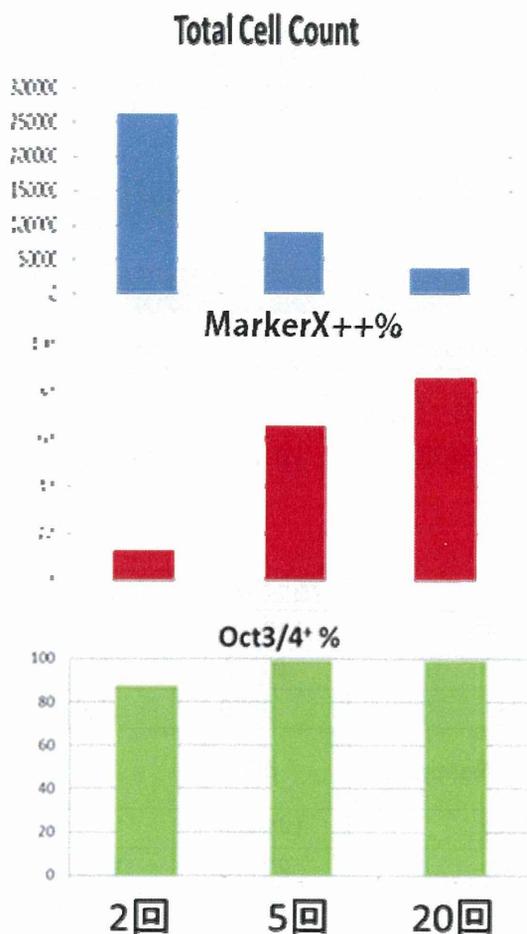


図 1 201B7-IA 細胞の免疫染色解析結果 播種時にピペッティングする回数を 2 回、5 回、または 20 回にし、6 日間培養した。ピペッティング回数に依らず細胞数は過剰となり、Oct3/4 の陽性率は低い。MarkerX 強陽性の細胞は 20%程度である。グラフの値は 5 回の平均値と誤差で示す。

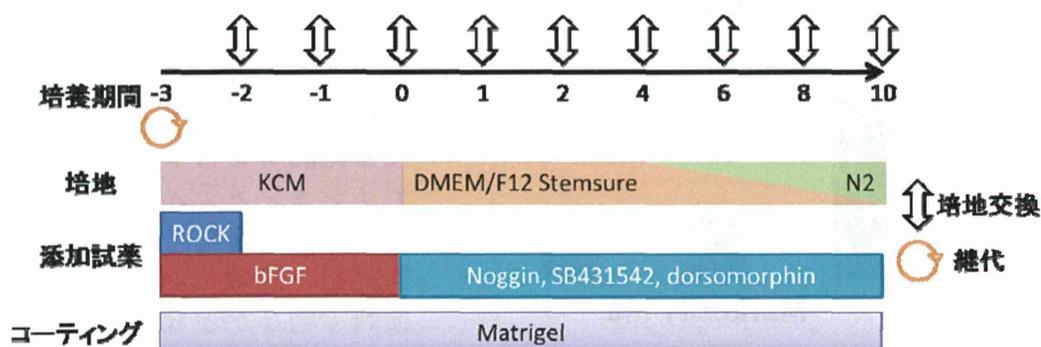


② 分化プロトコルの標準化のためのプロトコルの検証

ヒト iPS 細胞株 iPS-DF-19-9-7T を用い、UKN1 プロトコルに従って分化誘導を行った (図 1)。コンディショニングメディウム (KCM) を準備せねばならないが、比較的安定に神経系へ誘導できることが今回の検討で明らかとなった。

UKN1 プロトコルでは、適正な細胞播種密度は 18,000 cells/cm² と指定されているが、実際は 9,000 cells/cm² のときに最も神経幹細胞 (SOX2(+)/Nestin(+)) ダブルポジティブの割合が高くなることが免疫染色の解析により明らかになった。分化誘導実験開始の際の細胞密度は非常に重要なファクターであり、その差が顕著に結果に表れた。また、このように、分化効率などの分化誘導後の細胞の品質を免疫染色により検証できることがわかった。

参考 201B7 細胞の免疫染色解析結果 (H25 年度報告より転載)
 全体の細胞数と MarkerX 強陽性細胞数はピペッティング回数に依存する。



(図 2) 神経系細胞への分化プロトコール (UKN1)

本法では、実験開始から2週間以内(誘導開始から10日目)に神経幹細胞へ分化誘導が可能である。

播種細胞数		細胞数	(%)
36,000 cells/cm ²	全細胞数	136989	-
	SOX2(+)	10618	7.8
	Nestin(+)	9059	6.6
	SOX2(+)Nestin(+)	5008	3.7
18,000 cells/cm ²	全細胞数	148686	-
	SOX2(+)	22113	14.9
	Nestin(+)	11671	7.9
	SOX2(+)Nestin(+)	8716	5.9
9,000 cells/cm ²	全細胞数	82005	-
	SOX2(+)	33444	40.8
	Nestin(+)	38711	47.2
	SOX2(+)Nestin(+)	28391	34.6

(表 1) 神経系細胞への分化プロトコール (UKN1) により10日間分化誘導した細胞の免疫染色解析結果

適正な細胞播種密度は18,000 cells/cm²とされるが、実際は9,000 cells/cm²のときに最も神経幹細胞 (SOX2(+)Nestin(+)) の割合が高くなった。2回の実験の平均値を示す。

D. 考察

ヒト iPS 細胞由来機能細胞を薬剤安全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が国際的に期待されている。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である。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、2005 年より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、熟練した作業員が高い培養技術を持っていることが前提とされている。産業化するためには、技術の底上げが必要である。技術を習熟していない作業員により細胞の品質にどのような変動を与えるのかを明確にし、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、ヒト iPS 細胞 201B7 を用いて、ピペッティングという継代播種時に不可欠な、培養において基本的な操作について、継代播種後の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。今後、より詳細な解析を行い、報告する予定である。

一方、長期にわたって継代維持培養すると起こりやすいとされる染色体異常を持つ細胞株は、継代時のピペッティング操作、その他の培養操作にエラーがあった場合にも、大きな影響は出ず、継代播種後に過剰に増殖し続けるため、実際はヒト ES/iPS 細胞の培養初心者であっても培養しやすい。その点は、いわゆる一般の細胞株、つまり「がん細胞」に似ている。今年度の検証においては、染色体数異常株 201B7-IA のような異常な性質をもつ細胞株では、過剰なピペッティングをおこなっても細胞へのダメージとならない、つまり培養操作によって細胞自体の「品質変動」が顕著に現われにくい、ということが実証された。しかし、このように過剰な増殖能をもつ細胞の出現も「品質の低下」と考えるべきである。

以上の解析結果により、細胞継代時のピペッティング回数のような、正常な性質をもつヒト iPS 細胞の細胞培養に影響を与える細胞培養の手技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。また、細胞培養の手技の差がその後の培養に影響しない異常な性質をもつ細胞の検出にも応用できることが示唆された。

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が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 UKN1 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た。H27 年度は、複数の細胞株で UKN1 による分化誘導を実施し、詳細なプロトコルの策定を行っていく予定である。UKN1 においても、マトリゲルやコンディショニングメディウムなど、ロット差の大きいマテリアルが使用されることが問題点の一つである。より再現性の高いプロトコルを策定するため

には、ロット差のない組成が明らかなマテリアルの使用、あるいは、マテリアルのロット管理（ロット毎の品質チェック）が必要であろう。細胞自体の品質に加え、アッセイに使用するマテリアルの品質の管理も重要である。

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。本検証結果は、国内外の幹細胞研究者の注目を浴びつつある。引き続き、H27 年度も検証を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suga M, Kii H, Niikura K, Kiyota Y and **Furue MK**, Development of a monitoring method for non-labeled human pluripotent stem cell growth by time-lapse image analysis. *STEM CELLS Translational Medicine* (in press)
- 2) Andrews P, Baker D, Benvinisty N, Miranda B, Bruce K, Brüstle O, Choi M, Choi YM, Crook J, de Sousa P, Dvorak P, Freund C, Firpo M, **Furue MK**, Gokhale P, Ha HY, Han E, Haupt S, Healy L, Hei Dj, Hovatta O, Hunt C, Hwang SM, Inamdar M, Isasi R, Jaconi M, Jekerle V, Kamthorn P, Kibbey M, Knezevic I, Knowles B, Koo SK, Laabi Y, Leopoldo L, Liu P, Lomax G, Loring J, Ludwig T, Montgomery K, Mummery C, Nagy A, Nakamura Y, Nakatsuji N, Oh S, Oh SK, Otonkoski T, Pera

M, Peschanski M, Pranke P, Rajala K, Rao M, Ruttachuk R, Reubinoff B, Ricco L, Rooke H, Sipp D, Stacey G, Suemori H, Takahashi T, Takada K, Talib S, Tannenbaum S, Yuan BZ, Zeng F, and Zhou Q. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI). *Regen Med.* (2015) Mar;10 (2 Suppl): 1-44. DOI: 10.2217/rme.14.93.

- 3) Ozawa M, Ozawa Y, Iemura M, Kohara A, Yanagihara K, **Furue MK**. A simple improvement of the conventional cryopreservation for human ES and iPS cells. *Protocol Exchange* (2014) DOI:10.1038/protex.2014.012
- 4) Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Ohnuma Y, Chan T, Michiue T, **Furue MK**, Asashima M. Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations. *SCIENTIFIC REPORTS* (2014) 4, 4646 DOI: 10.1038/srep04646
- 5) Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, 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) 9, e90791 DOI: 10.1371/journal.pone.0090791. eCollection 2014.

著書

- 1) **古江・楠田美保** (2014) 第15章ヒト多能性幹細胞の利用技術開発、生命科学から創薬へのイノベーション 第Ⅲ部 **新たな創薬のための革新的技術開発** 南山堂 P105-112

- 2) 菅三佳、**古江・楠田美保** (2014) ヒト多能性幹細胞培養用培地の開発の現状と課題 *生物工学会誌* 第92巻9号 P487-490

2. 学会発表

国内学会：一般講演

- 1) 加藤竜司、岡田光加、長坂理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江・楠田美保** コロニー形態情報を用いた iPS 細胞株の特性解析 第14回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2015年3月19日-21日
- 2) 加藤竜司、吉田啓、岡田光加、長坂理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江・楠田美保** 細胞形態情報を用いた iPS 細胞培養手技の定量化 第14回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2015年3月19日-21日
- 3) 太刀川彩保子、菅三佳、**古江・楠田美保**、大沼清、二次元イメージングサイトメトリーは単層培養でのヒト多能性幹細胞コロニーの自己複製解析に適している 第14回再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2015年3月19日-21日
- 4) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、**古江・楠田美保**、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム品質評価法の開発 第66回日本生物工学会大会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2014年9月9日-11日
- 5) 城戸理紗子、岡田光加、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、**古江・楠田美保**、加藤竜司 画像解析を用いた iPS 細胞のリアルタイム品質モニタリング技術 第21回 HAB 研究機構学術年會 昭和大学上條講堂 (東京) 2014年5月16日-17日
- 6) Okamura M, Yanagihara K, Kanie K, YuJung L,

Nikawa H, Kato R, **Furue MK** *Bioinformatics based approach to predicting endodermal differential efficiency in human ES/iPS cells*. 第87回日本組織培養学会 2014年5月29日-30日

国内学会：シンポジウム・ワークショップなど

- 7) 吉田啓、長坂理沙子、岡田光加、佐々木寛人、清田泰次郎、本多裕之、**古江・楠田美保**、蟹江慧、加藤竜司 コロニートラッキングを応用した iPS 品質 状態のモニタリング 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール (東京) 2015年1月13日
- 8) 太刀川彩保子、藤木彩香、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、大沼清、2価イオンの制御によるヒト細胞シートの回収と細胞間結合の遮断 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京) 2015年1月13日
- 9) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、**古江・楠田美保**、加藤竜司 iPS細胞培養手技標準化のための形態評価 モデル 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール (東京) 2015年1月13日

招待講演

- 10) **古江・楠田美保** 再生医療に果たす工学の役割 -ヒト多能性細胞の培養において求められるマテリアル- 第64回日本歯科理工学会 アステールプラザ (広島) 2014年10月4日-5日
- 11) **古江・楠田美保** ヒト多能性幹細胞の品質管理と精度管理 第41回日本毒性学会学術年会 神戸コンベンションセンター (兵庫) 2014年7月2日-4日

学会座長

- 12) 柳原佳奈 Recent developments of Stem Cell Applications-leaders in industrialization JAACT2014 国際会議北九州大会 北九州国

際会議場 (福岡) 2014年11月11日-14日

- 13) **古江・楠田美保** 再生医療に求められる細胞培養 第14回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川) 2015年3月19日-21日
- 14) **古江・楠田美保** 臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞用培地の品質管理 iPS細胞ビジネス協議会 京都市サーチパーク (京都) 2014年11月26日

国際学会：一般講演

- 15) Yanagihara K, Okamura M, Kanie K, Kato R, **Furue MK**. *Prediction of differentiation tendency of human pluripotent stem cells toward endoderm* International Society for Stem Cell Reserch (ISSCR) 12th Annual Meeting, 2014.6.18-21 Vancouver, Canada
- 16) Suga M, Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, **Furue MK**. Establishment of a noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. ISSCR 12th Annual Metting 2014.6.18-21 Vancouver, Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願
PCT/JP2014/08221 判定装置、観察システム、観察方法、そのプログラム、細胞の製造方法、および細胞 株式会社ニコン 清田 泰次郎、紀伊 宏昭、**古江 美保**、菅 三佳、志賀 正武
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

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

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が最終目的とする。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。本年度は平成 26 年度に着手した、最近国内外でも広く使われ出したセンダイウイルスを用いたインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞の樹立実験を継続し、樹立されたヒト iPS 細胞の評価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

ヒト iPS 細胞の培養

昨年度樹立した iPS 細胞は、医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクから入手したヒト線維芽細胞 TIG-114 (細胞番号：JCRB0534) にセンダ

ウイルスを用いて Oct4/Sox2/Klf4/cMyc の 4 因子を導入して作製したものである。TIG-114 細胞は、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 で培養した後、2 種類のセンダイウイルスに感染させて樹立した。

また、ヒト iPS 細胞の培養はゼラチンコートしたディッシュに播種した MMC 処理したマウス線維芽細胞(SNL76/6, 大日本住友製薬)をフィーダーとして用いた。SNL76/6 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を使用し、5%CO₂、37°C で培養した。ヒト iPS 細胞培地は DMEM/F12 (和光) 500mL に Stemsure SR (和光) 125mL、Non-Essential amino acid 5mL、L-Glutamine 6.25mL、Penicillin/ Streptomycin 5mL を加えて調製した。bFGF (Peprotech) は終濃度 5ng/mL となるように毎回培地交換のたびにディッシュに直接添加した。また iPS 細胞の継代にはヒト ES 細胞用解離液 (0.25% Trypsin、1mg/ml Collagenase IV、1 mM CaCl₂、20% KSR を PBS 水溶液で調製した物)を用いた。

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。

定量 RT-PCR 解析

ヒト iPS 細胞は、ISOGEN (Nippon gene) を用いて溶解・回収

し、chloroform を加え 15 秒間ボルテックスし、室温で 10 分間放置した後、12,000rpm、4°C で 15 分間遠心を行った。その後、水相を新しいチューブにとり、isopropanol を加えて混和後、室温で 10 分間放置し、12,000rpm、4°C、10 分間遠心した。沈殿に 70% ethanol を加え、室温で 5 分間放置した後、7,500rpm、4°C で 5 分間遠心した。沈殿に DEPC 処理水を 20 μ L 加えて吸光度を測定した。その後 PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を合成した。Oligo dT primer を 1 μ L、dNTP mixture 1 μ L 添加したものに、吸光度で測定しておいた 1 μ g の total RNA サンプルを加え、RNase-free dH₂O で 10 μ L にメスアップし、65°C で 5 分間保温して氷上で急冷した。さらに、5 \times Prime Script II Buffer を 4 μ L、RNase Inhibitor を 0.5 μ L、Prime Script II RTase を 1 μ L を混合し、RNase-free dH₂O で 20 μ L にメスアップした。その後、42°C で 60 分間反応させた後、70°C で 15 分間処理し酵素を不活性化した。次に、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を 10 μ L、100 μ M Forward Primer、100 μ M Reverse

Primer を 0.6 μ L、cDNA サンプルを 2 μ L、DW を 6.8 μ L を混合し、各種特異的プライマーを用いて qPCR を行った。qPCR は CFX96 (Bio RAD) を用いて測定した。

C. 研究結果

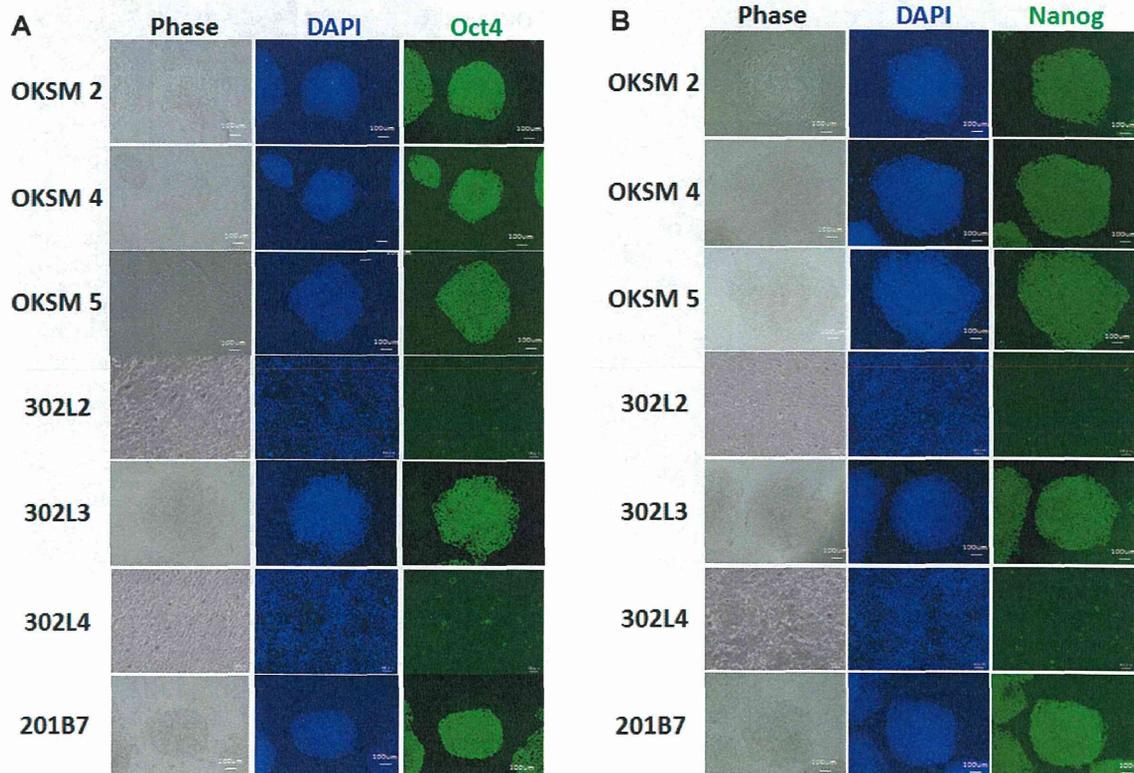
平成 26 年度は、昨年度にインテグレーションフリーな方法で樹立したヒト iPS 細胞を安定化するまで 14-15 継代ほど継代培養を続けた後、多能性幹細胞マーカーの発現を検証した。さらに優良な株については浮遊培養条件下で胚葉体を形成させ bFGF 非存在下で培養することで自由分化させ、外肺葉、中胚葉、内胚葉の初期マーカーの発現を定量的 RT-PCR で解析した。さらに核型解析を行い、マクロ的な見地から染色体異常の有無について検討を行うとともに、微生物検査も行い、ウイルス感染や最近の混入、センダイウイルスの残存などの問題がないことを確認し、医薬基盤研究所と長岡技術大学に細胞を譲渡した。

樹立したヒト iPS 細胞の多能性幹細胞マーカーの発現解析

ヒト線維芽細胞 TIG-114 に、Oct4/Sox2/Klf4/cMyc 4 因子を安定

発現させるセンダイウイルスベクター(OSKM-SeVdp ベクター)を用いて染色体 DNA への挿入なく 4 因子を安定発現させることでヒト iPS 細胞株を 7 株樹立した。本研究ではこれらを OSKM 株と呼び、樹立した 7 株を OSKM1 から OSKM7 と命名した。また、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 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を除去しやすくした改変版(OSKM-302L-SeVdp ベクター)を利用してさらに 7 株樹立した。これらのヒト iPS 細胞株は OSKM-302L 株と呼び、OSKM-

302L1 から OSKM-302L7 と順に命名した。レトロウイルスで樹立した場合と同様に、センダイウイルスで樹立した当初も iPS 細胞の維持は比較的不安定であり、十数継代維持し続けることで細胞の状態が安定化してきた。これらのヒト iPS 細胞の性状を免疫蛍光染色や定量的 RT-PCR により 201B7 とも比較することにより評価した。



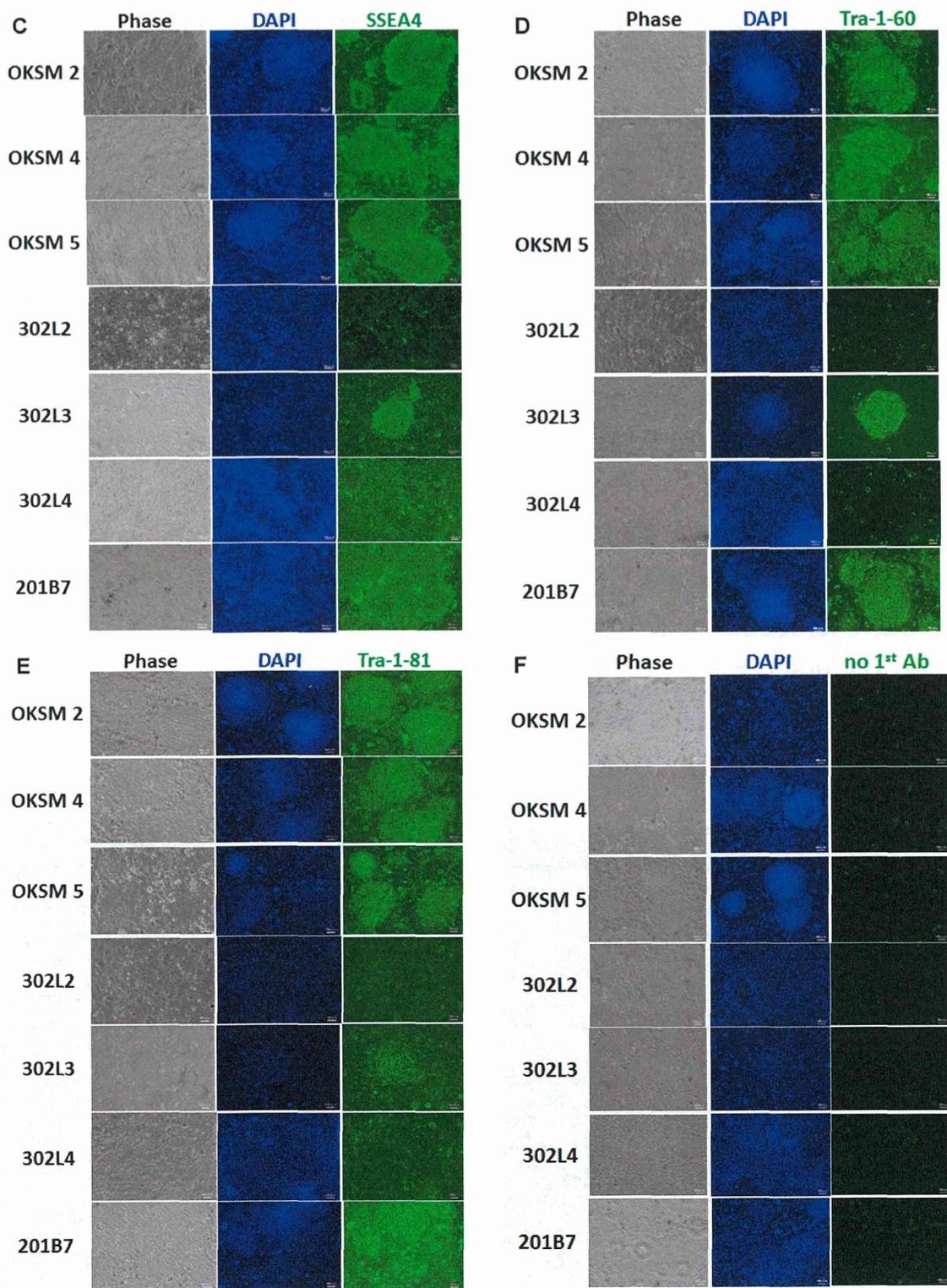


図1. センダイウイルスベクターを用いてTIG-114線維芽細胞から樹立したヒトiPS細胞における未分化マーカーの免疫蛍光染色。2種類のセンダイウイルスで樹立した比較的安定して継代が進んだヒトiPS細胞における多能性幹細胞マーカーの発現を京都大学でレトロウイルスを用いて作製された201B7株をコントロールに比較した。A. Oct4、B. Nanog、C. SSEA4、D. Tra-1-60、E. Tra-1-81、F. 1次抗体なしのネガティブコントロール。