

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 細胞等の代謝解析

研究分担者 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

研究要旨 細胞のエネルギー獲得方法は主に2つあり、1つは解糖系でもう1つはミトコンドリア内での酸化的リン酸化反応である。前者は酸素を利用せず、後者は利用する。iPS細胞は急速に増殖するためのエネルギーを主に解糖系から得ているが、一部分化してしまったiPS細胞集団のエネルギー代謝がいかなるものかは詳細には調べられていない。本年度は、細胞内エネルギー代謝を可視化することで、iPS細胞集団の質を評価するための方法を開発した。

A. 研究目的

質の良い iPS 細胞は急速に増殖するために、解糖系を主に利用して生体エネルギーである ATP を合成している。解糖系の一部は核酸合成やグルタチオン合成とも連動しており、細胞増殖に適している。一方、解糖系で合成できる ATP は僅かであるという欠点を有する。反対に、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化は、大量の ATP を合成できる反面、酸素を必要とし有害な活性酸素の発生原因となりうる。そのため、iPS 細胞におけるミトコンドリアの活性化は DNA 等の損傷に繋がる可能性もあり、質に影響を及ぼす要因となりうる。本研究では、解糖系を利用して増殖するヒト iPS 細胞のエネルギー産生能を ATP 合成以外も含めて評価することで、ヒト iPS 細胞の品質管理基準作成に役立つ項目を選出することを目的とする。本年度は特にヒト iPS 細胞内のエネルギー代謝変化を定性的に評価を行うことを試みた。

B. 研究方法

ミトコンドリアの膜電位の測定には JC-1 (Invitrogen 社) で染色した。JC-1 色素は水溶液中での凝集性が高いため、使用 1 時間前に直接培地に希釈し、遠心後に上清を細胞に添加した。染色時間は 30 分とし、培地交換で取り込まれなかった試薬を除去した。

染色後は、そのまま観察する場合と 4% パラホルムアルデヒドで固定して、OCT3/4 抗体 (サンタクルーズ社) との 2 重染色を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞の利用は医薬基盤研究所倫理委員会の承認の元で行った。

C. 研究結果

昨年度は、細胞生存を測定する kit を活用して、ATP、細胞質 NADH、ミトコンドリア NADH を簡便に測定する系を構築した。また、細胞外酸素消費計及び培地酸性度評価を活用して、ミトコンドリアでの ATP 産生に伴う酸素消費量と解糖系からの ATP 産生を予測した。その結果、ヒト iPS 細胞は、解糖

系を主要な ATP 産生源として利用していることが示唆された。一方で、継代が重なり、質が低下していると予想される細胞は、ミトコンドリア利用率が高まってことが予想された。

また、マウスの肝臓由来の癌細胞を活用して、ミトコンドリアの機能を可視化する試薬をスクリーニングすることも行っていた。その結果、細胞死（アポトーシス）を判定するための試薬 JC-1 を低濃度で利用すると、ミトコンドリアの膜電位にのみ反応して蛍光を発することが示唆された。元々 JC-1 は、ミトコンドリアに集積する傾向があるが、過剰な JC-1 は、再度細胞質へ拡散する。ミトコンドリアへの蓄積は、ミトコンドリアの膜電位により JC-1 が凝集し、その凝集により赤色を発する非水溶性沈着物の集積を発生させた結果である。ミトコンドリアが酸素を利用するために膜電位を上昇させていると、JC-1 の凝集が増す

が、解糖系が亢進しているためにミトコンドリアを利用していない細胞や死んでいる細胞は、JC-1 の細胞質側への拡散で終わり、赤色蛍光を発生しない。

そこで本年度は、JC-1 を活用してヒト iPS 細胞で、個別の細胞でのミトコンドリア利用率を予測することにした。図 1 に JC-1 で染色したヒト iPS 細胞の状態を示す。細胞集団の外層が良く染まっている。また、細胞集団の外に広がる細胞も強染色された。

次に、JC-1 で染色した細胞集団を別のプレートに移し継代した(図 2)。JC-1 での染色が継代培養を経ても同一細胞に残ることを利用しての判定である。継代前に JC-1 で染色された細胞は、細胞集団の外に位置する傾向が観察された。

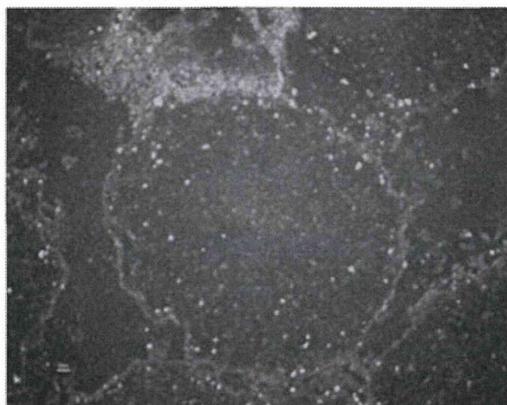


図1 ヒト iPS 細胞の JC-1 染色(上)と、位相差像 (下)

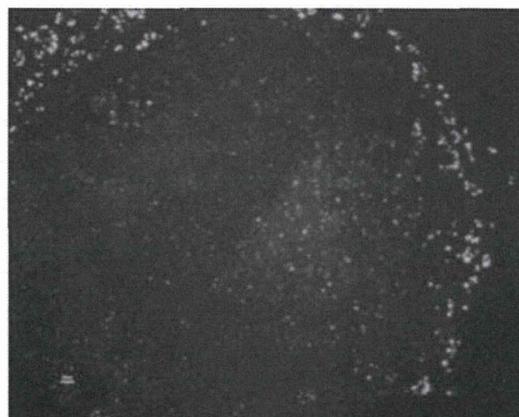


図2 JC-1 で染色した後、細胞を継代した。(継代後 3 日)

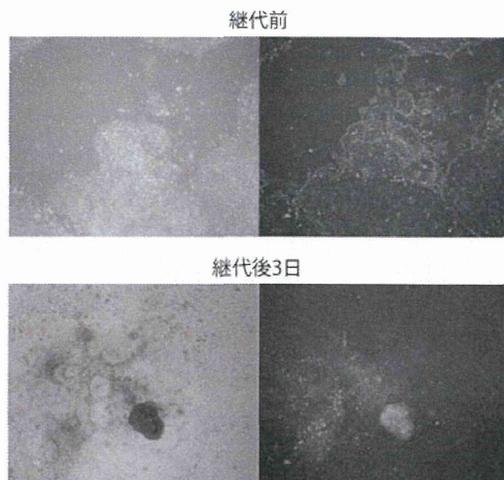


図 3 JC-1 強染色の細胞集団の継代

続いて、JC-1 での染色が強い細胞集団の継代を行った(図 3)。JC-1 染色強度の強い細胞集団は、継代後に色素沈着のある細胞塊を形成し、質の低下が伺われる。

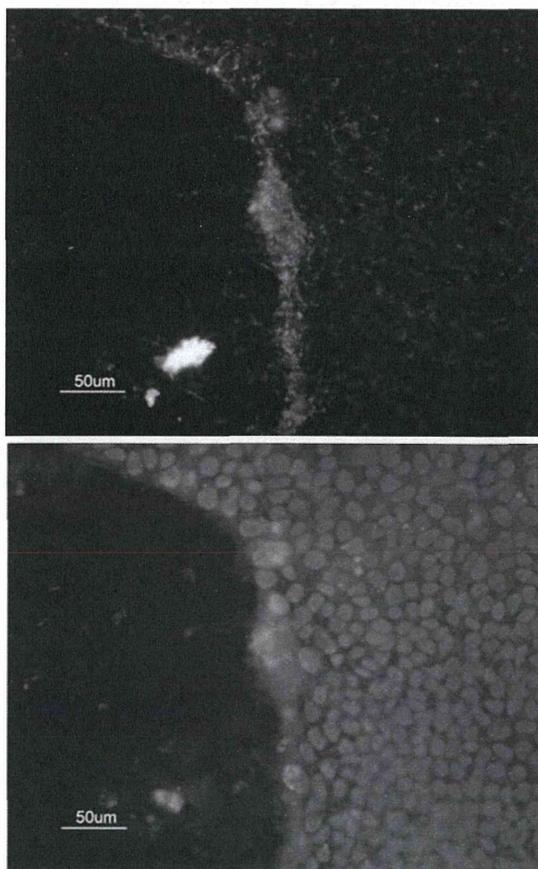


図 4 JC-1 染色(上)と OCT3/4 染色(下)

JC-1 の染色と Oct3/4 との染色を比較すると、JC-1 陽性は必ずしも、Oct3/4 陰性というものは無いようであるが、JC-1 強陽性区画には、Oct3/4 陰性細胞が存在していた(図 4)。また、JC-1 陽性細胞の細胞核は陰性細胞に比較して大きいようである。

最後に、JC-1 強陽性が細胞集団の周辺に位置することから、単なる JC-1 色素の取り込み効率の差から来た可能性も示唆される。そこで、細胞集団の内部でも JC-1 強陽性となる部位を特定することにした(図 5)。

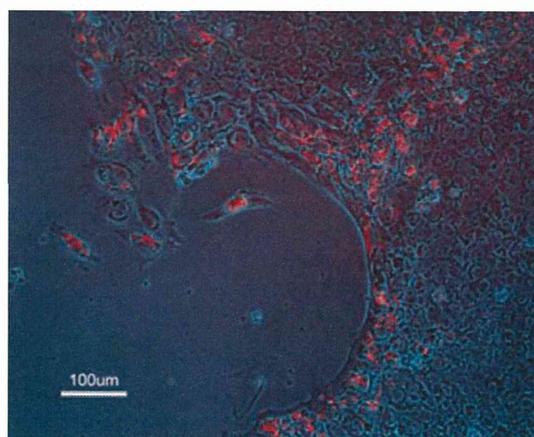


図 5 ヒト iPS 細胞集団における内部での JC-1 強陽性領域

図 5 は 2 つの iPS 細胞集団がぶつかった部位を示している。上方から 1 つの集団が、右から 1 つの集団が増殖しぶつかった場所(右上から左下への線)である。2 つの集団の境界は細胞の大きさも大きく異常が伺える。その細胞は JC-1 強陽性となった。単一の離れた細胞は JC-1 染色部位が核に見えてはいるが、これはミトコンドリが核に近傍に多く位置するためである。

D. 考察

本年度は、ヒト iPS 細胞の質を細胞内エネルギー代謝(ミトコンドリア利用度)で比較評価できないか検討を行った。特に、個別の細胞での評価方法を検討し、JC-1 による染色がヒト iPS 細胞の質との相関の一

部を反映している可能性が示唆された。また、JC-1 が細胞を生きのまま染色できる点や、継代後も染色時の細胞内エネルギー代謝を記憶している点が興味深い。今後は、他の指標も組み入れて、細胞内エネルギー代謝がヒト iPS 細胞の質を議論できるプローブとして利用できるのかを検討する必要がある。

E. 結論

ヒト iPS 細胞の品質管理に細胞内エネルギー代謝の指標として JC-1 染色が有効であることが示唆された。

F. 参考文献

1) Lee J, Tong T, Takemori H, Jefcoate C. Stimulation of StAR expression by cAMP is controlled by inhibition of highly inducible SIK1 via CRTC2, a co-activator of CREB. *Mol Cell Endocrinol.* (2015) in press.

2) Popov S*, Takemori H*, Tokudome T, Mao Y, Otani K, Mochizuki N, Pires N, Pinho MJ, Franco-Cereceda A, Torielli L, Ferrandi M, Hamsten A, Eriksson P, Bertorello AM, Brion L. (* equally contributed)

Lack of SIK2 prevents the development of cardiac hypertrophy in response to chronic high-salt intake

PLoS ONE (2014) 9e95771

3) Sontag JM, Sontag E, Tesone-Coelho C, Takemori H, Zwiller J, Dierrich JB. Cocaine Regulates the Salt-Inducible Kinase (SIK1) by Inducing Protein Phosphatase-2A Expression in Rat Brain. *J Drug Alcohol Res* (2014) 3: ID 235854.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H. SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice. *Immunology* (2015) in press

2) Kumagai A, Fujita A, Yokoyama T, Nonobe Y, Hasaba Y, Sasaki T, Itoh Y, Koura M, Suzuki O, Adachi S, Ryo H, Kohara A, Tripathi LP, Sanosaka M, Fukushima T, Takahashi H, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Mizuguchi K, Nomura T, Matsuda J, Tabata T, Takemori H. Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line. *Genes* (2014) 5: 1095-1114.

3) 熊谷彩子、竹森 洋. 薬用植物成分評価のためのモデルマウスの新たな活用 *薬用植物・生薬の開発と今後の展望 ～資源確保、品質評価、製品開発*, シーエムシー出版 川原信夫編集 (2015)

pp114-120

2. 学会発表

1) Alfredi A, Zhang Z, Mao W, Wang Y, Takemori H, Lu Z, Bast RC, Vankayalapati H. Highly potent and orally available SIK2 inhibitors block growth of human ovarian cancer cells in culture and xenografts *Cancer Res* (2014) 74(19 Suppl): Abstract nr 749

2) Tang HM, Gao WW, Chan CP, Siu YT, Wong CM, Kok KH, Ching YP, Takemori H, Jin DY

Metformin inhibits human T-cell leukemia virus type 1 transcription through activation of LKB1 and salt-inducible kinases *RETROVIROLOGY* (2014) 11(Suppl 1) P112

3) 熊谷彩子、伊東祐美、賀川舞、松田潤一郎、佐々木勉、田端俊英、竹森 洋 GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である
第 51 回日本臨床分子医学会 (東京) 2014 年 4 月 11 日

4) 竹森 洋、伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、賀川舞、竹本大策、佐々木勉 簡便な培養細胞 beta-酸化評価法について
第 51 回日本臨床分子医学会 (東京) 2014 年 4 月 11 日

5) 佐々木勉、竹森 洋、渡辺彰弘、由上登志郎、北川一夫、望月秀樹 脳虚血における CRTC1-PGC-1 α シグナルの動態についての検討
第 51 回日本臨床分子医学会 (東京) 2014 年 4 月 11 日

6) 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、竹森 洋、湊野裕之、川原信夫、土居純子、太田美穂

フラビ Pterosisin B の ATP 産生抑制作用
第 68 回日本栄養・食糧学会 (札幌) 2014 年 5 月 30 日

7) 佐野坂 真人、伊東 裕美、藤本 穰、大河原 知治、仲 哲治、竹森 洋 塩誘導性キナーゼ (SIK) ファミリー欠損マウスの LPS 感受性に関する研究
第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

8. 黒井 梓、伊東祐美、瀧野裕之、山原 年、川原信夫、竹森 洋

フラビ成分 Pterosin B の皮膚炎症疾患への応用

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

9. 賀川 舞、杉村康司、飯田 修、瀧野裕之、黒井 梓、熊谷彩子、山原 年、川原信夫、竹森 洋

メラニン産生制御効果のある植物エキスの網羅的解析

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

10. 熊谷 彩子、伊東 祐美、賀川 舞、松田 潤一郎、佐々木 勉、田端 俊英、竹森 洋

GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

11. 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、瀧野裕之、川原信夫、竹森 洋

肝糖新生における LKB1 下流因子 AMPK と SIK3 の重要性について

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

1) 特願 2014-234698 「メラニン生成抑制剤、化粧品、医薬組成物、及びメラニン生成抑制剤の製造方法」 竹森 洋、熊谷彩子、賀川舞、伊東祐美、川原信夫、瀧野裕之、杉村康司、黒井梓 （独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館）国内

2) 特願 2014-130876 「プレロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤」 妻木範行、竹森 洋、瀧野裕之、川原信夫 （国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所）
(国内優先権主張)、米国

3. 実用新案

該当せず

4. その他

無し

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

大阪大学大学院 薬学研究科

分子生物学分野 准教授

研究要旨：本研究では、ヒト iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的にヒト 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、技術不足がヒト iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明することを目的としている。本研究において、我々はヒト iPS 由来肝細胞を用いた創薬研究を目指す研究者らがコントロールとして使用できる再現性の高い肝細胞への分化プロトコルを策定したのち、様々な品質のヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導能の評価を行う予定である。本年度は、これまでに論文発表されている代表的な肝細胞への分化プロトコルの収集を行った。さらに、複数の代表的な分化プロトコルを用いて肝細胞を作製し、分化プロトコルの評価を開始した。

研究協力者

水口裕之

大阪大学大学院薬学研究科

独立行政法人 医薬基盤研究所

高山和雄

大阪大学大学院薬学研究科

独立行政法人 医薬基盤研究所

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は創薬過程において薬効評価および毒性評価等への応用が期待されている。高品質なヒト iPS 細胞を安定的に供給するには高い水準の培養操作技術レベル

を要する。そのため、研究者間でヒト iPS 細胞の品質が大きく変動することが深刻な

問題となっている。ヒト iPS 細胞由来製品

を創薬応用するには、再現よく分化誘導できる高品質なヒト iPS 細胞を培養する技術を開発することが急務である。本課題では、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。また、(ii)培養条件の違いによる品質変動を検証する。②iPS 細胞を創薬応用する際には、特定の組織細胞に分化させた細胞が利用されるため、(i)分化プロトコルを標準化し、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・検証を行う。我々は本課題のうち、②(i)肝細胞への分化プロトコルの標準化および(ii)ヒト iPS 細胞の品質を変動させる要因が肝細胞への分化誘導の再現性に及ぼす影響の評価を実施する。本年度は、これまでに公開されている代表的な肝細胞への分化プロトコルを収集する。さらに、複数の代表的な肝細胞分化プロトコルを用いて肝細胞を作製し、分化プロトコルの評価を開始した。

B. 研究方法

B. 1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 (Tic) は 10 ng/mL bFGF を含む iPS 細胞用培地 ReproStem (ReproCELL) を用いて、マイトマイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。4-6 日ごとに 0.1 mg/mL Dispase II (Roche) を用いてヒト ES/iPS 細胞コロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。ヒト ES/iPS 細胞の状態に応じてトランスファーピペット (Thermo Scientific) を用いてメカニカルに細胞を継代する場合もある。

B. 2. ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

肝細胞への分化を開始する前に、

ヒト iPS 細胞を dispase で剥離し、Matrigel 上に継代し、MEF-conditioned medium を用いて 3-4 日間培養した。ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法は図 2 を参照にされたい。

B. 3. FACS

ヒト ES/iPS 細胞およびその分化細胞を単細胞に分散したのち、4% Paraformaldehyde で 10 分間固定した。抗ヒトアジアロ糖タンパク受容体 1 (ASGR1) 抗体を用いて一次抗体反応をさせたのち、alexa 488-labeled 抗体を用いて二次抗体反応を行った。FACS 解析は FACS LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) を用いて行った。

B. 4. アルブミン (ALB) 産生能の評価

ヒト iPS 由来肝細胞について、培地交換したのち 24 時間後に培地を回収し、産生されたアルブミン量を Human Albumin ELISA Kit (Bethyl Laboratories) を用いて測定した。アルブミン産生量は総タンパク量で補正した。なお、総タンパク量の測定には Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) を用いた。

C. 研究結果

これまでに公表されているヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロト

コールの収集を行った。図 1 に記載する通り、Stephen Duncan 研 (Stem Book (<http://www.stembook.org/>); Hepatology. 2010 Jan;51(1):297-305.)、David Hay 研 (Stem Book (<http://www.stembook.org/>); Stem Cells Transl Med. 2014 Feb;3(2):141-8.)、Ludovic Vallier 研 (Nat Protoc. 2013 Feb;8(2):430-7.; Hepatology. 2010 May;51(5):1754-65.) における分化プロトコールを比較した。このようにヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコールは研究室間で大きく異なっていることが確認できた。

図 1 の 3 つの分化プロトコール (一部改編) のうちのどのプロトコールが最も再現性良く高機能な肝細胞を作製できるか調べるために、図 2 に示す 3 プロトコールを用いてヒト iPS 細胞から肝細胞を作製した。作製したヒト iPS 由来肝細胞の肝機能を評価するため、ASGR1 陽性細胞率を FACS により評価するとともに、ALB 産生量を ELISA により計測した。プロトコール 1 を用いて作製した肝細胞の ASGR1 陽性率は 80% 以上であったが、プロトコール 2 および 3 を用いて作製した肝細胞の ASGR1 陽性率はいずれも 30% 以下であった (図 3A)。また、プロトコール 1 を用いて作製した肝細胞の ALB 産生量は $11 \mu\text{g/ml/24hr/mg}$ protein 程度であったが、プロトコ

ール 2 を用いて作製した肝細胞の ALB 産生量は $7 \mu\text{g/ml/24hr/mg}$ protein であった (図 3B)。以上のことから、プロトコール 1 を用いることにより、プロトコール 2, 3 よりも高い肝機能を持つヒト iPS 由来肝細胞を作製できることが示唆された。図 3 の結果は独立した 3 回の分化誘導結果であることから、プロトコール 1 はプロトコール 2, 3 よりも高い肝機能を有するヒト iPS 由来肝細胞を再現よく作製できることが示唆された。

D. 考察

プロトコール 1 を用いることにより、高い肝機能を有するヒト iPS 由来肝細胞を再現良く作製できることが確認できたため、今後は本プロトコールを用いて様々な品質のヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導を実施していく。また、本プロトコールを用いて作製したヒト iPS 由来肝細胞における薬物代謝酵素活性などのさらなる詳細な機能解析も実施していく。

E. 結論

本年度は、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコールの収集を行うとともに、再現良く高機能な肝細胞を作製できるプロトコールの策定を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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-xL mutant gene. Cell Transplantation, in press.
- 2) 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 U S A., 2014; 111:16772-7.
- 3) Kuno S., Sakurai F., Shimizu K., Matsumura N., Kim S., Watanabe H., Tashiro K., Tachibana M., Yokoi T., Mizuguchi H. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector expressing human CYP3A4. Drug Metab Pharmacokinet. 2014; 29: 296-304.
2. 学会発表
- 1) 長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 細胞由来肝細胞の肝障害マウスへの効率良い移植法の開発、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 2) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下移植と組織化の検討、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 3) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；同一遺伝情報を有するヒト iPS 細胞由来肝細胞とヒト初代培養肝細胞の肝機能の比較解析、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 4) Takayama K., Morisaki Y., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Comparison of capacity for drug metabolism

- between genetically matched human hepatocytes and iPS-derived hepatocyte-like cells、ISSCR 12th Annual meeting、Vancouver、2014年6月
- 5) Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Human iPSC-derived hepatocyte sheet transplantation enhances the survival rate of acute liver failure mice、ISSCR 12th Annual meeting、Vancouver、2014年6月
- 6) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒトES/iPS細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下への移植法の検討、第64回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014年9月
- 7) 高山和雄、三村菜摘、萩原康子、立花雅史、櫻井文教、神田勝弘、川端健二、水口裕之；ヒト多能性幹細胞由来肝細胞を用いた次世代型創薬の実現を目指した基盤技術創成、第64回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014年10月
- 8) 今川和生、高山和雄、磯山茂美、野口恵美子、新開真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、須磨崎亮、水口裕之；疾患特異的iPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた進行性家族性胆汁うっ滞症2型の病態再現、第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月
- 9) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；マウス腎被膜下への分化誘導肝細胞の移植法の開発、第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月
- 10) 埴守史、高山和雄、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒトES/iPS細胞を用いた肝分化誘導系におけるHNF α アイソフォームの機能解析、第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月
- 11) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；同一遺伝的背景を持つヒトiPS細胞由来肝細胞と初代培養肝細胞の間における薬物代謝能・薬物応答能の比較解析、第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月
- 12) Takayama K., Morisaki Y., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Prediction of inter-individual differences in drug metabolism and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocyte-like cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (iPS Cells for

Regenerative Medicine)、大阪、
2015年1月

- 13) 長基康人、高山和雄、大橋一夫、
岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、
川端健二、水口裕之；ヒト iPS
細胞由来肝細胞シートを用いた
効率良い新規移植法の検討、第
14回日本再生医療学会総会、横
浜、2015年3月
- 14) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈
美、西村健、中西真人、立花雅
史、櫻井文教、川端健二、水口
裕之；ヒト iPS 由来肝細胞を用
いた薬物応答能の個人差の予測
—CYP2D6 遺伝子の SNP の相違に
よる個人差の再現—、第14回日
本再生医療学会総会、横浜、2015
年3月
- 15) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、
大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、

末永洋志、川端健二、水口裕之；
マウス腎被膜下への分化誘導肝
細胞移植における最適なヒト
ES/iPS 細胞株の探索、日本薬学
会第135年会、神戸、2015年3
月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し。

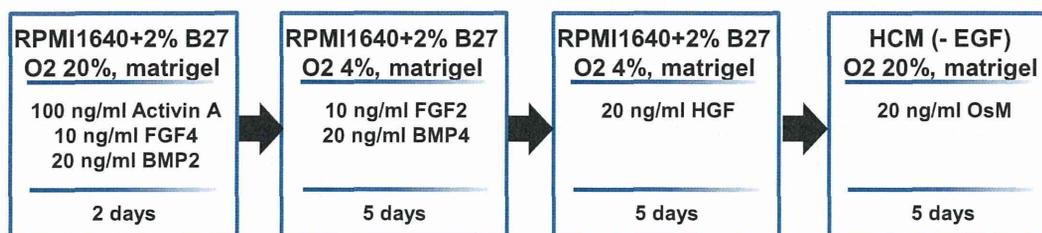
2. 実用新案登録

該当無し。

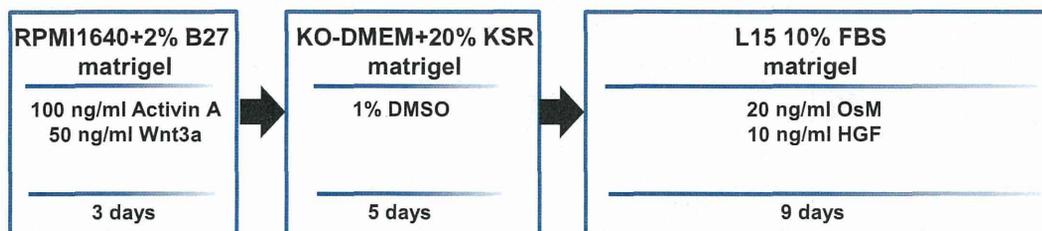
3. その他

該当無し。

Stephen Duncan Lab.



David Hay Lab.



Ludovic Vallier Lab.

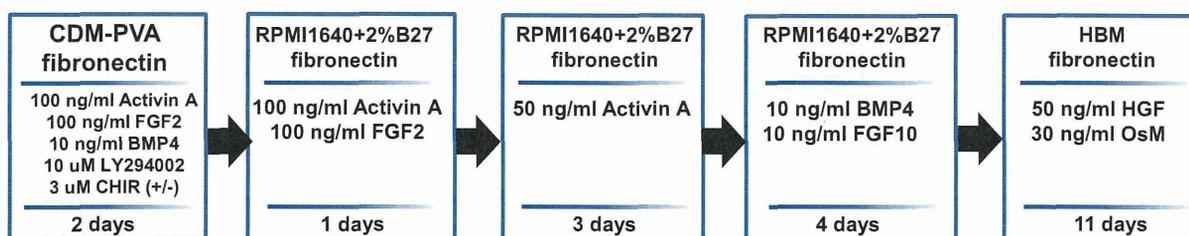
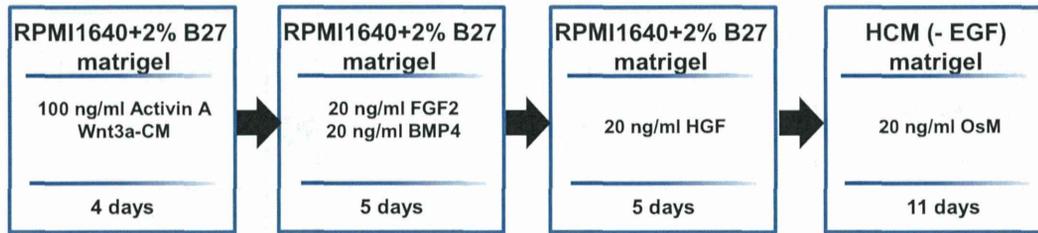
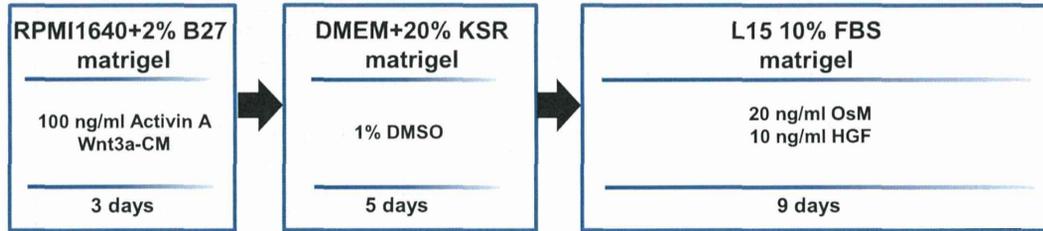


図1. Stephen Duncan 研、David Hay 研、Ludovic Vallier 研におけるヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコール

Protocol 1



Protocol 2



Protocol 3

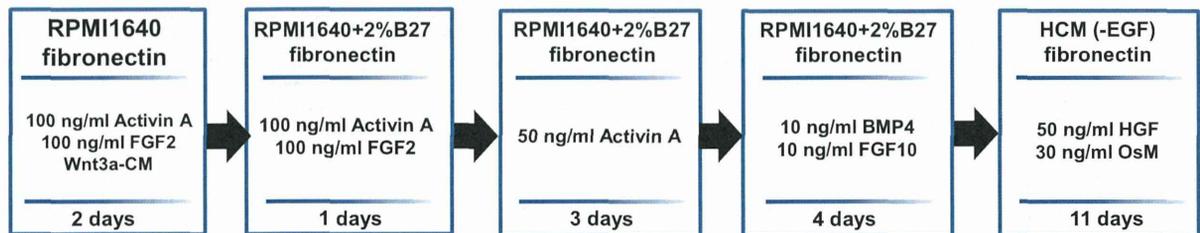


図 2. 本実験にて検討した 3 分化プロトコールの概略

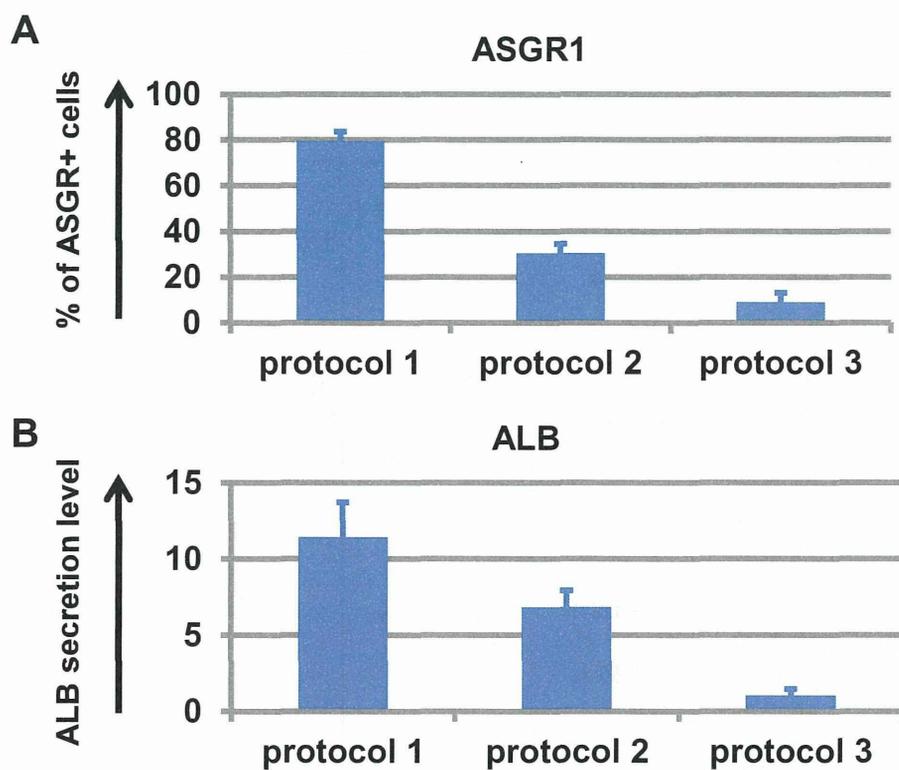


図3. 複数の肝細胞への分化プロトコールの比較

ヒト iPS 細胞 (Tic) を図2に示す3分化プロトコールを用いて肝細胞へ分化誘導した。(A) ヒト iPS 由来肝細胞の ASGR1 陽性細胞率を FACS を用いて計測した。(B) また、ヒト iPS 由来肝細胞の ALB 産生量を ELISA 法を用いて評価した。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
古江一楠田 美保	第15章 ヒト多 能性幹 細胞の 利用技 術開発	米田悦啓 堤康央 石井健	生命科学か ら創薬への イノベーシ ョン	南山堂	東京	2014	105- 112
菅 三佳、 古江一楠田 美保	ヒト多 能性幹 細胞培 養用培 地の開 発の現 状と課 題	公益社団 法人 日 本生物工 学会	生物工学会 誌	公益社団 法人 日 本生物工 学会	大阪	2014	487- 490

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Andrews P., et al	Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications	Regen Med	10(2)	1-44	2015
Ozawa M., et al	A simple improvement of the conventional cryopreservation for human ES and iPS cells	Protocol Exchange		DOI: 10.1038/prote x.2014. 012	2014
Ohnuma K., et al	Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations	SCIENTIFIC REPORTS	4	DOI: 10.1038/srep0 4646	2014
Watanabe- Susaki K., et al.	Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells	Stem Cells	32(12)	3099-3111	2014

Yamada R., et al.	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	2014
Yamada R., et al.	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	4(1-4)	165-76	2014
Takayama K., et al	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
Tashiro K., et al	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
Igarashi, Y., et al	Open TG-GATEs: a large-scale toxicogenomics database.	Nucleic Acids Res	43 (Database issue)	921-927	2015
Kumagai A., et al	Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line.	Genes	5	1095-1114	2014
Sanosaka M., et al	SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice	Immunology		In press	2015
Kuno S., et al	Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector expressing human CYP3A4.	Drug Metab Pharmacokin	29	296-304	2014

別添5

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI)

1. Background and utility of this document

In 2009 the International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI) contributors and the Ethics Working Party of the International Stem Cell Forum published a consensus on principles of best practice for the procurement, cell banking, testing and distribution of human embryonic stem cell (hESC) lines for research purposes [1], which was broadly also applicable to human induced pluripotent stem cell (hiPSC) lines. Here, we revisit this guidance to consider what the requirements would be for delivery of the early seed stocks of stem cell lines intended for clinical applications. The term 'seed stock' is used here to describe those cryopreserved stocks of cells established early in the passage history of a pluripotent stem cell line in the lab that derived the line or a stem cell bank, hereafter called the 'repository'. The seed stocks should provide cells with suitable documentation and provenance that would enable them to be taken forward for development in human therapeutic applications. WHO recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biologicals and for the characterization of cell banks were updated in 2010 and provide a number of definitions and guiding principles that may apply to stem cells. The term 'cell bank' is used to describe a stock of vials or other containers of cells with consistent composition aliquoted from a single pool of cells of the same culture history (for other specific definitions see PAS 84 [2] and WHO [3]).

Three important assumptions have been made in the preparation of this document. First, that seed stocks of hPSCs are used as starting materials to make cell banks for use in clinical trials. The cell banks made within a clinical trial would need to be established according to Good Manufacturing Practice (GMP) in a facility with a relevant product manufacturing license. These banks would need additional risk assessment focused on the new banking process/reagents and the specific intended clinical application.

Second, it has been assumed that undifferentiated pluripotent stem cells would not be inoculated into patients. Third, where feeder cells are used to culture hPSC lines, their cellular nature and intimate contact with the therapeutic cells means that they should be subject to similar risk assessment and banking procedures as applied to the hPSC cells.

It is important to note that responsibility for establishing and updating national regulations for medicinal products relies on National Regulatory Authorities. Therefore, national requirements for cell therapy may vary considerably. Accordingly, it is not intended that this international consensus provides comprehensive guidance that will ensure compliance with requirements in any given jurisdiction. Rather, it is designed to aid the development of clinical grade materials by providing points to consider in the preparation of seed stocks of stem cell lines for use in cell therapy. It may arise that there are circumstances where it is not reasonably possible to meet specific procedures presented in this document. Where this is the case any alternative procedures should be justified and mitigate against any adverse consequences. Finally, this document could also serve as a useful reference to assist in the evaluation of potential sources of candidate cell lines for the development of cell-based medicines, and provide the links necessary to identify some of the key differences in regulatory requirements between countries.

2. Governance and ethics

■ 2.1 General principles

Centers banking stem cell lines (hereafter called repositories) should adopt transparent and harmonized protocols for the collection, storage, access, and use of the cell lines that they curate. As part of a comprehensive governance structure, repositories should establish robust mechanisms for the authentication of *bone fide* users and should strive for equitable and transparent conditions of access and of material transfer (Appendices 1a, 1b and 2). Such protocols

Corresponding author:

Glyn Stacey
Division of Cell Biology & Imaging,
National Institute for Biological
Standards and Control, Blanche Lane,
South Mimms, Potters Bar,
Hertfordshire, EN6 3QG, UK
glyn.stacey@nibsc.hpa.org.uk

Complete list of contributors can be found at the end of this article.

should be adopted according to internationally accepted principles for research ethics and in compliance with applicable legal, ethical and regulatory requirements (Appendix 3, 4 and 5). Furthermore, repositories should establish a system for documenting and monitoring performance with respect to such principles and requirements.

■ 2.2 Key issues in determining provenance of pluripotent stem cell lines

Repositories should ascertain the provenance (source/origin) of the human biological specimens from which the pluripotent stem cell lines have been derived. International guidance exists for documenting the provenance of the cell lines [1,4–7].

Important issues to consider when evaluating provenance include:

- Evidence of free and voluntary informed consent, for the proposed research use, in conjunction with independent review and oversight, with particular attention given to disclosure of potential clinical and commercial applications.
- The extent to which reimbursement (e.g., expenses, financial incentives, monetary payments) were provided for donation of biological samples.
- The ability of the donor to withdraw original specimens, derived cell lines, data or otherwise to discontinue participation in research.
- The possibility that derived cell lines may be used for a wide range of research, possibly through a public repository.
- The establishment of robust systems for data security and traceability.
- The implementation of mechanisms for the protection of donor privacy and confidentiality. Particular attention should be given to the generation and use of genome sequence data.

Many national and more local jurisdictions have explicit policies governing the acquisition and use of human biospecimens for pluripotent stem cell derivation, particularly with regard to embryonic sources (Appendix 3 and 4). Prior to accepting a pluripotent stem cell line, a repository should determine its provenance by first documenting that the biospecimen was collected and the cell line derived in a manner broadly consistent with international standards for

research ethics [4,5,6,7,201]; and second, to make a positive determination that the biospecimen was obtained in a manner consistent with applicable laws in the country of origin.

2.2.1 Provenance determination and international standards

Providers of cells should be able to demonstrate to the repository that they have met all applicable legal and ethical requirements associated with the procurement of a human biospecimen from which a pluripotent stem cell line was derived. Given the heterogeneity of national laws and regulations governing research and clinical applications, the depositor of a cell line should provide information that enables the repository governance structure to determine whether the conditions of derivation, use and distribution are broadly consistent with the repository's national regulation. Moreover, repositories should have in place a mechanism (e.g., 'horizon scanning', advisory board) to track changes in the legal and regulatory frameworks. In addition, repositories should verify and retain sufficient documentation to support a determination that each cell line has been obtained in accordance with international standards for research ethics.

Key principles include the following:

Independent review and oversight

The protocol for procurement of tissues, gametes or embryos for the purpose of generating a pluripotent stem cell line should be subject to independent scientific and ethical review. Review bodies include ethics committees, licensing bodies or committees responsible for oversight of research involving human subjects.

Voluntary informed consent

In addition to verifying appropriate informed consent, the repository should ascertain additional details regarding donor's disclosure when available (Appendix 1b). Numerous bodies and national policies recommend or require the disclosure of specific information to donors (particularly for hESC derivation). A number of jurisdictions have consent requirements that include, but are not limited to, disclosure of possible human transplantation, genetic modification, international sharing and commercial potential. Documentation of a robust informed consent process that addresses these requirements can serve to support wide distribution and utilization of the cell lines (Appendix 3 and 4). Informed consent requirements for stem cell derivation, use and banking have evolved over time and jurisdictional