

その結果、図 1 に示すように 4 因子を安定発現する OSKM-SeVdp ウイルスで樹立したヒト iPS 細胞は比較的安定的に OCT4、NANOG、SSEA4、Tra-1-60、Tra-1-80 等の未分化マーカーを高発現していた。一方、今回の TIG-114 線維芽細胞を用いた iPS 細胞の樹立では、OSKM-302L-SeVdp ベクターを用いた場合には良好なコロニーが安定して維持されにくい傾向があり、特に OSKM-302L2、OSKM-302L4 では上記未分化マーカーの発現が

見られないコロニーが多く見られた。

また、我々は遺伝子レベルでも発現を検証してみたが、図 2 に示したように、ヒト iPS 細胞を樹立する元となった線維芽細胞 TIG-114 では *OCT4*、*NANOG*、*SOX2* は全く発現が観察されないが、センダイウイルスで樹立したヒト iPS 細胞では基本的にレトロウイルスで樹立された TIG-114-4f1 や 201B7 と同等レベルで発現していることが確認された。

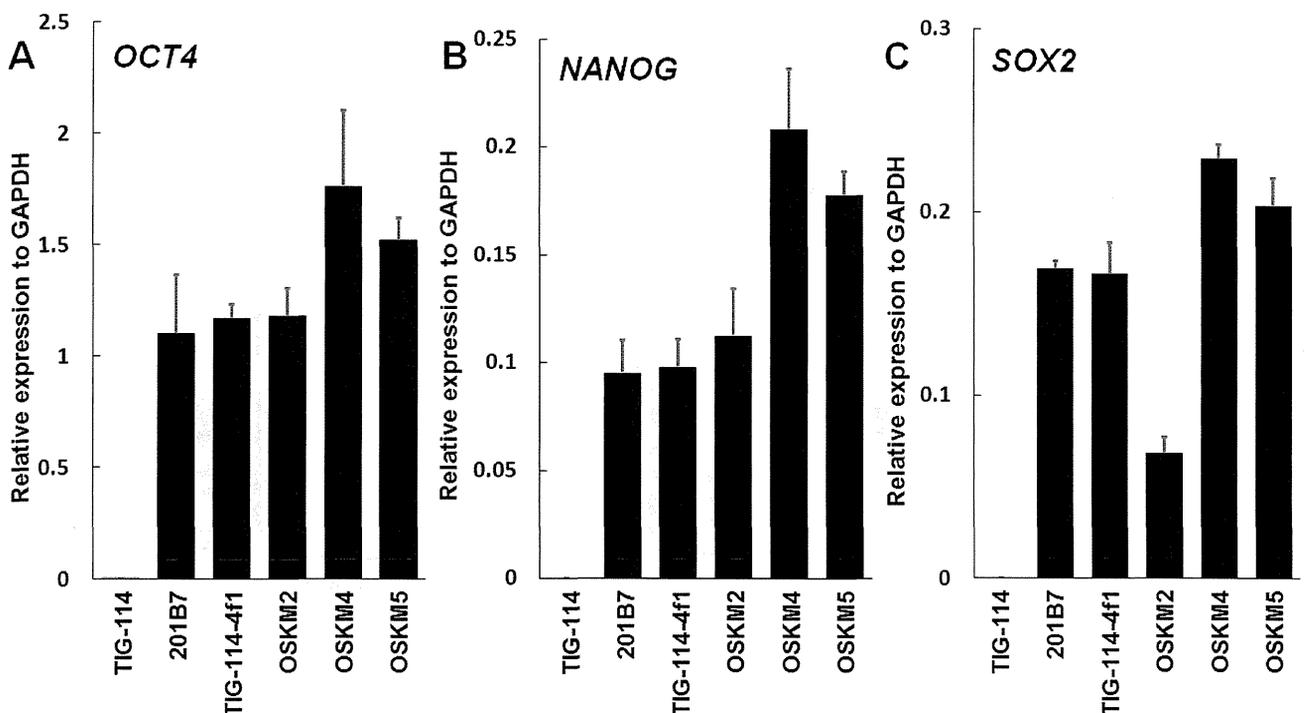


図 2. センダイウイルスベクターを用いて樹立したヒト iPS 細胞の未分化マーカーの定量的 RT-PCR を用いた発現解析。OSKM4 因子を発現するセンダイウイルスで樹立したヒト iPS 細胞における多能性幹細胞マーカーの発現を京都大学でレトロウイルスを用いて同じ TIG-114 線維芽細胞から作製された TIG-114-4f1 株や別の線維芽細胞から樹立された 201B7 株をコントロールに比較した。

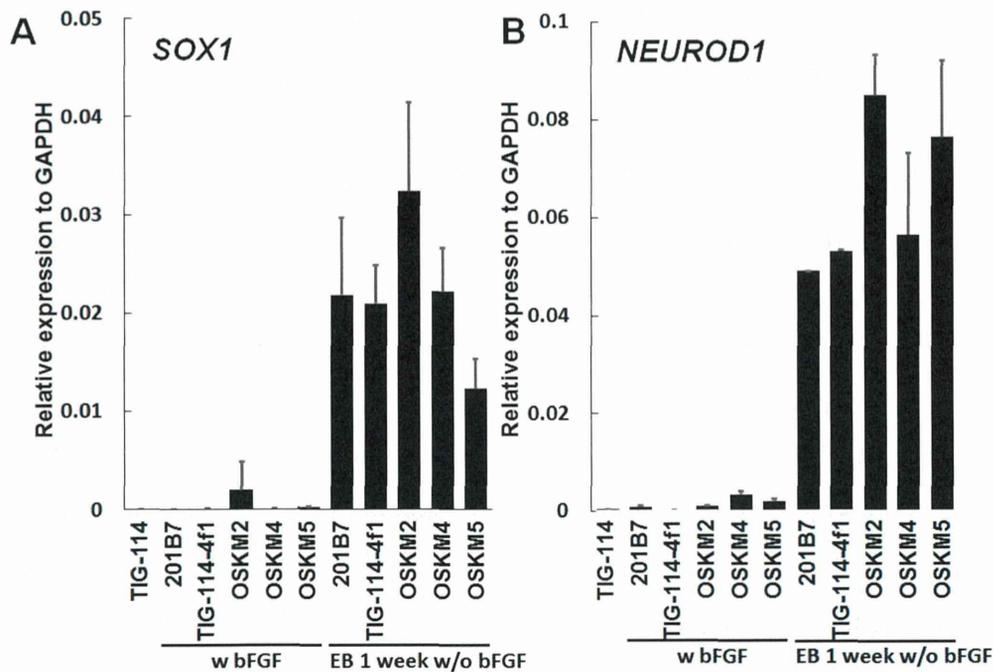


図3. ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期外肺葉マーカーの発現。w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を1週間浮遊培養させた分化細胞。

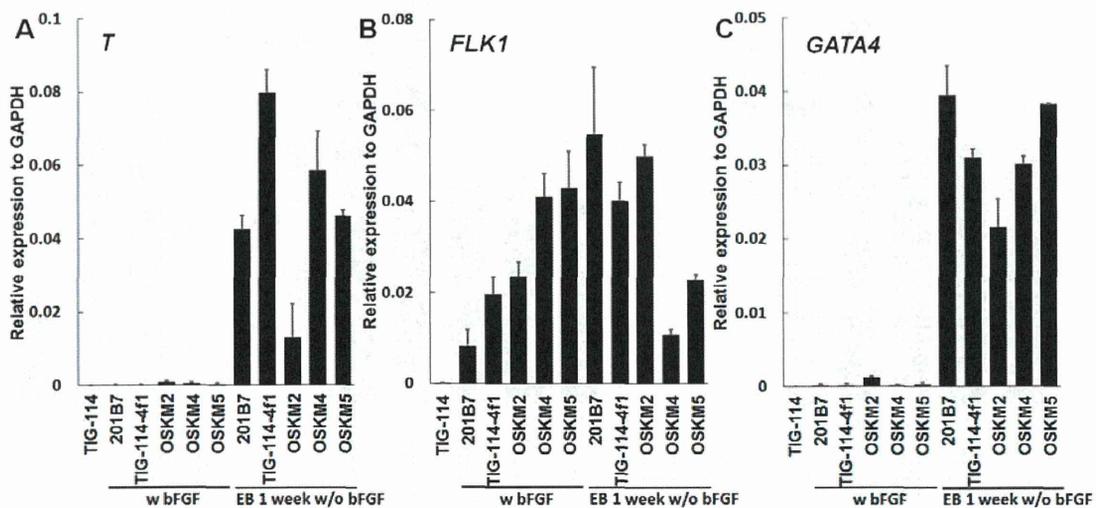


図4. ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期中肺葉マーカーの発現。w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を1週間浮遊培養させた分化細胞。

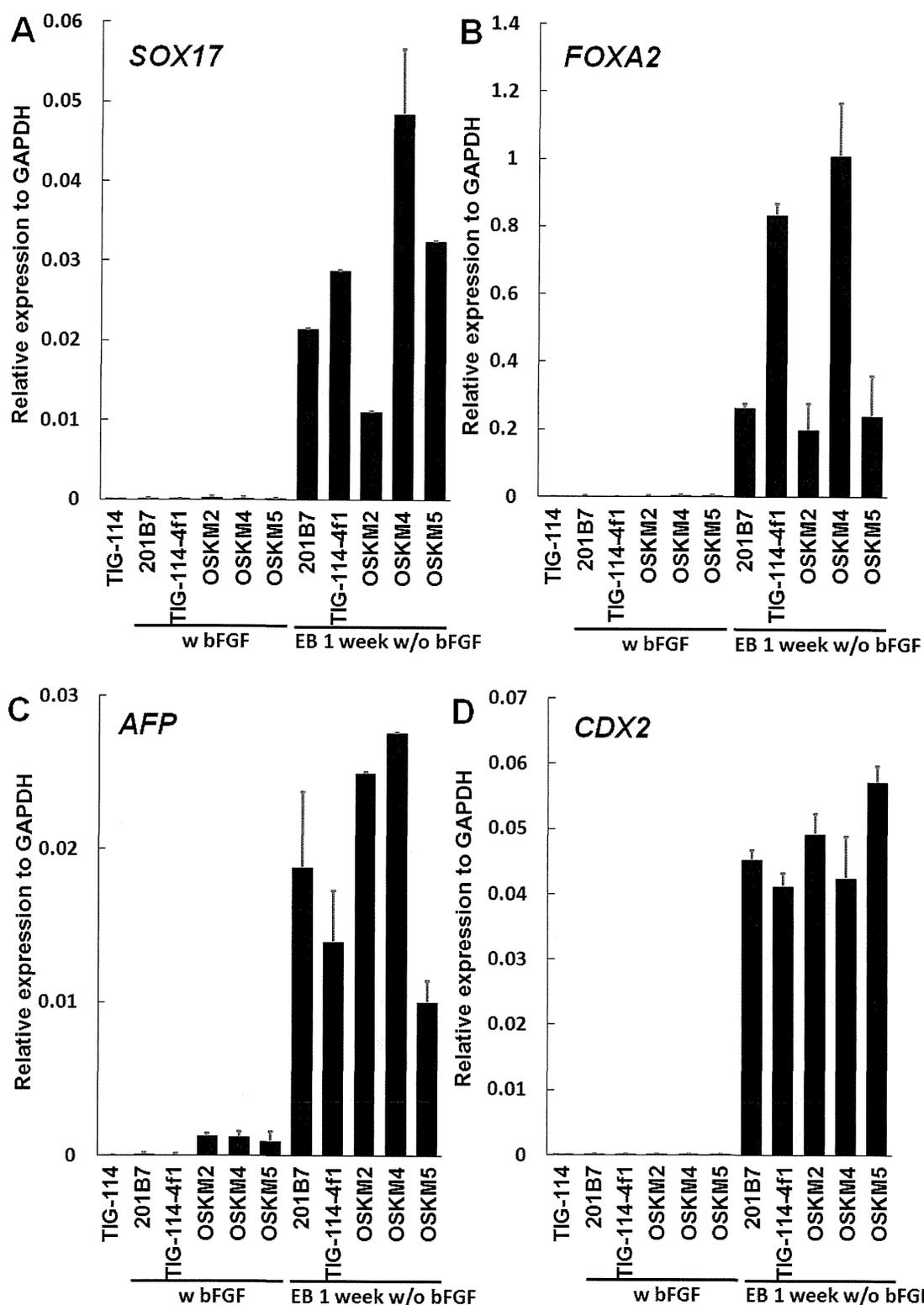


図5. ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期内肺葉マーカーの発現。 w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。

EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を1週間浮遊培養させた分化細胞。

次にセンダイウイルスで樹立した OSKM2, OSKM4, OSKM5 について、胚葉体形成法で 1 週間 bFGF 無の条件で自由分化させた際の各種初期マーカーの発現を検証した。その結果、外肺葉方向については *SOX1* と *NEUROD1* に関しては 201B7 や TIG114-4f1 と同レベルの分化能を示していることが確認された (図 3)。また、初期中胚葉マーカーの *T* や *GATA4* については OSKM2 がやや低めの発現を示す傾向が見られ (図 4)、初期内胚葉マーカーの *SOX17* と *FOXA2* においても OSKM2 が低めの発現を示したが (図 5 AB)、初期肝臓マーカー (*AFP*) や初期腸管マーカー (*CDX2*) の発現は 201B7 や TIG114-4f1 と同レベルの分化能と評価された (図 5 CD)。即ち、多少のばらつきはあるもののセンダイウイルスで樹立したヒト iPS 細胞はレトロウイルス法で樹立した細胞と比べても遜色ない幹細胞が樹立されていたことが確認された。

倫理面の配慮

ヒト iPS 細胞 201B7 及び TIG-114-4f1 は、理研細胞バンク (理化学研究所) と医薬基盤研究所の

JCRB 細胞バンクより、また、TIG-114 細胞も JCRB 細胞バンクよりより所定の手続きを経て入手したものを使用した。また、医薬基盤研究所と長岡技術科学大学への樹立した細胞の譲渡についても、産業技術総合研究所、医薬基盤研究所、長岡技術科学大学の倫理委員会で審査を受けて承認されたのちに譲渡手続きを行っている。

また、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2種類のセンダイウイルスOSKM及びOSKM-302Lのいずれのウイルスで感染させた場合においても、最終的にsiRNAでセンダイウイルスを除去した後に、センダイウイルス特異的タンパク質NPが陰性となったインテグレーションフリーのヒトiPS細胞が多数確認された。TIG-114線維芽細胞を用いた今回の実験結果では、OSKMタイプを用いて樹立したiPS細胞で十数継代の後に安定して維持しやすい傾向がみられた。この理由は現在のところ明

らかではないが、これまでのところ302miRを発現するKOSM-302Lタイプでもこれまでのところ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ことから、OSKM-302Lタイプはもう少し最適化を必要と考えられる。

一方、未分化マーカーの発現に関しては、増殖とコロニーの形態など、樹立したヒトiPS細胞の維持が比較的容易であったOSKM株の3株については、十分な発現を示しており、既存の201B7株や同一ロットの線維芽細胞TIG-114からレトロウイルス法で樹立したTIG-114-4f1と比較しても、ほぼ差がない状態であることからセンダイウイルス法による樹立に特段の問題はないと思われる。

さらに胚葉体形成法により自由分化させた場合の初期分化マーカーの発現についても上記OSKM株の3株で比較したところ、もっとも増殖能が高かったOSKM株の中でOKSM2が中内肺葉への分化能が低めである傾向が見られた。しかし、今回の評価では胚葉体形成法による1週間の分化という1点での評価であることから、既に*T*、*SOX17*、*FOXA2*など

のかなり初期の分化マーカーの発現ピークを過ぎてしまっている可能性もある。今後、これらの有望株については個々の特異的分化プロトコルによる、より厳密な評価を行うことにより、正しい能力が評価できると考えられる。

E. 結論

初年度の平成 26 年度は、昨年度樹立を開始したセンダイウイルスによるインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞株の有望株を用いてそれらの未分化マーカーの発現や分化能を比較検討した。本研究に用いた線維芽細胞は、京都大学が以前レトロウイルスにより樹立したヒト iPS 細胞と同一のヒト繊維芽細胞 TIG-114 から、最近世界中の多くの機関で使用されだしているインテグレーションフリー法により樹立した株である。世界的に広く使用されている iPS 細胞がこれらの 2 つの主要な樹立法により作成されていることから、これらの株を代表例にして、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。今後、ゲノム DNA の異常の有無や細胞分化能の詳細な際の有無など iPS

細胞の性状を慎重に解析する必要がある。本年度は、樹立し継代培養の末に安定化させた複数の株について未分化マーカーの発現と分化能の解析、核型解析や微生物検査で異常がないことを確認し、ヒト iPS 細胞としてある程度信用できる株を選択し、医薬基盤研究所と長岡技術科学大学へ譲渡することができた。以上、本分担研究は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) Watanabe-Susaki K, Takada H, Enomoto K, Miwata K, Ishimine H, Intoh A, Ohtaka M, Nakanishi M, Sugino H, Asashima M, Kurisaki A. (2014). Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. **Stem Cells**. 32(12):3099-3111.

2. 学会発表

1) 栗崎晃、“幹細胞の制御と分化” (招待講演)、食品薬品生物構造学研究会(ラフォーレ修善寺、静岡、2014年10月1日-2日)

岡, 2014年10月1日-2日)

2) 柳沢託磨、栗崎晃、“ヒトiPS細胞を用いた肺組織細胞への新規分化方法の検討” 第14回 LS-BT合同研究発表会、(ポスター発表)、産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂、茨城、2015年2月3-4日)

3) 伊藤泰斗、野口隆明、関根麻莉、高田仁実、栗崎晃、“ヒトiPS細胞から分化させた肺前駆細胞における細胞表面マーカーの解析” 第14回 LS-BT合同研究発表会、(ポスター発表) 産業技術総合研究所つくばセンター共用講堂、茨城、2015年2月3-4日)

4) 高田仁実、渡邊加奈子、榎本圭、三輪田恭子、石嶺久子、印東厚、大高真奈美、中西真人、杉野弘、浅島誠、栗崎晃、“核小体 rRNAs 合成は幹細胞の多能性と分化を制御する”、(口頭発表) 日本分子生物学会 (パシフィコ横浜、横浜、2015年3月19日-21日)

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 細胞の臨床応用や創薬応用の研究が盛んである。ところが、ヒト iPS 細胞は不安定なために培養が難しく、様々な経験則に基づき培養されているが、それらの良し悪しの具体的な検証がなされていないという問題がある。

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。本年度は、細胞の継代時の操作による違いを評価する方法の確立と、微小流体制御培養システムを用いた分化アッセイシステムでのヒト iPS 細胞の分化の検証と異なる株での検証と、分化の方向性の検証を行った。

A. 研究目的

現在、ヒト誘導多能性幹（iPS）[1, 2]の再生医療や創薬への実用化へ向けた研究が急ピッチで進んでいる。理研では網膜を移植する臨床研究も始まった。また、創薬の分野では、動物実験を減らし、かつヒトから抽出することなく、ヒトの正常細胞を大量に得るための技術としても着目されている。

このようなヒトiPS細胞の実用化研究が進む中、細胞の品質の管理が大きな問題となっている[3]。ヒトiPS細胞は状態が変化し易く、同じプロトコルで培養していても状態が急変する事が多発するため、各研究者が様々な工夫している。そのため、同じ細胞でも培養する人、時期により細胞の状態が大きく異なる。このような状態で分化実験を行っても再現性が取れない。

この細胞の品質管理の問題がユーザ側に於いてどの程度深刻な問題として認識されているかを調査するため、国内外の動物実験代替法やヒト細胞を用いた薬剤試験に関する学会やシンポジウムに出席した。その結果、どの分野に於いても、細胞の品質管理が現時点そして将来に於ける大きな問題である事を指摘する発表が多く、ユーザ側でも問題が表面化している事が分かった。

本分担研究では、この細胞の品質管理の問題に対処するため、iPS細胞の未分化維持に於ける品質変動の評価と、微小流体制御システムを用いたハイスループット分化アッセイの研究開発を行っている。

細胞の品質変動の原因の最たるものの一つとして、継代作業が挙げられる。一般的な細胞株やマウスES・iPS細胞と違うヒトES・iPS細胞の大きな特徴は、細胞同士が分離するとアポトーシスを起こすことである[4]。このアポトーシスはRho関連キナーゼ（ROCK）阻害物質で抑制できる事が知られているが、完全には抑制できない[4]。そのため、継代時の細胞分散の仕方や、かける時間が変わると、細胞がアポトーシスを起こし、その結果として細胞の再接着率や生存率などが減少する。そこで本年度は、細胞の品質の変動を定量化するため、継代後のアポトーシスと細胞の生死を定量的に測定手法を確立した。

微細加工技術を用いたハイスループット分化評価は前年度までに開発したシステムが実際に使えそうかを検討した。培養条件の評価は多数の検体を扱うために非常にコストがかかるうえ、従来手法では培養条件の制御に限界がある。昨年度まで、微小流体制御システムに、フィーダフリー・ディファインド培養を組み合わせた未分化・分化アッセイシステムを開発した。微細加工を用いることにより、培養器を縮小して細胞接着コートや培地等のコストが大幅に削減できる。また流体制御を用いた灌流培養により、培養条件を定常化できる。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。昨年度は、ヒトiPS細胞の未分化維持培養と初期分化に成功した。今年度は、分化の方向性が正しいことの検証と、異なるヒトiPS細胞の株を用いての検証を行った。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の KSR-MEF 培養

ヒト iPS 細胞の維持培養は一般的に行われている培養法に準じた[1, 5, 6]。ヒト iPS 細胞 201B7 株[1]と 253G1 株[7]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。ヒト iPS 細胞の Tic 株（胎児肺線維芽細胞、MRC-5、由、JCRB1331）[8]は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク（大阪）より入手した。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 °C、5% CO₂ 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[5]）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[4] 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

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 ウシ脾臓由来インスリン（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、 $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のファイブロネクチンでコートした [6, 9]。継代はまず、培養皿からhESF-9a培地を除き、 $0.2\text{--}0.5\text{ unit}/\text{mL}$ dispase、hESF-9a培地から成る解離液を 0.5 mL 加え5分間 37°C 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 $10\times\text{g}$ 、1分間遠心し、上清を除き、hESF-9a培地を 1 mL 加えた。 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ファイブロネクチンコート培養皿にhESF-9a培地を 4 mL 、 $5\mu\text{M}$ 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。

アポトーシス・生細胞・接着率

6 wellに細胞を播き、アッセイの前日には培地を $\text{PBS}^{+/+}$ (カルシウム・マグネシウム含有リン酸バッファ) で2回リンスしてアポトーシス抑制剤のROCK inhibitorを除去した後、新しい培地に交換した。

アポトーシスを誘導するために細胞を1細胞ずつに分散した試料と、アポトーシスを抑えるために塊で剥がす試料とを、以下の様に準備した。まず、 $\text{PBS}^{-/-}$ (カルシウム・マグネシウム不含リン酸バッファ) で2回リンスした後、 $\text{PBS}^{-/-}$ と PBS^{Ca} (カルシウム含有リン酸バッファ) に置換し、 37°C で15分インキュベートした後、 1 mL のピペットで細胞を剥離・分散した。

300 G 、 3 min の遠心沈降で細胞を回収し、ESF9a培地に再分散分散し、 10cm の培養皿に播いた。培養皿は細胞の接着を阻害するため、非接着培養皿を $1\text{ mg}/\text{mL}$ のウシ血清アルブミン (BSA) でコートした。細胞は浮遊状態で、4時間、 CO_2 培養器の中でインキュベートした。

アポトーシスをFACSで確認する手法は以下の通り。顕鏡で非接着確認後、チューブへ回収し、 300G 、3分の遠心沈降で回収した。回収した細胞をFACS解析ように分散するため、 0.02% EDTAで15分インキュベートした後、ピペティングで分散し、細胞係数後に 300G 、3分の遠心沈降で回収した (Annexin Vの接着にはCaが必要なため、EDTAを十分にリンスする)。 1×10^5 の細胞当たり、キット (BioVision, Milpitas, CA, USA)に付属の染色用バッファを $200\mu\text{L}$ 添加した。Annexin V - FITCを $2\mu\text{L}$ 加え、15分室温でインキュベートした (途中で一度揺すり、混合した)。BSA-PBS-PIを $300\mu\text{L}$ 加え、FACSで測定した。

細胞生着率の測定

細胞を PBS^{++} で2回洗浄した後、固定と染色のために 0.4% crystal violet溶液 (下記) を各wellに注入して、室温で30分静置する。 0.4% crystal violet溶液は、 $200\mu\text{g}$ crystal violet (031-04852, Wako,

Tokyo, Japan) を50 mL methanol (131-01826 Wako) に溶解した。

溶液を捨て、水を溜めたバットの中で2, 3回リンスした後、よく乾燥させ、染色された細胞の写真を撮った。定量するために、抽出液を注入してクリスタルバイオレット抽出した。抽出液は、1% acetic acid (017-00256, Wako)、30% ethanol (057-00456, Wako) 水溶液を用いた。抽出した色素の吸光度をマルチウェル吸光プレートリーダーで測定した (波長595 nm)。

生細胞数アッセイ

細胞を培養した96 wellプレートから培地を吸い取り、新たな培養液を100 μ L 添加した後、Cell counting kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を各ウェルに10 μ Lずつ添加し、37°C、1~4時間インキュベートした。その後、プレートリーダーで吸光度を測定した (波長450 nm)。

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

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[10, 11]。

ヒトiPS細胞を無血清・無フィーダー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 \times g、3分間遠心して回収した。5 μ M 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 μ g/cm²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 μ L加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。4% Formalin Solutionを各リザーバ150 μ L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 μ L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 μ L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 μ L加えて30 kPa加圧し、4°Cで12時間以上静置した。PBS⁺⁺を各リザーバ400 μ L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 μ L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 μ L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 μ L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。

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

継代時に、細胞分散する事により起こるアポトーシスや、その他の様々なダメージのためを評価するために、2つの手法を策定した。一つはAnnexin Vによるアポトーシスの定量であり、もう一つはクリスタルバイオレット法とホルマザン測定法による生細胞数の定量である。

継代操作が与える影響の評価 1 : アポトーシスの定量的評価法

アポトーシスを評価する手法の中で、簡便でかつ定量性が良い方法として、Annexin Vを用いてのFACS解析がある。生体内においてはマクロファージなどの貪食細胞が、アポトーシスをおこした細胞表面の変化を認識して除去する。細胞表面の変化のひとつとして、通常は細胞膜の内側に存在しているフォスファチジルセリンの細胞表面への露出が知ら

れている。Annexin VはCa²⁺存在下でフォスファチジルセリンに対して強い親和性を持つため、蛍光標識したAnnexin Vはアポトーシスの良いマーカーとなる。継代作業の違いがはっきり表れると予想される条件として、Ca²⁺・Mg²⁺不含の溶液を用いて細胞を単一細胞に分散した場合と、Ca²⁺を添加して細胞塊のまま分散した場合とを比較した。回収し、再播種して4時間後にAnnexin Vで染色して写真を撮り、その後FACS解析をした。

実験開始当初、結果が安定せず、同じ条件でも陽性率が大きく異なる事があった。様々な染色条件を試したところ、細胞濃度やバッファの量が異なると染色の濃さが大きく異なる事が分かった。そのため、染色条件を厳密に守る事が結果の安定性に大きく影響することが判明した。この条件下で上述の実験をした結果、単一細胞に分散した場合には60%以上の細胞がAnnexin V陽性となった

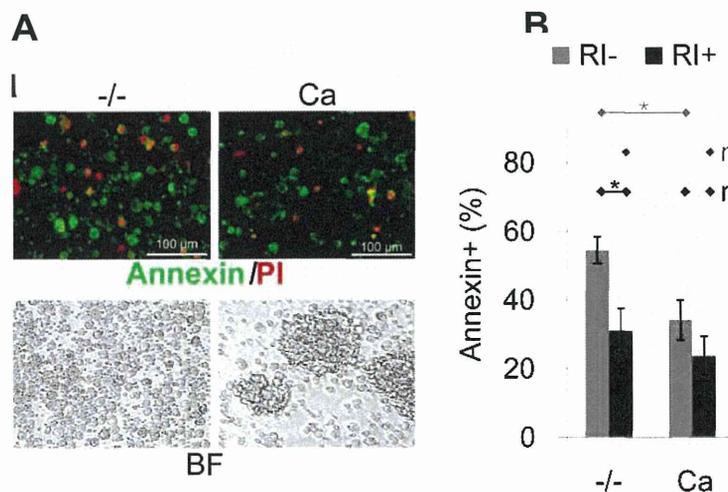


図 1: 継代作業によるヒト iPS 細胞へのダメージの定量的な評価。

A: 蛍光顕微鏡写真。-/- (左) は単一細胞分散の条件で、Ca (右) は細胞塊の条件。アポトーシスマーカーの Annexin V (緑) と、死細胞のマーカーの PI (赤) で染色。

B: FACS 解析による Annexin V 陽性細胞数の定量。RI はアポトーシス抑制剤 (ROCK 阻害剤)。

のに対し、細胞塊のまま回収した場合には50%以下であり、両者の間に有意な差があった (図 1、 $P < 0.05$)。この差は、アポトーシスを抑制するROCK抑制剤 (RI) を加えることによって消失した (図 1)。以上の結果より、このシステムがヒトiPS細胞の継代作業により誘発されるアポトーシスを定量するのに有効である事が解る。

継代操作が与える影響の評価 2 : 再接着率・生細胞数の測定

継代時に酵素を効かせ過ぎて細胞表面のインテグリン等の細胞接着分子の障害が起こると、細胞が底面に付着できず、結果として死んでしまう。そこで、細胞の再接着率の評価するために、播いた翌日の再接着率と生細胞数を測定する方法を検討した。

まず、生着細胞数の推定するため、

クリスタルバイオレットを使用した。クリスタルバイオレットは細胞染めるのに多用される。定量性があまり高くないという欠点があるが、96ウェルでも綺麗に細胞の写真が撮れることや、簡便で安価という利点がある。プロトコルの概要は以下の通り。96ウェルに播いた細胞を、PBSですすいだ後にメタノールに解かしたクリスタルバイオレットで固定、染色を同時に行う。その後非接着細胞を落とすのと、培養皿などに着いた色素を撮るために水洗いする。乾燥した後にエタノールと酢酸で抽出してマイクロプレートリーダーで595 nmの吸光を測定した。その結果、細胞は濃い紫色に染まり、細胞の形がくっきりと観察できた (図 2)。また、 $10^4 \sim 10^5$ 細胞/cm²において、細胞数とクリスタルバイオレット抽出液の吸光度との間で良い直線性を示した (図 2)。以上の結果から、クリスタルバイオレットを用いた生着細胞アッセ

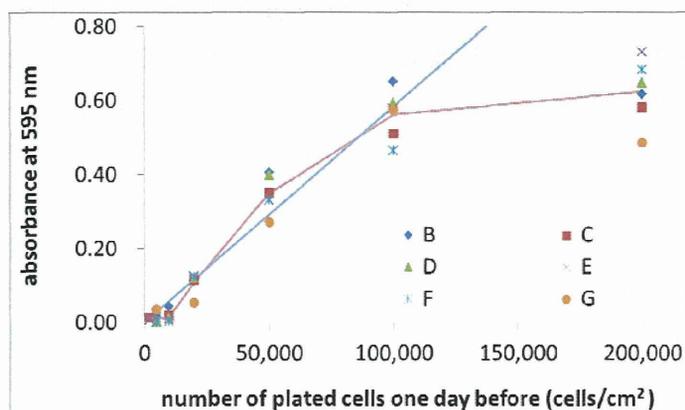
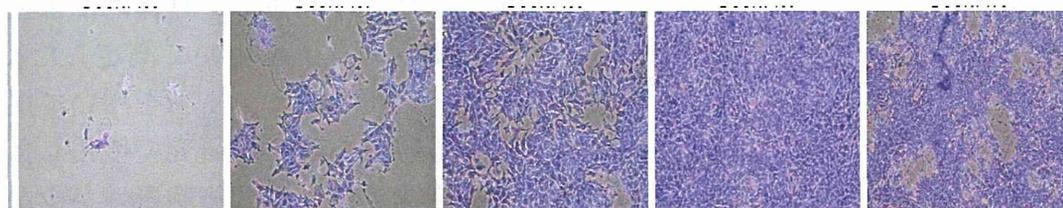


図 2 : クリスタルバイオレットを用いたヒト iPS 細胞の再接着の定量。

A : 位相差顕微鏡写真 (上段) と、クリスタルバイオレットで染色した後の明視野顕微鏡写真 (下段)。B : 抽出したクリスタルバイオレット吸光度 (縦軸) と細胞数 (横軸)。低濃度域でよい直線性を示す。

いは、ヒトiPS細胞の形態を観察し、生細胞数を定量するのに適している。

次に、市販の生細胞測定キット (Cell counting kit-8、和光純薬) を用いて細胞数のキャリブレーションカーブを描いてみた。この試薬は、細胞内脱水素酵素により生成される水溶性のホルマゼンを450 nmの吸光度で測定する方法である。反応させるために数時間インキュベートする必要があることが欠点だが、1ボトル溶液タイプで非常に簡便であり、更に細胞を固定したり溶解したりの操作が不要であるため、続けて他のアッセイを行えることが利点である。プロトコルの概要は以下のとおり。96ウェルに細胞培養した後、各ウェルに試薬を10 μ L加え、数時間インキ

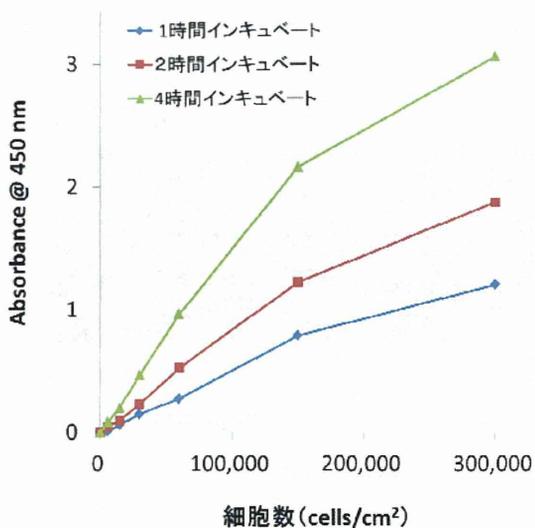


図 3: Cell counting kit-8 を用いたヒト iPS 細胞の再接着の定量。

吸光度で測定したホルマゼンの量 (細胞数に比例、縦軸) と細胞数 (横軸)。試薬と共にインキュベートする時間により感度が変わる。

ュベートし、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定する。その結果、やはり $10^4 \sim 10^5$ 細胞/cm² において良い直線性を示した (図 2)。また、インキュベートする時間を長くすることにより、細胞数が少ない領域を拡大して観察することが可能となる。生細胞のまま測定することができるため、この時間を変えた測定は同一サンプルで行うことが可能である。従って、このCell counting kit-8 もヒトiPS細胞の生細胞数を定量するのに適している。

以上の2つの方法がヒトiPS細胞の生細胞の定量に適していることが分かった。そこで、どちらか一方に絞ろうと考え、両者を比較する実験を行った。ところが、複数回アッセイを繰り返すと、たまに操作ミスなどのためにどちらかで異常な値が得られるという問題が発生した。そこで、同一のサンプルで、両方を併用すると良いと考えた。具体的には生細胞測定キットを用いて測定した後、クリスタルバイオレットを用いて測定する事である。本研究で使用した生細胞測定キットは細胞毒性が少ない上、両方の方法で吸光測定する場合の波長も異なるため、このような併用が可能となる。実際に試みてみると、この2つ方法で得られた結果が大きくずれているときは、何らかの操作ミスが疑われる時であった。以上より、2つのシステムを併用することにより、ミスの少ない評価が可能である事が解った。

微小流体制御培養システムにおける異なるヒト iPS 細胞の分化誘導

昨年度までの研究で、小流体制御培養システム内で未分化維持培養と分化誘導が可能である事を調べた。分化誘導試薬は、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。本年度は、このシステムを用いた分化誘導が他の細胞株でも働くかどうかを調べた。ヒト iPS 細胞は株により反応性が異なるため、複数の株を調べることが重要となる。そこで京都大学山中研で樹立されたヒト iPS 細胞

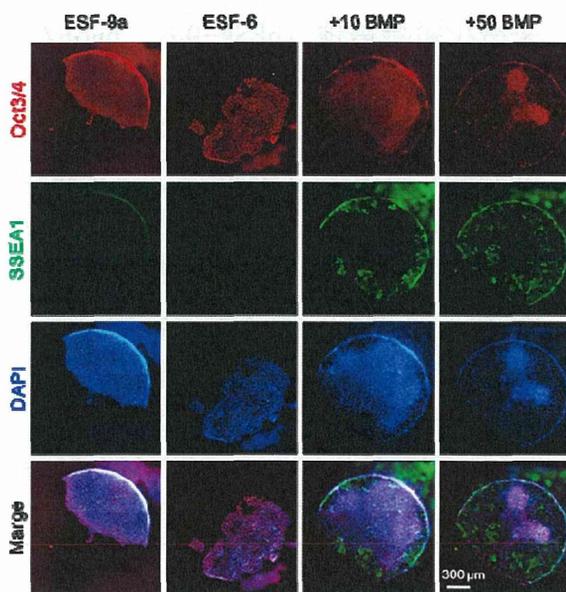


図 4 : 微小流体制御培養システムでのヒト iPS 細胞の分化誘導を、異なる iPS 細胞、Tic 株での確認。

未分化培地 (hESF-9a) とこれから未分化維持因子を除いた培地 (hESF-6)、それに低・高濃度 (10, 50 ng/mL) BMP-4 添加した分化誘導培地 (+10 BMP, +50 BMP,) で培養し OCT3/4 (未分化マーカー: 赤) と SSEA1 (初期分化マーカー: 緑) で免疫染色した。

細胞の他に、新たに生育医療センターで樹立されたヒト iPS 細胞の Tic 株を用いて同様の実験を試みた。

昨年度と同様、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、未分化マーカーの OCT3/4、初期分化マーカーの SSEA1 で免疫染色を行った。その結果昨年度と同様に、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 4)。

以上より、本分化誘導システムは、ヒト iPS 細胞株の 201B7 株、253G1 株、Tic 株の 3 株で同様の結果が得られるため、マイクロ流路を用いてのヒト iPS 細胞の分化誘導を確認するのに簡便で確実な方法が設定できた。

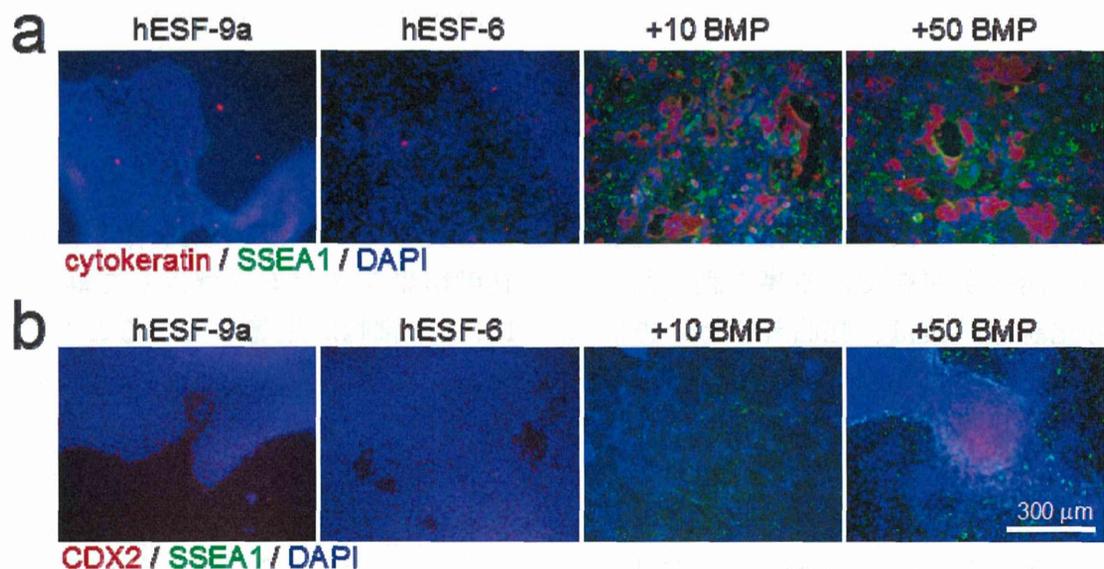


図 5：ヒト iPS 細胞の BMP 初期分化：正しい方向へと分化していることを確かめるために長く分化した時の細胞分化を免疫染色で確認した。分化誘導から 1 週間の時点での初期分化を SSEA1 (a, b)、胚胎外組織方向への分化を cytocheratin (a)と CDX2 (b) 青色は DAPI による核染色。

微小流体制御培養システムにおけるヒト iPS 細胞の分化誘導系の確認

昨年度までの研究で、小流体制御培養システム内で未分化維持培養と分化誘導が可能である事を調べた。分化誘導試薬は、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。ただし、未分化・初期分化マーカーでそれを確認したのみで、分化が正しい方向に向かっているかどうかは確認できていなかった。そこで、より長期に培養し、分化が進んだ段階で免疫染色し、分化の方向性が正しいかどうかを確認した。

無血清・無フィーダ培養したヒト iPS 細胞を播いて 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) を使用した。昨年度は 3 日間のみであったが、今年度は 1 週間培養した後、初期分化マーカーの SSEA1 と胚胎外組織分化の初期に現れるサイトケラチンと CDX2 で免疫染色した。その結果、未分化維持培地 (hESF-9a) や未分化維持因子を除いた培地 (hESF-6) ではほとんどの細胞が理両方の分化マーカー陰性だったのに対し、分化誘導培地では両方に陽性の細胞が見つかった (図 5)。従って、この分化誘導系が正しく機能していることが確認できた。

D. 議論

本年度は、細胞の継代時の操作の違いを評価する方法の確立と、ハイスループット分化評価のための基礎実験として昨年までに開発した系を用いて異なるヒトiPS細胞の分化の検証と分化の方向性の検証を行った。

ヒトES・iPS細胞は、同じ株でも培養の方法により遺伝子異常が起きる事が知られている[12]。この細胞間での違いは、主に継代の操作によると考えられている。ヒトiPS細胞は単一細胞に分散するとアポトーシスを起こすため[4]、継代時に酵素の作用が長かったり、ピペッティングしすぎたりすると、アポトーシスが 증가、翌日の生着細胞数が減少する。今回、このアポトーシスの違いを測る系としてAnnexinVを用いたFACS解析を、単一細胞分散した場合と、細胞塊へと分散した場合とで比較し、予想通り単細胞分散の方がアポトーシスが起こり易いことが示された。更に、細胞を播いて翌日の細胞数を計測するために2種類の方法を試し、両方で良好な結果が得られた。ただし、片方では正しい結果が得られない場合があるため、これらの併用が望ましいことも分かった。以上の方法を用い、ヒトiPS細胞の継代時における操作の違いを評価する系が確立できた。来年度は本法を用い、初心者を模倣した時間設定を行い、その影響を定量する予定である。

ヒトES・iPS細胞の性質は株間で大きく異なる事が報告されている[13]。従って、同じ実験を複数の株で行い、結果を比較することが重要となる。ハイスループット分化評価のため、昨年度までに微小流体制御システムを無血清・無フィーダ培養を組み合わせ、ヒトiPS細胞の未分化・分化が制御できる事を実証した。そこで本年度は、異なる株間でも同じ結果が得られるかを検証した結果、201B7、253G1、Ticの3株で同じ結果が得られることが確認できたため、このBMP4を用いた分化誘導系は、複数の株間で非常に安定して使えることが実証された。培養3日で結果が得られるために、簡便に早く結果が得られるのも良い点である。更に、過去の報告と同様に[14]、長期間培養することにより胚胎外方向へ分化が進むことが示された。以上をまとめ、マイクロ流体制御システムと無血清・無フィーダ培養にBMP4を組み合わせた分化誘導系は、複数のヒトiPS細胞の分化のアッセイ系として非常に適している事が解る。

E. 結論

本分担研究では、細胞継代時の影響を評価する系の確立と、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価のプロトコル確定ができた。来年度は、これらを用いて更なる研究・開発を進める。

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., *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. Watanabe, K., et al., *A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(6): p. 681-6.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Nishino, K., et al., *DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells over Time*. PLoS Genetics, 2011. **7**(5): p. e1002085.
9. 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.
10. Sugiura, S., et al., *Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay*. Biotechnol Bioeng, 2008. **100**(6): p. 1156-65.
11. Yoshimitsu, R., et al., *Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions*. Biotechnology and Bioengineering, 2014. **111**(5):