

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

ヒト ES/iPS 細胞の実用化における  
幹細胞バンクの基盤整備についての研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 古江-楠田美保

平成26(2014)年5月

## 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

### 目次

#### I. 総括研究報告

ヒト ES/iPS 細胞の実用化における幹細胞バンクの基盤整備についての研究	3
研究代表者 古江-楠田美保	

#### II. 分担研究報告

1. ヒト ES/iPS 細胞遺伝子発現プロファイルのバイオインフォマティクス解析	69
研究分担者：水口 賢司	
2. FACS 解析・バイオインフォマティクス解析	82
研究分担者 大沼清	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	95
. 研究成果の刊行物・別刷	97

**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**

**ヒト ES/iPS 細胞の実用化における幹細胞バンクの基盤整備についての研究**

**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 ES/iPS 細胞の実用化においては、プレマスターバンク、マスターバンク、ワーキングセルバンクを設置することが望ましい。実際に実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。一般細胞バンクにおける品質管理、ならびに臨床用細胞プロセッシングにおける作業工程などについてはすでに策定されており、本研究では、これらに加えるべきヒト幹細胞バンクにおけるデータベースの基盤設計、幹細胞としての品質管理に必要な技術の策定など、ヒト幹細胞バンク運営の基盤システムの基礎設計について研究を行った。

協力研究者

菅 - 岸本 三佳： 難病・疾患資源  
研究部 ヒト幹細胞応用開発室  
特任研究員

大沼清：長岡技術科学大学 生物機能  
工学専攻 准教授

分担研究者

水口賢司：独立行政法人医薬基盤研  
究所 バイオ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

A. 研究目的

これまで培養細胞を産業利用する際においては、細菌などの微生物の利用と同様に、樹立機関から提供された資源をストックするプレマスターバンク、さらに種としてのマスターバンク、実際に使用するワーキングバンクを作成して使用することが望ましい

とされ、培養細胞が資源化されてきた。しかし、ヒト胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞を実用化する上においては、従来の細胞とは異なり、培養過程において形質が変化しやすく、実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、これら細胞の特性検査などを含めた作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。そこで、実用に資するヒト幹細胞バンクに必要なデータベースの基盤設計、品質管理に必要な基盤技術の策定を行い、実用ヒト幹細胞バンクの基盤システムを設計について研究することを目的とする。

ヒト ES/iPS 細胞などヒト幹細胞を再生医療のソース、ワクチン作製や生物製剤原料、創薬研究ツールとして実用化するために、プレマスターバンク、統合的に管理するマスターバンク、実用のためのワーキングセルバンクの設置が望まれ、共用の基盤システムを構築しておく必要がある。一般細胞のバンクは独立行政法人 医薬基盤研究所の生物資源として JCRB 細胞バンクが設置されており、微生物検査、ウィルス検査、細胞同定検査（CGH アレイ検査）など基本的な検査項目についての作業工程は策定されている。また、臨床用細胞プロセッシングの作業工程については、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理規則に準じた工程が臨床研究を行っている各機関にて策定されている。しかし、ヒト多能性幹細胞は従来の細胞とは異なる

る形質をもつため、ヒト幹細胞特有の品質管理が必要となる。また、一番の問題点は、ヒト多能性幹細胞はゲノムが不安定であり（文献 1、2）長期に継代を行う事よりゲノムが変異してしまう可能性があることが報告されている。そのため、ヒト多能性幹細胞を治療に用いるためには、できるだけ短時間で資源化を行った細胞を使うべきであるとの見解がでていいる。海外では、国際幹細胞バンキングイニシャティブ（ISCT）が臨床用ヒト幹細胞バンクのためのガイドラインを作成中である（文献 4、5）。国内事情を鑑みたヒト幹細胞バンクの基盤設計が急務である。

具体的には、下記の 3 つの観点から研究を推進する。

効率的な品質管理を行うための基盤技術の策定

細胞登録システムの基礎設計案の作成

臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

遺伝子発現の解析の方法については、水口が分担し、また、細胞品質評価のうち、表面抗原プロフィール解析については、大沼が分担した。

## B. 研究方法

### 1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

(i) 遺伝子解析

未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性を明らかにするため、遺伝子発現プロフィール解析を行った。その検査方法については、H23 年度に策定を行った国際幹細胞イニシヤティブ (ISCI) にて用いられた Stem Cell PCR アレイを用いた方法を用いて行った。

これまで、厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1331 Tic、JCRB1327 Dotocom、JCRB1437 iPS-TIG-114-4f1、コントロールとして京都大学 iPS 細胞研究所より供与されたヒト iPS 細胞 201B7、京都大学ヒト ES 細胞 KhES-1(京都大学より分与)、ウィスコンシン大学ヒト ES 細胞 H9(Wicell

Bank より分譲)を検査対象としてきた。国際幹細胞イニシヤティブによる解析にも用いられた Pluripotency 遺伝子 PCR アレイを用いて解析し、データの蓄積を行ってきた。

今年度には、3 株のヒト iPS 細胞株 ; JCRB1341 iPS-TIG120-3f7、JCRB1363 iPS-TIG120-4f1 及び NIHS0693 UTA-SF2-2 (以上 JCRB Cell Bank) 2 株のヒト ES 細胞株 ; KhES-4 及び KhES-5 (京都大学より分与)を追加し、同様の手法で遺伝子発現プロフィール解析を行い、昨年度までに蓄積したデータと合わせて、遺伝子発現プロフィールの細胞株間の相違や個々の細胞株の特性を示す遺伝子等について検討した。

細胞番号	細胞名	樹立者	寄託機関	性状	ドナー情報	作成方法	使用培地	分譲条件	分譲受付開始
NIHS0693	UTA-SF2-2	浅島誠	東京大学	ヒトES細胞様	46才, 女性, 皮膚線維芽細胞	Human OCT3/4、Human SOX2、Human KLF4、Human c-MYCをVSV-Gレトロウイルスベクターを用いて導入後、ヒトES細胞様コロニーを無フィーダー培養したもの	hESF9a	国内の大学・公的研究機関・企業	分譲準備中

【遺伝子プロフィール解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 NIHS0693 UTA-SF2-2 の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/cellinfo/ips/u-tokyo\\_ipslist/](http://cellbank.nibio.go.jp/cellinfo/ips/u-tokyo_ipslist/)

【遺伝子プロファイル解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1341 iPS-TIG120-4f3 の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1341](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1341)

細胞番号(JCRB)	JCRB1341	細胞名	iPS-TIG120-3f7
生物種(日本語)	ヒト	組織名(日本語)	ヒトiPS
コメント(日本語)	ヒトiPS細胞, TIG120由来	プロフィール	Human iPS cell line which was generated from adult human skin fibroblast cell line (JCRB0542: TIG-120).
別名		動物名	human
系統名		学名・属名	Homo
種名	sapiens	性別	F
年齢・月齢	6	細胞識別情報	available
(癌) 原発組織名		病歴情報	
転移の有無 (Y/N)	No	(癌) 転移組織名	
遺伝的性質	Transgene: Human OCT3/4, SOX2, and KLF4 (in pMXs retroviral vectors)	細胞寿命	infinite
クライスPDL		形態	human ES-like
一般性状		細胞分類	transformed
細胞樹立者名	Yamanaka, S.	細胞寄託者	Yamanaka, S.
分譲時制限	1) Academic research purpose only. 2) Conclude a MTA with Kyoto Univ..	コメント	
入手年	2009	培養培地	Primate ES cells medium (ReproCELL) supplemented 4 ng/mL bFGF.
継代方法	Cells are treated with the solution consisted by 0.25% Trypsin, 0.1 mg/mL collagenase IV, 1mM CaCl <sub>2</sub> , and 20% KSR.	継代時細胞数	
人種		炭酸ガス濃度	5%
登録状況	registered	採取組織名	skin
ウイルス検査	tested	検出ウイルス	GAPDH(+), CMV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-), BKV(-), JCV(-), ADV(-), HBV(-), parvoB19(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-), HPV18(-)[- /negative, + /positive, nt /not tested, GAPDH is positive control]
組織型			

【遺伝子プロファイル解析を行った厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1363 iPS-TIG120-4f1 の細胞情報】

[http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search\\_res\\_det.cgi?RNO=JCRB1363](http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/cgi-bin/search_res_det.cgi?RNO=JCRB1363)

細胞番号(JCRB)	JCRB1363	細胞名	iPS-TIG120-4f1
生物種(日本語)	ヒト	組織名(日本語)	ヒトiPS
コメント(日本語)	ヒトiPS細胞, TIG120由来	プロフィール	Human iPS cell line which was generated from adult human skin fibroblast cell line (JCRB0542: TIG-120).
別名		動物名	human
系統名		学名・属名	Homo
種名	sapiens	性別	F
年齢・月齢	6	細胞識別情報	available
(癌) 原発組織名		病歴情報	
転移の有無 (Y/N)	No	(癌) 転移組織名	
遺伝的性質	Transgene: Human OCT3/4, SOX2, KLF4, and c-MYC (in pMXs retroviral vectors).	細胞寿命	infinite
カインPDL		形態	human ES-like
一般性状		細胞分類	transformed
細胞樹立者名	Yamanaka, S.	細胞寄託者	Yamanaka, S.
分譲時制限	1) Academic research purpose only. 2) Conclude a MTA with Kyoto Univ..	コメント	
入手年	2009	培養培地	Primate ES cells medium (ReproCELL) supplemented 4 ng/mL bFGF.
継代方法	Cells are treated with the solution consisted by 0.25% Trypsin, 0.1 mg/mL collagenase IV, 1mM CaCl <sub>2</sub> , and 20% KSR.	継代時細胞数	
人種		炭酸ガス濃度	5%
登録状況	registered	採取組織名	skin
ウイルス検査	tested	検出ウイルス	CMV(-), EBV(-), HHV6(-), HHV7(-), BKV(-), JCV(-), ADV(-), parvoB19(-), HBV(-), HTLV1(-), HTLV2(-), HIV1(-), HIV2(-), HPV18(-) [-/negative, +/positive, nt/not tested]
組織型			

アレイに含まれる遺伝子のリストは表 1 に示した。

アレイ名	Stem cell PCR array (幹細胞の同定、分化、増殖に関する 84 遺伝子の発現プロファイルを解析する)
アレイ遺伝子	BRIX, CD9, COMMD3, CRABP2, EBAF, FGF5, FOXD3, GABRB3, GAL, GBX2, GDF3, GRB7, IFITM1, IFITM2, IL6ST, IMP2, KIT, LEFTB, LIFR, LIN28, Nanog, NODAL, NR5A2, NR6A1, PODXL, POU5F1, PTEN, REST, SEMA3A, SFRP2, SOX2, TDGF1, TERT, TFCP2L1, UTF1, Xist, ZFP42, FGF4, NOG, CDX2, CGB, EOMES, KRT1, GCM1, DDX4, SYCP3, COL1A1, COL2A1, RUNX2, HBB, HBZ, ACTC, NPPA, DES, MYF5, MYOD1, T, WT1, CD34, CDH5, FLT1, PECAM1, GCG, IAPP, INS, IPF1, PAX4, SST, TAT, AFP, FN1, FOXA2, GATA4, LAMA1, LAMB1, LAMC1, PTF1A, SERPINA1, SOX17, GFAP, HLXB9, ISL1, NES, NEUROD1, OLIG2, PAX6, SYP, TH
コントロール遺伝子	ACTB, 18S, CTNNB1, DNMT3B, EEF1A1, GAPDH



## (ii) 未分化マーカータンパクのプロフィール解析

ヒト多能性幹細胞のマーカータンパクの発現について2つの手法を用いて解析を行い、その結果を比較した。手法1として、コーニング社製25cm<sup>2</sup>プラスチックフラスコを用いて培養後、細胞を分散し、Tra-1-60、SSEA-3、SSEA-4、SSEA-1などの抗体と反応させて免疫染色を行い、フローサイトメトリーによる解析を行った。手法2として、同じロットの細胞をBD社製6ウェルプレートにて培養した細胞を4%パラホルムアルデヒドにて室温で固定し、免疫染色を行ってイメージアナライザーにてプロフィール解析を行った。手法1、手法2による解析結果の比較を行った。

## **2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討**

海外のヒト幹細胞の分譲を行っている機関における細胞登録情報の収集を行った。また、細胞培養記録および各種検査結果記録を継続して記載し、データ化について検討を行った。

## **3. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定**

## (i) フィーダーを用いたヒトES/iPS細胞の培養に関する作業工程表ならびに作業手順書の作成

昨年度までにフィーダーを用いたヒトES/iPS細胞の解凍・培地交換、継代、凍結について必要な準備、作業などのリストアップを行い、解凍・培地交換、継代、凍結について作業手順書を作成した。データベースとして応用できるようにエクセルにて作成した。今年度は実際にこれらの手順書に従って細胞の解凍・培地交換、継代、凍結を行い、改善すべき点について検討し、手順書の改定を行った。

## (ii) フィーダーを用いないヒトES/iPS細胞の培養に関する品質管理法ならびに作業手順書の作成

フィーダー細胞を用いない無血清培地を用いて培養を行う場合、その品質管理も従来の培養法を用いる場合とは異なってくる。東京大学浅島研究室にて無フィーダー・無血清にて樹立され寄託されたヒトiPS細胞UTA-SF2-2の資源化に備えて、hESF9a培地を用いた培養工程における品質管理方法をこれまでに策定した。今年度は策定した品質管理方法に従いヒトiPS細胞UTA-SF2-2の資源化を行った。また、解凍・培地交換、継代、

凍結について作業工程表および作業手順書を作成した。

近年、次々と無血清培地が開発されていることから、どの培養条件にも対応できるような品質維持培養技術を策定する必要がある。そこで、これまでに報告されている既知の組成よりなるフィーダー細胞を用いない市販の培地； m TeSR1 培地、TeSR2 培地、TeSR-E8 培地、申請者が開発した既知組成よりなる hESF9a 培地、動物由来成分不含 hESF-FX 培地を用いて、複数の培養技術者がヒト ES/iPS 細胞を 5 継代にわたって培養を行い、評価や検査を行って、品質管理法を検討した。

## **倫理面の配慮**

本研究についてヒト試料を用いてゲノム解析を用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、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した。また、ヒト ES 細胞使用研究に関しては「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」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した。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っている。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。JCRB 細胞バンクならびに難病バンク運営にかかる倫理問題について従来より研究・政策提言を行っている難病疾患資源研究部・増井徹部長と連携し、研究推進のあり方、情報公開における問題等に関する検討も行っている。「ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究」(医薬基盤研究所)については文部科学大臣確認済みである。

## **C. 研究結果**

### 1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

ヒト ES/iPS 細胞の培養過程におけるヒト幹細胞の未分化マーカーや早期分化マーカーなどの遺伝子群の発現の安定性を確認するために、Pluripotency PCR アレイを用いて、対象株について異なる継代数で複数回、解析した。それらの結果については、分担研究者・水口らとともに、バイオインフォマティク解析を行ったので、詳細については水口の項に譲る。

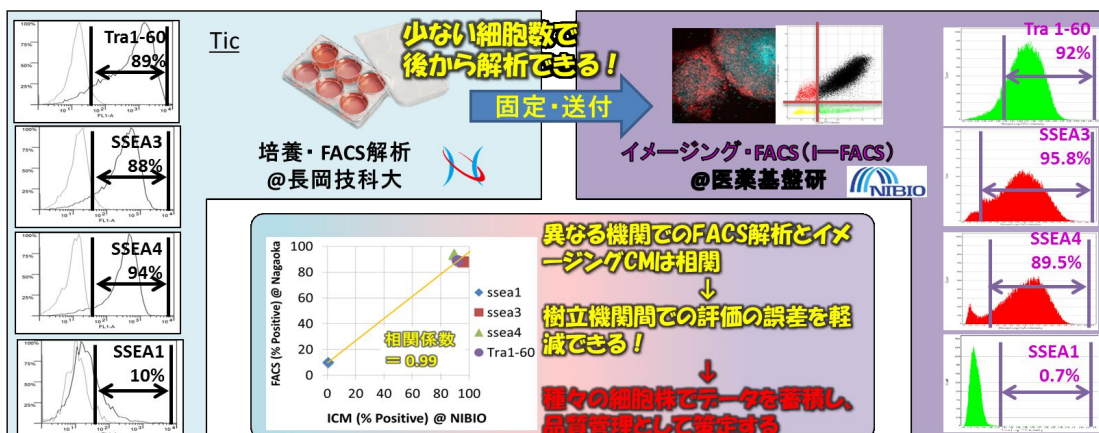
また、ヒト多能性幹細胞の未分化マーカータンパクの解析について

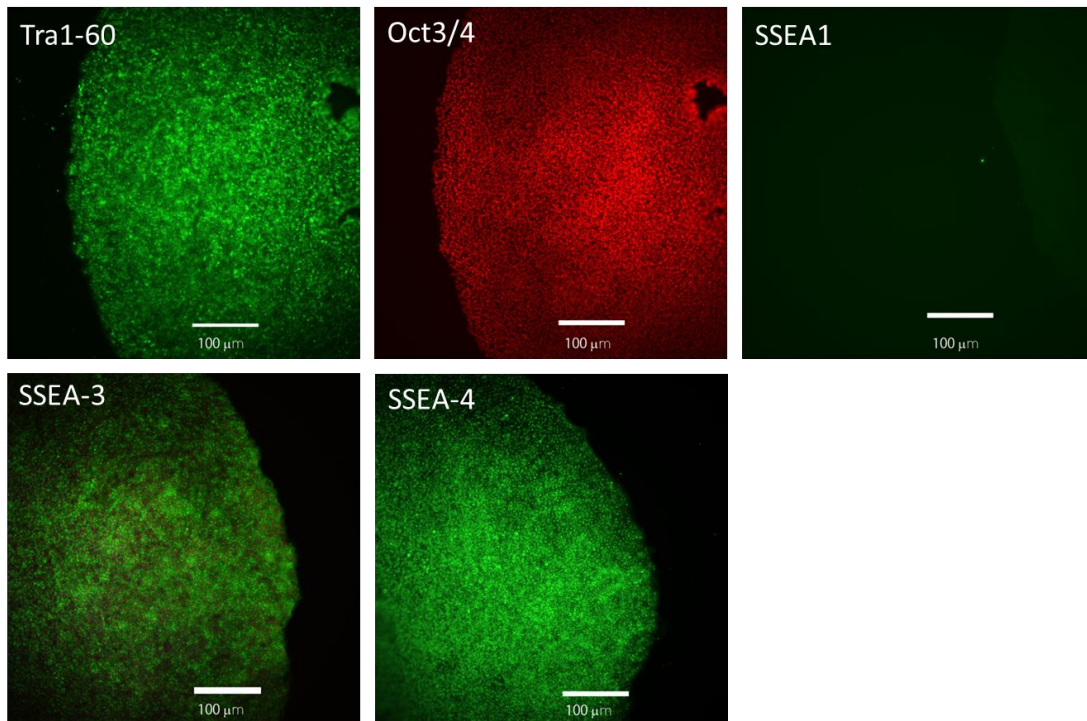
は、分担研究者・大沼の項に譲るが、昨年度にヒト iPS 細胞 Tic を用い、長岡技術科学大学にて培養を行った細胞を固定し、独) 医薬基盤研究所に送付後、免疫染色を行ってイメージアナライザーにより解析を行って、長岡技術科学大学にて行ったフローサイトメトリーでの解析結果と比較するという工程を作成し、実際に比較解析をおこなったところ、高い相関性が得られることが確認された(下図)。フローサイトメトリーによる解析を行うためには、細胞数が必要であり、また、解析を行うタイミングも限定されるのに対し、細胞をプレートで培養後固定して免疫染色を行って解析を行う場合は、少ない細胞数で解析でき、また、固定後は随時解析を行うこと

ができ、輸送を行った後に解析を行うこともできることから、品質評価法として有用であることが示された。今年度はヒト iPS 細胞 Tic を用いて策定したこの品質評価工程に従いヒトES細胞H9、ヒトiPS細胞 201B7及び253G1について解析を行い、イメージアナライザーによる解析結果がフローサイトメトリーでの解析結果と高い相関があることを確認した。(結果の詳細については大沼の項を参照されたい。)

イメージアナライザーによる未分化マーカータンパクの解析がヒト幹細胞の品質評価法として特に有用であり、結果の信頼性も高く、汎用性もあることが示された。そこで、これまで用いてきたヒト多能性

→少ない細胞数で低コスト、検査時設定の自由度向上、遠隔地の細胞状態を診断可能





幹細胞のマーカートンパク発現解析のための画像解析プロトコルの改良についても検討した。具体的には、これまではフィーダー細胞を用いてヒト幹細胞の培養を行った場合に、フィーダー細胞を特異的に染色できる抗体を用いてフィーダー細胞を解析対象から除いていたが、このような抗体染色をしなくともフィーダー細胞とヒト幹細胞の細胞面積や核の大きさの差異等を利用してヒト幹細胞のみを画像認識させるというプロトコルへと改良した。この改良版のプロトコルを用い、ヒト iPS 細胞 UTA-SF2-2 の品質評価を行った（上図）。この改良版のプロトコルは、より汎用性が高く、フィーダー細胞を用いない培養にも応用できるものであることが示

された。今後当バンクでも標準の評価方法として活用していく。

## 2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

ヒト幹細胞応用開発室にて資源化を行った細胞の細胞培養記録および各種検査結果記録は、JCRB 細胞バンクへの情報提供を行い、JCRB 細胞バンクにおいても情報の管理がなされている。それらの情報は JCRB 細胞バンクのホームページ

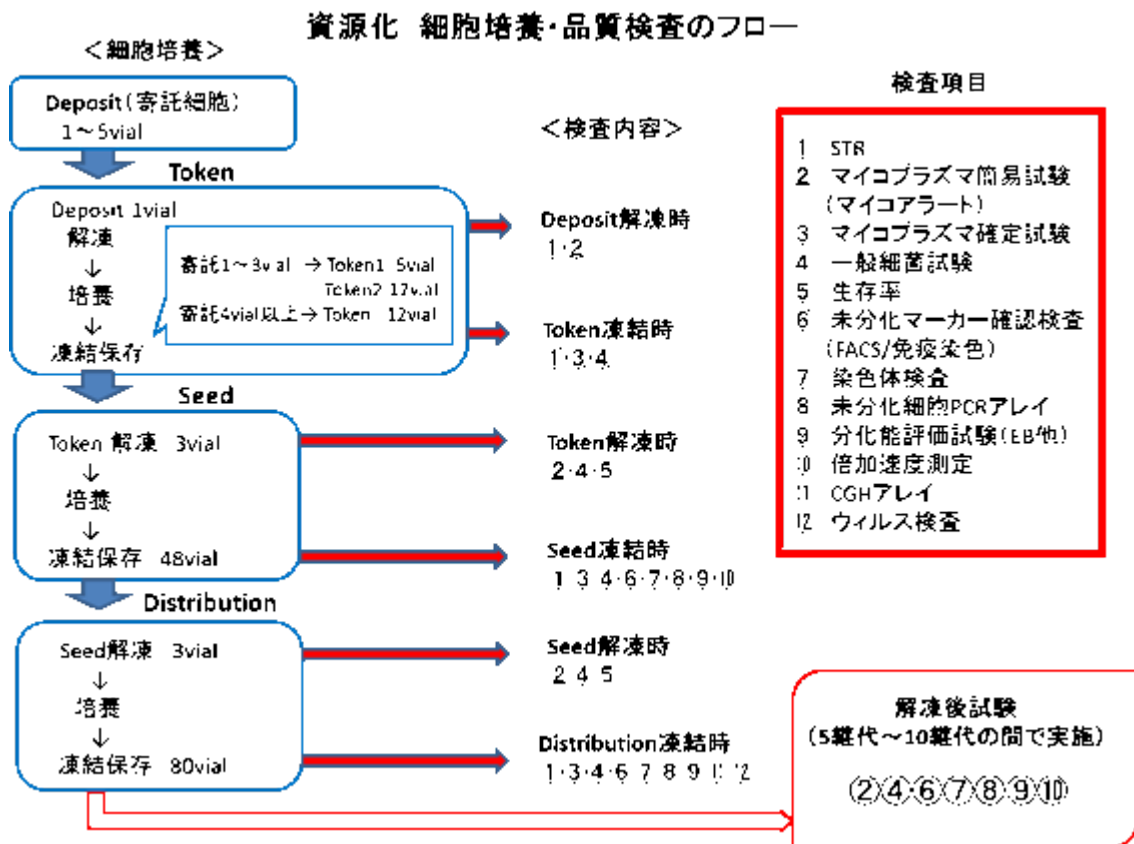
<http://cellbank.nibio.go.jp/>に掲載されている。また、資源化を行った細胞について、厚生労働省「ヒト幹細胞情報化事業」に情報提供を行い、その情報は <http://www.skip.med.keio.ac.jp/>

へ記載されている。また、収集した海外の細胞バンクのサイトの情報は、ヒト幹細胞応用開発室のホームページ

[http://www.nibio.go.jp/baiyou/myweb1\\_025.htm](http://www.nibio.go.jp/baiyou/myweb1_025.htm) に掲載している。H25年度は、海外の細胞バンクにおけるヒトES/iPS細胞の収集状況および細胞登録状況について調査を行うとともに、ヒト幹細胞情報化事業と連携して、細胞登録システムの基礎

設計案についての検討を行った。新たに収集した情報についても更新・掲載の準備を進めている。

【厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク(JCRB Cell Bank)におけるヒトiPS細胞の細胞培養及び品質検査のフロー】



### 3. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

(i) フィーダーを用いたヒト ES/iPS 細胞の培養に関する作業工程表ならびに作業手順書の作成

H23 年度に英国の UK Stem Cell Bank やスペインアンダルシア Stem Cell Bank などにおける分譲バンク作成工程表を参考にして、資源化工程表を策定した。その工程表を元に実際に資源化を行ったところ、それぞれの株間の特性の差により、工程表に沿って作業が行えない事例があった。そこで、H24 年度には、特性の異なるさまざまな株に対応できるよう、また、できるだけ短い継代数で資源化できるよう作業工程を改訂した。今年度は改訂した工程表に従い、ヒト iPS 細胞 Tic ならびに Skipper の資源化を行い、詳細に検討を重ね、図に示すような最終版の作業工程表に改訂した。H24 年度に作成した作業手順書についても同様に改訂を行い、JCRB 細胞バンクからの iPS 細胞の分譲時に添付する取り扱い説明書として提供を行った。

(ii) フィーダーを用いないヒト ES/iPS 細胞の培養に関する品質管理ならびに作業手順書の作成

昨年度までに策定した作業工程表をもとに、UTA-SF2-2 (東京大学浅島研究室にて無フィーダー・無血

清にて樹立され寄託されたヒト iPS 細胞株)の資源化を行い、ウシファイブロネクチンならびに hESF9a 培地を用いた培養工程に実際に応用できた。さらに、今年度に (i) で策定した最終版の作業工程表がフィーダーを用いない培養工程にも汎用できることを確認した。一方、作業手順書は別途作成する必要がある。ウシファイブロネクチンならびに hESF9a 培地を用いた培養における解凍、継代、培地交換、凍結の作業手順書を作成し、細胞分譲時の添付資料として JCRB 細胞バンクに提供した。(表 )

また、MEF (CF-1) や SNL などのフィーダー細胞を用いて樹立、培養されたヒト ES 細胞・iPS 細胞を市販の TeSR-E8 培地、申請者が開発した既知組成よりなる hESF9a 培地、動物由来成分不含 hESF-FX 培地を用いて 5 継代以上培養し、評価や検査を行い、無フィーダー・無血清培養に馴化させて使用できることを確認した。

[解凍 作業手順書]

Day:		Executioner:	
<b>Cell name:</b>			
Passage no:	P	P	
準備試薬リスト		Variance	
Medium	培地Lot:	Variance	
	量:whah用: ml 播種用: ml		
	FGF-2濃度: <input type="checkbox"/> 4ng/ml <input type="checkbox"/> 5ng/ml <input type="checkbox"/> 10ng/mL		
	FGF-2量: <input type="text"/> μL in <input type="text"/> mlMedium		
<b>Defrost</b>		Variance	
開始時間:	Vial 本	Photo - / +	
	Med 分注し、37° 恒温水槽で加温		
	加温したwash培地をクリーンベンチに入れる		
	N2タンクから液体窒素容器にストックのvialを取り出す		
	Vialをアルコールで拭いた後、クリーンベンチに入れる		
	加温したwash用Medを先太トランスファーピペットで約600ulほど入れ込む		
	穏やかにピペッティングで融解させ半融解したら素早くwash培地に回収する		
	遠心 rpm 分間		
	上清除去		
	細胞数: 多い やや多い 適切 やや少ない 少ない		
	軽く弾いて細胞ペレットをほぐす		
	終了時間:		播種用の培地を ml細胞ペレットに加える
			フラスコorプレートへ mlずつ( )播種する
	顕微鏡で細胞の様子を見る		
	細胞状態: 良い 適切 悪い コロニーの大きさ: 大きい 適切 小さい		



[培地交換 作業手順書]

培地交換 作業チェックシート										
日時					Executioner : 上田					
細胞情報	細胞名	インキュベーターNo.	資10%	前回作業者: 上田		プロジェクト名:				
	MMT-MEF:	CF-1	B6	ICR	SNL	EC(2102EP) NTERA2				
	hESC:	KhES-1	KhES-3	H1	H9	HES3	HES4			
	hiPSC:	201B7	201B2							
Passage No	P-(27+10+11+5+5)			前回継代日:	4月 14日	今回の継代日は:	予定通り	予定より早い	予定より遅い	
細胞の状態	未分化コロニーがほとんど	分化した細胞がやや多い	分化した細胞が多い	熟していないコロニーが多い	よくわからないが変	コンフルエント	サブコンフルエント	細胞が予定より少ない	細胞がほとんど死んでいて	細胞多すぎた
写真	なし	x40 ( )	x100 ( )	x200 ( )	ファイル格納場所					
機器	37°C湯浴			CO2インキュベーター						
マテリアルチェック	培地	京大培地 Lot: KS	EB (-2Me) Lot: EB(-)	mTeSR Lot:	Variance					
	成育培地	Lot: Sip	EB+2ME Lot: EB(+)	DMEW+FGF Lot: EC						
	hESF8	Lot: E8130419/22(ESF-)	Condition Med Lot: CMC	FGF-2 Lot:	ESF(-) 4/18作					
	hESF6	Lot: E6	Condition Med Lot: CMB	activin Lot:						
	hESF-FX	Lot: FX	Condition Med Lot: CMI	PDGF Lot:						
	hESF-Diff	Lot: Edif	PBS Lot:	ROCK inhibitor Lot:						
	必要量	培地	135ml							
	用事添加	FGF-2	10ug/ml	x(135)microL	最終濃度:	10 ng/mL	x( )microL	最終濃度:	g/mL	
	Activin A	10ug/ml	x(27)microL	最終濃度:	2ng/mL	x( )microL	最終濃度:	g/mL		
	PDGF	10ng/ml	x( )microL	最終濃度:	ng/mL	x( )microL	最終濃度:	g/mL		
Rock inhibitor		x( )microL	最終濃度:	ng/mL	x( )microL	最終濃度:	g/mL			
必要量	mL		37°C湯浴		分					
対象	5cmフラスコ	6枚	75cm フラスコ	60mm Dish	90mm Dish	Variance				
	24well plate	24well	12well plate	24well plate						
	培地吸引	全量吸引	5mL残し	mL残し	2mL残して	mL残して 吸引せず				
培地添加	4.6	mL/each								
	インキュベーターNo.	資10%								



[継代 作業手順書]

細胞継代 作業チェックシート										
細胞情報	日時	Executioner : 上田						プロジェクト名: Distribution		
	細胞名	MMT-MEF: CF-1 B6	IGR	SNL			EC(2102EP)	NTERA2		
		hESC: KhES-1 KhES-3	H1	H9	HES3	HES4				
		hiPSC: 201B7 201B2	Dotcom	Toe	Lollipop	UTA-1	UTASF2-2	IPS(Foreskin)-1		
Passage No	P-( 27+10+11+2 )	前回継代日:	解凍 1月15日	予定通り	今回の継代日は:	予定通り	予定より早い	予定より遅い		
細胞の状態	分化した細胞が多い	細胞がやや多	細胞が多い	よくわからぬが変	コンフルエント	サブコンフルエント	細胞が予定より少ない	細胞がほとんど死んでいる	コロニーが少	
写真	あり	x50 ( )	x100 ( )	x200 ( )	ファイル格納場所	(研究業務)共有>50 写真 維持用細胞				
機器	遠心機	37°C湯浴		CO2インキュベーター No.						
medium	京大培地	Lot. KES	EB(-2Me)	Lot. EB(-)	mTeSR	Lot.	Variance			
	成育培地	Lot. Sip	EB+2ME	Lot. EB(+)	DMEM+FBS	Lot. EC				
	hESF8	Lot. E8 130121/130123	Condition Med	Lot. CMO	FGF-2	Lot. D2222				
	hESF6	Lot. E6	Condition Med	Lot. CMB	activin	Lot. BNV321201E				
	hESF-FX	Lot. FX	Condition Med	Lot. CMI	PDGF	Lot.				
	hESF-Dif	Lot. Edif	PBS	Lot.	ROCK inhibitor	Lot.				
	必要量	培地	88 mL	37°C湯浴	10 min					
用事添加因子	FGF-2	10ng/ul	x(88)microL	最終濃度: 10 ng/ml	x( )microL	最終濃度: g/ml				
	Activin A	10ng/ml	x(17.6)microL	最終濃度: 2 ng/ml	x( )microL	最終濃度: g/ml				
	PDGF	10ng/ml	x( )microL	最終濃度: ng/ml	x( )microL	最終濃度: g/ml				
	Rock inhibitor	x( )microL	最終濃度: ng/ml	x( )microL	最終濃度: g/ml					
分散液	Dispase	Lot. D	CTK	Lot. CTK	Variance					
	High Trypsin/EDTA	Lot. TE(H)	アキュターゼ: Lot.							
	Low Trypsin/EDTA	Lot. TE(L)								
	Media Trypsin/EDTA	Lot. TE(M)								
	STEMPRO <sup>3</sup> EZ Passage Tool									
ピッキングアップ										
必要量	ml									
分散	分散枚数	25cmフラスコ	75cm フラスコ	60mm Dish	90mm Dish	Variance				
		6well plate	12well plate	24well plate						
	洗浄/培地交換	1回目PBS	ml/each	2回目PBS	ml/each	1回目培地	ml/each	2回目培地	ml/each	Variance
	剥離液処理	ml/each								Variance
	処理時間	室温	~1分	~2分	~7分	~10分	ピッキングアップ: ①→3コロニー			
		37°C	~1分	~2分	~7分	~10分	②→10コロニーぐらい			
	処理後の様相	コロニーの周囲のみがカール	コロニーが半分程度剥がれた	コロニーがほとんど浮き上がった	ほとんど変化ない	継代				
	分散	剥離剤吸引除去	x( 1 )	(1:5) Ezpassageとスクレーパー						
		Wash with Medium	10 ml/each	x( 1 )	(1:10) 2ml播種x1					
		Wash with PBS	ml/each	x( )	(1:15) 1ml播種x3					
	pipetting	x( )	(1:20) 670ul播種x3							
	scraper	x( )	500ul播種x3							
回収	チューブに回収	直接次の培養器に播種			Variance					
遠心速度	200rpm ( 10G )	300rpm ( 20G )	700rpm ( 90G )	1000rpm ( 190G )	1200rpm ( 270G )	ピッキングアップ				
遠心時間	1min	2min	3min	5min	顕微鏡で先細でピッキングアップ					
上清を除去	培養液全量回収後、300rpm 1min遠									
Wash培地添加	10 ml/each	pipetting	x( )							
繰り返し	x( )	上清吸引除去 播種用培地6mlで浮遊させて 1枚に播種								
	①② それぞれ1枚ずつ									
調製	細胞浮遊液	10 ml	pipetting	x( 2 )						
	ヘモサイトメーター	( )microL	mix with trypanblue	( )microL	( )cells/ml	Variance				
	コールターカウンター	( )mL	( )cells/ml							
	GEカウンター	( )microL	( )cells/ml							
容器と枚数	細胞浮遊液	7 ~ 8 ml/each	※分散密度: 1 : 5 ~ 1 : 20							
	25cmフラスコ	x( 12 )	75cmフラスコ	x( )	60mm Dish	x( )	90mm Dish	x( )	x( )	
	6well plate	x( )	12well plate	x( )	24well plate	x( )	x( )	x( )	x( )	
インキュベーター	No. :	資源下	CO2濃度 :		10%					

[凍結 作業手順書]

細胞凍結 作業チェックシート											
細胞情報	日時	Executioner :					プロジェクト名:				
	細胞名	MMT-MEF:	CF-1	B6	ICR	SNL	EC(2102EP) NTERA2				
		hESC:	KhES-1	KhES-3	H1	H9	HES3	HES4			
		hiPSC:	201B7	201B2	Dotcom	Toe	Lollipop	UTA-1	UTASF2-2	IPS(Foreskin)-1	
	P-( )	前回	月	日							
細胞の状態	本日のコロニーがほとんど	分化した細胞がやや多	分化した細胞が多い	コロニーが多い	よくわからないが要	コンフルエント	サブコンフルエント	細胞が予定より少ない	細胞がほとんど死んでいる		
写真	なし	x40 ( )	x100 ( )	x200 ( )	ファイル格納場所						
機器	遠心機	37℃湯浴			CO2インキュベーター						
マテリアルチェック	medium	成大培地	Lot: Kcs	EB (-2Mo)	Lot: EB(-)	mToSR	Lot:	Variance			
		成育培地	Lot: Slp	EB+2ME	Lot: EB(+)	DMEM+FBS	Lot: EC				
		hESF8	Lot: F8	Condition Med	Lot: CMC	FGF-7	Lot:				
		hESF6	Lot: E6	Condition Med	Lot: CMB	actwn	Lot:				
		hESF-FX	Lot: FX	Condition Med	Lot: CMI	PDGF	Lot:				
		hESF-Dif	Lot: Eoif	PBS	Lot:	ROCK inhibitor	Lot:				
	必要量	培地	ml	37℃湯浴	分						
	用事添加因子	FGF-2	10ng/ul	x( )microL	最終濃度:	ng/ml	DMSO	x( )microL	最終濃度:	g/ml	
		Activin A	10ng/ml	x( )microL	最終濃度:	ng/ml	x( )microL	最終濃度:	g/ml		
		PDGF	10ng/ml	x( )microL	最終濃度:	ng/ml	x( )microL	最終濃度:	g/ml		
Rock inhibitor		x( )microL	最終濃度:	ng/ml	x( )microL	最終濃度:	g/ml				
Dispase		Lot: D	GTK	Lot: GTK	Variance						
分散液	High Trypsin/EDTA	Lot: TE(H)	アキュターゼ	Lot:							
	Low Trypsin/EDTA	Lot: TE(L)									
	Media Trypsin/EDTA	Lot: TE(M)									
	STEMPROBEZPassage™ Tool										
	ピックアップ										
必要量	ml										
分散	分散枚数	25cm プラスコ	75cm プラスコ	60mm Dish	90mm Dish	Variance					
		6well plate	12well plate	24well plate							
	洗浄/培地交換	1回目PBS	ml/each	1回目培地	ml/each	Variance					
		2回目PBS	ml/each	2回目培地	ml/each						
	剥離液処理	ml/each							Variance		
	処理時間	室温	~1分	~2分	~7分	~10分					
		37℃	~1分	~2分	~7分	~10分					
	処理後の様相	コロニーの周囲のみがカール	半分程度剥がれた	コロニーがほとんど浮き上がった	コロニーがほとんど変化しない						
		剥離剤吸引除去	x( )								
	分散	Wash with Medium	ml/each	x( )							
Wash with PBS		ml/each	x( )								
pipetting		x( )	酵素液で変化がなかったのでスクレーパーした X( )								
scraper		x( )									
回収	チューブに回収	直接次の培養器に播種			Variance						
遠心速度	200rpm (10G)	300rpm (20G)	700rpm (90G)	1000rpm (190G)	1200rpm (270G)						
	1min	2min	3min	5min							
遠心時間	上清を除去										
凍結	調製	10%DMSO 培地	ml	pipetting	x( )	Variance					
	細胞数計測	ヘモサイトメーター	( )microL	mix with trypanblue	( )microL	( )cells/ml					
		コールターカウンター	( )mL	( )cells/ml							
		GEカウンター	( )microL	( )cells/ml							
	10%DMSO 培地	ml/each	※凍結密度:	:							

## D. 考察

### 1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

国内外で多くのヒト iPS 細胞が樹立され、再生医療のソース、ワクチン作製や生物製剤原料、創薬研究ツールとして実用化が期待されている。実用化に際しては、プレマスタバーク、統合的に管理するマスタバーク、実用のためのワーキングセルバンクの設置が望まれ、共用の基盤システムを構築しておく必要がある。しかしながら、ヒト ES 細胞とほぼ同じ特性を持つヒト iPS 細胞においても、絶対的なマーカーはなく、また、多分化能を持つがゆえに、未分化状態は不安定である。これまで細胞バンクにおいて資源化されてきた培養細胞は、多くが癌細胞である。細胞増殖速度も速く、解凍後の生存率も高い。しかし、ヒト iPS 細胞は癌細胞とは異なり、細胞倍加時間は遅く、解凍後の生存率も低い。また、培養過程において細胞形質が変化しやすく、実用化を目指してバンク設置と運営を円滑に行うためには、幹細胞特性検査などを含めた作業工程などのフローを事前に構築しておく必要がある。そこで、実用に資するヒト幹細胞バンクに必要なデータベースの基盤設計、品質管理に必要な基盤技術の策定を行い、実用ヒト幹細胞バンクの基盤システムを設計について研究を行っている。また、多様な形質をもつヒト iPS 細胞の標準化は、細胞自体を標準化するのではなく、品質評価を標準化することが先決であると考えられ、研

究を進めている。

未分化マーカーや分化マーカーなど 84 遺伝子を集めた PCR アレイを用いて遺伝子プロファイルの解析を行うためのプロトコルを策定し、その方法を用いて各細胞株の未分化状態の品質管理を行うため、異なる継代数の細胞から RNA を抽出して Stem Cell PCR アレイ解析を行い、継代による未分化状態の変化を確認した。詳細については、分担研究者・水口の項にゆずるが、継代数が異なることにより発現が変動する遺伝子と、ほとんど変動しない遺伝子があることが明らかとなった。また、細胞株によって発現量が大きく異なる遺伝子が複数存在することが明らかとなった。これらの遺伝子の特徴を理解し、ヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現プロファイル解析を行っていくことが重要である。

ヒト iPS 細胞における未分化マーカータンパク発現のプロファイル解析は、フローサイトメトリーを用いて行われるが、機器やその操作方法、また、解析操作により、しばしば結果が異なる。詳細については、分担研究者・大沼の項にゆずるが、フローサイトメトリーによる解析のためには、多くの細胞数が必要であり、解析のタイミングも制限される。本研究で、イメージアナライザーによって、フローサイトメトリーと同等の解析を行うことが可能であることが明らかとなった。イメージアナライザーによる解析の場合、プレートに播種された細胞を固定して 4 で保存し、数週間の期間、保存することが可能である。凍結保存する細胞と同じロットの細胞を評価しようとする際、

フローサイトメトリーによる解析の場合には、凍結と同日に行う必要があるが、免疫染色の場合には後日解析が可能であり、細胞バンクにおける実務効率が向上する。さらに、今回、分担研究者・大沼が培養を行ったものを固定後、医薬基盤研究所に送付し、同所にて免疫染色を行って解析を行うことが可能であることを示した。この二施設間でのやりとりは、複数株について複数回行い、いずれも良好な結果が得られた。従って、イメージアナライザーを用いた解析は、特定の機関による評価を可能とし、今後、活用されるべきものと考えられる。

## 2. 細胞登録システムの基礎設計案についての検討

国内外で、ヒト iPS 細胞が多数樹立され、細胞情報を登録する動きが活発化してきている。H23 年度、H24 年度と比較しても、疾患特異的 iPS 細胞株や遺伝子操作で作成した亜株（例：GFP 発現細胞や特定の遺伝子を欠失した細胞）を含む細胞株など大幅に増加しており、樹立方法や培養条件などもバラエティーに富むものになっている。このような状況に対応可能な細胞登録システムの構築が必要である。

昨今、新しいリプログラム法や維持培養条件が次々と開発されており、論文には詳細に記載されていない場合も多い。幹細胞バンクなどにおいて資源化する際には、このようなリプログラム法や維持培養条件をトレースできるようにすることが重要である。今後は細胞バンクと樹立機関との情報交換を推進し、互換性の

あるデータベースを構築しておく必要がある。このことは、海外の細胞登録機関へ情報提供して研究を推進するためにも必須である。

## 3. 臨床応用などに資するヒト幹細胞の品質維持技術の策定

ヒト ES/iPS 細胞の培養は、従来研究ツールとして使われてきた癌細胞に比べて、培養が難しく、ちょっとしたピペット操作、培地交換のタイミング、継代時の操作時間などによりその後の品質に影響を与える。従って、小さな作業も含めて作業手順書を作成することが品質維持につながると考えられる。本研究では、細胞培養工程表、品質評価工程表ならびに、各培養工程の作業手順書を策定した。この作業手順書には、詳細な作業手順が記載され、どのような培養技術・手順をもってすれば良好に細胞を培養できるかという品質維持技術についても具体的にわかりやすく示している。今後は、この培養手順書を含む本研究成果を活用し、様々な施設において様々な培養技術者がヒト ES/iPS 細胞を安定に培養できるよう情報提供に努めていきたい。

無フィーダーで、既知の組成からなる無血清培養条件を用いる方が、従来のフィーダー細胞と KSR を用いた培養に比べて、ロット差なく培養維持できるものの、高度な培養の技術も必要であり、些細な操作が品質に影響を与える。今後、さらに安定した培養条件が開発されるとともに、それら培養条件に特有の品質維持技術を作業手順書に記載することによ

り、より安定して培養を行うことが可能となり臨床応用などに資する細胞の資源化が効率化されると考えられる。

## E. 結論

ヒト iPS 細胞としての幹細胞特性検査などを効率的に行うためには、様々な工程を考える必要がある。海外のヒト幹細胞バンクにおいて、複数機関から資源化工程についての研究論文が発表されているが、このような研究が重要であることを再認識した。本研究で策定した資源化のための培養・品質評価工程表は、実際に日本で樹立された複数のヒト iPS 細胞株を資源化することが可能であったことから、汎用性のあるものを確立することができたとと言える。しかし、ヒト iPS 細胞は樹立方法や培養方法、細胞そのものの特性など株間の差が大きく、また、今後さらにバラエティーに富んだ樹立方法、培養方法が確立されていくことから、実際に資源化を行った際に作業工程表に合わなくなることも予想される。本研究を基盤にして、樹立機関との意見交換を推進できることを願う。

## F . 健康危険情報

特筆すべき事項はなし。

## G. 研究発表

### 1 . 論文発表

1. Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, 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 Mar 20; 9(3).

2. Kinehara M, Kawamura S, Mimura S, Suga M, Hamada A, Wakabayashi M, Nikawa H, Furue K.M. Protein Kinase C-induced Early Growth Response Protein-1 Binding to SNAIL Promoter in Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells and Development 2014 Jan 11.

3. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. Development. 2014. 141(1):91-100.

### 書籍

4. 菅 三佳、古江 楠田 美保、GMP に準拠した細胞プロセッシングにおける無血清培地組成の考え方 . 実験医学別冊「ESiPS 細胞実験スタン

ダード」(2014) in press

5. 福田隆之、古江 - 楠田美保 *In vitro* 毒性・動態評価の最前線 第6章 ヒト iPS 細胞の供給と標準化 p81-87 シーエムシー出版 (2013)

6. 川寄敏祐、川寄伸子、中尾広美、松本正悟、古江 - 楠田美保、豊田英尚実験医学増刊：第三の生命鎖糖鎖の機能と疾患 (Vol.31 No.10) 第1章 作動原理と疾患、生命現象とのかかわり 新規 iPS/ES マーカー抗体とその応用 p129-133 羊土社 (2013)

その他

7. 古江 - 楠田美保 HUMAN SCIENCE (Vol.24 No.3) TOPIC : ヒト iPS 細胞研究の海外動向 p24-27 公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団 (2013)

## 2. 学会発表

### 【国際学会】

#### 一般講演

1. Risako Jouto, Megumi Matsumoto, Hiroto Sasaki, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Miho Kusuda-Furue, Ryuji Kato.

Morphology-based PSC culture protocol evaluation. 5th Annual Symposium of Stem Cell Society Singapore(SCSS) 2013.11.18-19 Singapore(Biopolis)

2. Mika Suga, Hiroaki Kii, Takayuki Uozumi, Yasujiro Kiyota, Miho K Furue. A noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. STEM CELLS IN TRANSLATION(ISSCR) 2013.9.15-18 Florence, Italy

3, Megumi Matsumoto, Hiroto Sasaki, Risako Joto, Mika Suga, Masaki Kinehara, Kana Yanagihara, Yasujiro Kiyota, Kei Kanie, Hiroyuki Honda, Miho Kusuda-Furue, Ryuji Kato. Image-based irregular iPS colony detection for intelligent automated cell culture. ISSCR 11<sup>th</sup> 2013.06.12-15 Boston, USA

4. Masaki Kinehara, Suguru Kawamura, Daiki Tateyama, Mika Suga, Hiroko Matsumura, Sumiyo Mimura, Mitsuhi Hirata, Kana Yanagihara, Miho K. Furue. Protein kinase C regulates human pluripotent stem cell self-renewal. ISSCR 11<sup>th</sup> 2013.06.12-15 Boston, USA

【国内学会】  
(一般演題)

1. 岡田光加、城戸理紗子、佐々木寛人、蟹江慧、菅三佳、柳原佳奈、福田隆之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム評価法 化学工学会 第 79 年会 2014 年 3 月 19 日 岐阜 (岐阜大学柳戸キャンパス)
2. 岡村美菜子、柳原佳奈、劉有容、加藤竜司、古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞株の内胚葉分化指向性を予測するための評価法の開発 第 13 回日本再生医療学会 2014 年 3 月 3 日 京都 (国立京都国際会館)
3. 古江 - 楠田美保 *in vitro* 毒性評価系構築におけるヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞の可能性 第 26 回 動物実験代替法学会 2013 年 12 月 19 ~ 21 日 京都 (京都テルサホール)
4. Miho K Furue Standardization of culture conditions for human pluripotent stem cells toward clinical application 第 40 回日本低温医学会 2013 年 11 月 28 日 愛知 (名古屋大学 野依記念学術交流館)
5. 三村純代、菅三佳、二川浩樹、古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞の単層無血清培養下における神経分化誘導法の開発 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・

総会 2013 年 11 月 23-24 日 東京 (日本歯科大学 生命歯学部 九段ホール)

6. 岡村美菜子、柳原佳奈、Shandar Ahmad、劉有容、平田みつひ、水口賢司、二川浩樹、古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞から内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株の選択方法 日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術大会・総会 2013 年 11 月 23-24 日 東京
7. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 iPS 細胞の創薬応用にむけた画像評価法 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2013 年 11 月 10 日 三重 (鈴鹿医療科学大学 白子キャンパス)
8. 古江 - 楠田美保 臨床用ヒト ES/iPS 細胞の培養に使える原材料についての考え方 第 14 回医薬品等ウイルス安全性研究会 2013 年 9 月 28 日 東京 (北里大学薬学部コンベンションホール)
9. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、古江美保、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 化学工学会 第 45 回秋季大会 2013 年 9 月 16-18 日 岡山 (岡山大学 津島キャンパス)

10.松本尚悟、中尾広美、野中元裕、川端健二、古江 - 楠田美保、滝島佑人、豊田英尚、川寄伸子、川寄敏祐  
ヒト iPS/ES マーカーとしての新規糖鎖認識抗体 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11-13 日 神奈川 (パシフィコ横浜)

11.古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞由来肝前駆細胞の可能性 第三回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 2013 年 9 月 6~7 日 東京 (一橋大学 一橋講堂)

12.Miho Furue-Kusuda, Takeki Tsutsui, Ken Kataoka Professional training for cell culture “Programs for beginners to experts” 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30~31 日 茨城 (独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター)

13.Kana Yanagihara, Yujung Liu, Ken Fukumoto, Hirotomo Banko, Keiichi Takagi, Masanori Hatashima, Satoshi Terada, Miho K. Furue. Ion beam modification of Jellyfish collagen-derived biomaterial as a scaffold for culturing human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30-31 日 茨城 (産業技術総合研究所 つくばセンター中央第一)

14. Minako Okamura, Kana

Yanagihara, Shandar Ahmad, Yujung Liu, Mituhi Hirata, Hiroki Nikawa, Kenji Mizuguti, Miho K. Furue. Prediction of hepatocytic differentiation tendency of human pluripotent stem cells. 日本組織培養学会 第 86 回大会 2013 年 5 月 30-31 日 茨城 (産業技術総合研究所つくばセンター中央第一)

(シンポジウム・ワークショップ等)

15. 古江 - 楠田美保 再生医療に求められる細胞培養 第 1 回 再生医療資格認定セミナー 2014 年 3 月 3 日 京都 (国立京都国際会館)

16. 城戸理紗子、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 画像情報処理を用いた iPS 細胞品質管理 予防早期医療センター第四回ワークショップ 2014 年 1 月 29 日 愛知 (名古屋大学 野依学術記念交流会館)

17. 古江 - 楠田美保 Q quality stability of human stem cells in cell banking 再生医療イノベーションシンポジウム 2014 年 1 月 14~15 日 大阪 (大阪大学中之島センター)

18. 古江 - 楠田美保 セミナー ヒト多能性幹細胞について 大阪ハイテクノロジー専門学校 2013 年



12月12日 大阪

19. 大沼清、藤木彩香、太刀川彩保子、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、楠田 - 古江美保、浅島誠 ヒト ES-iPS 細胞の無酵素培養 細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 2013年11月25日 東京(東京大学生産技術研究所コンベンションホール)

20. 城戸理紗子、松本恵、蟹江慧、佐々木寛人、本多裕之、清田泰次郎、古江美保、加藤竜司 画像情報処理を用いた iPS 細胞培養プロトコルの定量化 細胞アッセイ研究会シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 2013年11月25日 東京(東京大学生産技術研究所コンベンションホール)

21. 古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞の特性とその応用の可能性 長浜バイオ大学セミナー 2013年10月30日 滋賀(長浜バイオ大学)

22. 古江 美保 再生医療に利用する細胞の品質評価の重要性 日本分析化学会第62年会 特別シンポジウム講演 2013年9月10~12日 大阪(近畿大学 東大阪キャンパス)

23. 古江 - 楠田美保 再生医療に求められる細胞培養 第1回 再生医

療資格認定セミナー2014年3月3日 京都(国立京都国際会館)

24. 古江 - 楠田美保 Quality stability of human stem cells in cell banking 再生医療イノベーションシンポジウム 2014年1月14-15日 大阪(大阪大学中之島センター)

25. 古江 - 楠田美保 セミナー ヒト多能性幹細胞について 大阪ハイテクノロジー専門学校 2013年12月12日 大阪

26. 古江 - 楠田美保 ヒト多能性幹細胞の特性とその応用の可能性 長浜バイオ大学セミナー2013年10月30日 滋賀(長浜バイオ大学)

27. Miho Furue-Kusuda, Takeki Tsutsui, Ken Kataoka Professional training for cell culture “Programs for beginners to experts” 日本組織培養学会 第86回大会 2013年5月30-31日 茨城(独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター)

## II. 分担研究報告

### ヒト ES/iPS 細胞遺伝子発現プロファイルのバイオインフォマティクス解析

研究分担者 水口 賢司

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部  
バイオ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：**現在は、多くのヒト ES/iPS 細胞が国内外の様々な研究所において樹立され、様々な培養方法により培養され、研究に使用されている。これらの細胞を治療目的あるいは創薬研究目的のために利用するには、詳細な細胞特性分析や培養手順の標準化が必要である。これらの細胞株の差異、及び培養条件の差異を調査するために、我々は、NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において出されたヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現解析結果について、バイオインフォマティクス分析を行った。

#### A. 研究目的

ゲノム解析技術や各種ハイスループット実験技術の進展に伴い、医学生物学のいずれの分野においても大規模データの取り扱いが日常的なものとなり、コンピュータ解析が必須となっている。扱われるデータの種類は、遺伝子発現、相互作用ネットワーク、タンパク質立体構造など多種多様だが、それらの解析には、データベース技術や統計学、機械学習(コンピュー

タがデータから自動的にルールを抽出し学習する技術の総称)などの共通技術が用いられ、これらの基本技術に支えられ、生物情報からの知識抽出を目指す分野一般を広い意味でバイオインフォマティクスと呼ぶことが多い。

本研究では、各種 ES/iPS 細胞を特徴付けるために遺伝子発現情報を用いるが、その最初の段階では、膨大なデータ点(例えば、細胞株数×遺伝子数×実験条件)から何らかのパターン

を見いだせるかどうかという探索的な解析が重要な役割を果たす。階層的クラスタリングは、その目的のために一般的に広く用いられる手法であり、データ点にある共通の特徴を持つ部分集合(クラスタ)に分割する。例えば、各サンプルについて、特定の一群の遺伝子の発現量(測定値の組)を「遺伝子発現プロフィール」と呼ぶことにすると、2つのサンプル間でどの程度遺伝子発現プロフィールが似ているかを定義できるので、近い発現プロフィールを持つサンプルから順番に繋げていくことで、クラスタを構築することができる。

これらのクラスタリング結果の可視化のために、本研究ではヒートマップを用いる。これは、データを行列の形に整理し(例えば、行が遺伝子で列がサンプル)、データ値を色で表したものである。クラスタリングの結果に従って行と列の順序を入れ替えることにより、似た値を持つデータ点が近接し、視覚的に部分集合を識別することができる。

未分化状態で維持培養されたヒト ES/iPS 細胞は、Oct3/4、Nanog、Tra1-60、Tra1-81、Tra2-54、SSEA3、SSEA4 等の未分化マーカーを発現し、SSEA1 等の分化マーカーを発現しない。このことを判定する免疫染色やフ

ローサイトメトリー(FCM)解析は、細胞の培養状態、すなわち未分化/分化状態の比較的解釈が簡単な評価方法であり、世界中で採用されている。NIBIO ヒト幹細胞応用開発室においても、この評価方法が細胞の品質管理のひとつとして採用され、改良・改善を加えつつ、継続的に運用されている。しかし、免疫染色や FCM 解析では、基本的には蛋白質や糖脂質など抗体の抗原となりうる遺伝子の発現解析が可能であるが、mRNA レベルの遺伝子発現の解析が困難である。また、アフィニティーの高い抗体がある場合にのみ解析が可能であり、一度に解析できる蛋白質や糖脂質の数はある程度限られているため、網羅的に解析をすることはできない。しかし、ヒト ES/iPS 細胞を治療目的あるいは創薬研究目的のために利用するには、詳細な細胞特性分析や培養手順の標準化が求められている。そこで、NIBIO ヒト幹細胞応用開発室では、免疫染色、FCM 解析と平行して、未分化状態で維持培養されたヒト ES/iPS 細胞の RNA レベルの遺伝子発現を網羅的・定量的に測定するために、細胞株毎、培養条件ごとに RNA サンプルを採取し、PCR アレイをおこなってきた。我々は、NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において蓄積された PCR アレイ測

定結果をより詳細に解析し、細胞株の差異、及び培養条件の差異を調査することを第一の目的とし、バイオインフォマティクス解析を進めた。さらに、より迅速且つ正確で詳細な遺伝子発現プロフィール解析を進めるための解析手順を策定することを目的とし、アレイデータの取り扱い方法についての検討を行った。

## B. 研究方法

### 未分化状態でのヒト ES/iPS 細胞の遺伝子発現プロフィール解析

NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において、未分化状態でのヒト ES/iPS 細胞の特性を明らかにするため、未分化維持培養をおこなったヒト ES/iPS 細胞から RNA を抽出し、Human Stem Cell Pluripotency Array (Applied Biosystems) を用い、定量 RT-PCR による遺伝子発現プロフィール解析が行われた。その検査方法は、H23 年度に策定を行った国際幹細胞イニシャティブ (ISCI) にて策定された方法と同様のものがあった。

この PCR アレイ (Human Stem Cell Pluripotency Array) において発現量が測定される遺伝子は 96 遺伝子

であり、このうち 6 遺伝子 (ATCB、RAF1、CTNNB1、GAPD、EEFA1、18S) はハウスキーピング遺伝子と呼ばれる一般に発現量が変化しにくいとされる遺伝子群、残る 90 遺伝子が本来の解析対象の遺伝子群である (表 2)。各遺伝子の発現量の測定結果は CT 値 (ある一定の核酸量が測定されるまでに必要な PCR の増幅回数; 遺伝子発現量が高いと CT 値は低い) として表される。ハウスキーピング遺伝子をコントロールとしてこの CT 値に補正をかけ、サンプル間で遺伝子発現量を直接比較できるように算出したものが CT 値である。我々は、まず、CT 値を算出する際のコントロールとして適切なハウスキーピング遺伝子 3 遺伝子 (ATCB、RAF1、GAPD) を選抜し、これらをもとに算出された CT 値を用いて解析を進めた。

階層的クラスタリングは、R 統計ソフトウェア (<http://www.r-project.org>) の `hclust` 関数で実行し、距離としてユークリッド距離を使用、`average-linkage` のクラスタリングを行った。ヒートマップは、R による `gplot` パッケージ中の `heatmap2` 関数により作成した。

## C. 研究結果

## ハウスキーピング遺伝子群：

前述したとおり、ハウスキーピング遺伝子群は一般的に発現量の変化しにくいものとされている。しかしながら、ヒト ES/iPS 細胞においてはハウスキーピング遺伝子群の発現の挙動が一般細胞と異なり、必ずしも一定でないということが我々の解析によっても明らかとなった。そこで、このバイオインフォマティクス解析においては、CT 値による解析をより正確なものにするために、ATCB、RAF1、および GAPD の 3 遺伝子のみをコントロール遺伝子として取り扱うことと決定した。

## プレ解析：

NIBIO ヒト幹細胞応用開発室において、ヒト ES/iPS 細胞の未分化維持培養過程におけるヒト幹細胞の未分化マーカーや早期分化マーカーなどの遺伝子群の発現の安定性を確認するために、Human Stem Cell Pluripotency Array を用いて、対象株について異なる継代数で複数回、測定された。その結果について、我々はまず、上記のコントロール遺伝子を用いて CT 値の算出を行った。

## 遺伝子発現プロフィール解析

これまでに、このサンプルごとの CT 値比較解析により、同一の細胞株、同一の培養方法によってえられた細胞サンプルであっても、継代数が異なる場合、発現量が一定している遺伝子がある一方、ある程度発現量の異なる遺伝子が存在することが明らかとなった。つまり、未分化維持培養を続けていたとしても、継代ごとに遺伝子発現プロフィールが異なるということである。我々は、このことに注目をして、より詳細にサンプル間の遺伝子発現プロフィール解析を行った。

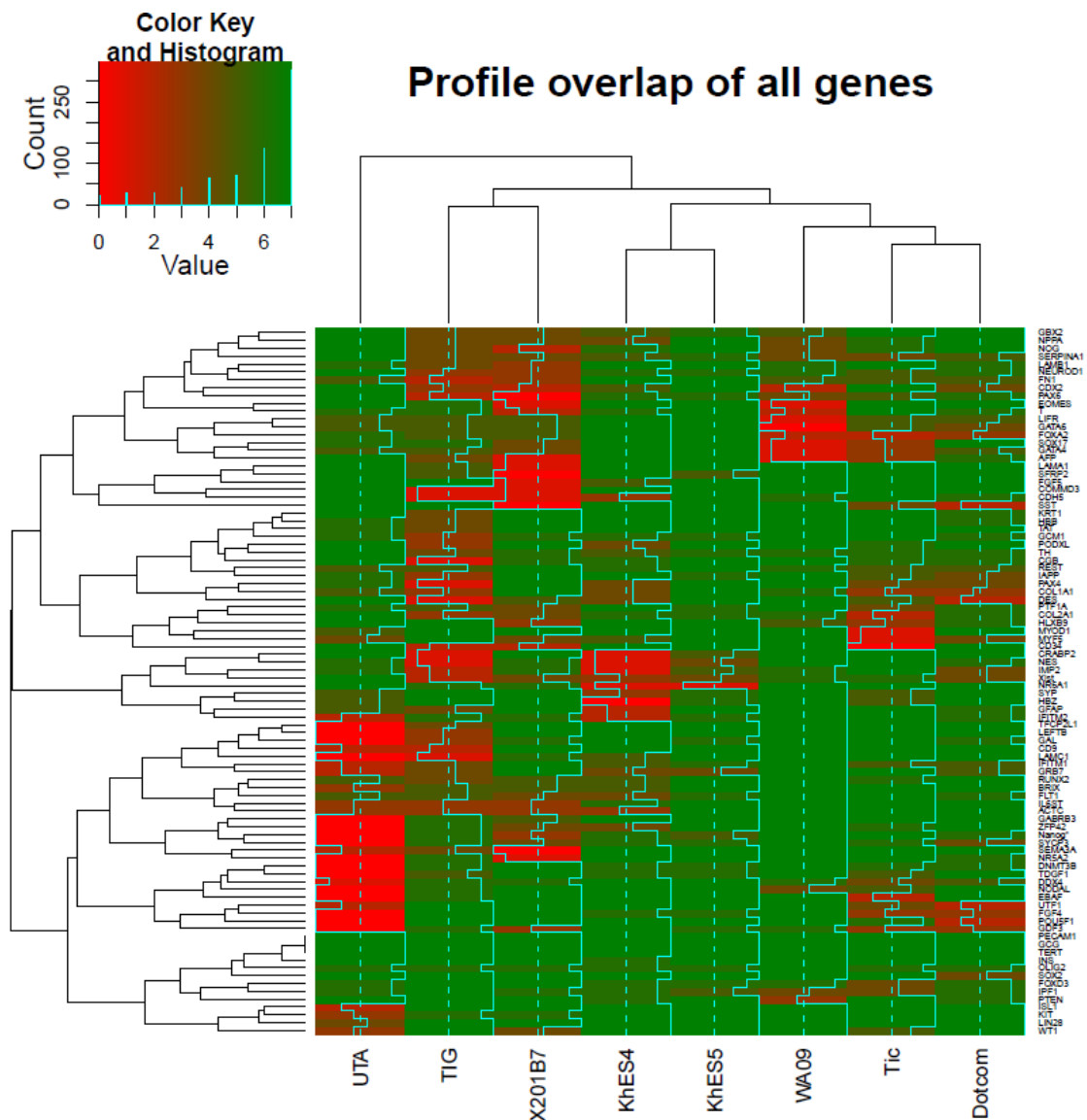
UTA-SF2-2 は、東京大学浅島研究室にて無フィーダー・無血清にて樹立され寄託されたヒト iPS 細胞である。NIBIO ヒト幹細胞応用開発室では、UTA-SF2-2 の資源化にあたり、ウシファイブロネクチンならびに hESF9a 培地を用いた無フィーダー・無血清の培養工程における品質管理法を策定し、実際に資源化をおこなっている。その過程で、品質管理の一環として、RNA サンプルを 3 回、異なる継代数で採取し、遺伝子発現プロフィール解析が行われた。遺伝子発現プロフィールは 3 サンプル間で非常によく一致し、このサンプルにおいて

遺伝子発現が安定していることが明らかとなった。

一方、Dotcom は分化誘導に適しているため資源化細胞の需要も高いが、一般には安定して未分化に維持して培養することが難しいとされている。この Dotcom は未分化維持培養の過程においても、たびたび分化する傾向があるため、資源化や研究で品質管理を行った場合に、免疫染色や FCM 解析の結果、未分化細胞の割合が通常より低い（全体の 80% 以下）と判定されることがある。今回、このバイオインフォマティクス解析をおこなった

サンプルは、少なくとも 80% 以上未分化細胞が含まれるという細胞集団のサンプルから RNA を抽出し、遺伝子発現を測定したものであるが、個々のサンプル間の遺伝子発現プロフィールは大きく異なる場合があることが判明した。つまり、免疫染色や FCM 解析の未分化/分化マーカー発現解析のみでは判明しなかった遺伝子発現の変化が、PCR アレイによる網羅的遺伝子発現測定とバイオインフォマティクス解析を組み合わせることによって詳細に解析できたということを示している。





**図2 各細胞株を特徴付ける遺伝子発現パターンの比較**

まず 8 つの各細胞株毎に、各遺伝子の発現量の分布を計算した。次に、各細胞株と各遺伝子に対して、発現量分布の 25%-75%の範囲が別の細胞株の対応する範囲と重なる場合には 1 を重ならない場合には 0 を与えた。最後に、他の全ての細胞株との比較でこの数を足し合わせたものを元の細胞株と遺伝子に割り当てた（最小が 0 で最大が 7。この数を「細胞株非特異的発現量」と呼ぶ）。ヒートマップは、細胞株非特異的発現量を示したもので、遺伝子と細胞株のそれぞれについて、階層的クラスタリングを実行している。



## D. 考察

図 2 から、限られた少数の遺伝子のみが、細胞株に特異的な発現分布を示すことがわかった。特に、UTA は他の細胞株に比べて、より多くの特異的な遺伝子を持っている。また、Dotcom と Tic は、この解析による遺伝子発現パターンの観点からは極めて類似していることが示された。(但し、分化マーカーとして知られている GCM1、LAMB1、NES の発現量分布は、Tic に特異的である。) さらに、KhES4 と KhES5 は同じクラスタに入ることが示された。

本報告には示していないが、同様の解析を特定のマーカー遺伝子のみについて行なったところ、各細胞株(特に UTA) を特徴付ける遺伝子のほとんどは、分化マーカーであることが分かった。

本研究で新たに定義した「細胞株非特異的発現量」は、各遺伝子の発現量分布がどの程度、細胞株に固有かを定量化した点がユニークだと考えられる。これまでに報告された類似の解析のほとんどが、細胞株ペアの比較にとどまるのに対して、この量を用いることで、3 つ以上の細胞株についての特徴を解析することが可能になった。

但し、ここで定義した「細胞株非特

異的発現量」は、その遺伝子の発現量の大小を示しているわけではない点に注意する必要がある。特異的な遺伝子として同定されたものが、各細胞株でどのような発現量を示すかは元のデータに戻って調べねばいけない。

本研究では、遺伝子の数に比べてサンプル数は比較的少ない(各細胞株に 3-5 サンプル)ため、発見された遺伝子発現パターンが細胞株を十分に代表できているかどうかについては、今後の実験で検証していく必要があるだろう。そのためにも、本研究で得られた網羅的な遺伝子発現情報などのデータを蓄積し、将来の解析と組み合わせられる形で整理しておくことが重要である。

## E. 結論

網羅的遺伝子発現測定とバイオインフォマティクス解析を組み合わせ、ヒト ES/iPS 細胞の株間の差異や細胞の培養の状態の微妙な差異をより正確に的確に検出できることが確認された。ヒト iPS 細胞としての幹細胞特性検査の結果を効率的に解析していくためには、バイオインフォマティクス解析が不可欠である。その際に、遺伝子発現プロフィールだけでなく、

培養工程、培養に使用したマテリアル、染色体数や免疫染色・FCM 解析結果等の品質評価の情報をトレースできるようセットで情報を管理していくことが、より発展した品質管理につながり、より詳細な細胞特性解析を可能にするだろう。今後は、このような膨大な情報を適切に管理し、解析に役立てていくことがより一層重要になってくる

## F . 健康危険情報

特筆すべき事項はなし。

### 参考論文

[1] Tang C. K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Aoshi T., Jounai N., Ito J., Ohata K., Kobiyama K., Dessailly B.H., Kuroda E., Akira S., Mizuguchi K., Coban C., Ishii K., The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant, *PLoS One*, 8(3):e60038. 2013

[2] Dessailly BH, Dawson NL, Mizuguchi K, Orengo CA., Functional site plasticity in domain superfamilies, *Biochim Biophys Acta*, 1834(5):874-89, 2013

[3] Tripathi L., Kambara, H., Chen Y. A. , Nishimura Y., Moriishi, K., Okamoto T., Morita, E., Abe, T., Mori, Y., Matsuura, Y., Mizuguchi K., Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach, *Journal of Proteome Research*, 12(6):2537-51, 2013

[4] Fujita J., Miyazaki Y., Hirose M., Nagao C., Mizohata E., Matsumoto Y., Mizuguchi K., Inoue T., Matsumura H., Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic study of FtsA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 69(Pt 8):895-8, 2013

[5] Nystrom J., Igarashi Y., Ito M., Morita M., Nakatsu N., Yamada H., Mizuguchi K., Toxygates: interactive toxicity analysis on a hybrid microarray and linked data platform, *Bioinformatics*, 1;29(23):3080-6, 2013

[6] Yoshimaru T., Komatsu M., Matsuo T., Chen Y. A., Murakami Y., Mizuguchi K., Mizohata E., Inoue T., Akiyama M., Yamaguchi R., Imoto S., Miyano S., Miyoshi Y., Sasa M., Nakamura Y., Katagiri T.,

Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells, Nat Commun, 4:2443, 2013

[7] Andrabi M., Mizuguchi K., Ahmad S., Conformational changes in DNA-binding proteins: Relationships with precomplex features and contributions to specificity and stability., Proteins, in press

[8] Hobro A. J., Standley D.M., Ahmad S., Smith N.I., Deconstructing RNA: optical measurement of composition and structure., Phys Chem Chem Phys, 15(31):13199-208, 2013

[9] Takemura N., Kawasaki T., Kunisawa J., Sato S., Aayam L., Kobiyama K., Aoshi T., Ito J., Mizuguchi K., Karuppuchamy T., Matsunaga K., Miyatake S., Mori N., Tsujimura T., Satoh T., Kumagai Y., Kawai T., Standley D., Ishii K., Kiyono H., Akira S., Uematsu S., Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome, Nature Communications, in press

[10] 水口賢司, 創薬支援のデータベースとバイオインフォマティクスに

よるデータ統合, SAR News, 24:2-6, 2013

## G. 研究発表

### 1. 学術論文発表

1 . Nagao C., Nagano N., Mizuguchi K., Prediction of detailed enzyme functions and identification of specificity determining residues by random forests, PLoS One, 9(1):e84623. 2014

### 2. 学会発表

#### 【国際学会：一般講演】

1 . Ahmad S., Mizuguchi K., Global gene co-expression patterns improve consistency between experimentally detected host factors crucial for influenza virus life cycle, Keystone Symposium on Advancing Vaccines in the Genomics Era, Rio de Janeiro, Brazil, 2013.11.1

2 . Ito J., Ahmad S., Ishii K., Mizuguchi K., A Comprehensive Analysis of miRNA Expression Profile in Human Serum Collected from Type-A Influenza Vaccine Clinical Trial, Keystone Symposium on Advancing

Vaccines in the Genomics Era,  
Rio de Janeiro, Brazil, 2013.11.2

3. Shirai H., Ikeda K., Yamashita K., Tsuchiya Y., Sarmiento J., Liang S., Mizuguchi K., Morokata T., Higo J., Standley D.M., Nakamura H., High-resolution modeling of antibody structures by a combination of bioinformatics, expert knowledge, and molecular simulations., Antibody Engineering and Therapeutics Conference, Huntington Beach, CA, USA, 2013.12.8

【国内学会：一般講演】

4. 岡村美菜子, 柳原佳奈, Ahmad S., 劉有容, 平田みつひ, 二川浩樹, 水口賢司, 古江 - 楠田美保, ヒト多能性幹細胞から肝細胞に優れた細胞株を予測するための評価方法の開発, 第 86 回日本組織培養学会年会, 大阪, 2013.5.30
5. 木田博, 濱野芳匡, 井上義一, 水口賢司, Tripathi L., 広瀬雅樹, 矢野幸洋, 多田康子, 西川博嘉, 坂口志文, 熊ノ郷淳, 特発性非特異的間質性肺炎における疾患特異的自己抗体の検索, 第 16 回間質性肺炎細胞分子病態研究会, 東京, 2013.8.24

6. 五十嵐芳暢, Nystrom J., 森田瑞樹, 伊藤真和吏, 中津則之, 山田弘, 水口賢司, Toxygates, トキシコゲノミクスデータと linked data の統合解析プラットフォーム, トーゴの日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.4

7. 伊藤真和吏, 森田瑞樹, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂手龍一, 増井徹, 水口賢司, 創薬・疾患研究のための生命科学分野のデータベース横断検索 システム Sagace, トーゴの日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.5

8. 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司, TargetMine, a data warehouse system for target discovery, トーゴの日シンポジウム 2013, 東京, 2013.10.5

9. 藤田純三, 宮崎祐満, 廣瀬未果, 長尾知生子, 溝端栄一, 松本佳巳, 水口賢司, 井上 豪, 松村浩由, メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)由来 FtsA の結晶化, 平成 25 年度日本結晶学会年会及び総会, 熊本, 2013.10.12

10. Andrabi M., Mizuguchi K., Ahmad S., DNA-binding-induced conformational changes in protein, 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都, 2013.10.28

11. 池田和由, 伊東純一, 水口賢司,

富井健太郎, PoSSuM Updates and Integration With ChEMBL For Application of Drug Reuse, CBI学会 2013大会, 東京, 2013.10.28

12. Ahmad S., Mizuguchi K., Sequence-based prediction of interacting residue-pairs in proteins to integrate prediction of partners and binding sites, 日本バイオインフォマティクス学会 2013年年会 (JSBi 2013), 東京, 2013.10.29

13. 土屋裕子, 水口賢司, Analysis of antibody-antigen interactions and prediction of their complex structures, CBI学会 2013大会, 東京, 2013.10.29-30

14. 長尾知生子, 長野希美, 水口賢司, A random-forest based method that can predict detailed enzyme functions and also identify specificity determining residues, CBI学会 2013大会, 東京, 2013.10.29

15. 陳怡安, Tripathi L., 水口賢司, Applications of an integrated data warehouse system in to investigate complex biological systems, CBI学会 2013大会, 東京, 2013.10.29

16. 田端桂介, 有本大, Tripathi L., 水口賢司, 森田英嗣, フラビウイ

スタンパク質と宿主因子の相互作用ネットワーク解析, 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 神戸, 2013.11.9

17. 岡村美菜子, 柳原佳奈, Ahmad S., 劉有容, 平田みつひ, 水口賢司, 二川浩樹, 古江-楠田美保, ヒト多能性幹細胞から肝細胞内胚葉分化誘導効率に優れた細胞株, 日本口腔組織培養学会, 日本歯科大学 東京, 2013.11.23

18. 伊藤真和吏, 五十嵐芳暢, 陳怡安, 長尾知生子, 坂手龍一, 水口賢司, 生命科学分野の横断検索サービスとセマンティック・ウェブ, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013.12.6

#### 【国際学会：招待講演】

19. 水口賢司, Data integration and protein network analysis for early stage drug discovery, Structural Life Science 7<sup>th</sup> International Conference on Structural Genomics (ICSG2013-SLS), 札幌, 2013.7.31

#### 【学会以外のセミナー、講演会等】

20. 水口賢司, 医薬基盤研における創薬支援データベースの開発, シリーズ研究講演会「薬づくりの新しいR

- & Dモデルを探る」第1回, 東京, 2013.6.20
21. 水口賢司, 創薬支援のためのデータ統合とデータベース開発, 東北大学大学院情報科学研究科、仙台, 2013.7.10
22. 水口賢司, Computational and systems approaches to early stage drug discovery, 九州大学 生体防御医学研究所附属生体多階層システム研究センター, 福岡, 2013.9.25
23. 水口賢司, データ統合とネットワーク解析による創薬初期研究の支援, 第3回シスメックスプロテインカンファレンス、東京, 2013.10.18
24. 水口賢司, データ統合とネットワーク解析による創薬支援, 第9回 霊長類医科学フォーラム, つくば, 2013.11.14
25. 水口賢司, 創薬の初期研究におけるデータ統合:ターゲットと安全性の評価, 第345回 CBI学会研究講演会, 東京, 2014.1.9
26. 水口賢司, ‘アジュバントゲノミクス’に向けた統合データベースの現状, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21
27. Ahmad S., Ito J., Mizuguchi K., An integrated map of influenza-virus life-cycle host factors and their predicted micro-RNA regulators for bottom-up bio-marker discovery, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21
28. 伊東純一, Ahmad S., Tripathi L., 石井健, 水口賢司, ‘インフルエンザワクチンが誘発する発熱」の予測へ向けた血清中マイクロ RNA マーカーの探索, 第7回次世代アジュバント研究会, 大阪, 2014.1.21
29. 水口賢司, データベースは、創薬初期でのターゲット評価と安全性の予測に役立つか?, 「創薬研究におけるバイオデータベース講習会」(第三回データベース講習会@大阪(池田)), 大阪, 2014.1.24
30. 水口賢司, 計算生物学によるシステムの理解から創薬へ, 京都大学理学部, 京都, 2014.2.18

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

FACS 解析・バイオインフォマティクス解析

研究分担者 大沼清

長岡技術科学大学・産学融合トップランナー養成センター  
特任准教授

**研究要旨：**ヒト ES・iPS 細胞が様々な研究者により樹立・培養されているが、ヒト ES・iPS 細胞の培養は難しく、施設や担当者により細胞状態が異なるという問題がある。そこで、異なる施設における細胞の状態を、統一的・定量的に検査・管理するため、イメージングサイトメトリー (I-FACS) 解析に着目した。昨年度までの研究で、FACS 解析と I-FACS 解析での結果を比較した結果、非常に強い相関が得られた。今年度に於いては、異なる 3 つの細胞株を用いて複数回の実験を行い、同様の結果が得られた。本研究により、様々な施設で培養している細胞の状態を、幹細胞バンクにおいて統一的に測定できる品質管理法の作業工程が策定できた。今後は多面的に検証し、実用化に向け改訂する。

A. 研究目的

ヒト胚性幹 (ES) 細胞 [1]、誘導多能性幹 (iPS) [2, 3] を再生医療や創薬へ応用・実用化する研究が盛ん

である。特に日本に於いては目覚ましく進んでいる。昨年は、再生医療推進法が成立した。また、網膜色素変性症の治療を目的とした臨床試験が理化学研究所を中心に開始された。ヒト iPS 細胞より網膜の細胞を分化

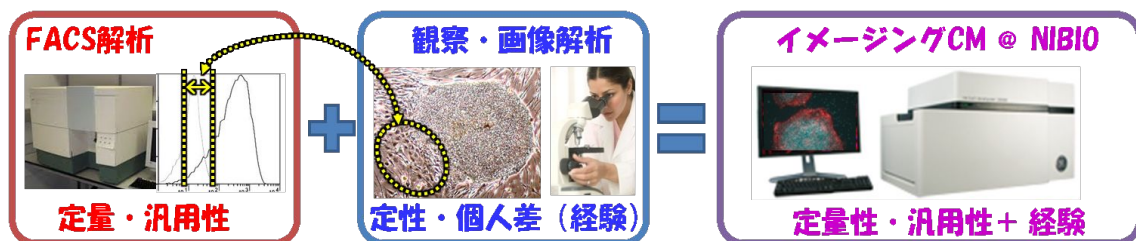


図 1: FACS 解析と顕微鏡観察と I-FACS 解析

誘導し、それをシート状に加工して移植する計画である。更には、日本製薬工業協会（製薬協、東京都中央区、手代木功会長）は昨年（2013年）ヒトiPS細胞を用いた薬剤の安全性評価ツール検証のためのコンソーシアム（ヒトiPS細胞応用安全性評価コンソーシアム）を立ち上げ、約40社が参加している。

このようなヒト幹細胞を用いた実用化の流れの中で、品質の管理が大きな問題となっている[4]。ヒトPS細胞は分化し易いため、同じ研究者が培養していても、1回の継代で状態が大きく変わってしまい、同じ手法で実験をしても得られる結果が大きく異なる事が頻繁に起こる。2014年3月に京都で行われた日本再生医療学会に於いても、細胞の品質管理、標準化などに関して多くの発表があった。幹細胞を資源としてあつかうバンク運営においては、このような研究所・研究者による違いを無くし、誰もが同じ結果が得られるような品質管理のための基準の策定が非常に重要となる[4]。

本研究課題では、FACS解析と顕微鏡観察との両方の利点を併せ持つイメージングサイトメトリー（I-FACS）を利用し、遠隔地のヒトiPSユーザーの細胞の培養状態を管理するためのプラットフォームを作る事を目標としている（**図 1**）。I-FACSは顕微鏡観察とFACS解析は相補うような形の解析法で近年注目されている。培養細胞

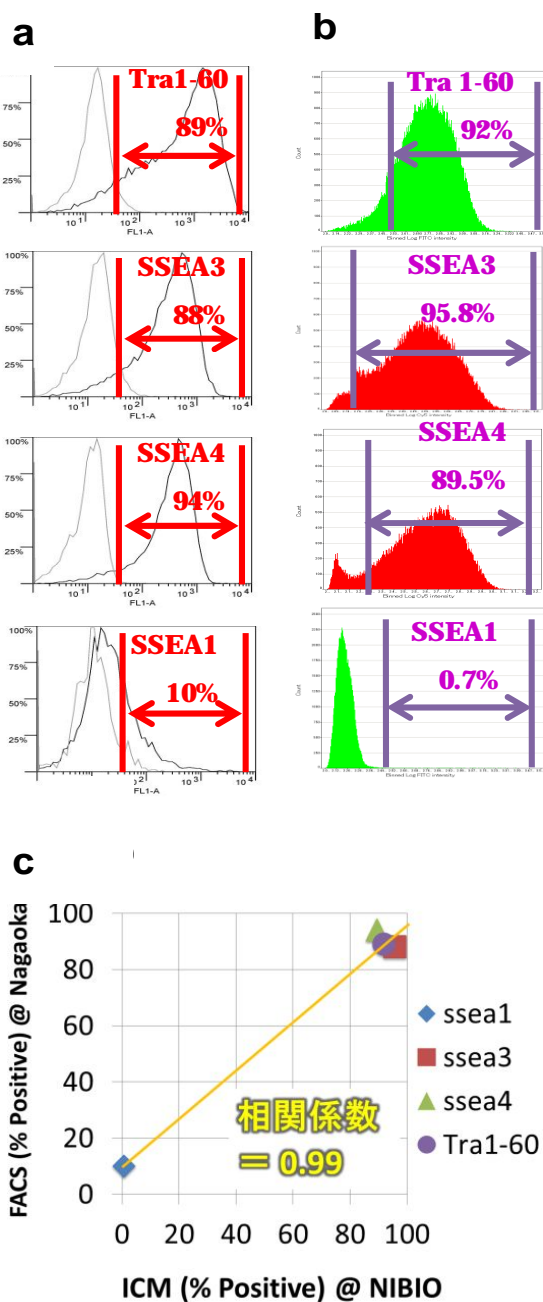


図 2： 昨年度の実験。培養施設（長岡技術科学大学）での FACS 解析結果と、検査施設（医薬基盤研）に於ける I-FACS 解析結果の比較。培養施設に於いて培養したヒト iPS 細胞を FACS 解析した結果（a）と、その姉妹培養した細胞を固定して検査施設に送付して I-FACS で解析した結果（b）と、両者の比較（c）。



を剥がさずに広範囲の写真を自動的に撮り、1個1個の細胞の蛍光量を定量解析する。細胞を剥がさず空間情報を保ったまま解析するため、顕微鏡観察と同じように熟練の技術者が細胞状態を診断できるうえ、FACS解析と同等の定量解析が可能となる。

昨年度は、主に3項目に関して検討した。1)固定ヒトiPS細胞の送付、2)フィーダー細胞の除去、3)上記1)2)の方法を用いて実際にヒトiPS細胞のTic株を培養し、一部を顕微鏡観察とFACS解析し、一部を固定して医薬基盤研へ送付してI-FACSで解析した。両者の結果を比較・解析した結果、強い相関が得られた(図2)。

本年度は、同様の実験を3種の細胞株(ヒトiPS細胞のTic株、201B7株、253G1株)を用い、統計的な解析ができるように実験を繰り返すと共に、データの解析方法、特に閾値の変化による結果の違いに関して検討した。

## B. 研究方法

### ヒト iPS 細胞の培養

昨年度と同様、ヒト iPS 細胞の培養法は、一般的に行われている培養法に準じた[2, 5, 6]。ヒト iPS 細胞 Tic 株は成育医療センターで樹立され、医薬

基盤研究所・JCRB 細胞バンクを通じて入手した(資源番号: JCRB1331)[7]。ヒト iPS 細胞 201B7 株[2]と 253G1 株[8]は理研 BRC 細胞バンク(つくば、茨城)より、ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて入手した。細胞の培養は以下の通り。D-MEM/F12 に KSR、2-mercaptoethanol、MEM non-essential amino acids、bFGF、Penicillin-Streptomycin を加えた培地(KSR 培地)を用いて、フィーダ細胞(MEF)上で 37℃、5% CO<sub>2</sub> に設定したインキュベータで培養した。継代はまず、培養皿から培地を除き、ヒト iPS 細胞解離液(CTK 溶液[5])を 0.5 ml 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 加えてピペティングし、細胞懸濁液を 15 ml チューブに移した。このチューブを 10 × g、1 分間遠心し、上清を除き、KSR 培地を 1 ml 加えた。MEF を培養している培養皿から MEF 培地を除き、KSR 培地に 5 μM ROCK inhibitor[9]を加え、ヒト iPS 細胞懸濁液を 1/6 ~ 1/3 加え、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てインキュベータで培養した。フィーダ細胞は、継代 3 回目の MEF を mitomycin C で 90 分間処理し、0.1% ゼラチンコート培養皿に播種し、調製した。

### ヒト iPS 細胞の送付

細胞を送付する際、気泡の混入し、細胞が破壊ないようにするため、昨年度確立した以下の方法を使用した。手短に述べる。hiPS 細胞を培養している 6 ウェルプレートから培地を除き、カルシウム、マグネシウム入りのリン酸緩衝溶液 (PBS+/+) で 2 回洗浄した後、カルシウム、マグネシウム入りの 4% ホルマリン溶液を各ウェルに 500  $\mu$ l 加えて室温で 20 分間静置して固定した。PBS+/+ で 2 回洗浄した後、各ウェルを PBS+/+ で満たし、気泡が残らないように容器全体をプラスチックパラフィンフィルム (パラフィルム、Pechiney Plastic Packaging Company, Menasha, WI, USA) で覆い、その上からプレートの蓋で押さえ、更に蓋をパラフィルムで固定した。6 ウェルプレートは緩衝材で覆い、ダンボールに詰め、宅配便で冷蔵 (4 度) で送付した。

### **未分化状態でのヒト iPS 細胞のフローサイトメトリ解析方法の検討**

FACS 解析の手順も昨年度と同様、以下の通り [6]。培養皿から培地を除き、PBS で 2 回洗浄した。PBS を除き、0.02% EDTA-PBS を 1 ml 加えてインキュベータで 15 分間静置した。1 mg/ml BSA-PBS を加え、ピペッティングして細胞懸濁液を 15 ml チューブに移した。このチューブを 400  $\times$  g、3 分間遠心し、上清を除き、500  $\mu$ l の 4%ホルマリンを加えて室温で

20 分間静置した。細胞を固定後、400  $\times$  g、3 分間遠心して上清を除き、 $1 \times 10^7 \sim 3 \times 10^7$  cells/ml になるように 1 mg/ml BSA-PBS で調製した。細胞懸濁液を 20  $\mu$ l ずつ 15 ml チューブに移し、10 mg/ml BSA-PBS で 1/50 に希釈した一次抗体 (下記) を 20  $\mu$ l 加えた。これらの一次抗体を加えた 15 ml チューブはアルミ箔で遮光し、4 で一晩静置した。一次抗体を除去するため、チューブに PBS を 4ml 加え、600  $\times$  g、3 分間遠心して上清を除いた。一次抗体を反応させたチューブには 10 mg/ml BSA-PBS で 1/250 に希釈した Alexa Fluor 488 標識二次抗体を 20  $\mu$ l 加えた。さらに、各チューブに PE 標識した抗 feeder 抗体 (130-096-094、Milteny Biotec K.K.) を加えた。これは、フィーダー細胞を標識・除去し、ヒト ES・iPS 細胞のみを解析するために加えた。15 ml チューブはアルミ箔で遮光し、4 で 30 分間静置した。二次抗体を除去するため、チューブに PBS を 4ml 加え、600  $\times$  g、3 分間遠心して上清を除いた。各チューブに 1 mg/ml BSA-PBS を 500  $\mu$ l 加えた。その後、JSAN セルソーター (ベイバイオサイエンス株式会社、兵庫) を用いて、フローサイトメトリ解析を行った。

ヒト ES/iPS 細胞の未分化マーカーとして以下の 4 抗体を使用した。抗 Stage specific Embryonic Antigen 3 (SSEA3) 抗体 (mouse monoclonal IgM, clone MC-631, R&D, Cat# MAB1434, 1/100)、抗 Stage specific Embryonic

Antigen 4 (SSEA4) 抗体 ( mouse monoclonal IgG3, Cat# sc-21704, Santa Cruz Biotechnology, 1/100 ) 抗 Tra 1-60 抗体 (mouse monoclonal IgM, Cat# sc-21705, Santa Cruz, 1/100)。抗 Oct3/4 抗体( rabbit polyclonal IgG, Cat# sc-9081, SantaCruz1, 1/500 )。更に、分化し始めた細胞を確実に検出するために、以下の代表的な初期分化マーカーも一つ使用した。抗 Stage specific Embryonic Antigen 1 (SSEA1) 抗体 ( mouse monoclonal IgM, Cat# sc-21702, Santa Cruz, 1/100 )

## **データ解析**

FACS 解析データと I-FACS 解析データの比較をするため、マイクロソフトエクセル、及びバイオインフォマティクスの分野をはじめ、工学などの幅広い分野で使われている統計解析用のオープンリソースのフリーソフトの R を使用した( <http://www.r-project.org/> )。

## **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 i P S 細胞の導入、ヒト i P S 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 i P S 細胞の移植、ヒト i P S 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**

### **FACS 解析と I-FACS 解析データの所見**

今年度は 3 つの細胞株 ( 201B7 株、253G1 株、Tic 株 ) で、それぞれ 3 回以上実験を行った。201B7 株 [2]、253G1 株 [8] は京都大学でレトロウイルスによる遺伝子導入で樹立された株で、前者は 4 遺伝子 ( OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC )、後者は 3 遺伝子 ( OCT3/4, SOX2, KLF4 ) を使用している。Tic 株 [7] は成育医療センターに於いてレトロウイルスによる 4 遺伝子 ( OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC ) を遺伝子導入して樹立された株である。

ヒト PS 細胞の未分化性を FACS と I-FACS で検査するため、ヒト ES・iPS 細胞の未分化マーカーとして広く使われている Stage specific Embryonic Antigen 3 (SSEA3)、SSEA4、Tra 1-60 の 3 種類に加え、より正確性を期すために転写因子の Oct3/4 も未分化マーカーを用いた。また、初期分化マーカーとして SSEA1 を用いた。培養施設（長岡技科大）では同じ細胞を 10cm 培養皿、6 ウェルプレートで培養し、10cm 培養皿の方は FACS 解析を行い、6 ウェルプレートは固定・透過した後診断施設（医薬基盤研究所）に送付し I-FACS 解析を行い、両者の結果を比較した。

3 株で行った結果を一見して分かる通り、3 つの細胞株でほぼ同様の結果が得られている（図 3）。4 つの未分化マーカー（OCT3/4、SSEA3、SSEA4、TRA-1-60）の値が、横軸（検査施設における I-FACS）と縦軸（培養施設における FACS）の両方が大きい値をとっている（グラフ右上に点が集中している）。それに対し、初期分化マーカーの SSEA1 が横軸・縦軸共に低い値をとっている（グラフ左下に点が集中している）。以上の事から、全ての細胞に於いて、FACS、I-FACS 解析の両方において未分化性が高いことが確認できた。

細かくデータを見ると、FACS、I-FACS データの間で違いも見られた。4 つの未分化マーカーに関しては、横軸の値が全て 80%以上であるのに対し、縦軸の値は 80%以下の点が多く、

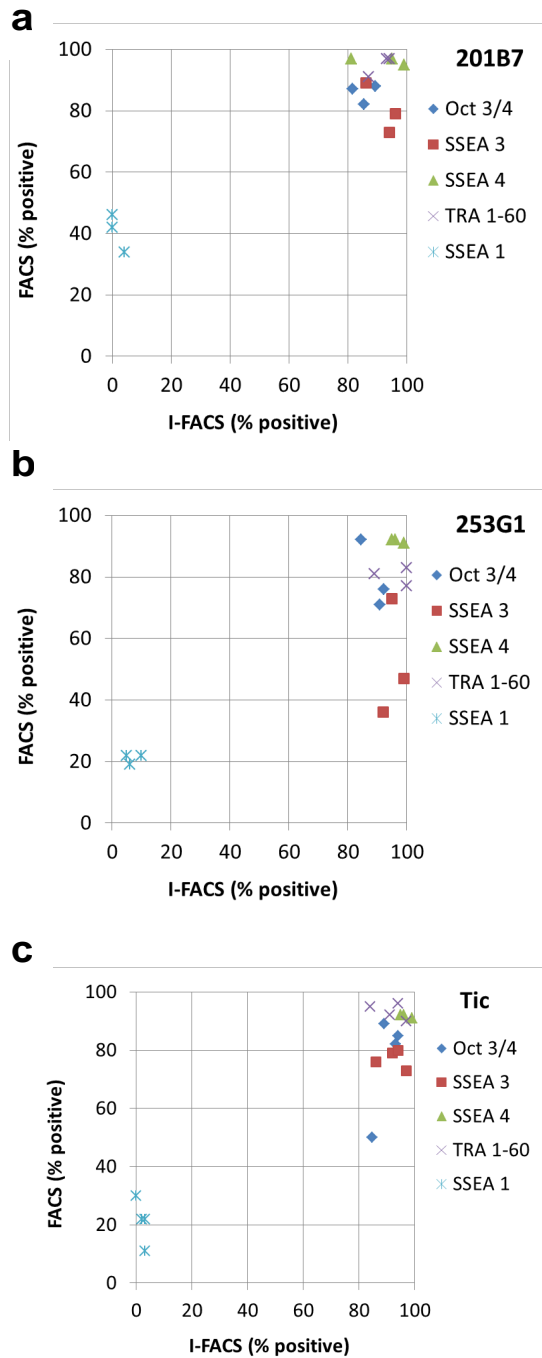


図 3：3 つのヒト iPS 細胞株での、培養施設（長岡技科大）における FACS 解析結果と、検査施設（医薬基盤研）に於ける I-FACS 解析結果の比較。使用した細胞は、京都大学山中研の 201B7 株（a）、253G1 株（b）、及び成育医療センターの Tic 株（c）。縦軸、横軸はそれぞれ FACS 解析、I-FACS 解析した各マーカーの陽性率。SSEA1 は初期分化マーカーでその他は未分化マーカー。

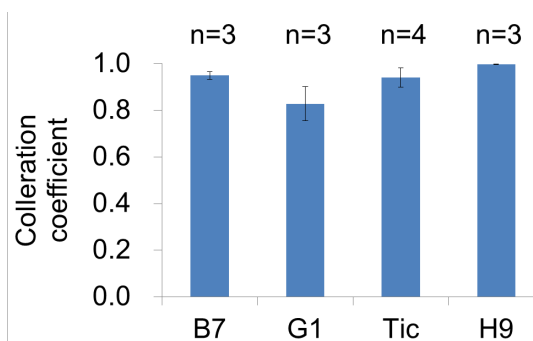
中には 40%を下る点もみられる。また、SSEA1 の結果に於いては、横軸の値が全て 10%以下であるのに対し、縦軸の値はほとんどが 10%以上であり、中には 40%以上の点もみられる。以上のことから、検査機関での I-FACS 結果（縦軸）は培養機関における FACS 結果（縦軸）に比べて、未分化率が安定して高い値を示している事が示唆される。

更に、細胞株間でも違いが観察された。201B7 株（図 3a）は SSEA1 の横軸の値より縦軸の値が高めだったことから、培養機関における FACS 解析では初期分化マーカーの発現率が高く見積もられたことになる。また、253G1 株（図 3b）は SSEA3 の横軸の値より縦軸の値が低めであったことから、培養機関における FACS 解析では未分化マーカーの一つの発現率が低く見積もられたことになる。ただし、これらの細胞は別々の時期に培養し、解析されたため、必ずしも細胞の個性を表しているのではないかもしれない。

総合して示唆されることは、I-FACS の解析結果は安定している事である。

### **FACS 解析と I-FACS 解析データの相関**

FACS 解析と I-FACS 解析の結果を比較するため、図 3 に示したデータを元にピアソンの相関係数を算出した（図 4）。各実験の中で 5 つのマーカー



**図 4**：FACS 解析と I-FACS 解析の相関。4 つの細胞株で行っている。201b7 株（B7）、253G1 株（G1）、Tic 株、それとヒト ES 細胞の H9。H9 に関しては、医薬基盤研内で培養され、更に FACS 解析と I-FACS 解析の両方が行われた。

ーから相関係数を計算し、その値を平均した。その結果、201B7、253G1、Tic の全ての株で相関係数の平均値が 0.8 以上であった。相関係数は、今回のデータの様に、2 つのデータを比較する場合に用いられる指標で、両データが比例関係に近いほど 1 に近くなり、ランダムの場合 0 に近づく。3 つの株で 0.8 以上であったため、強い相関がある(比例関係に近い)と言える。以上の結果より、異なる機関で培養・送付しても途中で細胞状態が変化せず、適切に診断が行われることが明らかとなった。

### **閾値の問題**

FACS 解析を実際に行う際に良く問題になるのが、ゲートの取り方である。理想的には、特異的抗体を用いない陰性コントロール（図 5a 青）と、特異的抗体を用いたデータとの蛍光

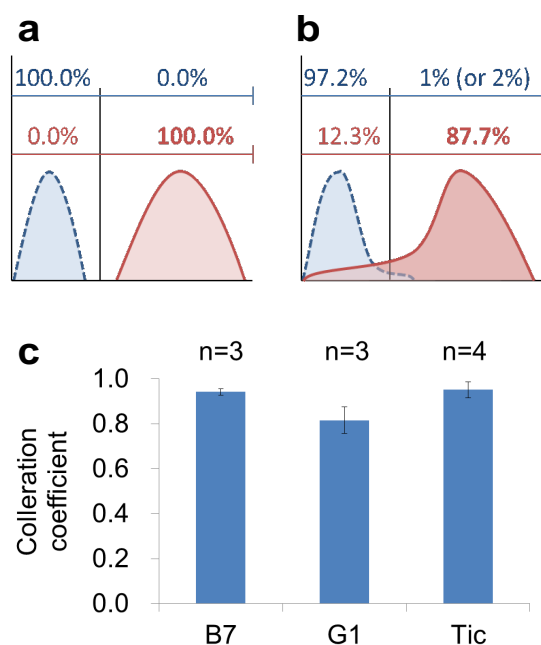


図 5 : FACS のゲート ( 閾値 ) の問題。横軸が各細胞のシグナル強度、縦軸が細胞の割合。A : 陰性コントロール ( 青 ) と、特異的抗体を使用したデータ ( 赤 ) が、完全に分離している場合 ( A ) と、分離していない場合 ( B ) の模式図。ポジティブ率はそれぞれの右下部 ( 100% と 96.4% ) 。

シグナル ( 図 5a 赤 ) が完全に分離する ( 片方が 100:0、もう片方が 0:100 ) 条件で測定し、その間に閾値を設ければ良い ( 図 5a )。しかし、実際には分布のすそ野が広がり、両者が完全に分離できない場合がほとんどである ( 図 2、図 5b )。そのため、適当な基準を元にポジティブ率を算出する。そのため、閾値をどこに設定するかに任意性があり、結果の値も変わる。特に、別々の装置で測定してその陽性率に偏りが無いかどうか判定する場合、閾値の取り方により結果が逆転することも予想される。

今回は閾値を少し変えてみて、どの

くらい影響が有るかを確かしてみた。具体的には陰性コントロールの陽性率を I-FACS の解析では 1% とし、FACS 解析の時には 1% ( 図 4 ) と 2% ( 図 5c ) の両方で比較してみた。その結果、FACS の結果のみ 2% としたときには相関係数が若干減少したもの、ほぼ同様の結果が得られた。

以上の事から、測定する機関に於いて閾値が多少ずれても、大まかな結果は変化しない事が示唆された。

## D . 考察

本研究では、幹細胞バンクに於いて、様々な施設におけるヒト PS 細胞の状態を、統一的・定量的に検査・管理することを目標とし、異なる施設で培養した細胞を送付し、FACS 解析と I-FACS 解析した比較した。昨年確立した実験プロトコルの元、3 つの細胞株でそれぞれ 3 回以上実験を繰り返した。その結果、どの株でも安定して強い相関が得られたことから、本研究で確立した手法は異なる施設で培養した細胞を同一基準で検査できる事を示唆する。

### 複数の細胞株で複数回の実験

ヒト多能性幹細胞は安定しない。全ての細胞に分化できる能力を持つが、この能力は細胞の状態の変化し易さ、つまり不安定に繋がる。実際、同じ手法で培養していても培養状態が大きく変化することがある。更に、細胞株



により未分化状態や分化し易さに大きな違いがある。そのため、単一の細胞株だけで調べるのではなく、複数の細胞株を使って調べるのが通例となっている。

昨年度は 1 細胞株のみを用いて実験系を確立し、今年は 3 株で複数回行った。その結果、実験回毎にバラつきが観測され、更に細胞株ごとにも結果が異なった。この結果は細胞の株の違いを反映している可能性と、異なるときに行った実験であるから違う可能性があり、どちらであるかは今回の実験だけでは判断できない。

ただし、複数回行った実験結果はいずれも同じような傾向にあった。FACS の結果と I-FACS の結果が強く相関していたため、このバラつきは実験誤差の範囲内として許容することができる事が示唆される。単一のマーカーを使って診断する事はエラーが出やすいが、今回の様に複数のマーカーを用い、複合的に診断することにより、細かい違いがキャンセルされ、安定した結果が得られると期待できる。

#### 閾値の問題

今回は異なる機械（FACS と I-FACS）を用い、異なる施設（長岡技術科学大学と医薬基盤研究所）に於いて解析を行った。FACS 解析ではどの領域をネガティブとし、どの領域をポジティブと判断するかに任意性がある。解析する細胞や抗体によっては少しの閾値のズレで結果が大きく変わる事もある。今回は閾値を少し変化

させた時に結果が大きく変わらない事から、我々の作成したプロトコルが適切に働いていることが示唆される。

#### **E . 結論**

本研究では、異なる施設（長岡技術科学大学と医薬基盤研究所）間で細胞を送付し、更に一般に普及している FACS 解析と、これまでに本研究課題で代表者らが構築した I-FACS 解析との比較を、3 つの細胞株で複数回実験して比較した。その結果、どの細胞株でも高い相関が得られた。従って、遠隔地での細胞培養施設に於いて、一般的な試薬・設備・方法で細胞を固定・送付し、医薬基盤研でそれを解析することにより、細胞状態を的確に診断できる事が示された。以上の事から、ヒト PS 細胞を少量の試料・低コストで測定できる品質管理法を策定できたと言える。

## F . 参考文献

1. Thomson, J.A., et al., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
2. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
3. Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
4. 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.
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. Fukawatase, Y., et al. Characterization of newly established induced pluripotent stem cells from human embryonal lung fibroblast, MRC-5. in *Ann. Meeting. of the Biochemistry(81st) and Molecular biology(31st)*. 2008. Japan.
8. Nakagawa, M., et al., Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, 2008. **26**(1): p. 101-106.
9. Watanabe, K., et al., A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(6): p. 681-6.
- 10 . 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  $\gamma$ -globulin." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (In Press)
11. Katsuto Takakura, Takahiro



Yamamoto, Kensuke Kurihara, Taro Toyota, Kiyoshi Ohnuma, and Tadashi Sugawara\*, Spontaneous Transformation from Micelle to Vesicle Associated with Sequential Conversions of Comprising Amphiphiles within Assemblies, Chem Commun

12. Yoshimitsu, R., Hattori, K., Sugiura, S., Kondo, Y., Yamada, R., Tachikawa, S., Satoh, T., Kurisaki, A., Ohnuma, K.\*, Asashima, M., Kanamori, T. (2013). Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, (2013 Nov 13. Epub ahead of print)
13. K. Hattori, R. Yoshimitsu, S. Sugiura\*, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamoria, Masked Plasma Oxidation: Simple Micropatterning of Extracellular Matrix in a Closed Microchamber Array, *RSC Advances*, 3, 17749-17754, (2013)
14. Ohnuma, K., Assays of traditional drugs using human neurons derived from pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters*, (2013 Nov 21. E-pub ahead of print)

## G . 研究発表

### 1 . 原著論文

- 1) Yamada R, Hattori K, Tachikawa S,

Tagaya M, Sasaki T, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K, Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and  $\gamma$ -globulin." *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (2014 Mar 18. E-pub ahead of print)

### 2 . 学会発表

1. 吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、近藤祐樹、山田遼太郎、太刀川彩保子、佐藤琢、栗崎晃、大沼清、浅島誠、金森敏幸、“マイクロチャンバーアレイチップによるヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダ培養”、日本再生医療学会（京都国際会館、京都、2014年3月4日-6日）
2. 近藤裕樹、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、金森敏幸、大沼清、“hiPS 細胞の細胞塊を培養するための灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ”、化学とマイクロシステム（兵庫県立先端科学技術支援センター、兵庫、平成12年9月29日～30日）
3. 山田遼太郎、服部浩二、多賀谷基博、佐々木徹、杉浦慎治・金森敏幸、大沼清、“プラズマ処理による、 $\gamma$ -globulin と Vitronectin を使った無血清/無フィーダ培養でのヒト iPS 細胞パターン作成”細胞アッセイ技術の現状と将来

- ( Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay )(Tokyo, 25 Nov 2013)
4. 大沼清、藤木彩香、太刀川彩保子、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、楠田-古江美保、浅島誠、” ヒト ES・iPS 細胞の無酵素培養 ”、細胞アッセイ技術の現状と将来 ( Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay ) (Tokyo, 25 Nov 2013)
  5. 近藤裕樹、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、金森敏幸、大沼清、” hiPS 細胞の細胞塊を培養するための灌流培養マイクロチャンバーアレイチップ ”、細胞アッセイ技術の現状と将来 ( Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay ) (Tokyo, 25 Nov 2013)
  6. 吉満亮介、服部浩二、杉浦慎治、佐藤琢、栗崎晃・浅島誠、大沼清、金森敏幸、” マイクロチャンバーアレイチップを用いたヒト iPS 細胞培養 ”、細胞アッセイ技術の現状と将来 ( Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay ) (Tokyo, 25 Nov 2013)
  7. K. Hattori, R. Yoshimitsu, S. Sugiura\*, A. Maruyama, K. Ohnuma and T. Kanamori, MASKED PLASMA OXIDATION METHOD AS A SIMPLE MICROPATTERNING OF EXTRACELLULAR MATRIX IN A CLOSED MICROCHAMBER ARRAY, micro TAS 2013 (Messe Freiburg, Freiburg, GERMANY, 27-31 October 2013)
  8. R. Yoshimitsu, K. Hattori, S. Sugiura , Y. Kondo, T. Satoh, A. Kurisaki, M. Asashima, K. Ohnuma\*, and T. Kanamori MICROFLUIDIC PERFUSION CULTURE OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL IN MICROCHAMBER ARRAY CHIP, micro TAS 2013, (Messe Freiburg, Freiburg, GERMANY, 27-31 October 2013)
  9. Ryotaro Yamada ( M2 学生・登壇 ), Koji Hattori<sup>2</sup>, Motohiro Tagaya<sup>3</sup>, Toru Sasaki<sup>4</sup>, Shinji Sugiura<sup>2</sup>, Toshiyuki Kanamori<sup>2</sup>, Kiyoshi Ohnuma\*, Patterning of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Patterned Plasma Treatment on a PDMS Surface Followed by Composite Protein Adsorption, 24th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2013) 12 Nov 2013 Nagoya University □頭
  10. Ohnuma K\* , Motility Control of Neuronal and Human iPS Cells under Serum- and Feeder-Free Culture Condition, Mini Symposium at The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13) □頭
  11. Ohnuma, K, Fujiki, A, Koike, S, Hayashi, Y, Ito, Y, Onuma, Y, Chan, T, Michiue, T, Furue, M K., Asashima,

M, ENZYME FREE PASSAGE OF  
HUMAN PLURIPOTENT STEM  
CELLS, International Society for  
Stem Cell Research (ISSCR  
2013)(Boston, MA, USA, 14 June  
2013)

### 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
福田隆之、 古江 - 楠田 美保	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	In vitro 毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	日本	2013	81-87
川寄敏祐、	第1章 作動原理と疾患、生命現象とのかかわり 新規iPS/ESマーカー抗体とその応用	門松健治 遠藤玉夫 岡 昌吾 北川裕之	実験医学増刊：第三の生命鎖 糖鎖の機能と疾患 Vol.31 No.10	羊土社	日本	2013	129-133
菅三佳 古江 楠田 美保	GMPに準拠した細胞プロセッシングにおける無血清培地組成の考え方	末盛博文	実験医学別冊「ESiPS細胞実験スタンダード」	羊土社	日本	2014	44-52

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
古江 - 楠田美保	ヒトiPS細胞研究の海外動向 TOPIC	HUMAN SCIENCE ヒューマンサイエンス振興財団	24 (3)	24-27	2013
Watanabe H, et al.	HHEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin	PloS One	9(3)	DOI: 10.1371/journal.pone.0090791	2014
Kinehara M, et al.	Protein Kinase C-induced Early Growth Response Protein-1 Binding to SNAIL Promoter in Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Embryonic Stem Cells.	Stem Cells and Development		doi:10.1089/scd.2013.0424.	2014
Takayama K, et al.	CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGFβ receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision.	Development	141	91-100	2014
Chioko Nagao C, et al	Prediction of Detailed Enzyme Functions and Identification of Specificity Determining Residues by Random Forests	PLoS ONE	9(1)	doi:10.1371/journal.pone.0084623	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.		doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.009	2014