

p. 937-947.

12. Draper, J.S., et al., *Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(1): p. 53-4.
13. Osafune, K., et al., *Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(3): p. 313-5.
14. Xu, R.H., et al., *BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast*. Nature biotechnology, 2002. **20**(12): p. 1261-1264.

G. 研究発表

1. 原著論文

1) Yamada R, Hattori K, Tagaya M, Sasaki T, Miyamoto D, Nakazawa K, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K*. Plasma-patterned polydimethylsiloxane surface with single-step coating of a mixture of vitronectin and albumin enables the formation of small discs and spheroids of human iPS. Plasma Medicine. 2014;4(1-4):165-76.

2) Ninomiya H, Mizuno K, Terada R, Miura T, Ohnuma K, Takahashi S, et al. Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2014 (e-pub 15 Aug 2014)

3) Yamada, R., K. Hattori, S. Tachikawa, M. Tagaya, T. Sasaki, S. Sugiura, T. Kanamori and K. Ohnuma* (2014). "Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ -globulin." Journal of Bioscience and Bioengineering. 118, 315-322 (Sept 2014).

4) Yoshimitsu, R., Hattori, K., Sugiura, S., Kondo, Y., Yamada, R., Tachikawa, S., Satoh, T., Kurisaki, A.,

Ohnuma, K.*, Asashima, M., Kanamori, T. (May 2014). Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 937-947 (2014).

5) Ohnuma, K*., A. Fujiki, K. Yanagihara, S. Tachikawa, Y. Hayashi, Y. Ito, Y. Onuma, T. Chan, T. Michiue, M. K. Furue and M. Asashima (Apr. 2014). "Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations." *Sci. Rep.* 4: 4646.

6) Tadashi Ninomiya*, Toru Hiraga, Akihiro Hosoya, Kiyoshi Ohnuma, Yuzuru Ito, Masafumi Takahashi, Susumu Ito, Makoto Asashima, Hiroaki Nakamura, "Enhanced Bone-forming Activity of Side Population Cells in the Periodontal Ligament" *Cell Transplantation*, 23, 691-701 (Apr 2014).

2. 学会発表

1) K. Ohnuma, Microfluidic perfusion culture system for culturing human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions, 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 24-28 Aug 2014, Prague, Czech Republic.

2) Y. Yamamoto, R. Yamada, K. Hattori, S. Tachikawa, M. Tagaya, T. Sasaki, D. Miyamoto, K. Nakazawa, S. Sugiura, T. Kanamori, and K. Ohnuma, Discs of human induced pluripotent stem cells on a plasma-patterned polydimethylsiloxane surface following single-step coating with vitronectin and γ -globulin, 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (San Antonio, Texas, USA), pp901-903, October 26-30, 2014

3) 山本悠太・中村昇吾・加納歩・大沼清、「分化・未分化細胞のタイムラプス撮影」、細胞アッセイ研究会、2015年1/13（東京大学生産技術研究所コンベンションホール）

4) 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、楠田-古江美保、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、2015年1月13日（東京大学生産技術研究所コンベンションホール）

5) 近藤裕樹、田代将大、吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、栗崎晃、浅島誠、金森敏幸、大沼清、「マイクロ灌流培養器によるヒトiPS細胞の細胞塊の培養」、細胞アッセイ研究会、2015年1月13日（東

京大学生産技術研究所コンベンションホール)

6) 太刀川彩保子、菅美香、古江美保、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」、再生医療学会、2015年3月20日(パシフィコ横浜)

7) 山本 悠太、加納歩、中村昇吾、大沼清、「タイムラプス撮影による分化・未分化細胞の移動の定量」、再生医療学会、2015年3月20日(パシフィコ横浜)

8) 近藤裕樹、田代将大、吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、栗崎晃、浅島誠、金森敏幸、大沼清、「マイクロ灌流培養装置によるヒト iPS 細胞の細胞塊の培養」、再生医療学会、2015年3月20日(パシフィコ横浜)

9) Ryotaro Yamada, Koji Hattori, Saoko Tachikawa, Motohiro Tagaya, Toru Sasaki, Shinji Sugiura, Toshiyuki Kanamori, and Kiyoshi Ohnuma, “ Plasma-patterned PDMS Coated with Vitronectin and γ -globulin Enables Patterning of Human iPS Cells “, 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5), May 18-23, 2014 (Nara, Japan)

10) 山田遼太郎、服部浩二、太刀川彩保子、多賀谷基博、佐々木徹、杉浦慎治、金森敏幸、大沼清、「プ

ラズマ照射と複合コートによるヒト iPS 細胞の 2 次元パターンの作製」、第 21 回 HAB 研究機構学術年会、2014年5月16日~17日(昭和大学上條講堂)

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 26 年度は、昨年度に引き続き iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化プロトコルの収集を行い、適切なプロトコルの抽出を試みた。その結果、胚様体形成法を用いることで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。また、ヒト iPS 細胞株が異なった場合でも再現性良く血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞が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ルとなり得る可能性が示された。

研究協力者

岡田淳雅：独立行政法人医薬基盤研究所

田代克久：独立行政法人医薬基盤研究所

山口朋子：独立行政法人医薬基盤研究所

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）は自己複製能と分化多能性を有しており、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞は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・検証することを目指す。平成 26 年度は、昨年度に引き続き、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液前駆細胞等）への分化プロトコルの収集および再現性の高いプロトコルの抽出を試みた。

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)、NEPB (筑波大学、須磨崎亮教授から供与)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) 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]

B-2. 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 μ M 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 μ g/ml Ascorbic acid (Sigma)、450 μ M 1-thioglycerol (MTG ; Sigma)、2 mM L-Glutamine (Life Technologies)、120 μ g/ml streptomycin および 200 μ g/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 μ M 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 μ M 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 μ g/cm² 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-3. 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 9 日目の EB を回収し、Trypsin/EDTA (Life Technologies) を加えて 37°C で 5 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°C、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。

[血液前駆細胞]

B-4. 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 μ M Y27632 を含む EB 形成培地 [50 μ g/ml Ascorbic acid、450 μ M 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 10⁶ 個の iPS 細胞と前日放射線処理した 6 x 10⁵ 個 C3H10T1/2 細胞を 1 ng/ml ActivinA、10 ng/ml BMP4、10 μ M 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)、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF を含む EB 分化培地 [50 μ g/ml Ascorbic acid、450 μ M 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 μ M 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、10 ng/ml stem cell factor (SCF; Pepotech)、10 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-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 9 日目の EB を回収し、Trypsin/EDTA (Life Technologies) を加えて 37°C で 5 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、セルソーター (SONY SH-800) を用いて CD34 陽性 CD43 陽性細胞の割合を解析した。

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。昨年度までに、胚様体 (embryoid body : EB) を形成させることで、201B7 株から安定的に CD34 と VE-Cadherin を共発現する血管内皮細胞様の細胞へ分化誘導可能であることを示した。そこで本年度は、前年度に引き続き、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞へのプロトコルを収集するとともに、201B7 株以外のヒト iPS 細胞株を用いても安定的に再現良くヒト iPS 細胞から血管内皮細胞が分化誘導可能か検討した。まず、昨年度に引き続きヒト iPS 細胞か

ら血管内皮細胞への分化誘導プロトコールを収集した。血液細胞への分化支持能を有することが知られている OP9 ストローマ細胞株とヒト ES 細胞を共培養することで、血管内皮前駆細胞である CD34 陽性細胞が効率良く分化誘導可能であることが報告されている (Blood. 2005; 105(2): 617-26., Blood. 2006; 108: 2095-2105., Stem Cells. 2009; 27: 559-567.)。そこで、同プロトコールでヒト ES/iPS 細胞から高効率に血管内皮前駆細胞を分化誘導できるのではないと考え、検討を行った。その結果、現在用いている胚様体形成を介した分化誘導法と比較して、CD34 陽性細胞への分化誘導効率ならびにその安定性が低いことが明らかとなった (data not shown)。

次に、201B7 株以外のヒト iPS 細胞を用いた場合でも胚様体形成法により安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能か否かについて検討した。その結果、201B7 株と比較して血管内皮細胞への分化誘導効率は低いものの、その他のヒト iPS 細胞株でも安定的に CD34 陽性細胞が分化誘導可能であった (Figure 1)。

また、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能かどうかについて 201B7 株を用いて検討した。その結果、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能であった (Figure 2) 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。

C-2. ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血液細胞を分化誘導するには、まず血液前駆細胞を得る必要がある。

ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へ分化誘導する方法として、支持細胞との共培養法、単層培養法や胚様体形成法などが報告されている。昨年度いくつかの手法で検討した結果、胚様体形成法がもっとも安定的にヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へと分化誘導可能であることを示した。昨年度に引き続き、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導プロトコールを収集した。本年度は、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 および SCF、TPO などの血液細胞分化を支持するサイトカイン存在下で培養することにより中胚葉・血液前駆細胞様細胞の誘導を試みた。その結果、本手法では再現性良く血液前駆細胞を誘導することが出来なかった (data not shown)。

次に、胚様体形成法を用いることで、201B7 株だけでなく他のヒト iPS 細胞株を用いた場合でも安定的に血液前駆細胞が分化誘導可能かどうか検討した。その結果、201B7 株だけでなくヒト末梢血由来 iPS 細胞株である NEPB においても安定的に血液前駆細胞が分化誘導可能であることが示された (Figure. 3)。また、201B7 株と比較して、ヒト血液由来 iPS 細胞株である NEPB で最も効率良く血液前駆細胞へと分化した。

また、実験者が異なった場合でも安定的に

血液前駆細胞へ分化誘導可能かどうかについて、NEPB 株および 201B7 株を用いて検討した。その結果、実験者が異なった場合でも安定的に血液前駆細胞へ分化誘導可能であった (Figure 4) ことから、胚様体形成法は、血管内皮細胞だけでなく、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化においても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。

D. 考察

iPS 細胞を研究へ応用する場合、iPS 細胞そのものではなく、iPS 細胞から特定の細胞に分化させる必要がある。昨年度、中胚葉 (血管内皮細胞、血液細胞) への分化プロトコールの決定を目的に研究を行った結果、胚様体形成法が最も安定的に 201B7 株から血管内皮細胞および血液前駆細胞へ分化誘導可能であることを示した。そこで本年度は、201B7 株以外のヒト iPS 細胞株を用いて、同様の手法で安定的に血管内皮細胞および血液前駆細胞が分化誘導可能かどうか検討した。その結果、201B7 株だけでなく他のヒト iPS 細胞株においても安定的に血管内皮細胞および血液前駆細胞が得られることが明らかになった。また、実験者が異なる場合においても、本手法を用いれば再現性良く血管内皮細胞および血液前駆細胞へと分化誘導可能であることが示された。しかし、分化誘導効率に改善の余地があるため、来年度も高効率なヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞および血液前駆細胞作製法の開発を目指し、プロトコールの収集およ

び検討を継続して行う予定である。また、iPS 細胞から血管内皮細胞および血液前駆細胞への分化誘導に使用する培地や、サイトカインやプレートをも更に改良することで分化効率が向上する可能性もあるため、来年度も引き続き胚様体形成法を軸として、さらに再現性・安定性・有用性の高い分化誘導プロトコールの確立を行っていく予定である。

E. 結論

実験者が異なった場合でも再現性高くかつ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分化プロトコールとなり得る可能性が示された。これらの結果は、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞を用いた創薬研究の基盤技術となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tashiro K, Hirata N, Okada A, Yamaguchi T, Takayama K, Mizuguchi H, Kawabata K. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor separates hematopoietic and cardiac progenitor cells in Flk1-expressing mesoderm. *Stem Cells Transl Med.*, in press.
2. Okada A, Tashiro K, Yamaguchi T, Kawabata K. Selective differentiation into hematopoietic and cardiac cells from pluripotent stem cells based on the expression of cell surface markers. *Springer Protocol Methods in Molecular Biology ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition.*, in press.
3. Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R, Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 47: 16772-16777 (2014)
4. Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-x₁ mutant gene. *Cell Transplant.*, in press
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.* 3: e90791 (2014)

6. Tashiro K, Nonaka A, Hirata N, Yamaguchi T, Mizuguchi H, Kawabata K. Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow. *Stem Cells Dev.*, 18: 2202-10 (2014)
7. Taura A, Furuta K, Yamaguchi T, Kawabata K, Tanaka S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfi1 and Gfi1b, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 1: 81-6 (2014)

2. 学会発表

- 1 岡田淳雅、田代克久、山口朋子、平田信恵、菊池愛子、水口裕之、川端健二: CARはFlk1陽性中胚葉細胞から血液・心筋前駆細胞を分離可能な新規細胞表面分子である; 第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月14-18日
- 2 池田由美、山口朋子、田代克久、岡田淳雅、大川恭行、川端健二: 骨髄由来マスト細胞から各マスト細胞サブクラスへの分化誘導とサブクラス特異的因子の探索; 第64回日本薬学会近畿支部大会、京都、2014年10月11日
- 3 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Haruka Minami, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of human iPS cell-derived endothelial cells into brain endothelial cells for establishment of *in vitro*

- blood brain barrier model; International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting, Vancouver, Canada, June, 2014
- 4 池田由美、山口朋子、田代克久、大川恭行、川端健二: マスト細胞関連疾患に対する創薬ツールとしての各種マスト細胞サブセットの分化誘導法の確立; 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、名古屋、2014年5月23-24日
- 5 山口朋子、平林玲子、田代克久、岡田淳雅、水口裕之、川端健二: ヒト ES/iPS 細胞から皮膚型/粘膜型マスト細胞への分化誘導; 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、名古屋、2014年5月23-24日
3. その他
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

川端健二、山口朋子

成熟マスト細胞の作製方法及び得られた成熟マスト細胞

出願番号：特願 2013-103582

出願日：平成 25 年 5 月 15 日

川端 健二、田代 克久

多能性幹細胞から脳血管内皮細胞を製造する方法

出願番号：特願 2014-038105

出願日：平成 26 年 2 月 28 日

2. 実用新案登録

該当なし

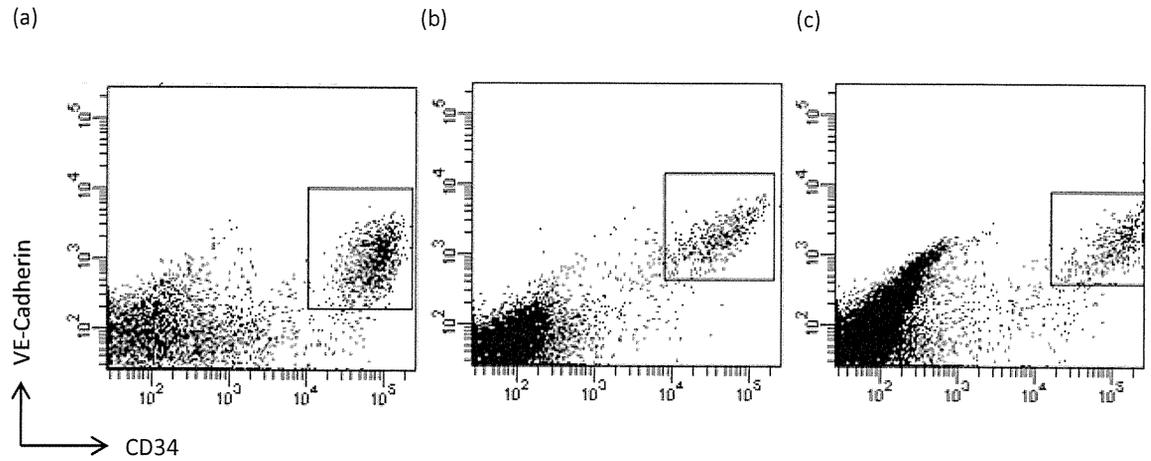


Figure 1 異なるヒトiPS細胞株から血管内皮細胞への分化誘導効率の違い
 (a) 201B7株、(b)Tic株、(c) NEPB株からそれぞれ血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にフローサイトメーターにてCD34およびCD144 (VE-カドヘリン)の発現について検討した。

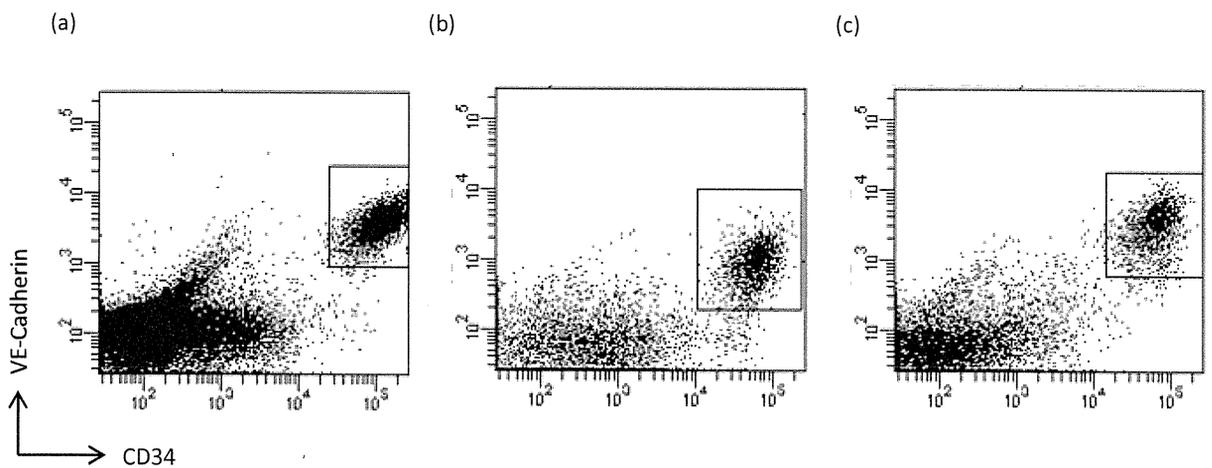


Figure 2 実験者が異なる場合における201B7株から血管内皮細胞への分化誘導効率の違い
 201B7株からそれぞれ異なる実験者(3名)が独立して血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にフローサイトメーターにてCD34およびCD144 (VE-カドヘリン)の発現について検討した。

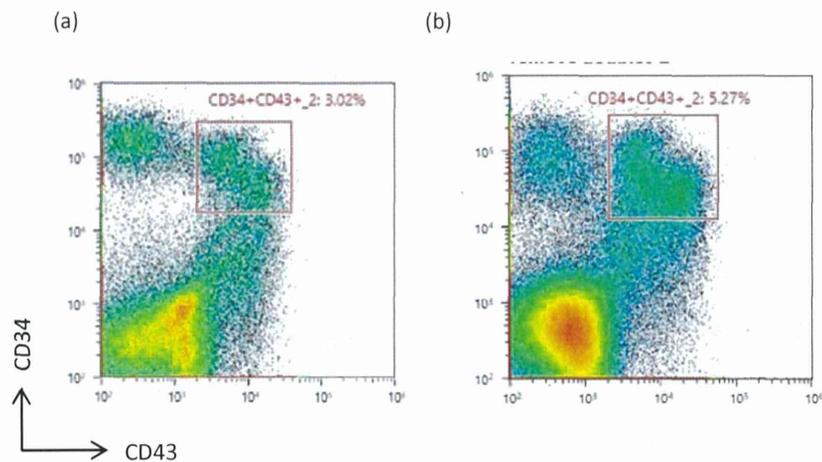


Figure 3 異なるヒトiPS細胞株から血液前駆細胞への分化誘導効率の違い
 (a) 201B7株、(b) NEPB株からそれぞれ血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にセルソーターにてCD34およびCD43の発現について検討した。

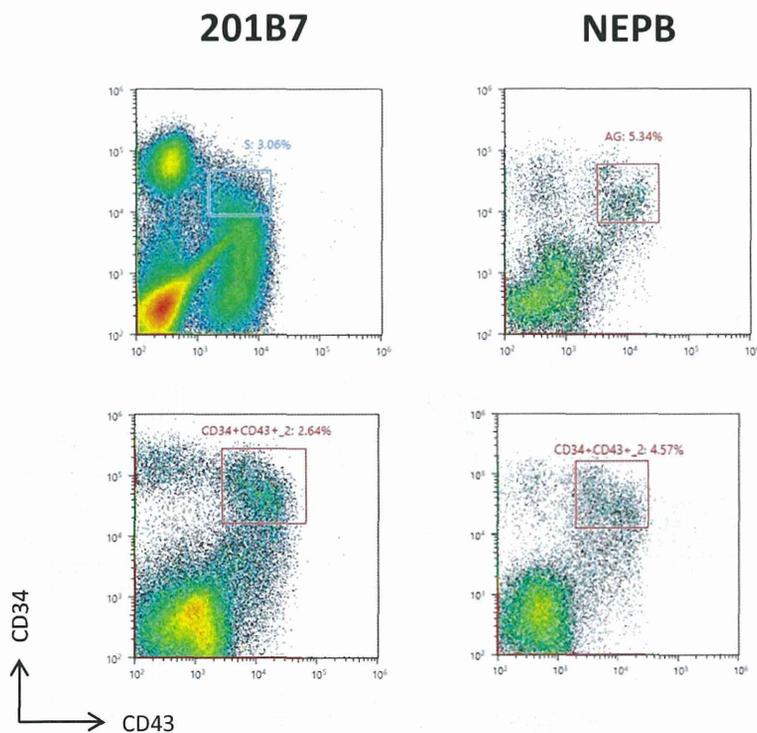


Figure 4 実験者が異なる場合における201B7株およびNEPB株から血液前駆細胞への分化誘導効率の違い
 201B7株およびNEPB株からそれぞれ異なる実験者(2名)が独立して血液前駆細胞への分化誘導を行い、9日目にセルソーターにてCD34およびCD43の発現について検討した。

iPS 細胞由来分化細胞の品質の検証

研究分担者 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

研究要旨

iPS 細胞の創薬への応用に関する研究が精力的に行われている中、iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞に関する品質管理技術の確立が急務となっている。

本分担研究の目的は、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースの情報を活用し、当データベースに蓄積されたヒト初代培養肝細胞と hiPS 由来肝細胞様細胞の薬剤応答性トランスクリプトームデータをインフォマティクス手法で比較解析することにより、iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞の品質変動に関わる要因を明らかにすることである。

本年度は、hiPS 由来肝細胞様細胞に係る一連の基礎データを取得するため、分担研究者・櫻井により作製された hiPS 由来肝細胞様細胞の品質評価を開始した。具体的には、作製日の異なる hiPS 由来肝細胞様細胞についてトランスクリプトームデータを取得し、分化誘導実験の間でのデータ比較を行った(日間差の確認)。

その結果、hiPS 由来肝細胞様細胞の誘導実験間での再現性は、ヒト凍結初代肝細胞の同一ロット間での実験間再現性よりも低く、異なるロット間での再現性とは同等あるいはやや低い結果が得られた。また、hiPS 由来肝細胞様細胞間の比較で、一部遺伝子に著しい発現値の違いが認められたが、これら多くには分化度の差に起因する遺伝子の変動が含まれると考えられた。

今後、hiPS 由来肝細胞様細胞からの追加基礎データ及び薬剤応答性トランスクリプトームデータ取得などを行い、品質評価系の確立を目指す。

研究協力者

中津 則之 (独立行政法人 医薬基盤研究所)

五十嵐芳暢 (独立行政法人 医薬基盤研究所)

保が不可欠となる。

本研究事業は、iPS 細胞の品質を変動させる要因を明らかにするとともに、実用化に向けて開発が進んでいる培養技術の標準化を目指している。この中で本分担研究は、平成 23 年度までに構築したトキシコゲノミクスデータベースの情報を活用し、当データベースに蓄積されたヒト初代培養肝細胞と hiPS 由来肝細胞様細胞の薬剤応答性トランスクリプトームデータをインフォマティクス手法で比較解析することにより、iPS 細胞及び iPS 細胞由

A. 研究の目的

iPS 細胞及び iPS 細胞由来分化細胞を創薬に応用するためには、それら細胞の性状を明らかにするとともに、安定した品質の確

来分化細胞の品質変動に関わる要因を明らかにすることを目的としている。トキシコゲノクスデータベースには、医薬品を中心とした約 170 種の化合物をヒト初代培養肝細胞に曝露した際の遺伝子発現情報が蓄積されている。データベース構築においてはヒト肝細胞を用いているが、曝露した化合物の多くは薬効メカニズムが知られた医薬品であることから、単に肝毒性に関わる遺伝子発現変化だけでなく、薬理作用に起因した変化も捉えられる可能性がある。従って、先ずは肝細胞の特性に着目した研究を進めるが、次の段階では肝細胞で得られた知見の他臓器細胞への応用についても検証を行う。

B. 研究の方法

(1) 測定サンプル

分担研究者・櫻井により作製された分化誘導実験日の異なる 3 種の hiPS 由来肝細胞様細胞 (iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3) から調製したサンプルを測定に用いた。当サンプルは分化誘導開始 25 日目の細胞から抽出された total RNA であり、測定直前まで -80°C 下で凍結保存されていたサンプルである。

(2) 網羅的遺伝子発現測定

測定はアフィメトリクス社のプロトコールに従い GeneChip 3' IVT Plus Kit 及び Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて行った。total RNA 100 ng より T7-oligo dT プライマーを用いて逆転写し、一本鎖 cDNA を合成した。さらに T4 DNA polymerase により、二本鎖 DNA を合成・精製した。次に IVT 反応により標識化された

cRNA を合成・精製後、300-500bp となるように断片化し、ターゲット液とした。断片化の前後で吸光度測定及びアガロースゲル電気泳動を行い、純度及び分解の有無を確認した。ターゲット液を Human Genome U133 Plus 2.0 Array に 45°C にて 18 時間ハイブリダイゼーションし、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンで染色し、専用スキャナーにて発現データを得た。測定したデータは MAS5 法・メディアン値による global normalization により標準化した。

(3) 遺伝子発現データの解析

遺伝子発現データの実験間再現性及び変動は、スキャッタープロットにより検討した。また、肝臓で選択的に発現している遺伝子を抽出するため、先ず平成 23 年度までに取得済みのラット組織別遺伝子発現データより ROKU 法を用いてラット肝臓に選択的に発現している遺伝子を抽出し、続いてこれらの遺伝子の中で発現量の大きい上位 50 遺伝子について NetAffy によりヒト遺伝子へオルソログ変換して肝臓選択的発現遺伝子群とした。

(倫理面への配慮)

本年度、特に関連する事項はなかった。

C. 研究結果

異なる時期に実施された分化誘導実験において取得された 3 種のサンプル (iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3) について、サンプル間の遺伝子発現レベルの相関性をスキャッタープロットにより確認した(図 1)。

その結果、iPS-hepa1 と iPS-hepa2 間、iPS-hepa1 と iPS-hepa3 の間では異なる遺伝子発現を示す細胞集団(プロットの偏り)が認められた。一方、iPS-hepa2 と iPS-hepa3 の間には、大きなプロットの偏りは認められなかった。

iPS-hepa2 と iPS-hepa3 の間でのプロットの収束性について、ヒト初代肝細胞のロット内(2 ロット)及びロット間(3 ロット)での収束性と比較したところ、ヒト初代肝細胞のロット内(図 2-1)での収束性よりも低く、ヒト初代肝細胞のロット間(図 2-2)との比較では、ほぼ同等あるいはやや低い傾向が認められた。

次に iPS-hepa1 と iPS-hepa2、iPS-hepa1 と iPS-hepa3 の間で発現レベルに差を示した遺伝子について解析を行った。肝臓に選択的に発現している遺伝子の中から発現量の大きい上位 50 遺伝子をスクATTERプロットに重ねてプロットしたところ(図 3)、約半数が iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 において非常に高い発現値を示していた。これらの遺伝子の中には肝実質細胞で高発現を示すとしてよく知られているアルブミンやフィブリノーゲンなどが含まれていた。

D. 考察

異なる時期に実施された分化誘導実験において取得された 3 種の hiPS 由来肝細胞様細胞(iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3)より抽出された total RNA サンプルについて、サンプル間の遺伝子発現レベルの相関性をスクATTERプロットにより確認したところ、iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 で高い発現値を示す遺伝子集団

を見出した(図1)。この集団を除いた全体的なスクATTERプロット及び iPS-hepa2 と iPS-hepa3 間のスクATTERプロットの分布との比較において、hiPS 由来肝細胞様細胞の誘導実験間での再現性は、ヒト凍結初代肝細胞の同一ロット間での実験間再現性よりも低く、異なるロット間での再現性とは同等あるいはやや低い結果となった(図 2)。これらの結果は、改善の余地はあるものの、現状の分化誘導法で得た hiPS 由来肝細胞様細胞においても、ヒト凍結初代肝細胞に近い再現性の下で実験が実施できる可能性を示しているものと考えられた。

iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 で高い発現値を示す遺伝子集団について解析したところ、ヒトアルブミン等の肝実質細胞で高発現を示す遺伝子を多数含んでいることが明らかとなった。分担研究者・櫻井らにより測定されたアルブミン産生量は、iPS-hepa1、iPS-hepa2、iPS-hepa3 で、それぞれ 9.24 ± 1.04 、 15.23 ± 2.19 、 13.9 ± 0.92 ($\mu\text{g}/\text{ml}/24\text{hr}/\text{mg protein}$)であり、iPS-hepa1 と比して iPS-hepa2 及び iPS-hepa3 において高いアルブミン産生量が示されている。従って、スクATTERプロットで示されたプロットの偏りは、肝実質細胞への分化の程度の差、あるいは分化の異なる細胞の混在等を示唆するものと考えられた。また、本研究で設定した肝臓選択的発現遺伝子群は、hiPS 由来肝細胞様細胞の品質管理に応用できる可能性があると考えられた。

今後、分化誘導過程、特に hiPS 由来肝細胞様細胞になる時期と設定されている分化誘導開始 25 日目前後における経時的遺伝子発現プロファイル等を確認することにより、スクATTERプロットで示されたプロットの

偏りの原因を明らかにして行く予定である。

E. 結論

hiPS 由来肝細胞様細胞に係る一連の基礎データを取得するため、本年度は作製日の異なる hiPS 由来肝細胞様細胞からトランスクリプトームデータを取得し、分化誘導実験の間でのデータ比較を行った(日間差の確認)。その結果、hiPS 由来肝細胞様細胞の誘導実験間での再現性は、ヒト凍結初代肝細胞の同一ロット間での実験間再現性よりも低く、異なるロット間での再現性とは同等あるいはやや低い結果が得られた。また、hiPS 由来肝細胞様細胞間の比較で、一部遺伝子に著しい発現値の違いが認められたが、これら多くには分化度の差に起因する遺伝子の変動が含まれると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onishi, M., Ozasa, K., Kobiyama, K., Ohata, K., Kitano, M., Taniguchi, K., Homma, T., Kobayashi, M., Sato, A., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Wijaya, E., Igarashi, Y., Nakatsu, N., Ise, W., Inoue, T., Yamada, H., Vandenberg, A., Standley, DM., Kurosaki, T., Coban, C., Aoshi, T., Kuroda, E., and Ishii, KJ. (in press). Hydroxypropyl- β -cyclodextrin spikes local inflammation that induce Th2 and Tfh5 responses to the co-

administered antigen. *J. Immunol.*

- 2) Igarashi, Y., Nakatsu, N., Yamashita, T., Ono, A., Ohno, Y., Urushidani, T. and Yamada, H. (2015). Open TG-GATEs: a large-scale toxicogenomics database. *Nucleic acids research* 43(Database issue), D921-7.
- 3) Hanafusa, H., Morikawa, Y., Uehara, T., Kaneto, M., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). Comparative gene and protein expression analyses of a panel of cytokines in acute and chronic drug-induced liver injury in rats. *Toxicology* 324, 43-54.
- 4) Minami, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Omura, K., Kanki, M., Horinouchi, A., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). miRNA expression atlas in male rat. *Scientific Data* 1, 10.1038/sdata.2014.5.
- 5) Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T. (2014). Comprehensive analysis of DNA methylation and gene expression of rat liver in a 2-stage hepatocarcinogenesis model. *J Toxicol Sci* 39(6), 837-48.
- 6) Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T. (2014). Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocar-

cinogenesis study in rats. *J Toxicol Sci* 39(5), 785-794.

- 7) Saito, K., Maekawa, K., Ishikawa, M., Senoo, Y., Urata, M., Murayama, M., Nakatsu, N., Yamada, H. and Saito, Y. (2014). Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicological Sciences* 141(2), 377-386.
- 8) Uehara, T., Horinouchi, A., Morikawa, Y., Tonomura, Y., Minami, K., Ono, A., Yamate, J., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T. (2014). Identification of metabolomic biomarkers for drug-induced acute kidney injury in rats. *Journal of applied toxicology : JAT* 34(10), 1087-1095.

2. 学会発表

【招待講演】

山田弘, Overview:トキシコゲノミクスプロジェクト, 第 41 回日本毒性学会年会,トキシコゲノミクスの活用例と今後の展開(神戸), 2014.7.

山田弘, 堀井郁夫, 第 41 回日本毒性学会年会, 日本毒性学会&日本中毒学会合同シンポジウム 急性中毒の予後に影響するバイオマーカーの臨床および基礎毒性的な考察(神戸), 2014.7.

Yamada H., Future approach for safety assessment / evaluation with new science & technology, International Workshop of Nonclinical Safety Studies for Human Clinical Trials (Seoul, Korea), 2014.11.

山田弘, 大規模トキシコゲノミクスデータベースを活用した安全性バイオマーカー探索, 第 8 回ラットリソースリサーチ研究会(京都), 2015.1.

【ポスター発表】

中津則之, 五十嵐芳暢, 青枝大貴, 石井健, 山田弘, 麻酔剤としてのイソフルラン, ジエチルエーテル, ペントバルビタールがラット肝遺伝子発現に及ぼす影響についての検討, 第 41 回日本毒性学会学術年会(神戸), 2014.7.

五十嵐芳暢, Johan T Nystrom-Persson, 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxigetes:トキシコゲノミクスデータ解析プラットフォームの実装, 第 41 回日本毒性学会学術年会(神戸), 2014.7.

坂手龍一, 深川明子, 水口賢司, 山田弘, 増井徹, 塩谷恭子, 松田潤一郎, 宮本恵宏, 松山晃文, 創薬・疾患研究のための生物資源・疫学研究データベースの開発, トーゴの日シンポジウム 2014(東京), 2014.10.

五十嵐芳暢, Johan T. Nystrom-Persson, 山田弘, 石井健, 水口賢司, アジュバントデータベースの開発とトキシコゲノミクスデータの統合に向けて, トーゴの日シンポジウム 2014(東京), 2014.10.

五十嵐芳暢, 中津則之, 山田弘, 安全性評価モデルのアジュバント遺伝子発現情

報への適用に向けて, 第8回次世代アジュ
バント研究会(大阪), 2015.1.

H. 知的財産所有権の出願・登

録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 hiPS 由来肝細胞様細胞(3 ロット)間での遺伝子発現レベルの相関性

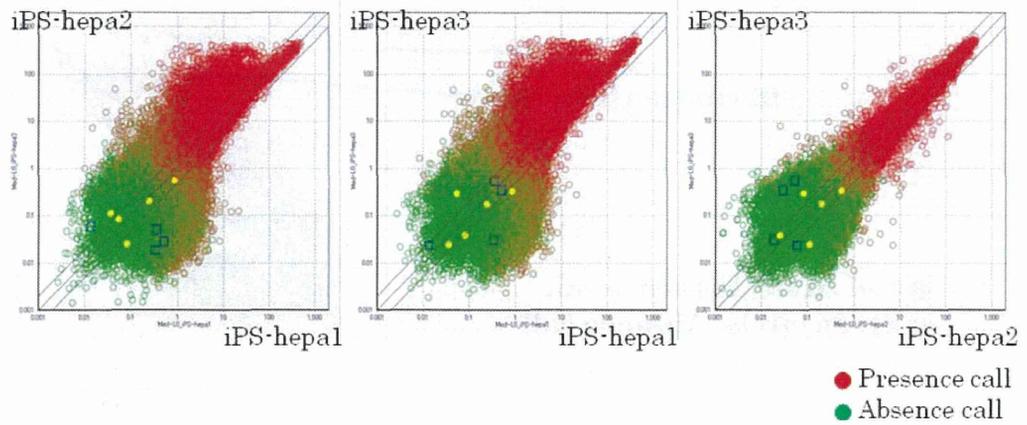
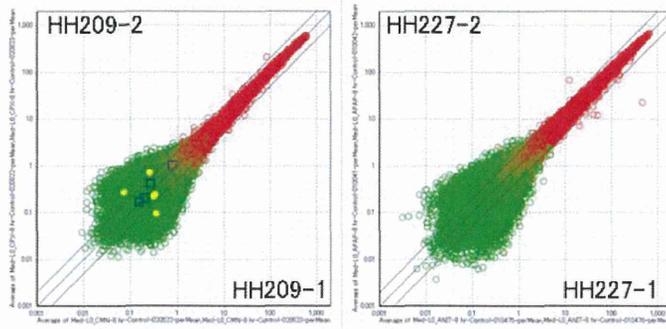


図2 ヒト初代肝細胞におけるロット内及びロット間でのプロットの収束性

1) ロット内でのプロットの収束性(2 ロット)



2) ロット間でのプロットの収束性(3 ロット)

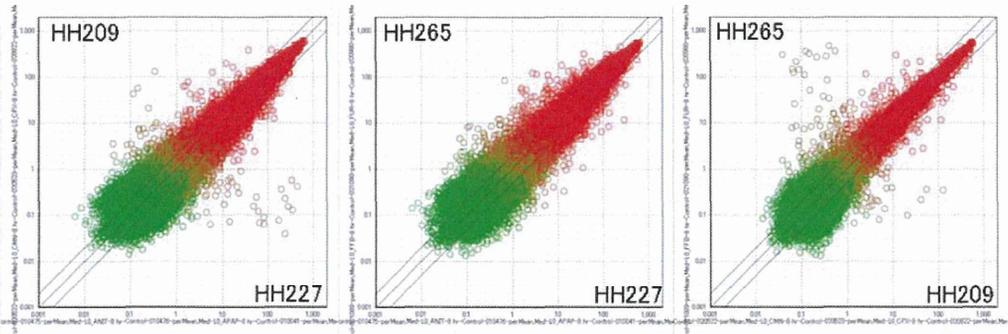


図3 hiPS 由来肝細胞様細胞のスクアタープロットにおける肝臓選択的遺伝子の分布

