

厚生労働科学研究費補助金
再生医療実用化研究事業

iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した
培養技術の標準化に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古江美保

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

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.....	1
研究代表者 古江-楠田 美保	

II. 分担研究報告

1. インテグレーションフリーシステムを利用して樹立したヒト iPS 細胞の品質変動及び分化に及ぼす影響の解析.....	13
研究分担者 栗崎 晃	
2. iPS細胞の培養・ハイスループット分化評価.....	22
研究分担者 大沼清	
3. 中胚葉分化誘導の標準化と評価.....	34
研究分担者 川端 健二	
4. iPS細胞由来分化細胞の品質の検証.....	45
研究分担者 山田 弘	
5. iPS細胞等の代謝解析.....	52
分担研究者 竹森 洋	
6. 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 ..	58
分担代表者 櫻井 文教	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	65
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	67
----------------------	----

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（総括）研究報告書**

I. 総括研究報告

iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究

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 iPS 細胞は医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年、次々と分化プロトコールが発表されている一方、同じ iPS 細胞株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多い。実験者又は研究施設が変わることによるヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。その原因の一つに培養技術が挙げられる。ピペティングなど単純な作業を誤ることが iPS 細胞の未分化状態に影響を及ぼすことは経験上知られているが、分化誘導の再現性にどのような影響を及ぼすかなど、具体的に検証された研究はない。ISCI (International Stem Cell Initiative) はグローバルスタンダードの構築を目指したヒト幹細胞の標準化を行っているが、詳細な個々の作業までは検討していない。そこで、本研究では、iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明する。iPS 細胞の品質変動要因を明確にして培養技術を標準化することにより、その重要性を啓蒙し、創薬研究推進を図る。

研究協力者

菅 - 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

分担研究者

栗崎 晃：独立行政法人 産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 幹細胞制御研究チーム 研究チーム長
大沼 清：長岡技術科学大学 生物機能工学専攻 准教授
川端 健二：独立行政法人 医薬基

盤研究所 創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

山田 弘：独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー
竹森 洋：独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト プロジェクトリーダー

櫻井 文教：大阪大学大学院 薬学研究科 分子生物学分野 准教授

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞は医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年、次々と分化プロトコールが発表されている一方、同じ iPS 細胞株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多い。実験者や研究施設が変わることによるヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。その原因の一つに培養技術が挙げられる。ピペティングなど単純な作業を誤ることが iPS 細胞の未分化状態に影響を及ぼすことは経験上知られているが、分化誘導の再現性にどのような影響を及ぼすかなど、具体的に検証された研究はない。そこで、(i)培養手技の違いが iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検証する (H25-28)。また、(ii)培養条件の違いによる品質変動を検証する (H26-29)。また、iPS 細胞を研究に応用する際には、iPS 細胞そのものではなく、iPS 細胞から特定の細胞に分化した細胞が利用されるため、まず、(i)分化プロトコールを標準化し (H25-28)、(ii)個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証する (H26-29)。具体的には、3 胚葉 (神経細胞等 [外胚葉]、心筋・血球系細胞等 [中胚葉]、肝臓細胞等 [内胚葉]) への分化能の再現性に及ぼす影響を検証する。更に、分化細胞の薬剤感受性を検討することで iPS 細胞の品質変動による影響を検証する (H25-29)。なお、申請者らは、ヒト初代肝細胞に約 170 種の化合物を曝露した際の遺伝子

発現データをトキシコゲノミクスデータベースに構築する作業を既に完了しており、分化細胞の品質検証に必要な測定エンドポイントを探索する環境も整備している。

上記研究に基づき、iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明する。また、iPS 細胞の品質変動要因を明確にし、培養技術を標準化することにより、その重要性を啓蒙し、国内の iPS 細胞を用いた創薬研究の推進を図る。ISCI (International Stem Cell Initiative) はヒト幹細胞の標準化を行っており、グローバルスタンダードの構築を目指した基準を作成しているが、個々の作業の詳細な設定までは検討していない。高品質な iPS 細胞を培養するために必要な手技を詳細に検討する本研究は他に類を見ず、iPS 細胞に係る今後の創薬研究を支援し、発展させるために不可欠である。

今年度、培養技術についての基本的技術の検証については、栗崎、大沼、古江、竹森が担当する。まず、栗崎はヒト iPS 細胞を同じドナーから異なる方法にて iPS 細胞を作成し、比較の準備を行った。竹森は iPS 細胞の状態を把握するための新規評価法として代謝解析を試みた。また、大沼は、分化誘導方法は微小流体制御培養システムに、無血清・無フィーダ培養を組み合わせた分化アッセイシステムの策定を行った。また、分化細胞の品質検証は川端、山田、櫻井が担当した。詳細に

についてはそれぞれの分担報告に譲る。

B. 研究方法

未分化状態における品質変動の要因の検証

-培養技術-

熟練者及び初心者の技術を模倣した手技により培養し、手技の違いがiPS細胞の品質に及ぼす影響を複数機関で検証を行うために、まず、ピペッティング回数による品質変動を検討した。京都大学 iPS 細胞研究所(山中研究室)により樹立されたヒト皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞 201B7 株を用いて、ピペッティング回数のヒト iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検討する方法の策定を行った。

具体的には、以下に方法を示す。

細胞は、リコンビナント・ビトロネクチン (Vitronectin XF™、STEMCELL TECHNOLOGIES 社 Cat#ST-07180) でコーティングした 6 ウェルプレート (グライナー社 CELLSTAR Cat#657185 浮遊性細胞培養用) を用いて、無血清培地・TeSR™-E8™ 培地 (STEMCELL TECHNOLOGIES 社 Cat#ST-05940) で培養を行ったヒト iPS 細胞 201B7 細胞を用いた。継代 6 日目の細胞の培養液をアスピレーターで除き、1 ウェルあたり 1mL の剥離剤 (Gentle Cell Dissociation Reagent STEMCELL TECHNOLOGIES 社 Cat#ST-07174) を加えて、室温で 6 分 30 秒インキュベートした後、すぐに剥離剤をアスピレーターで除く。1 ウェルあたり 1mL の TeSR-E8 培地を添加し、セルスクレーパーを

用いて細胞のコロニーをウェルの培養面から剥離させる。剥離した細胞塊を碎かないよう慎重に 15mL コニカルチューブに回収し、遠心操作 (室温、300 回転、1 分) で細胞塊を沈殿させ、上清を除き、12ml の TeSR-E8 培地に懸濁し、3 本の 15mL コニカルチューブに分注する。10ml ピペット (ファルコン) ならびに電動ピペット (ファルコン) を用いて、各チューブの細胞懸濁液をそれぞれ 2 回、5 回、20 回ピペッティング操作を行った後、リコンビナント・ビトロネクチンをコートした 6 ウェルプレートに 1 : 4、ならびに 1 : 10 の割合で細胞を播種した。

細胞が十分に接着した 2 日目より、自動培養観察装置 (バイオステーション CT、ニコン) を用いて、12 時間毎に生細胞画像を取得した。生細胞画像の解析は、他のプロジェクトにて開発した画像解析ベータ版ソフトを用いて行った。

培地交換は 2 日間毎 (播種後 2 日目、4 日目) に行い、播種後 6 日目に、培養液を除去し、固定剤 (4 % パラフォルムアルデヒド) で室温で 15 分間固定を行った。PBS にて 3 回洗浄して固定剤を除去し、マウス抗 Vimentin 抗体およびウサギ抗 Oct3/4 抗体を用い、間接蛍光抗体法 (使用抗体は下表を参照) で染色し、Hoechst33342 で核染色を行い、イメージングサイトメーター IN CELL Analyzer 2000 (GE ヘルスケア社) またはバイオステーション CT (ニコン) を用いて蛍光画像を取得・解析を行った。

	1次抗体	2次抗体
Vimentin	Monoclonal Anti-Vimentin antibody produced in mouse clone V9, ascites fluid (SIGMA社、V6630)	Alexa Fluor® 555 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed (ライフサイエンス社、A21424)
Oct3/4	Oct-3/4 Antibody (H-134), rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz社、sc-9081)	Alexa Fluor® 647 Chicken anti-Rabbit IgG(H+L) (ライフサイエンス社、A21443)

」に従って行うほか、各研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。また、コントロール細胞として使用するヒトES細胞使用研究に関しては「ヒトES細胞の使用に関する指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた規定を遵守して研究を遂行する。動物実験については、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに各研究機関の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施するものであり、倫理審査の承諾を得て行う。これらを含めて、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については研究開始前に所定の手続きを行う。将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、研究を推進する。

分化プロトコールの標準化と分化誘導再現性の検証

- 分化プロトコールの標準化のためのプロトコール収集-

iPS細胞から外胚葉である神経系細胞への分化プロトコールの収集を行い、収集したプロトコールを検討し、コントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコールを策定することを目標としている。H25年度は、これまで報告されているヒト多能性幹細胞から神経系への分化プロトコールを収集した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究を実施する場合には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、その他の研究は「臨床研究に関する倫理指針

C . 研究結果

培養技術

201B7 細胞を用いて、継代作業時のピペッティング回数の差が、播種後の細胞形態、細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。実際には、図 1-1 に示すようなウェルデザインを用いて、実験を進めた。イメージングサイトメーターによる蛍光染色画像の解析により、播種後 6 日目の細胞数、Vimentin 強陽性 (Vimentin++) 細胞、及び Oct3/4 陽性細胞 (Oct3/4+) について解析を行った (図 1-2、図 1-3)。また、生細胞画像を用いた細胞形態解析を行った (図 1-4)。

以上の結果より、播種密度であってもピペッティング回数の差によって 6 日後の細胞数や Vimentin 強陽性細胞数に大きく影響が出る事が明らかとなった。また、ピペッティング回数の差は、生細胞画像の解析によって示された、正常細胞領域と異常細胞領域が全体に占める

割合にも影響を及ぼすことが明らかとなった。これらの免疫染色解析、生細胞画像解析は、細胞継代時のピペッティング回数のような、細胞培養に影響を与える細胞培養の手法の差を数値化するのに有効であるということが示された。

分化プロトコルの標準化のためのプロトコル収集

神経分化プロトコルを収集し、調査した結果の一部を下表に示す。今回の調査により、これまで公表された神経分化誘導プロトコルにおいては、分化誘導に要する日数が非常に長いことや誘導神経の評価方法が多岐にわたっていること、また、再現性が比較的低いことが明らかとなった。また、誘導期間が非常に短いプロトコルにおいては、その多くが分化誘導の前段階で特定の遺伝子強発現やフローサイトメーターによるソーティングのステップが必要であった。

Reference	PMID	Targeted Cell Type	Time to Tuj1/ MAP2+ Cells	Time to Functional Synapses	Yield of Neurons	Neuronal Purity	Neuron Subtype Purity
Hu et al., 2010	20160098	Neurons	~ 6 weeks	12 weeks	ND	15-79%*	Mixed
Zhang et al., 2001	11731781	NPCs	4-5 weeks	ND	ND	ND	Mixed
Johnson et al., 2007	17376968	Neurons	4 weeks	7 weeks	ND	89 ± 3%*	Mixed
Chambers et al., 2009	19252484	NPCs	~ 3 weeks	ND	ND	82%*	Mixed
Elkabetz et al., 2008	18198334	NPCs	~ 3-4 weeks	ND	ND	ND	Mixed
Chambers et al., 2012	22750882	Nociceptive sensory neurons	~ 2 weeks	ND	ND	>75%*	>60% **
Kriks et al., 2011	22056989	Midbrain dopamine neurons	~ 3-4 weeks	>7 weeks	ND	ND	60%-80%**
Koch et al., 2009	19218428	NPCs	4 weeks	ND	ND	40-70%*	mixed
Espuny-Camacho et al., 2013	23395372	Cortical excitatory neurons	~ 3-4 weeks	>8 weeks	ND	40% *	<20%**
Wu et al., 2007	17693548	Neurons	4 weeks	~ 5 weeks with glia coculture	ND	70-80%*	mixed
Maroof et al., 2013	23642365	Inhibitory forebrain neurons	~ 3-4 weeks	~ 6 weeks	ND	~ 70% **	80%**
Nicholas et al., 2013	23642366	Inhibitory forebrain neurons	~ 3-4 weeks	8 weeks with glia coculture	ND	92% **	76%**
Israel et al., 2012	22278060	Neurons	~ 3-4 weeks	~ 4-5 weeks	ND	90% **	mixed
Zhang et al., 2013	23764284	Excitatory neurons	~ 1 week	2 weeks	~ 100%**	100%**	~ 100%***

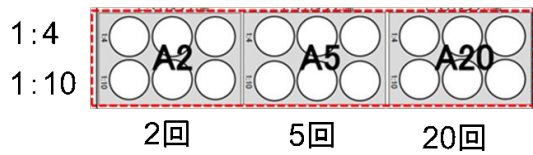


図 1-1 実際のウェルデザイン(6 ウェルプレートの使用法)播種密度 1 : 4 または 1 : 10。継代作業時のピペッティング

回数 2 回、5 回、または 20 回。1 条件につき 3 ウェルずつ実験をおこなう。

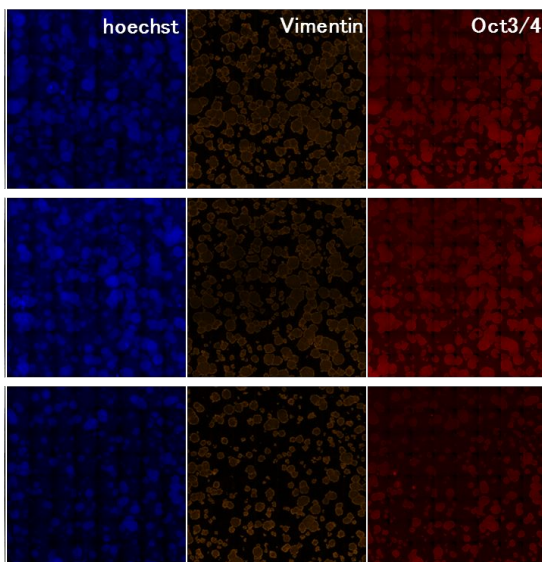


図 1-2 免疫染色画像の例

イメージングサイトメーターにより取得した蛍光画像の解析例を示す。上：ピペッティング 2 回、中：ピペッティング 5 回、下：ピペッティング 20 回。いずれも播種密度 1 : 4 のウェルの撮像範囲をすべてタイリングしたものを 1 ウェルずつ示している。

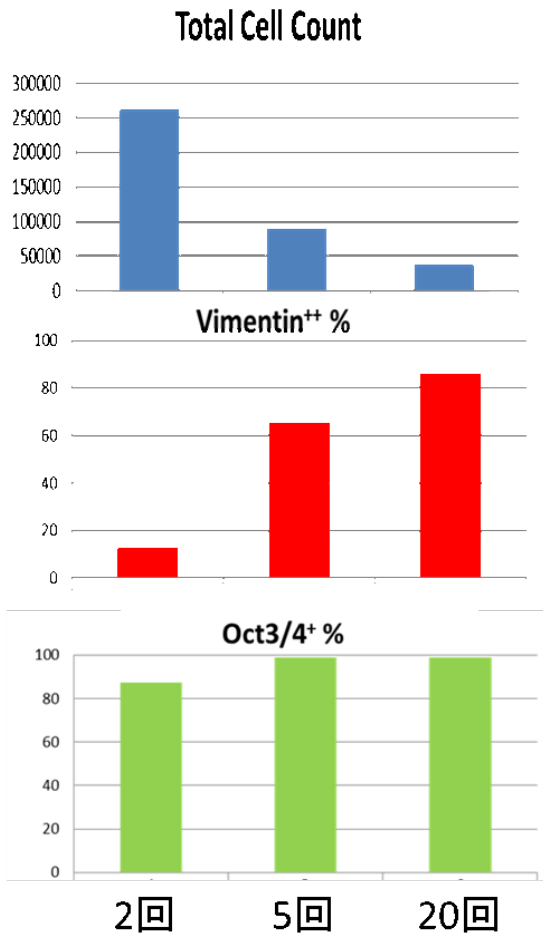


図 1-3 免疫染色解析結果
イメージングサイトメーターにより取得した蛍光画像の解析例を示す。図 1-1 の画像について解析した結果。

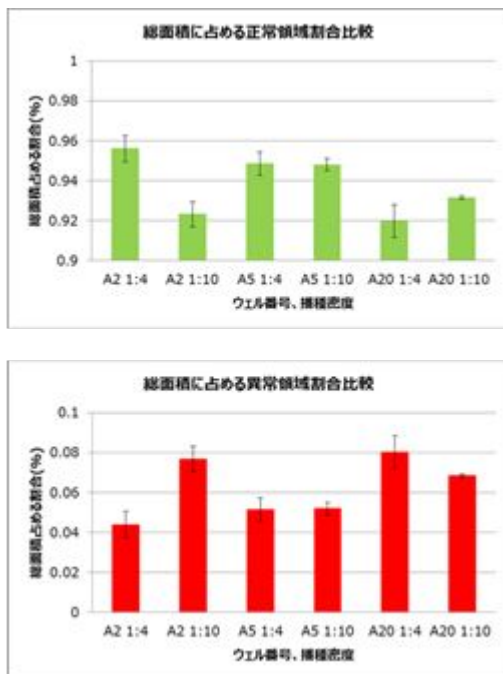


図 1-4 生細胞画像解析結果
開発した解析ソフトウェア版を使用して生細胞画像を解析し、正常な細胞形態の領域と異常な細胞形態を示す領域を自動検出した結果。グラフは 1 条件 3 ウェルの平均値と誤差で表される。

D . 考察

個人差を反映するヒト由来機能細胞を毒性評価ツール等として利用し、安全性の高い新薬の開発を目指す研究は、日本発の画期的発明を活かした、独創性の高い iPS 細胞技術を用いることで初めて可能になる。しかし、現在精力的に行われている幹細胞を用いた基礎研究の成果等が広く実用化されるためには、ヒト iPS 細胞の品質の安定性と分化効率の再現性の向上が課題となっている。従来より、ヒト ES 細胞を用いた研究の再現性が低いことが認識されており、ヒト多能性幹細胞を用いた医療、創薬利用を推進するために、国際標準化プロジェクトが推進されている。日本は、ヒト iPS 細胞作製技術や分化誘導技術開発では国際的にリードしている一方、ヒト ES 細胞研究による先行技術や経験に基づく基盤技術やノウハウの蓄積が乏しいため、英米に比べてヒト幹細胞の産業応用のための環境整備が遅れている。日本国内で iPS 細胞標準化プロジェクトは京都大学 iPS 細胞研究所において推進されているが、高い培養技術を持っていることが前提とされており、細胞自体の品質変動に注目した研究は、国内外においても行われていない。iPS 細胞の品質変動要因を明確にして培養技術を標準化し、その重要性を啓蒙することは、創薬技術開発研究において公的機関として行うべき重要な研究課題である。

実際、ピペッティングという培養において基本的な操作について、iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検討したところ、大きな影響を与えることが明らかとなった。従来、ヒト多能性幹細胞を継代する際には、コロニーは 50 ~ 100 個程度の細胞集団に分散することが望ましいとされ、それ以上小さく分散すると、分化したり、細胞死することが知られている。しかし、ヒト ES 細胞の培養経験がない場合には、具体的にど

の程度ピペッティングするとどの程度の影響を及ぼすのか、十分な理解が得られていない。そこで、実際に 2 回、5 回、20 回とピペッティングを行って、具体的な操作に結びつけて実証することが必要であると考えた。実際、日本再生医療学会における臨床医療資格認定セミナーならびに同学会におけるランチョンセミナーにて概要を説明し、その結果に多くの反響をいただいた。今後、より詳細な解析を行い、報告する予定である。

ヒト多能性幹細胞は、分化させて利用することが目的である。現状では未分化状態を維持して増幅する際の標準化に注目を集めているが、欧米ではすでに分化させてからの標準化プロジェクトが進んでいる。高効率な分化誘導法が開発されたとしても、それが産業利用されるためには、再現性が高く安定供給される必要がある。熟練者のみが供給できる方法では産業化への利用は難しい。また、使用するマテリアルや細胞株によってその効率は変わってくるため、国内で使用できる細胞株、マテリアルを使って、再現性高い分化細胞を得るための標準化が必要である。一方、低い再現性の原因として、原材料である iPS 細胞の不安定な未分化状態があげられる。上記で述べたように品質の低下した iPS 細胞を使って分化させた場合、分化効率の低下のみならず、その分化細胞の品質にどれだけ影響があるのか、これまで検証されたことはない。品質の異なる原材料を用いて分化誘導した細胞を比較するために、分化効率が低くても高い技術を必要としない再現性の高いプロトコルを策定する必要がある。外胚葉への分化誘導法は、ニューロスフェアなど凝集体を作成して誘導する方法が一般的である。しかし、この方法はロット差が大きく、また、分化過程の形態的観察が難しい。そこで、二次元培養法で既知の組成からなる分化誘導法 UKN を選ぶこととした。この方法では、成熟した

神経細胞を誘導するわけではないが、二次元で短期間に判定する方法であることから、当該研究において有用な方法であると思われる。H26年度はこの方法の再現性やマテリアルなどを確認し、詳細なプロトコールの策定を行っていく予定である。

E. 結論

本研究において、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明するため、まずは培養の基本的技術の一つであるピペット操作によるヒト iPS 細胞の品質に及ぼす影響を検討した。この検証結果は、幹細胞研究者の注目を浴びつつある。引き続き、H26年度も検証を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

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 TGF receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. Development. 2014 Jan;141(1):91-100.
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「ES・iPS 細胞実験スタンダード」(2014)
5. 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)

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. 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)

2. 学会発表

国内学会：一般講演

1. 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
2. Kana Yanagihara, Yujung Liu, Ken Fukumoto, Hiroto 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)

3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
- 国内学会：シンポジウム・ワークショップなど**
7. 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)
8. 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)
9. 大沼清、藤木彩加、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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)

「厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（分担）研究報告書

インテグレーションフリーシステムを利用して樹立したヒト iPS 細胞の品質
変動及び分化に及ぼす影響の解析

研究分担者 栗崎 晃

（独）産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 幹細胞制御研究チーム
研究チーム長

研究要旨：ヒト iPS 細胞は、ヒトの体を構成する多くの細胞を作り出す強力な多分化能から、医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されている。しかし、近年日進月歩で、様々な細胞の invitro 分化プロトコルが発表される一方で、同じ結果を再現できないことが非常に多く、文書化されていない様々な重要なポイントが存在することが、実際に実験を行っている研究者の中で示唆されている。その原因の一つは培養技術であるが、それがどのように幹細胞の培養や分化に影響を及ぼすのかについては系統的に解析されておらず、未だ iPS 細胞の培養や分化にはある程度の「名人芸」レベルのテクニックが必要とされる状態にある。本研究では、培養手技の違いや培養条件の違いによる品質変動に加えて、それらが iPS 細胞から特定の細胞への分化に及ぼす影響を検証し、個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証する。これらのトラブルシューティングを系統化することにより、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、わが国の幹細胞制御技術のレベルを引き上げることを最終目的とする。本分担研究では、特にインテグレーションフリーシステムを利用してヒト iPS 細胞を樹立し、レトロウイルス法で樹立した iPS 細胞と比較しながら上記の問題点を検証していく。本年度は、まず国内外でも広く使われ出したセンダイウイルスを用いてインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞の樹立を開始したので、その進捗状況について報告する。

A. 研究目的

本研究の目的は、iPS 細胞を用いた画期的な新薬開発を目指す研究者が、恒常的に iPS 細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足が iPS 細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明することである。ヒト iPS 細胞は医薬品等の効果や毒性の評価ツールとして創薬研究においても利用が期待されて

いる。しかし、近年、次々と分化プロトコルが発表されている一方、同じ iPS 細胞株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多い。実験者又は研究施設が変わることによるヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。そこで、iPS 細胞の品質変動要因を明確にして培養技術を標準化することにより、創薬研究推進を図ることを本研究の目的とする。

2007年に京都大学山中教授らが当初発表したレトロウイルス[1]やレンチウイルス[2]を用いたヒトiPS細胞の樹立方法の他に、近年、その樹立効率の高さやゲノムへのDNAの取込みがないことから多くの施設でヒトiPS細胞の樹立に利用されてきているRNAウイルスであるセンダイウイルスを用いた樹立方法[3-5]がポピュラーな方法となりつつある。そこで本研究計画においても、過去にレトロウイルスでヒトiPS細胞が樹立された線維芽細胞と同一患者由来の線維芽細胞からセンダイウイルスを用いてヒトiPS細胞を樹立し、これら2種類の樹立方法の異なるヒトiPS細胞を元に、恒常的にiPS細胞の高い品質を維持し、再現性高い分化誘導法を研究開発できるよう、培養技術を科学的に検証し、技術不足がiPS細胞に及ぼす悪影響を科学的に証明する。特に本分担研究では、このセンダイウイルスを用いてヒトiPS細胞から樹立を行い、他の研究者に細胞を配布する。また、培養条件や様々な培養技術を合わせて比較し、品質変動の状況を複数機関で検証することでヒトiPS細胞の未分化状態における品質変動の要因の検証を行う。

B. 研究方法

初年度の平成25年度は、インテグレーションフリーな方法でヒトiPS細胞を樹立し、同じヒト線維芽細胞株からレトロウイルス4因子で樹立さ

れたヒトiPS細胞とて比較検討する細胞材料を作製するため、4因子を搭載した2種類のセンダイウイルスベクターを用いて、ヒトiPS細胞の樹立実験を開始した。

ヒトiPS細胞の樹立

これまでにレトロウイルスベクターでOct4/Sox2/Klf4/cMycの4因子を導入してiPS細胞の樹立に用いられたヒト線維芽細胞としてTIG-114細胞が知られている。このTIG-114細胞は医薬基盤研究所・JCRB細胞バンクに登録されているため(細胞番号: JCRB0534) JCRB細胞バンクを通じて入手した。TIG-114細胞の培養には、EMEMに10%FBS及びペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で5%CO₂、37℃で培養した。

また、ヒトiPS細胞の樹立に必要なマウス線維芽細胞はリプロセル(株)から購入した。ヒトiPS細胞の維持培養に必要なマウス線維芽細胞株(SNL76/6)は大日本住友製薬(株)から購入した。これらのマウス線維芽細胞の培養にはDMEM(low glucose)に10%FBS及びペニシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で5%CO₂、37℃で培養後、マイトマイシンC処理してフィーダー細胞として利用した。

(Day0) 12 ウェルプレートディッシュの各ウェルに2x10⁵個の

TIG-114 細胞を播種した。

(Day1) 0.1%ゼラチン水溶液でコートした 12 ウェルプレートディッシュの各ウェルに 1.9×10^5 細胞となるよう MMC-MEF を播種した。また、TIG-114 細胞に MOI=3 のタイターで Oct4/Sox2/Klf4/cMyc の 4 因子を発現するセンダイウイルスを感染させ、室温で 2 時間放置した後、一晩 5%CO₂、37 °C で培養した。

(Day2) 感染させた TIG-114 細胞を PBS でリンスした後、TrypLE で細胞を剥離し、前日に用意しておいた MMC-MEF に播種し、5%CO₂、37 °C で培養した。

(Day3) 感染させた TIG-114 細胞の培地をヒト ES 細胞用の培地 (D-MEM/F12, 20% KSR, 0.1 M 2-mercaptoethanol, MEM non-essential amino acids, 5ng/mL bFGF にペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培地) で培養し、1 - 2 日ごとに培地を交換した。

(Day14) 感染後 2 週間程経過し、十分な大きさのコロニーが出現した頃に PBS でリンス後、TrypLE で細胞を継代し、0.1%ゼラチン水溶液でコートした 6 ウェルプレートディッシュの各ウェルに 3.8×10^5 細胞となるよう MMC-MEF を播いたものに ES 細胞培地で播種した。この時センダイウイルスを除去するための siRNA を RNAi Max (Invitrogen) を

用いて導入し、Rock インヒビターを添加して培養した。

siRNA 処理は 2 日おきに 3 - 4 回繰り返し行い、2 日後に培地交換した。

免疫蛍光染色

細胞を PBS でリンスした後、3.7%ホルムアルデヒド/PBS で室温 10 分固定し、PBS でリンスした後、50mM NH₄Cl/PBS を加え、室温 10 分放置した。PBS でリンスした後、0.5% NP40/PBS で膜透過処理し、さらに PBS でリンスした後、5%FBS/PBS で室温 1 時間ブロッキング処理をした。抗 SeV NP マウスモノクローナル抗体を 1/1600 に 5%FBS/PBS で希釈し、室温 30 分インキュベートした。その後、細胞を 5%FBS/PBS で 4 回洗った後、AlexaFluro594-anti mouse IgG 抗体を 1/500 に 5%FBS/PBS で希釈し、室温 15 分インキュベートした。その後、細胞を 5%FBS/PBS で 2 回洗浄し、0.1 μg/mL の DAPI/PBS 溶液で室温 10 分インキュベートした後、明視野及び蛍光観察し、画像取得した。なお、画像取得はオリンパス IX70 倒立顕微鏡に設置した Photometrics 社の CoolSNAP HQ² カメラを用い、Molecular Devices 社の MetaMorph ソフトウェアを利用して行った。

C. 研究結果

TIG-114 ヒト線維芽細胞を用いたセ ンダイウイルスによるヒト iPS 細胞 の樹立

ヒト線維芽細胞(TIG-114)を医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクより入手し、以下の2種類のセンドイウイルスベクターを用いて iPS 細胞の樹立を行った。図1に示したように、野生型のセンドイウイルスの名古屋株を元にいくつかの改変を行い、A、B、C、Dの4つの外来遺伝子を搭載可能にしたバージョンである[1]。本研究では Oct4/Sox2/ Klf4/cMyc の4遺伝子を挿入したベクター(KOSM)と RNA ポリメラーゼである L タンパク質をコードする配列部分の後に

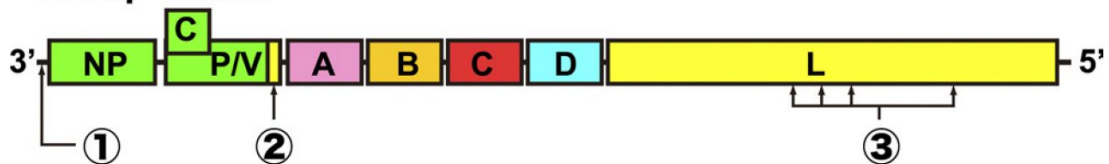
未分化 ES/iPS 細胞で発現する miR302 のターゲット配列を導入して、iPS 細胞樹立後にセンドイウイルスがより除去しやすくしたバージョン(KOSM-302L)を利用し、ヒト線維芽細胞(TIG-114)の iPS 細胞化を行った。

センドイウイルスを MOI=3 で感染させた後、3日目の細胞を固定し、センドイウイルス特異的タンパク質の一つ NP に対するマウスモノクローナル抗体で免疫蛍光染色したところ、図2に示す通り、KOSMバージョンも KOSM-302Lバージョン共に、60-70%程度の感染効率を達成していることが確認された。さらに、センドイウイルス感染後1週間たったころにはマウス ES 細胞様の少し盛

Wild-type Sendai virus (Nagoya strain)



SeVdp vector



Key Features:

- ① Insertion of End Signal
- ② P (P517)
- ③ L (V981, S1088, C1207, V1618)

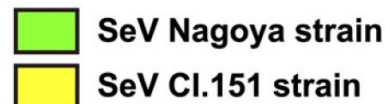
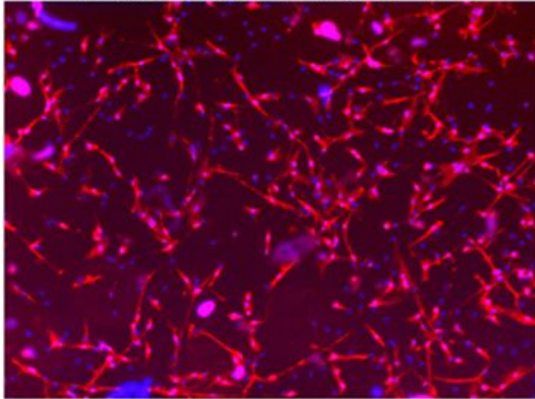
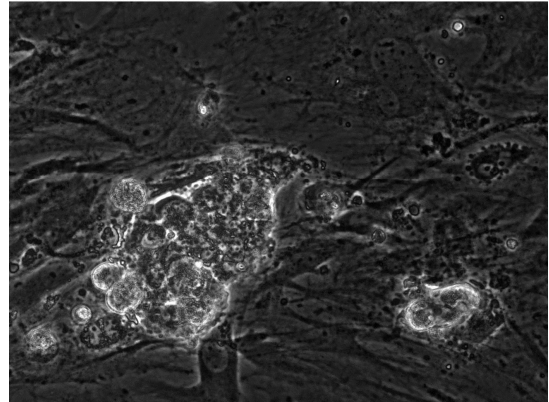


図1 . センドイウイルスベクターの構造。(上)野生型のセンドイウイルス(名古屋株)の構造。(下)不要タンパク質コード領域の除去と - の改変を行い、A-Dの4つの外来遺伝子を発現しうるように改変したセンドイウイルスベクター。(参考文献3より引用)

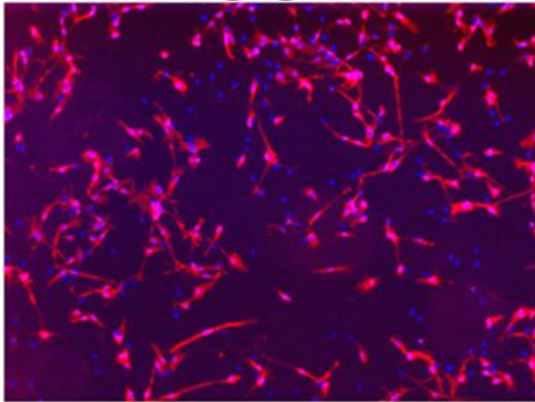
KOSM-302L



KOSM



KOSM



KOSM-302L

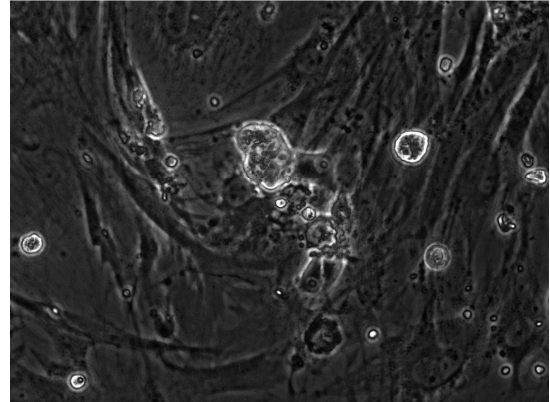


図2 . ヒト線維芽細胞へのOct4/Sox2/Klf4/cMyc 4 因子発現センダイウイルスの感染効率 2種類のセンダイウイルスを用いてMOI=3でTIG114細胞を感染させ、翌日固定し、センダイウイルスを認識する特異的抗体で免疫染色した(赤)。DAPI(青)で核を染色している。いずれのウイルスでも60-70%程度の感染効率が確認された。

図3 . TIG-114 細胞をセンダイウイルスで感染させた後、1週間後に出現した初期マウス ES 細胞様のコロニーの形態。

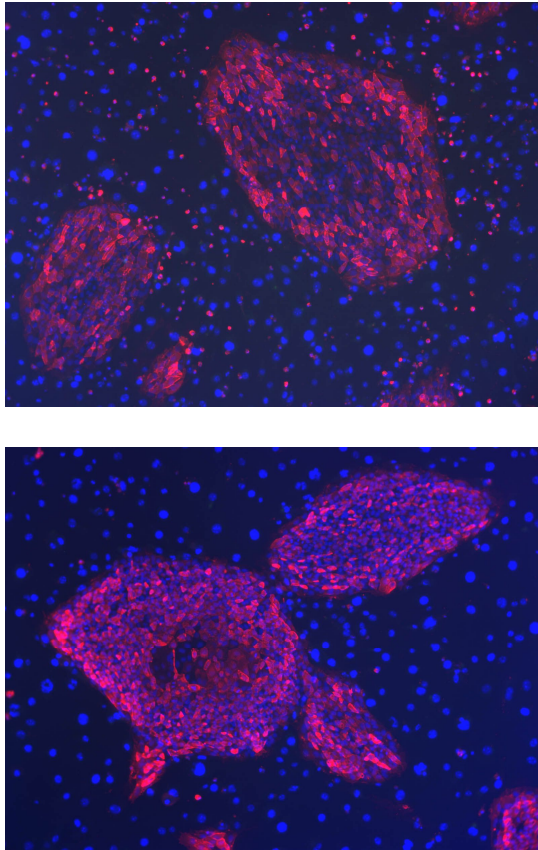


図4 .siRNA をトランスフェクションして出現したヒト iPS 細胞様のコロニー。センダイウイルスで 4 因子を導入後、出現したコロニーを含む細胞集団を新しい MMC-MEF 上に播種し直し、約 1.5 か月後に観察した際のヒト iPS 細胞。細胞は Tra-1-60 抗体（赤）とセンダイウイルス特異的 NP 抗体（緑）、DAPI（青）で染色した。センダイウイルス特異的な緑色のシグナルは観察されず、全てヒト iPS 細胞のコロニーは siRNA によりセンダイウイルスが除去できていることが確認された。

り上がったコロニーの形成が KOSM 及び KOSM-302L いずれのウイルスで感染させた場合においても観察された（図3）。センダイウイルス感染後 2 週間後に継代し、センダイウイルスの L ポリメラーゼに対する siRNA を 2 日おきに数回トランスフェクションしたところ、形態が扁平な典型的ヒト iPS 細胞様のコロニーが出現し、Tra-1-60 陽性のコロニーであることが確認された。また、これらのコロニーはセンダイウイルス特異的な NP タンパク質を認識する抗体で全く染まらず（図4）、siRNA 処理することで、多くのヒト iPS 細胞コロニーをセンダイウイルスフリーの状態に樹立できたことを確認した。これら扁平なヒト iPS 細胞を各ウイル

スについて、7 クローンずつピックアップして継代しており、これらの細胞を増殖させ安定に維持できるよう現在、増殖継代しつつストック作製を進めている途中である。

倫理面の配慮

ヒト iPS 細胞は、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。また、ヒト TIG-114 細胞は医薬基盤研究所・JCRB 細胞バンクよりより所定の手続きを経て入手した。なお、文部科学省からの通知（平成 20 年 2 月 21 日付 19 文科振第 852 号）にある禁止事項（着床前のヒト胚へのヒト iPS 細胞の導入、ヒト iPS 細胞から除核卵への

核移植などにより個体を発生させる研究、ヒトへのヒトiPS細胞の移植、ヒトiPS細胞を導入した着床前の動物胚からの個体産生、生殖細胞の作製)は行っていない。

本研究は、法令及び、独立行政法人 産業技術総合研究所の所内規定を遵守し、外部委員を含む産総研所内のヒト由来試料倫理委員会で審査を経た上で、限られた研究員が利用できる専用の実験室内で行った。また、本研究で使用したセンダイウイルスでヒトiPS細胞を樹立する実験を行うに当たっては、上記の産総研所内のヒト由来試料倫理委員会でヒト線維芽細胞 TIG-114 細胞の使用、ヒトiPS細胞の培養・樹立の計画を申請し承認済みであり、また、産総研所内の組換え DNA 実験委員会でセンダイウイルスを用いてヒトiPS細胞を樹立する計画は承認済みである。さらに、将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいて有効性及び安全性を確保できるよう厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従い、研究を行った。

D . 考察

これまでのところ、KOSM及びKOSM-302Lのいずれのウイルスで感染させた場合においても、NP陰性の

インテグレーションフリーの扁平なヒトiPS細胞が多数確認されており、各ウイルスを感染させた細胞から7株ずつピックアップして培養し、継代・増殖を進めつつ、ストック作製を進めている。なお、KOSM-302Lはもともと樹立後のヒトiPS細胞からセンダイウイルスを除去しやすくするため設計したベクターであるが、これまでのところsiRNAのトランスフェクションなしで容易にセンダイウイルスを除去することには成功しておらず、本方式のみでウイルスフリーのヒトiPS細胞の樹立を簡便に行うには至っていない。また、現在のところ、15継代後の現在でも未だヒトiPS細胞の形態は十分安定したものではなく、ところどころ自発的に分化した細胞集団が見えており、今しばらく完全なヒトiPS細胞の樹立の完了には時間がかかると思われる。しかしながら、センダイウイルスでヒトiPS細胞を樹立する際にはわりと一般的に見られる現象であり、いずれにしてももう少し維持培養しながら様子を見る必要があると考えている。

E . 結論

初年度の平成 25 年度は、まず本研究に必要なまず国内外でも広く使われ出したセンダイウイルスを用いてインテグレーションフリーのヒトiPS細胞の樹立を開始した。産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センターのプロトコルに従い、既にレト

ロウイルスによりヒト iPS 細胞が樹立されているのと同様のヒト繊維芽細胞からインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞を作製中であり、これにより種々の品質変動要因による影響を検証する細胞材料が整備できつつある。しかしながら、均一な未分化状態を維持しながらヒト iPS が安定して増殖するようになるためには、しばらく継代して様子を見て、樹立した細胞の性状を慎重に解析する必要がある。引き続き継代培養を行いつつ、iPS 細胞が安定した後、様々な解析を行い信用できる株を来年度選択する予定であるが、本年度は、まずは未分化幹細胞マーカーを発現するセンダイウイルスフリーのヒト iPS 細胞株を多数樹立し保存したところまでは達成しており、当初の計画どおり順調に研究が進行している状況にある。

F . 参考文献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**, 861-72.
2. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1720.
3. Nishimura K., et al., *Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming*. J Biol Chem. 2011 **286**, 4760-4771.
4. Nishimura T., et al., *Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. Cell Stem Cell. 2013 **12**, 114-126.
5. Wakao H, et al., *Expansion of functional human mucosal-associated invariant T cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. Cell Stem Cell. 2013 **12**, 546-558.

G . 研究発表

1 . 原著論文

- 1) 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)

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、“マイクロチャンバアレイチップによるヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダー培養”、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) 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)
- 3) 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)

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
（分担）研究報告書

iPS 細胞の培養・ハイスループット分化評価

研究分担者 大沼清

長岡技術科学大学・工学部・生物系

准教授

研究要旨：ヒト iPS 細胞の創薬応用を目指した研究が進んでいる。しかし、ヒト iPS 細胞の培養は難しく、経験則に基づいた様々な培養法が試されているが、各培養方法の良し悪しの具体的な検証がなされていない。そこで本分担研究では、iPS 細胞の未分化維持に於ける品質変動の評価と、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価を行う。平成 25 年度は、微小流体制御培養システムに、無血清・無フィーダ培養を組み合わせた分化アッセイシステムを用い、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養と初期分化の制御に成功した。今後は、様々な分化アッセイでの使用を検討する。

A. 研究目的

再生医療や創薬の実用化へ向けたヒト誘導多能性幹（iPS）[1, 2]を用いた研究が世界中で盛んである。実用化にあたり、品質の管理が大きな問題となっている[3]。ヒトiPS細胞は同じ人が同じプロトコルで培養していても状態が変わる事がある。ましてや、別のグループが別のプロトコルで培養した場合、その状態は大きく異なる。そのような状態で分化実験を行っても再現性が取れない。本分担研究では、iPS細胞の未分化維持に於ける品質変動の評価と、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価を行う事である。本年度は、特に微細加工技術を用いたハイスループットの分化評価の予備実験を進めた。

現状のヒトiPS細胞の培養や薬剤アッセイにはマルチウェルプレートが良く使われる。しかし、これには大きな問題が2つある。1つが、コストである。ヒトiPS細胞の培地は高価である。一般的な細胞を培養するために多用されるウシ胎児血清（FBS）の代わりに、ヒトiPS細胞の培養では血清を精製して様々な成分を補った血清代替物（KSR）や様々な精製タンパク質等を用いる。そのため、培地の価格が数倍になる。更に、分化するときには、サイトカインや小分子化合物、特殊な細胞接着コートなどを用いるが、それらは上記培地の数倍～10倍近くの値段のものもある。2つ目の問題は、細胞環境の制御問題である。通常の培養皿を用いた場合、1日1回の培地交換時

に培養状態が大きく変わる。また、細胞同士の相互作用があるため、ある部分は神経系へと分化し、別の部分は中胚葉方向へ分化するなど、非常に不均等な状態となる。以上の様に、マルチウェルを使う培養方法には、コスト問題と制御問題が有る。

微細加工を用いれば、この2つの問題の解決できる[4, 5]。コスト問題は、単純に培養器を縮小すれば良い。培養面積が半分になれば、細胞接着コートのコストが半分、必要な培地のコストも半分になる。培養環境の制御問題に関しては、常に培地を灌流¹するシステムを用いることにより解決が可能となる。更に、無血清・無フィーダ培養を併用することにより、血清やフィーダなどから供給される未知因子が排除できるため、培養の制御がより厳密なものとなる。

本年度は、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価の基礎実験として、作製したプロトタイプを用い、ヒトiPS細胞の無血清・無フィーダ培養を試みた。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の KSR-MEF 培養

ヒトiPS細胞を維持培養一般的に行われている培養法に準じた[1, 6, 7]。ヒトiPS細胞201B7株[1]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。特別断りのない

¹ 灌漑のように、常に培養部へと新鮮な培養液を供給し、古い培養液を流し出すこと。環流(環のように流れる)ではない。

限り、実験には201B7細胞を使用した。細胞の培養は以下の通り。

D-MEM/F12にKSR、2-mercaptoethanol、MEM 非必須アミノ酸、bFGF、ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培地(KSR培地)を用いて、フィーダ細胞(MEF)上で培養した。インキュベータは37℃、5% CO₂に設定した。継代は、培養皿から培地を除き、ヒトiPS細胞解離液(CTK溶液[6])を加えて3分間静置した。その後、ヒトiPS細胞解離液を除き、KSR培地を2 mL加えてピペッティングし、細胞懸濁液を15 mLチューブに移した。このチューブを10 × g、1分間遠心し、上清を除き、KSR培地を1 mL加えた。MEFを培養している培養皿からMEF培地を除き、KSR培地に5 μM ROCK inhibitor[9]を加え、ヒトiPS細胞を元の培養皿の1/6~1/3量を播種した。継代の2日後から毎日、培地を交換した。MEFは、D-MEMに0.9% Penicillin-Streptomycin、9% FBSを加えた培地を用い、同じインキュベータで培養した。フィーダ細胞は、継代3~4回目のMEFをmitomycin Cで90分間処理し、翌日に10%DMSO入りの培養液で凍結保存し、それを解凍して0.1%ゼラチンコート培養皿に播種したものを使用した。

ヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダ培養

微小流体制御培養システムを用いた全ての実験で、ヒトiPS細胞をKSR-MEF培養から、無血清・無フィーダ培養に移した後、少なくとも1回以上継代培養してから実験

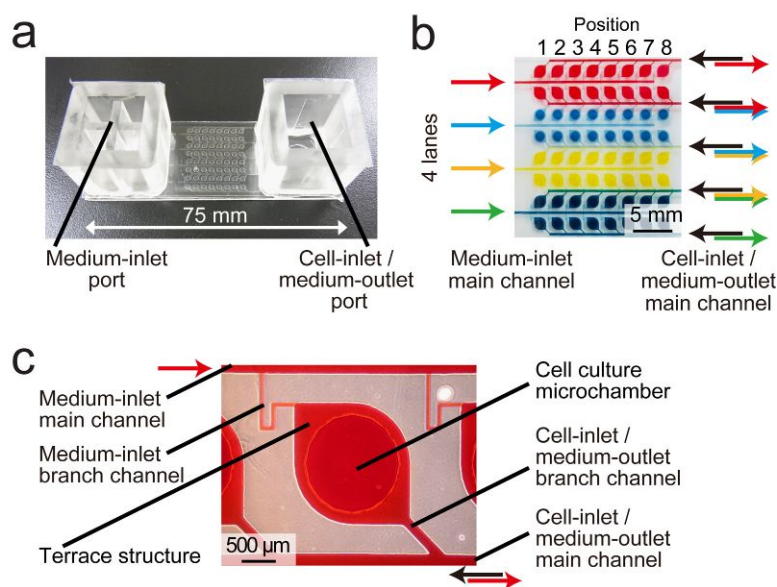


図 1: 微小流体制御培養システム。全体像 (a)、64 個の細胞培養部を色素で染め分けたもの (b)、一つの細胞培養部 (c)。

a) 全体はスライドガラスの上に乗っている。左に培養液を入れるリザーバ、右に廃液を貯めるリザーバがあり、中央に細胞培養部がある。培養液は左から右へと流れる。

b) 64 の細胞培養部拡大。

c) 一つの細胞培養部の拡大。左上から培養液が流入し、右下へと流れ出す。

に使用した。無血清培養 (ESF9a) の組成は以下の通り。基礎培地は hESF-Gro medium (Cell Science & Technology Institute、宮城)。これに以下を添加した。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ウシ膵臓由来インスリン (Sigma I-5500)、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヒトアポトランスフェリン (Sigma T-1147)、10 μM 2-メルカプトエタノール (Sigma M-7522)、10 μM エタノールアミン (Sigma E-0135)、20 nM セレン酸ナトリウム (Sigma S-9133)、0.5 mg/mL の脂肪酸不含のウシ血清アルブミンのフラクション V に結合した 4.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のオレイン酸 (Sigma O-3008)、100 ng/mL ブタの腸粘膜由来のヘパリン・ナトリウム塩 (Sigma H-3149)、10 ng/mL 塩基性繊維芽細胞成長因子 (bFGF、Wako)、2 ng/mL ヒトアクチビン A (338-AC R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)。

培養皿は、2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のファイブプロネクチンでコートした [7, 10]。継代はまず、培養皿から hESF-9a 培地を除き、0.2-0.5 unit/mL

dispase、hESF-9a 培地から成る解離液を 0.5 mL 加え 5 分間 37 度で静置した。その後、解離液を除き hESF-9a 培地を 2 mL 加えてピペティングした後、細胞懸濁液を 15 mL チューブに移した。このチューブを 10 \times g、1 分間遠心し、上清を除き、hESF-9a 培地を 1 mL 加えた。1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ファイブプロネクチンコート培養皿に hESF-9a 培地を 4 mL、5 μM ROCK inhibitor を加え、ヒト iPS 細胞懸濁液を 0.2 mL 加え、播種した。播種 2 日後から毎日培地を交換した。

微小流体制御培養システムの作製

微細フォトリソグラフィで鋳型を作り、2液混合の熱硬化性のシリコンゴム PDMS で模りした [4, 5]。

鋳型作りは、UV 露光によりパターンを UV 硬化樹脂の SU-8 に転写する工程を 4 サイクル行った。各サイクルは SU-8 をシリコンウェハにス

ピンコートし、ソフトベーク後、マスクアライメント露光装置 (MODEL K310P100S) を用いてUV露光し、ポストベークした。その後、乳酸エチルに浸けてパターン以外のフォトレジストを除去し、イソプロパノールで洗い、窒素ガスで乾燥し、tridecafluoro-1, 1, 2, 2-tetrahydrooctyl-1-trichlorosilaneで疎水化した。

PDMSでの模りの方法は以下の通り。10/1 (w/w) で混合したPDMSプレポリマーと硬化剤を上述の鑄型に流し、オープンで120℃、2時間加熱し、微小流体制御培養器を模った。模った培養器と蓋の平板はエタノールで洗浄後、乾燥し、プラズマリアクターPR500 (ヤマト科学株式会社、Tokyo、Japan) を用いて O_2 プラズマで処理して接着した (Duffy et al., 1998)。培養液・廃液を貯め置くりザーバもPDMSで作製した後、エタノールで洗浄後、乾燥後、未硬化のPDMSを接着剤として用いて接着した。

微小流体制御培養システムによるヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダー培養

ヒトiPS細胞を無血清・無フィーダー培養した培養皿から培地を除き、PBSで2回洗浄し、0.02% EDTA-PBSを加えて10分間静置した。そこに培地を1 mL加えてピペティングして一細胞レベルまで分散した後、300 ×g、3分間遠心して回収した。5 μM ROCK inhibitor を添加したESF-9a培地を加えて、 4.2×10^5 cells/mL細胞懸濁液を調整した。

微小流体制御培養システムは1 μg/cm²のファイブロネクチンでコートした。そこに細胞懸濁液を5 kPaの加圧によって細胞懸濁液を導入した。1日後に細胞が接着したことを確認してから、電磁弁制御装置 (エンジニアリング・システム株式会社、Nagano、Japan) と高性能調圧器PR4102 (ジーエルサイエンス株式会社、Tokyo、Japan) から成る灌流培養装置を用いて灌流培養を行った。

微小流体制御培養システム内での免疫染色

微小流体制御培養システムの培養液リザーバに、0.5 mM カルシウム入り、0.5 mM マグネシウム入りPBS (PBS++) を各リザーバに400 μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。4% Formalin Solutionを各リザーバ150 μL加えて30 kPa加圧し、室温で20分間静置して細胞を固定した。固定後、PBS++を各リザーバ400 μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS++を各レーン150 μL加えて30 kPa加圧し、室温で90分静置し、透過、ブロッキングを行った。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS++でそれぞれ希釈し1次抗体を各リザーバ150 μL加えて30 kPa加圧し、4℃で12時間以上静置した。PBS++を各リザーバ400 μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS++でそれぞれ希釈した2次抗体を各リザーバ150 μL加えて30 kPa加圧し、アルミ箱で被った箱に入れ、室温で3時間静置した。DAPIを0.2% Triton X-100、

10 mg/mL BSA-PBS++で希釈し、各
レーンリザーバ μ L加えて30 kPa
加圧し、アルミ箔で被った箱に入れ、
室温で30分静置した。その後、
PBS++を各リザーバ400 μ L加えて、
30 kPa加圧し、洗浄し、オールイ
ンワン顕微鏡を用いて観察した。1
次抗体はウサギポリクローナル抗
Oct-3/4抗体 (1/500)、マウスモノ
クローナルIgM抗SSEA-1抗体
(1/1000)を用い、2次抗体は抗マウ
スIgM抗体 (1/500)、抗ウサギIgG
抗体 (1/2000)を用いた。

に関する指針」に従い、研究を推
進した。

倫理面の配慮

ヒトiPS細胞は、JCRB細胞バン
ク（医薬基盤研究所）及び、理研
細胞バンク（理化学研究所）より
所定の手続きを経て入手した。文
部科学省からの通知（平成20年2
月21日付 19文科振第852号）にあ
る禁止事項（着床前のヒト胚への
ヒトiPS細胞の導入、ヒトiPS
細胞から除核卵への核移植など
により個体を発生させる研究、ヒ
トへのヒトiPS細胞の移植、ヒ
トiPS細胞を導入した着床前の
動物胚からの個体産生、生殖細胞
の作製）は行わなかった。

全研究は、法令及び、長岡技術
科学大学の内規を遵守し、所定の
手続きと審査を経た上で、専用の
実験室内で行った。更に、将来有
用な医療に繋がる可能性を秘めた
ヒト幹細胞研究が、社会の理解を
得て適正に実施・推進されるよう、
個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、
科学的知見に基づいて有効性及び
安全性を確保できるよう厚生労働
省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究

C. 研究結果

微小流体制御システムでのヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダ培養

ヒト iPS 細胞を無血清・無フィーダ培養条件下において、微小流体制御培養システム内で未分化維持培養が可能であるか、更にそれに必要な培地の量を調べた。無血清・無フィーダ培養したヒト iPS 細胞を微小流体制御培養システムに導入して静置し、1日後に細胞が生着していることを確認した後、1日1回の培地交換、1日3回の培地交換、12.5 $\mu\text{L}/\text{時}$ の灌流培養、50 $\mu\text{L}/\text{時}$ の灌流培養の4つの培地交換条件で4日間培養した。

ヒト iPS 細胞の未分化マーカー

OCT3/4で免疫染色したところ、全ての培地交換条件においてほとんどの細胞が陽性であったことから、未分化維持が可能であることが分かる。ところが、細胞数を計測して24ウェルで培養したときと比較したところ、1日1回、1日3回の培地交換では細胞数が有意に少なかった。それに対し、灌流培養した条件下では24wellで培養したときに比べて有意差は認められなかった。以上の結果から、微小流体制御培養システムを用い、灌流培養することにより、未分化なヒト iPS 細胞の培養が可能であること、更に細胞の状態を変えることなく培地の交換速度を変えられることが分かった。

微小流体制御培養システムにおけるヒト iPS 細胞の分化誘導

次に、このシステムを使い分化

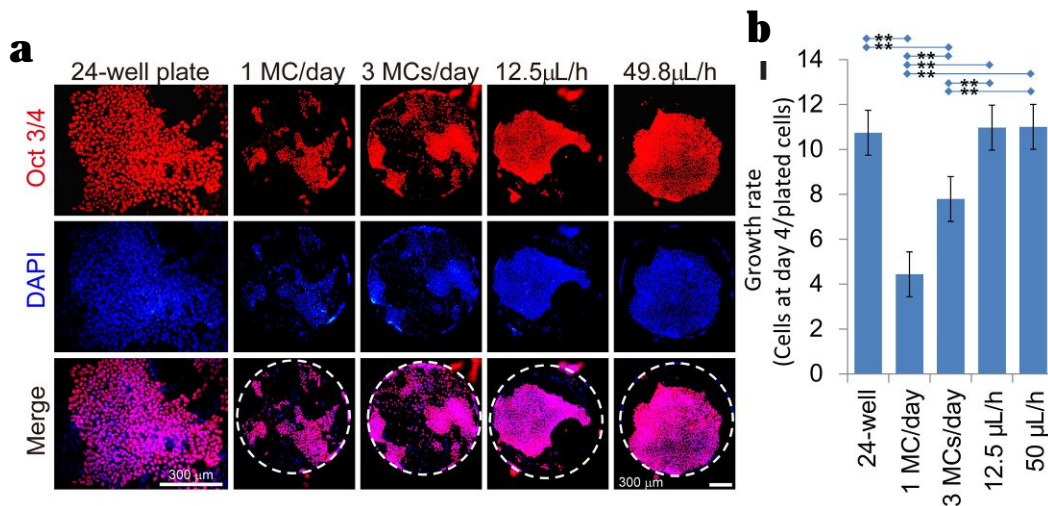


図 2：微小流体制御培養システムを用い、ヒト iPS 細胞を培養液の交換頻度を変えて無血清・無フィーダ培養した。a)左から 24 ウェルのマルチウェルプレート上での培養(コントロール)、1日1回、1日3回、12.5 $\mu\text{L}/\text{時}$ 、50 $\mu\text{L}/\text{時}$ の培地交換をした。3日後に OCT3/4 で免疫染色した。青色は DAPI による核染色。b)細胞の増殖の比較。

誘導が可能かどうかを調べた。分化には、胚胎外組織の方向へ分化誘導する因子として知られている骨形成因子4 (BMP-4) を用いた。無血清・無フィーダ培養したヒトiPS細胞を微小流体制御培養システムに導入して静置し、1日後に細胞が生着していることを確認した後、4種類の培地へと交換した。4種類の培地は、未分化維持培地 (hESF-9a)、bFGFなどの未分化維持因子を除いた培地 (hESF-6)、分化を誘導するためにhESF-6に低濃度 (10 ng/mL) のBMP-4を入れた培地 (+10 BMP)、分化を誘導するためにhESF-6に高濃度 (50 ng/mL) のBMP-4を入れた培地 (+50 BMP) を灌流した。

各培地に交換した後、3日間灌流培養をした。位相差顕微鏡で観察したところ、未分化維持条件ではヒトiPS細胞は通常の形態(核が大きく、細胞質が小さく、コンパクト)だったが、分化誘導培地内では細胞が大きく伸展して明らかに分化した形態となった(図 2a PhC)。未分化マーカのOCT3/4、初期分化マーカのSSEA1で免疫染色を行った結果、未分化維持培養条件ではほとんどの細胞がOCT3/4陽性(赤)かつSSEA1陰性であったのに対し、分化誘導培地ではOCT3/4陰性かつSSEA1陽性(緑)の細胞が多かった(図 2a)。以上の結果を定量するため、各細胞におけるOCT3/4とSSEA1の蛍光量を、無血清維持状態を基準にグラフ化したところ、BMP-4を加えることにより、未分化維持マーカOCT3/4陽性の蛍光(赤)が減少し、初期分化マーカSSEA1陽性の蛍光(緑)が増加していることが明らかとなった(図

2b)。同様の結果が、別のヒトiPS細胞株である253G1を用いた実験でも得られた。

これらの結果より、無血清・無フィーダ条件下において、微小流体制御培養システムでヒトiPS細胞の未分化維持培養と分化誘導できたことが示唆される。

D. 議論

本年度は、ハイスループット分化評価の基礎実験として、微小流体制御培養システムを作製し、ヒトiPS細胞を無血清・無フィーダ培養した。その結果、培養液の交換速度を変えても未分化性は変わらなかったが、灌流培養した時にはマルチウェルと同様の増殖率を示した。また、分化誘導培地では未分化維持マーカが減少し、初期分化マーカが上昇した。以上より、この微小流体制御培養システムはヒトiPS細胞を用いた分化アッセイに使えることが示唆される。

ヒトiPS細胞培養におけるコスト問題は、培地の使用量を抑えることが一つの解決策となる。本実験では、本実験において、12.5 μ L/hの灌流速度で3日間の灌流培養時に使用した培地は1チャンバー当り56.25 μ Lである。それに対し、96ウェルプレートを用いて行った場合、必要な分化誘導培地を1日200 μ Lとすると3日間で1ウェル当り600 μ L必要である。そのため我々の方法を用いたとき、96ウェルプレートよりも培地使用量が1/11とかなり少ない。したがって、コスト問題の解決に向けて1歩前進したといえる。

ヒトiPS細胞培養における制御

問題に関しては、常時培養液を流し続ける灌流培養により制御できること予想された。本実験では、1日1回と3回の間歇的な培養に比べ、灌流培養をした場合は細胞の増殖が速いことを示した。通常の細胞培養では、培地交換は1日1回であり、その交換毎に古い培地から新しい培地に変化する。すなわち、通常の細胞の培養条件は、徐々にグルコース等の栄養の濃度が減少し、アンモニア等の不要物が増していき、それが突然元の状況に戻る、ということが24時間周期で繰り返されることになる。それに対して灌流培養の場合は常に一定の培養条件を保つことができるため、培養のより良い制御が可能だ。

また本研究では無血清・無フィーダ培養で、ヒトiPS細胞の未分化維持と分化誘導できることを示した。血清やフィーダ細胞を用いず、高純度に生成されたタンパク質などを用いた培養である。実験では、ヒトiPS細胞の未分化維持に必要なbFGF等を除去して分化誘導因子であるBMP4を添加した結果、優位な差が観察された。すべての組成が明らかであるため、培養条件と細胞状態との間に1対1対の応付けが可能となる。

E. 結論

本分担研究では、微細加工技術を用いたプロトタイプシステムを用いて、ハイスループット分化評価の基礎実験を行った。微小流体制御培養システムに、無血清・無フィーダ培養を組み合わせ、ヒトiPS細胞の未分化維持と分化誘導に成功した。今後は、様々な分化アッセイを

試みる予定である。

F. 参考文献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
2. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
3. 古江-楠田, 美保., *日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化: その2 分化能の評価*. 組織培養研究, 2009. **28**(2/3/4): p. 129-133.
4. Sugiura, S., et al., *Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay*. Biotechnol Bioeng, 2008. **100**(6): p. 1156-65.
5. Yoshimitsu, R., et al., *Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions*. Biotechnology and Bioengineering, 2014. **111**(5): p. 937-947.
6. 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.
7. 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.
8. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nature biotechnology, 2007. **26**(1): p. 101-106.
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. Kusuda Furue, M., et al., *Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010.
11. 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)
12. 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)

13. 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 γ -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、 γ -globurin 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、藤木彩加、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、 Koji Hattori、 Motohiro Tagaya、 Toru Sasaki、 Shinji Sugiura、 Toshiyuki Kanamori、 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 口頭

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) 口頭

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)

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 25 年度は、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により、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

田代克久 (独)医薬基盤研究所

山口朋子 (独)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)は自己複製能と多分化能を有しており、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞は再生医療や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、種々のヒト iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化効率を測定することにより、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 25 年度は、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標準化へ向け、まずは分化プロトコルの収集を行った。また、収集したプロトコルを基に、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞および血液前駆細胞へ分化誘導を試みた。

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) 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) を用いて継代、またはコロニーのピックアップにより継代した。

[血管内皮細胞]

B-2. 血管内皮細胞への分化誘導 (単層培養法 (分散法))

単一細胞へ解離したヒト iPS 細胞を用いて血管内皮細胞への分化誘導を行った。実験は下記に従って行った。まず、分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Cell Science & Technology Institute) で培地交換した。次に、Accutase (Millipore) を用いてヒト iPS 細胞を回収後、100 ng/ml Activin A (R&D systems) 及び 10 ng/ml の bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地(6 因子[10 µg/ml human

recombinant insulin、5 µg/ml human apotransferrin、10 µM 2-mercaptoethanol、10 µM ethanolamine、10 µM sodium selenite、0.5 mg/ml fatty acid free bovine albumin (全て Sigma)] を含む hESF-DIF 培地 [Cell Science & Technology Institute]) に懸濁後、マトリゲル (BD Biosciences) でコーティングした細胞培養用 12 ウェルプレートの各ウェルに 1×10^5 個/ウェルで播種したのち、2 日間培養した。その後、50 ng/ml BMP4 (R&D Systems)、10 ng/ml bFGF を含む Differentiation hESF-DIF 培地にて 4 日間培養した。分化誘導 6 日目に細胞を回収し、付属のサプリメントおよび 20 ng/mL の vascular endothelial growth factor (VEGF : Peprotech) を加えた EGM-2 培地 (Lonza) にてその後の培養を行った。

B-3. 血管内皮細胞への分化誘導 (単層培養法 (コロニー法))

コロニー状のヒト iPS 細胞を用いて血管内皮細胞への分化誘導を行った。実験は下記に従って行った。マトリゲルにてコーティングした 12 ウェルプレートにヒト iPS 細胞をコロニー状で播種し、10 ng/mL の FGF2 を含む MEF の培養上清にて 2 - 3 日培養した。分化開始日に 4 mM L-グルタミン、100 ng/mL の Activin A を含む RPMI1640 培地 (Sigma) にて置換し、24 時間培養した。その後 4 mM L-グルタミン、100 ng/mL の Activin A、0.2%FBS を含む RPMI1640 培地でさらに 1 日培養した。

分化誘導 2 - 5 日目に 4 mM L-グルタミン、50 ng/mL BMP4、2% FBS を含む RPMI1640 培地にて培養し、その後、20 ng/mL VEGF を加えた EGM-2 培地 (Lonza) にて培養した。

B-4. 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-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 6 日目および 9 日目の EB を回収し、Cell dissociation buffer (Life Technologies) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 15 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 $^{\circ}$ 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。セルソーターにて細胞分離作業を行う場合は、0.25% trypsin/EDTA (Life

Technologies)によりEBを単細胞に解離した後に、APC標識抗ヒトCD34抗体を反応させた。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)にてCD34+細胞を分離した。

B-6. マトリゲルを用いた管腔形成能の評価

48 wellプレートに100 μ lのマトリゲル(Matrigel Matrix 2270588; BD Bioscience)溶液を加えて37 $^{\circ}$ C、1時間静置することにより、プレートをコーティングした。接着培養して増幅させた細胞を0.25% trypsin/EDTAにて回収し、10 ng/ml VEGFを含む培地に懸濁し、 1×10^5 cells/wellの細胞数で播種した。37 $^{\circ}$ C、16時間培養後に顕微鏡下で細胞を観察した。

B-7. アセチル化LDLの取り込み能の評価

接着培養したCD34+細胞を、終濃度10 μ g/ml AlexaFluor 488 acetylated LDL(Life Technologies)を含む培地で置換し、37 $^{\circ}$ C、4時間培養後に蛍光顕微鏡(BIOREVO BZ-9000; キーエンス)にて観察した。

[血液前駆細胞]

B-8. 血液前駆細胞への分化誘導 (支持細胞との共培養法)

分化誘導開始の前日に50 Gyの放射線を照射し増殖を止めたOP9細胞あるいはC3H10T1/2細胞株をゼラチンコートした10 cm培養皿に 7×10^5 個で播種し、フィーダー細胞として用いた。iPS細胞は、

$5-10 \times 10^4$ 個/10 cm培養皿となるようにフィーダー細胞上に播種した。細胞の播き直しは行わず、50 ng/ml VEGF含有培地を9日目までは3日毎、9日目から15日目までは2日毎に交換することにより血液前駆細胞を分化誘導した。

B-9. 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、 1×10^6 個のiPS細胞と前日放射線処理した 6×10^5 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)、2 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、20 ng/ml stem cell factor(SCF; Pepotech)、20 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-10. 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

Sac 法により分化誘導した細胞は、ピペッティングを繰り返すことで機械的に嚢状構造体を崩し、40 μm セルストレイナーを通して、嚢状構造体内部の血液細胞のみを回収した。EB 形成法により分化誘導した細胞は、培養 8 日目の EB を回収し、Cell dissociation buffer (Life Technologies) を加えて 37 °C で 15 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、フローサイトメーター (BD LSRFortessa II ; BD Bioscience) を用いて CD34 陽性 CD43 陽性細胞の割合を解析した。セルソーターにて細胞分離作業を行う場合は、上述した方法でサンプルを調製し、セルソーター (SONY SH-800) にて CD34+CD43+ 細胞を分離した。

B-10. コロニーアッセイ

B-10. の方法により回収した CD34+CD43+ 血液前駆細胞は、MethoCult H4435 メチルセルロース培地 (rhSCF; rhGM-CSF; rhG-CSF; rhIL-3; rhIL-6; rhEPO を含む) (Stem Cell) に懸濁し、35mm 培養皿に播種した。37 °C、

5% CO₂ インキュベーターで 14 日間培養を行い、顕微鏡下で形態学的に識別しコロニー形成細胞 (colony-forming cell; CFC) を分類・計数・観察した。

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。簡便に実験を行える単層培養法にて分化誘導を行った。まず始めにヒト iPS 細胞を単細胞に解離させ、各種サイトカインを含む培地中で血管内皮細胞への分化誘導を試みたところ、血管内皮細胞マーカーである VE-Cadherin を発現する細胞が一部得られた。しかし、細胞のプレートへの接着が実験間で大きくばらつき、毎回同様の結果を得ることが出来なかった(データ略)。そこで次に、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 により中胚葉・血管内皮細胞様細胞の誘導を試みた。その結果、本手法においても、VE-Cadherin 陽性細胞を得ることが可能であったが、再現性良く血管内皮細胞を誘導することが出来なかった(データ略)。

単層培養法では分化誘導効率が実験間で異なってしまうため、次に、胚様体 (embryoid body: EB) を形成させて分化誘導を行った。低接着性の 96 ウェルプレートへ単細胞に解離したヒト iPS 細胞を播種したところ、培養 2 日目には均一な大きさの EB が形成されていた。さらに培養を進めたところ、CD34 や VE-Cadherin を発現する細胞を誘導できていることが確認された。EB 法では、実験間で CD34 と VE-Cadherin を共発現する血管内皮細胞様の細胞への分化効率に大きなばらつきはなかった。本手法ではヒト iPS 細胞 201B7 株だけでなく、その他のヒト iPS 細胞株においても血管内皮細胞を誘導できていた (データ略)。なお、得られた CD34 をセルソーターにて単離し、増殖させて機能を確認したところ、アセチル化 LDL の取り込み能や管腔形成能も有しており、機能的な血管内皮細胞が得られていることが示された。したがって、EB 形成法により、ヒト iPS 細胞から安定的に機能的な血管内皮細胞を誘導可能であることが明らかとなった。

C-2 . ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法として、支持細胞との共培養法や EB 形成法などが繁用されている。そこで、iPS 細胞を VEGF 存在下で骨髄ストローマ細胞株である OP9 細胞やマウス間葉系細胞株である C3H10T1/2 細胞と共培養することを試みた。iPS 細胞を OP9 細胞と

共培養した結果、血液前駆細胞マーカである CD34 と CD43 を共に発現する細胞は得られなかった。一方、iPS 細胞を C3H10T1/2 細胞と共培養した結果、iPS 細胞から CD34 と CD43 を共発現する血液前駆細胞を分化誘導可能であった。しかし、ばらつきが大きく、安定した結果を得ることが出来なかった (データ略)。次に、EB 形成法によりヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導を試みた。iPS 細胞と共に放射線照射した C3H10T1/2 細胞をペトリディッシュに播種したところ、培養 2 日目には EB が形成されていた。さらに培養を進めたところ、培養 8 日目には CD34+CD43+血液前駆細胞が得られた。EB 形成法は、C3H10T1/2 との共培養法と比較し、短期間で効率良く安定的に血液前駆細胞を分化誘導可能であることが確認された。また、本手法は、ヒト iPS 細胞 201B7 株だけでなく、その他のヒト iPS 細胞株においても血液前駆細胞を分化誘導可能であった (データ略)。なお、得られた CD34+CD43+血液前駆細胞をセルソーターにて単離し、コロニー形成能を検討したところ、種々のコロニーが検出されたことから、iPS 細胞由来 CD34+CD43+ 細胞は血液多能性を有する未熟な血液細胞であることが示された。

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。本年度は、コントロールとして使用できる中胚葉(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。ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法については、EB 形成法が最も再現性の良いプロトコールであることが確認された。単層培養法(分散法・コロニー法)でも検討を行ったが、分散法については、細胞の接着が安定しないために、分化誘導効率は不安定であった。また、コロニー法についても安定的に血管内皮細胞を誘導できなかった。詳細な原因は不明であるが、コロニーの大きさ等は実験者の感覚・経験に委ねられているため、一般的なプロトコールとしては困難である可能性がある。一方、EB 形成法ではヒト iPS 細胞株や実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞を誘導可能であったことから、本分化誘導法は、コントロールとして使用可能な血管内皮細胞への分化誘導法となり得ると考えられた。

ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導法についても、EB 形成法が最も再現性の良いプロトコールであることが確認された。共培養法では、iPS 細胞を単細胞に解離せず、塊のまま支持細胞上に播種する。播種するコロニーの大きさ等にはばらつきが生じるため、安定した結果が得られなかった。一方、EB 形成法では iPS 細胞を単細胞に解離し、一定の細胞数を播種するため、安定的な結果が得られたと考えられる。なお、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、今後は EB 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

胚様体形成法を用いることにより、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。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。

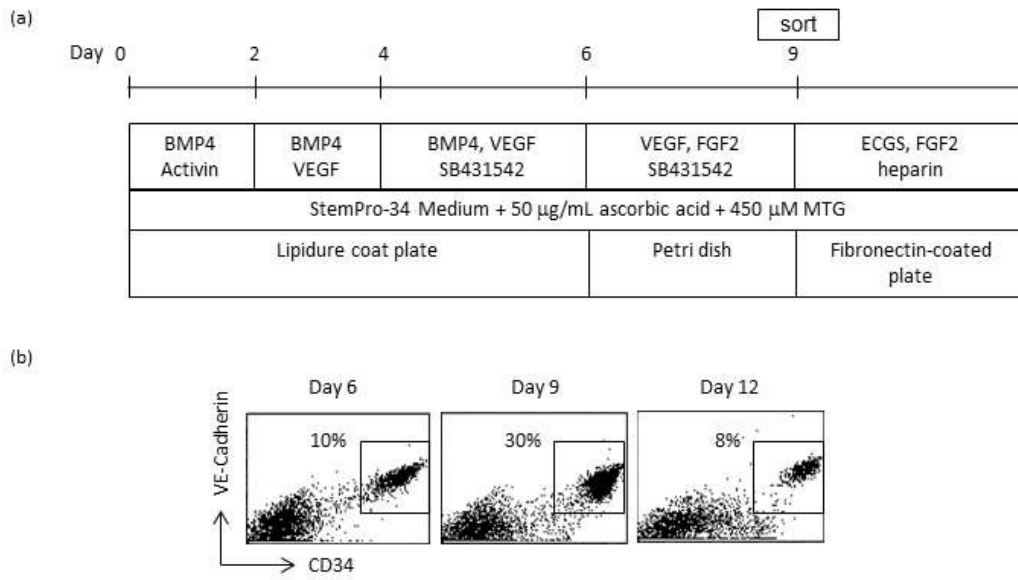


Figure 1 Differentiation of CD34+VE-Cadherin+ cells from human iPS cells by EB formation. (a) Differentiation protocols. (b) Proportion of CD34+VE-Cadherin+ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry.

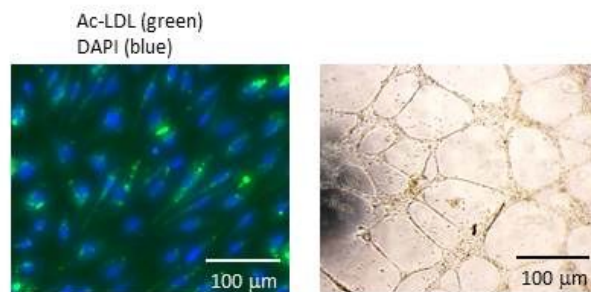


Figure 2 Characterization of human iPS cell-derived endothelial cells. (a) Morphology of human iPS cell-derived endothelial cells. (b) The expression of endothelial marker was examined by immunostaining. (c) Ac-LDL uptake assay (left) and Matrigel tube formation assay (right) were performed.

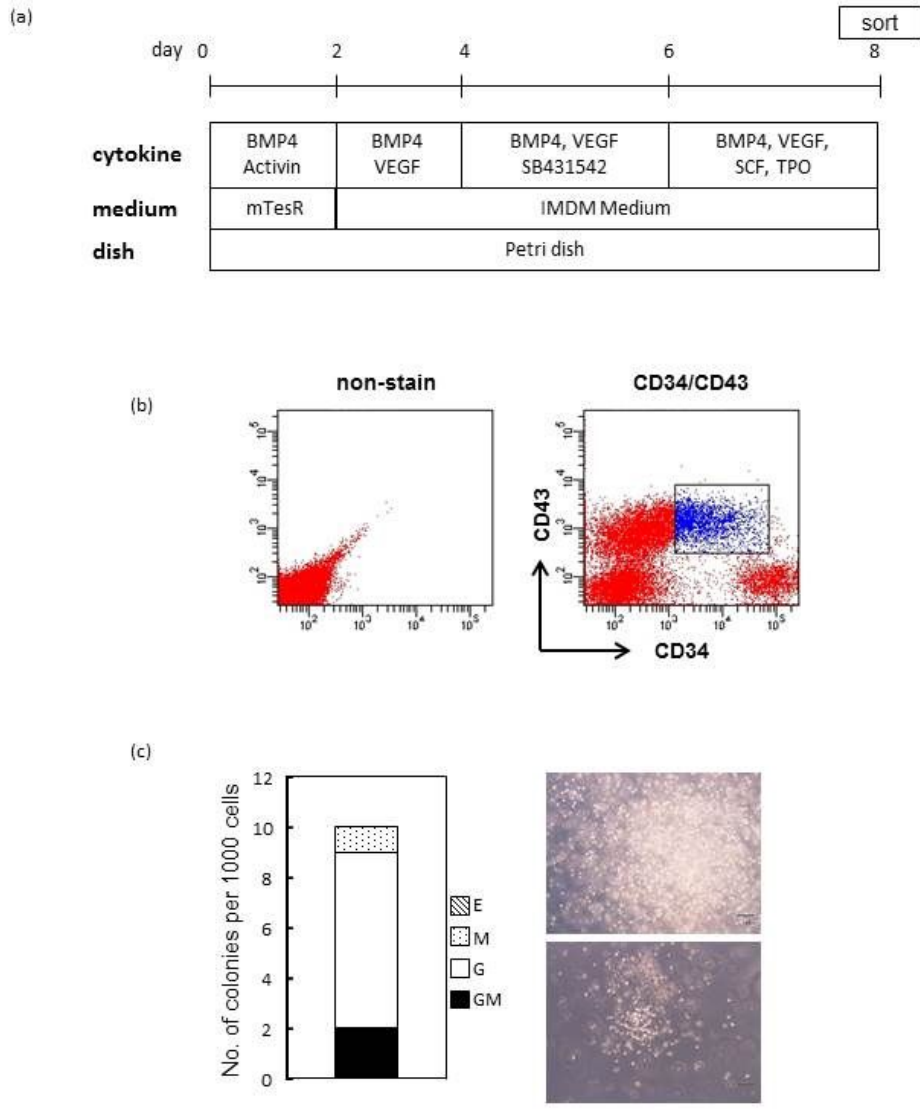


Figure 3 Differentiation of CD34+CD43+ cells from human iPS cells by EB formation. (a) Differentiation protocols. (b) The proportion of CD34+CD43+ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry. (c) Sorted CD34+CD43+ cells were subjected to CFU-C assay. E, M, G, and GM stand for colony containing erythroid cells, monocytes, granulocytes, and granulocytes and monocytes, respectively.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., **Kawabata K.** Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)
2. 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.*, in press
3. 山口朋子、川端健二、iPS 細胞由来マスト細胞を用いた難治性疾患の新規治療薬開発へ向けて、*Biophilia 電子版* 2、21-25 (2013)

2. 学会発表

- 1 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: *In vitro* 血液脳関門モデルの構築を目的としたヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 2 平林玲子、山口朋子、田代克久、池田由美、水口裕之、川端健二: メチルセルロース法を用いたヒト ES/iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞へ

の分化誘導; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日

- 3 山口朋子、田代克久、池田由美、田中智之、水口裕之、川端健二: Wnt シグナルによるマスト細胞の成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 4 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling; 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11-13 日
- 5 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: 血液脳関門モデルの構築を目指したヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 6 山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関する新規因子の同定; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 7 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞の作製に関する基礎的検討; 第 14 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム、東京、2013 年 6 月 1 日
- 8 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells: 第

11 回幹細胞シンポジウム、東京、2013
年 5 月 17-18 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

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

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

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

iPS 細胞由来分化細胞の品質の検証

研究分担者 山田 弘

（独）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 iPS 細胞由来分化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、iPS 細胞由来分化肝細胞の品質検証に用いる化合物の選択及び検証データを取得するための実験条件の確立を目指した研究を行った。具体的には、(1) トキシコゲノミクスデータベースに登録されている 166 種の化合物の中から検証に適していると考えられる化合物の選択、(2) 検証の対象とする遺伝子プローブの絞り込み、(3) 検証実験における化合物曝露条件の設定を行った。その結果、3 種の実験条件でデータを取得することにより、目的とする遺伝子変動の約 45 % が検出可能であることが示された。今後、上記条件の最適化、iPS 細胞由来分化細胞からの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 五十嵐芳暢

プロジェクト研究員

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、安定した品質の確保が不可欠となる。

研究協力者 中津 則之

プロジェクト研究員

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

A. 研究の目的

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 iPS 細胞由来分化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を目的としている。トキシコゲノミ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、ま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) 品質評価データ取得に用いる化合物の選択

トキシコゲノミクスデータベースにデータが登録されている 166 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を解析し、これらの化合物の中から様々なシグナル伝達、及び肝細胞の機能の特徴づける薬物代謝酵素や肝毒性パスウェイに関わる遺伝子発現において顕著な変動を誘発する化合物を検索

した。

(2) 検証の対象とする遺伝子プローブの抽出

トキシコゲノミクスデータベースに格納されている遺伝子発現データは、アフィメトリクス社のマイクロアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0 array) を用いて取得しており、1 マイクロアレイあたり 54,675 個のプローブセットが搭載されている。これらのプローブセットの中から検証の対象とする遺伝子プローブの抽出を行った。

方法は、54,675 個のプローブセットのアノテーション情報を整理し、これらの情報からシグナル伝達及び肝臓の機能の特徴付けると考えられる薬物代謝酵素などに関わる遺伝子 (プローブセット) を抽出した。

(3) 検証実験における化合物曝露条件の設定

(1) で選択した化合物については、それぞれ 3~4 用量、曝露後 2~3 時点 (2、8、24 時間) のデータが取得されている。品質評価を行う上で全ての条件におけるデータを取得することは、効率性及び費用の面から考えても有効な方法とは言えない。従って、実験条件を絞り込むための検討を行った。

方法は、(1) で選択した化合物の全遺伝子発現データから、(2) でリスト化したプローブセットに関わるデータを抽出し、そ

れらの中で溶媒対照に対して有意に発現変動している遺伝子の数を全ての化合物、時点、用量の組合せ(実験条件)についてカウントした。なお、上記解析における有意な発現変動は、溶媒対照群に対して変動幅が1.5倍以上もしくは0.667倍以下かつPA consistency値が1の場合とした。最後に、最も変動遺伝子数の多い実験条件から順に並び換え、さらに上位の実験条件ではカバーできない遺伝子の変動をより多く検出できる実験条件が上位となるように並び換えた。

(倫理面への配慮)

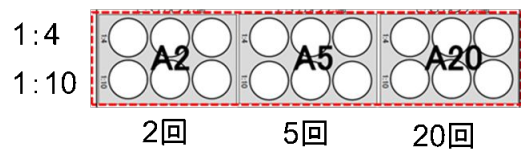
本研究では、ヒト試料を用いてゲノム解析を行う研究を実施する場合には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に、その他の研究は「臨床研究に関する倫理指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた倫理規定を遵守して研究を遂行する。また、コントロール細胞として使用するヒトES細胞使用研究に関しては「ヒトES細胞の使用に関する指針」に従って行うほか、各研究機関等で定められた規定を遵守して研究を遂行する。動物実験については、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに各研究機関の動物実験に関する指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実施するものであり、倫理審査の承諾を得て行う。これらを含めて、あらかじめ当該研究機関の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については研究開始前に所定

の手続きを行う。将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、研究を推進する。

C. 研究結果

(1)品質評価データ取得に用いる化合物の選択

トキシコゲノミクスデータベースにデータが登録されている166種の化合物の中から、ヒト初代培養肝細胞に曝露した際、様々なシグナル伝達、あるいは肝細胞の機能の特徴づける薬物代謝酵素や肝毒性パスウェイなどに関わる遺伝子に対して顕著な変動を誘発する化合物として、以下の10種の化合物を選択した。



イソニアジド、フェノバルビタール、バルプロ酸、オメプラゾール、エチオニン、メタピリレン、コルヒチン、カフェイン、テオフィリン、ヒトインターフェロン

(2)検証の対象とする遺伝子プロープの抽出

全54,675個のプロープセットのアノテーション情報を整理し、これらの情報から様々なシグナル伝達、あるいは肝細胞の機能の特徴づける薬物代謝酵素や肝毒性パスウェイなどに関わる遺伝子に関わる2,146個のプロープセットを抽出し

た。

(3) 検証実験における化合物曝露条件の設定

化合物 10 種、時点数 2~3、用量段階 3~4 の全ての組合せについて、(2)で抽出した 2,146 個のプロープセットの発現変動を解析し、最も遺伝子変動数の多い組み合わせから順に並び変え、さらに上位の実験条件ではカバーできない遺伝子の変動をより多く検出できる実験条件が上位となるように並び換えた。その結果、得られた上位 1 種の実験条件 (化合物・時点・用量) では 2,146 個のプロープセットのうち 575 個 (26.8%)、上位 2 種の実験条件では 833 個 (38.8%)、上位 3 種のプロープセットでは 971 個 (45.2%) のプロープセットの有意な発現変動を検出することができた。なお、上位 25 種まで実験条件を拡大した場合の検出は 1,290 プロープセット (60.1%) であり、必ずしも実験条件の設定数と検出率は比例関係には無かった。

上位 3 種の実験条件では 21 種のチトクローム P450 遺伝子の発現変動が検出できることを確認した(図 1)。

D. 考察

本年度は、iPS 細胞由来分化肝細胞の品質検証に用いる化合物の選択及び検証データを取得するための実験条件の確立を目指した研究を行った。実験条件を幅広く設定し、より多くのデータを取得すればそれに伴って検出力は向上すると考えられるが、効率性及び費用の面か

ら考えると有効な方法とは言えない。従って、品質評価を行うための実験条件をどの程度まで絞り込むことが可能か検討を行った。その結果、3 種の実験条件を設定してデータを取得することにより、目的とする約 45% の遺伝子変動が検出でき、これらの遺伝子変動の中には 21 種のチトクローム P450 遺伝子が含まれていることを確認した。一方で、実験条件を上位 25 種まで拡大してもカバー率は 60% 程度であり、極端な改善は認められなかった。

今後は、さらに多くの情報が得られ、且つより限定された実験条件の設定について検討を行うとともに、iPS 細胞由来分化細胞からの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。

E. 結論

iPS 細胞由来分化肝細胞の品質検証に用いる化合物の選択及び検証データを取得するための実験条件の確立を目指した研究を行い、目的とする遺伝子のうち 21 種のチトクローム P450 遺伝子を含む約 45% の遺伝子に対する発現変動を検出できる実験条件の設定を達成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Okubo S., Miyamoto M., Takami K., Kanki M., Ono A., Nakatsu N., Yamada H., Ohno Y. and Urushidani T., Identification of novel liver-specific mRNAs in plasma for biomarkers of drug-induced liver injury and quantitative evaluation in rats treated with various hepatotoxic compounds, *Toxicol. Sci.*, 132(1), 21-31, 2013

Nyström-Persson 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*, 29(23), 3080-3086, 2013

Uehara T., Horinouchi A., Morikawa Y., Tonomura Y., Minami K., Ono A., Yamate J., Yamada H., Ohno Y. and Urushidani T., Identification of metabolomic biomarkers for drug-induced acute kidney injury in rats, *J. Appl. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表

【招待講演】

山田弘, 第28回日本薬物動態学会年会, 日本TDM学会 & 日本薬物動態学会共催シンポジウム 医薬品適正使用における薬物動態・毒性インフォメーションの有効活用(東京),

2013.10

前川京子, 齊藤公亮, 山田弘, 斎藤嘉朗, 医薬品化合物によるリン脂質症の解析, 日本薬学会第134年会, メタボロミクスの食品・環境分野への新展開(熊本), 2014.3

【ポスター発表】

五十嵐芳暢, 中津則之, 山田弘, 免疫系に作用する化合物群の予測モデル構築, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

大村功, 森川裕二, 上原健城, 林仁美, 三森国敏, 南圭一, 神吉将之, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, 肝発がんにおける DNA メチレーションと遺伝子発現の関連, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

南圭一, 上原健城, 近藤千晶, 大村功, 神吉将之, 堀之内彰, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷 徹郎, ラット腎における miRNA 発現と腎障害モデルにおける変動の比較検討, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

花房弘之, 森川裕二, 上原健城, 兼藤雅子, 小野敦, 山田弘, 大野泰雄, 漆谷徹郎, マルチプレックスイムノアッセイによるラット肝障害時のサイトカイン変動解析, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉), 2013.6.

Nakayama S., Kiyosawa N., Morikawa Y., Ito K., Kazunori F., Takuya M., Kobayashi Y., Nishiya T., Yamada H., Ohno Y., Urushidani T., Takasaki W. and Izumi T., Identification of the gene transcript associated with formation of the drug covalent binding to

macromolecules, 第 28 回日本薬物動態学会年会(東京), 2013.10.

坂手龍一, 深川明子, 平田誠, 山下智也, 山田弘, 高橋一朗, 増井徹, 創薬・疾患研究をサポートする医薬基盤研究所のデータベース, 科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター主催: トーゴの日シンポジウム 2013(東京), 2013.10.

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, 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, 科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター主催: トーゴの日シンポジウム 2013(東京), 2013.10.

齊藤公亮, 前川京子, 浦田政代, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 田島陽子, 大野泰雄, 中津則之, 山田弘, 斎藤嘉朗, メタボロミクスを用いた肝臓性リン脂質症の血中バイオマーカー探索, 第 34 回日本臨床薬理学会(東京), 2013.12.

五十嵐芳暢, 中津則之, 山田弘, イソフルラン, ジエチルエーテル, ペントバルビタールが麻酔剤としてラット肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響についての検討, 第 7 回次世代アジュバント研究会(大阪), 2014.1.

Omura K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A., Ohno, Y., Urushidani, T., Comprehensive DNA methylation and gene expression study on livers using 2-stage hepatocarcinogenesis model in rats, 53rd Society of Toxicology Annual Meeting (Phoenix, US), 2014.3.

齊藤公亮, 前川京子, 浦田政代, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 中津則之, 山田弘, 斎藤嘉朗, 脂質メタボロミクスを用いた薬剤性リン脂質症の肝バイオマーカー探索, 日本薬学会第 134 年会(熊本), 2014.3.

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 上位3種の実験条件における代表的な薬物代謝酵素関連遺伝子の発現変動

Probe.Set	Gene.Symbol	Gene.Title	Sample1	Sample2	Sample3
205502_at	CYP17A1	cytochrome P450, family 17, subfamily A, pol	1.587	0.740	4.229
207245_at	UGT2B17	UDP glucuronosyltransferase 2 family y, polype	1.313	0.755	0.365
205765_at	CYP3A6	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	5.212	1.387	0.771
208596_s_at	UGT1A1 // UGT	UDP glucuronosyltransferase 1 family y, polype	0.682	0.334	0.832
216607_s_at	CYP51A1 // LR	cytochrome P450, family 51, subfamily A, pol	1.028	1.272	2.302
1553977_a_at	CYP39A1	cytochrome P450, family 39, subfamily A, pol	1.042	0.440	0.684
214320_x_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.252	0.609	2.027
202436_s_at	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, poly	1.570	4.888	1.568
216025_x_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.749	0.222	1.075
211295_x_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.119	0.948	1.993
1554837_a_at	CYP4A11 // CY	cytochrome P450, family 4, subfamily A, poly	0.411	0.411	0.209
205676_at	CYP27B1	cytochrome P450, family 27, subfamily B, pol	0.862	1.000	0.506
204532_x_at	UGT1A1 // UGT	UDP glucuronosyltransferase 1 family y, polype	0.743	0.269	0.861
215125_s_at	UGT1A1 // UGT	UDP glucuronosyltransferase 1 family y, polype	0.692	0.232	0.774
216687_x_at	UGT2B15	UDP glucuronosyltransferase 2 family y, polype	0.591	0.154	0.162
207958_at	UGT2A1 // UGT	UDP glucuronosyltransferase 2 family y, polype	1.231	0.722	1.534
214234_s_at	CYP3A6	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	3.387	1.425	0.692
205073_at	CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, poly	0.790	1.229	0.906
206754_s_at	CYP2B6 // CYP	cytochrome P450, family 2, subfamily B, poly	1.776	1.094	4.628
202437_s_at	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, poly	0.886	4.612	1.499
217133_x_at	CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, poly	1.702	1.159	4.739
207126_x_at	UGT1A1 // UGT	UDP glucuronosyltransferase 1 family y, polype	0.716	0.280	0.827
1554931_at	CYP4A11	cytochrome P450, family 4, subfamily A, poly	0.437	0.907	0.301
216661_x_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.672	0.157	1.045
209975_at	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, poly	1.508	1.345	3.344
206153_at	CYP4F11	cytochrome P450, family 4, subfamily F, poly	0.855	1.750	1.753
206539_s_at	CYP4F12	cytochrome P450, family 4, subfamily F, poly	1.868	0.760	0.667
214421_x_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.644	0.150	1.099
214622_at	CYP21A2	cytochrome P450, family 21, subfamily A, pol	1.497	0.660	1.264
211231_x_at	CYP4A11	cytochrome P450, family 4, subfamily A, poly	0.190	0.189	0.380
1494_f_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.278	0.737	2.557
214235_at	CYP3A6	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	1.553	1.040	0.393
207244_x_at	CYP2A6	cytochrome P450, family 2, subfamily A, poly	1.490	1.707	2.470
209976_s_at	CYP2E1	cytochrome P450, family 2, subfamily E, poly	1.722	1.429	3.833
214419_s_at	CYP2C9	cytochrome P450, family 2, subfamily C, poly	0.495	0.270	0.498
205998_x_at	CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	2.235	0.598	0.263
205999_x_at	CYP3A4	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	4.319	1.011	1.068
210272_at	CYP2B7P1	cytochrome P450, family 2, subfamily B, poly	1.933	1.196	2.493
210462_x_at	CYP4F2	cytochrome P450, family 4, subfamily F, poly	0.651	1.332	2.216
205939_at	CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, poly	3.767	0.989	0.477
211682_x_at	UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase 2 family y, polype	1.983	0.318	0.308
207608_x_at	CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, poly	0.816	0.659	0.740

脚注1) Sample: 実験条件(化合物・時点・用量)

脚注2) 赤は2倍以上、橙は1.5倍以上2倍未満、青は0.5倍未満、緑は0.5倍以上0.667倍未満、灰はPA consistencyが0(変動倍率の信頼性が低い)であることを示す。

分担研究報告書

iPS 細胞等の代謝解析

分担研究者 竹森 洋

所属 独立行政法人医薬基盤研究所

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。本研究では、iPS 細胞集団の質を評価するための細胞内エネルギー代謝測定法の確立を目指す。

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 を合成できる半面、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力を 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。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞のエネルギー代謝との比較のためにマウス肝臓由来培養細胞

AML-12 (ATCC から入手) を利用した。AML-12 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium / F-12 (DMEM/F-12: Wako 社) に、10%胎児血清、1 X ITS サプリメント (Invitrogen 社)、1 X アンピシリン・ストレプトマイシンを添加した培地で培養した。解糖系の NADH は WST-8 (Dojin 社) を、ミトコンドリアの NADH は MTT-assay Kit (Roche 社) を利用した。ATP の測定は、Luciferase-kit (Toyo Ink 社) を利用した。

細胞外酸素消費量と乳酸分泌量 (細胞外酸性度速度) の測定には Flax-analyzer XFe24 (Seahorse 社) を利用し、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。

ヒト iPS 細胞は、医薬基盤研究所・ヒト幹細胞応用開発室で培養された細胞を利用した。

(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

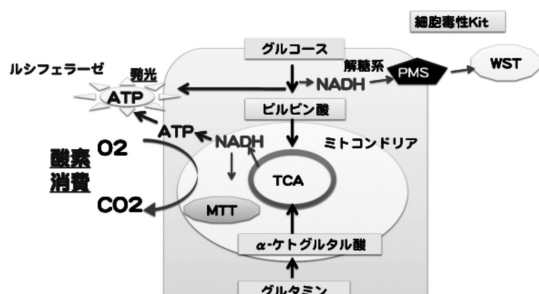


図1 細胞毒性 Kit を活用した細胞内エネルギー代謝測定系

図1に今回利用した細胞内のエネルギー代謝測定法の原理を示す。NADHは解糖系とミトコンドリアの双方で合成されるが、双方間での行き来はできない。細胞質側はWST-Kitで測定でき、ミトコンドリア側はMTT-Kitで測定できる。これは、WSTは細胞透過性が少ないため、WSTへの電子供給にPMSを利用するが、このPMSがミトコンドリアへは入らないためである。単離したミトコンドリアでもPMSの還元はできないが、ミトコンドリアを0.1%のTritonX-100で処理するとミトコンドリア内のNADHでPMSが還元されることからPMS-WST検出系は解糖系に特化できると結論した。反対に、MTT試薬はすばやくミトコンドリアに集積し、NADHで還元されるため、細胞質側の影響を受けず、ミトコンドリアで産生されるNADHのみを測定できると考える。

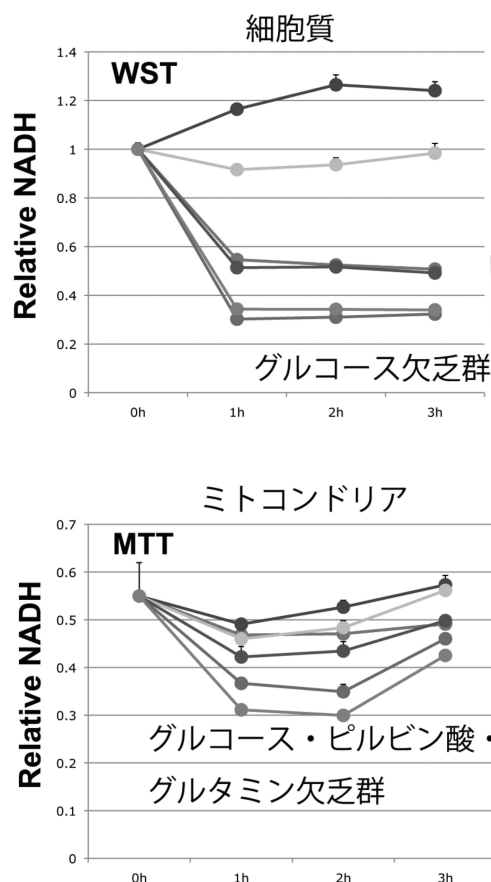


図2 WST と MTT-kit の特性

実際にWSTとMTTで細胞にエネルギーの代謝の場を検出し分けることができるか否かを検討した(図2)。グルコースを欠乏させると、解糖系が低下し、そこで産生されるNADHも低下するはずである。事実、AML-12細胞をグルコース欠乏にすると、WSTで検出される値が低下した。他の重要な細胞エネルギー源(ピルビン酸・グルタミン)を欠乏させると、その値はさらに低下した。このことから、WSTは確かに解糖系で産生されるNADHを検出していると結論した。

一方、MTTで検出されるNADHはグルコース・ピルビン酸・グルタミン欠乏培地において最も低下した。これらは、全てミトコンドリアでのNADH産生に利用されるエネルギー源になり得るためである。

また、エネルギー源欠乏後 2 時間からは MTT で検出される値が上昇に転じた。このとき、脂肪燃焼阻害剤を加えておくと、この上昇は阻害されることから、ペクター酸化を検出していると示唆された。ペクター酸化もミトコンドリアで NADH 産生を行うことから、本系は細胞内エネルギー代謝、とりわけ解糖系とミトコンドリア利用率を予測するには十分な系と結論した。

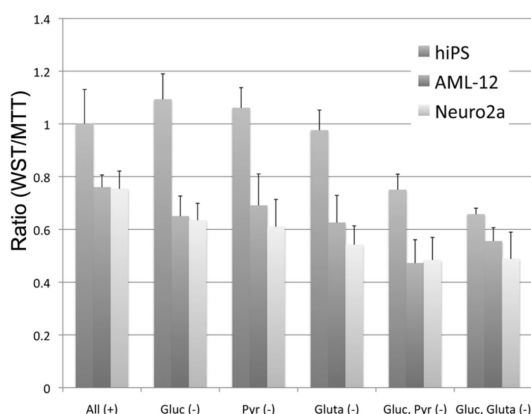


図 3 NADH 量の解糖系(WST)/ミトコンドリア(MTT)比率。AML-12 肝臓細胞、Neuro2a 神経芽細胞。Gluc、グルコース;Pyr、ピルビン酸;Gluta、グルタミン

そこで、ヒト iPS 細胞での評価を行った。予想した様に、WST で検出される NADH が高く、MTT 側は低い結果となった(図 3)。WST と MTT の呈色数値が NADH 量一致しない(MTT 側は NADH で検量線を作成できない)ことから、評価には、AML-12 細胞や Neuro2a 神経芽細胞の結果との相対比較とした。ヒト iPS 細胞の WST/MTT 比はグルコースを欠乏させた培地でも高く、なんらかの方法で解糖系を絶えず利用していることが示唆された。また、ヒト iPS 細胞で維持される解糖系はグルコースと同時にピルビン酸やグルタミンを除くと低下した。これは、他の細胞種(分化細胞)はミトコンドリアへピルビン酸を供給するために解糖系が必要であるのに対して、ヒト iPS 細胞では、最低限のミトコンドリア活性が解糖系の維持に必要と予想される。また、この解糖系維持作用には、

グルタミンが重要である。さらに、MTT の検出値はヒト iPS 細胞を維持するためのフィーダー由来の値も僅かではあるが含まれていることから、MTT 検出値はフィーダーや質が低下した iPS 細胞の双方に由来するものと予想する。

続いて、酸素消費量を元にした検討を行った。

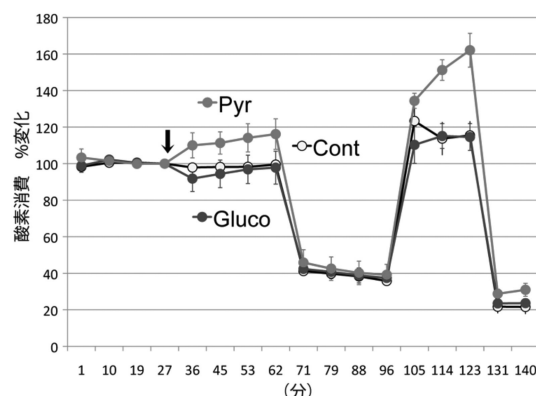


図 4-1 酸素消費量の変化(ミトストレステスト: AML-12 細胞)

図 4-1 は、AML-12 細胞を Flax-analyzer で酸素消費量を検出した際の結果である。AML-12 細胞をあらかじめエネルギー源を低下させた(0.625mM グルコース/0.5mM グルタミン)培地で馴化し、矢印部分で解糖系を亢進させるために 25mM グルコースを、ミトコンドリアでの酸化リン酸化を亢進させるためには 10mM ピルビン酸を添加し酸素消費量の変化を検討した。結果として、グルコースとピルビン酸で酸素消費量変化が反対に推移した。また、解糖系の指標である培地の酸性度変化量指標も酸素消費とは反対に推移した(図 4-2)。

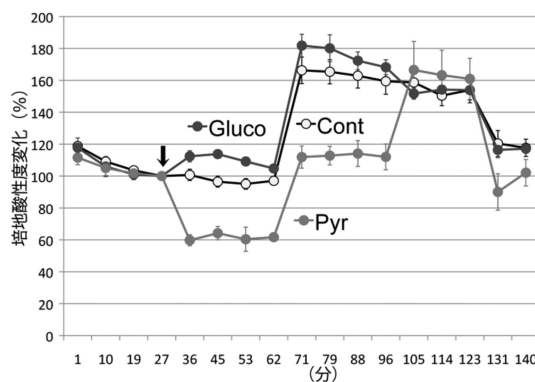


図 4-2 培地酸性度(解糖系指標)の変化(ミトストレステスト: AML-12 細胞)

そこでヒト iPS 細胞で同様な検討を行った。培地の酸性度変化量指標に顕著な差が検出されたことから、ヒト iPS 細胞はグルコースを主なエネルギー源として利用し、解糖系を最大限活用していることが再確認できた。肝臓の AML-12 細胞がグルコース添加で 120%ほど解糖系が亢進するのに対して、ヒト iPS 細胞は 250%まで解糖系が上昇した。

また、ヒト iPS 細胞の解糖促進作用は、iPS 細胞の継代に必要な特殊培地で増強されることも確認できた(図5)。これらのことから、Flax-analyzer がヒト iPS 細胞の解糖系維持能力(品質)を評価するために有用であることが示された(図5)。

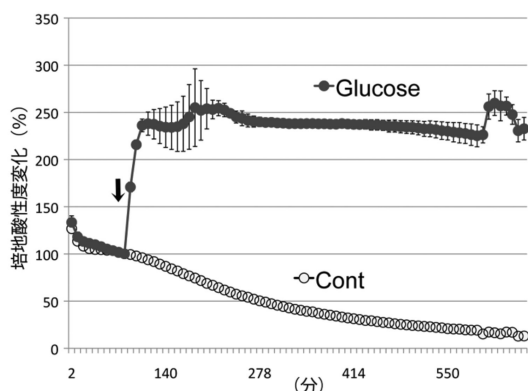


図5 培地酸性度(解糖系指標)の変化(ミトストレステスト:ヒト iPS 細胞)

最後に、ミトコンドリアの膜電位に関して検討を行った(図6)。ミトコンドリアを蛍光染色するための指示薬を複数試験したところ、JC-1 が有効であることが示唆された。JC-1 は生細胞と死細胞を区別するための指示薬であり、元々は緑の蛍光を呈し、死細胞内ではそのまま緑の蛍光を発する。一方、JC-1 は膜電位が存在する(生細胞でのミトコンドリア膜)と、重合し赤色の蛍光を呈する。ミトコンドリア機能が十分であると細胞内が赤色蛍光を発することとなる。AML-12 細胞で、ミトコンドリアでの ATP 合成を阻害し、ATP 合成に必要な H⁺(プロトン)を停滞させ

ると、JC-1 の赤色蛍光強度が上昇した。反対に、ミトコンドリア機能を停止させると、赤色蛍光は低下した。

同様な方法でヒト iPS 細胞でも検討した。その結果、ヒト iPS 細胞は JC-1 で染色されず、ミトコンドリアは最低限しか利用されていないことが確認できた。

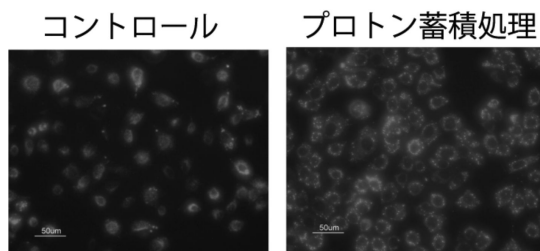


図6 JC-1 によるミトコンドリア膜電位の変化の検出

D. 考察

本研究ではヒト iPS 細胞を利用するにあたり、細胞のエネルギー代謝面で標準化指標として活用できる可能性のある方法を抽出した。いずれの方法も低侵襲性であり、簡便である、Flax-analyze は機器としての利用とはなるが、酸素消費および酸性度指標は低侵襲性の液体試薬も販売されており、他の方法同様に簡便に評価できると期待される。また、細胞内エネルギー代謝の応用は、ヒト iPS 細胞を分化させる評価にも応用可能であり、既に多くの報告例がある。今後、ヒト iPS 細胞においても、細胞内エネルギー代謝変化を活用した品質基準値作成が重要になると予想される。

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が有効であることが示唆された。

F. 参考文献

1) 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 9:e95771 (2014)

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

LKB1 tumor suppressor and salt-inducible kinases negatively regulate human T-cell leukemia virus type 1 transcription.

Retrovirology. 10: 40, 2013

3) Horibe I, Satoh Y, Shiota Y, Kumagai A, Horike N, **Takemori H**, Uesato S, Sugie S, Obata K, Kawahara H, Nagaoka Y.

Induction of melanogenesis by 4'-O-methylated flavonoids in B16F10 melanoma cells.

J Nat Med. 67: 705-10, 2013

4) Yu J, Hu X, Yang Z, **Takemori H**, Li Y, Zheng H, Hong S, Liao Q, Wen X. Salt-inducible kinase 1 is involved in high glucose-induced mesangial cell proliferation mediated by the ALK5 signaling pathway.

Int J Mol Med. 32: 151-157, 2013

5) 伊東祐美、**竹森 洋**

注目の病態因子「AMPK」

分子脳血管病 12: 290-294, 2013

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, **Takemori H**, Narumiya S.

Prostaglandin E promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase.

Nat Commun. 4:1685, 2013

2. 学会発表

1) Ito Y, Sanosaka M, Kumagai A, **Takemori H**, Fuchino H, Kawahara N, Doi J, Ota M.

Effects of Pterosin B from *Pteridium Aquilinum* on the blood glucose level in db/db mice.

The EMBO meeting (AMSETDAM) 2013年9月22日

2) Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Ito Y, Kumagai A, Naka T, **Takemori H**. SIK3 regulates pro-inflammatory cytokine expression in mouse macrophage.

2013 ASCB Annual Meeting (New Orleans) 2013年12月15日

3) 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

16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses (Montreal) 2013年6月23日

RETROVIROLOGY 2014 11(Suppl 1) P112

4) 川村知裕, 舟木壮一郎, 中桐伴行, 新谷 康, 井上匡美, 澤端章好, 南 正人, 杉村康司, 飯田修, 淵野裕之, 川原信夫, **竹森 洋**, 奥村明之進

カルノソール・カルノソール誘導体による酸化ストレスに対する臓器保護

第194回近畿外科学会 (大阪) 2013年11月9日

5) 伊東祐美, 佐野坂真人, 熊谷彩子, **竹森 洋**, 淵野裕之, 土居純子, 太田美穂

ワラビ Pterosin の db/db マウスにおける血糖値低下作用

第67回日本栄養・食糧学会 (名古屋) 2013年5月24日

6) 津田正明, 福地守, 高崎一朗, **竹森 洋**, 田淵明子 G タンパク質共役型受容体 GPCR 活性化による Ca²⁺/カルシニューリン経路を介した活動依存的な 遺伝子発現制御系に関する解析

Neuro 2013 (京都) 2013年6月21日
7) **竹森 洋**
疾患モデルマウスを活用した評価系
地域資源の高度利用を図るバイオリ
ファイナリーの基盤形成とその実用化セ
ミナー(東京) 2013年12月20日

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 特願 2013-094995「カスパーゼ1活
性化阻害剤、抗炎症剤、鎮痒剤、及び
カスパーゼ1活性化阻害剤の評価方
法」**竹森 洋**、佐野坂真人、伊東祐美、
淵野裕之、川原信夫 (独立行政法人
医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館)
- 2) 特願 2013-135040「ブテロシン誘導
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**、
淵野裕之、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)

2. 特許登録

- 1) 特許第 5498754 号「肝機能の保護・
改善薬」河原秀久、長岡康夫、**竹森 洋**、
小出芳栄 (学校法人関西大学、独立
行政法人医薬基盤研究所、有限会社一
栄)

3. 実用新案

該当せず

4. その他

無し

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)

研究報告書

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

分担代表者 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

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い、我々のプロトコルへのフィードバックに着手した。

研究協力者

水口裕之 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

高山和雄 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

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、(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。

iPS 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、(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誘導プロトコルを収集し、再現性良く実施できるものを探すことを目的としている。

B. 研究方法

図 1 に示した Stephen Duncan 研、David Hay 研、Ludovic Vallier 研における分化プロトコルの比較調査を通して、適宜我々の分化プロトコルに適用し、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコルの最適化に着手した。

C. 研究結果

まず、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ルの収集を行った。図 1 には、代表的なプロトコルである Stephen Duncan 研、David Hay 研、Ludovic Vallier 研における分化プロトコルを比較した。これら 3 研

研究室間において、内胚葉分化誘導に Activin A を使用し、肝細胞分化誘導に Oncostatin M を使用するなどといった点は共通しているが、異なる点も多数存在した。たとえば、Stephen Duncan 研においては(Stem Book (<http://www.stembook.org/>); Hepatology. 2010 Jan;51(1):297-305.)、分化誘導段階に応じて酸素濃度を最適化させている。David Hay 研においては(Stem Book (<http://www.stembook.org/>); Stem Cells Transl Med. 2014 Feb;3(2):141-8.)、内胚葉からの肝特異化過程において DMSO を使用しており、エピジェネティックな変化を促すことで肝分化を促進させている。Ludovic Vallier 研では(Nat Protoc. 2013 Feb;8(2):430-7. ; Hepatology. 2010 May;51(5):1754-65.)、細胞外基質としてマトリゲルではなくフィブロネクチンを選択している。このようにヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導プロトコルは研究室間で大きく異なっているため、我々は複数の肝細胞への分化プロトコルのうち最も再現性良く、高効率に肝細胞を作製可能なものを策定する予定である。

肝細胞への分化プロトコルは研究室間で大きく異なる点が多数あったが、興味深いことにヒト iPS 細胞の未分化状態の維持や分化開始時期等についても異なる点が多数見受けられた。Stephen Duncan 研、David Hay 研、Ludovic Vallier

研における、ヒト iPS 細胞維持・分化開始時の方法・注意点等を以下に箇条書きにしてまとめた。

< Stephen Duncan 研 >

- ・ヒト iPS 細胞維持培地には mouse embryonic fibroblast condition medium を使用
- ・ヒト iPS 細胞を維持する際の酸素濃度は 4%
- ・ヒト iPS 細胞に維持には融合タンパク (E-cadherin extracellular and the IgG Fc domain) をコートしたディッシュを使用
- ・ 50%コンフルエントを超えない程度のヒト iPS 細胞密度で分化を開始
- ・ヒト iPS 細胞は Tra1-60、Tra1-81 が 95%以上となるように維持
- ・マトリゲルに継代したのちに、24 時間以内に分化開始

< David Hay 研 >

- ・ヒト iPS 細胞維持培地は R&D 社が販売している mouse embryonic fibroblast condition medium を使用
- ・ collagenase IV でヒト iPS 細胞を継代
- ・マトリゲルをコートしたディッシュを使用
- ・ヒト iPS 細胞の状態に合わせて継代比率を適宜変更 (基本的には 5-7 日に 1 回 1:3 で継代)
- ・ 1 か月に 1 回、OCR3/4、Tra1-60、SSEA4 陽性率を測定し、品質確認

< Ludovic Vallier 研 >

- ・ヒト iPS 細胞維持培地は CDM を使用
- ・ 6-8 日に 1 回継代する。80%コンフルエントになったときが継代のタイミング
- ・ヒト iPS 細胞は OCT4、Tra1-60 が 80-90%以上陽性となるように維持
- ・分化に使用する iPS 細胞のコロニーの大きさは適切な大きさにする (1 コロニーあたり 200-3000 細胞が目安)

以上のプロトコルを参考に、適宜我々の分化プロトコルに適用し、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコルの最適化に着手した。

D. 考察

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコルの収集を通して、分化方法だけでなく分化開始時期もいずれのプロトコルにおいても厳密に決められていた。分化方法だけでなく、分化開始時の細胞密度やプレ培養期間等の条件設定も分化効率に大きく影響を及ぼすと考えられる。したがって、分化誘導方法の策定を行う際に用いるヒト iPS 細胞の細胞密度やマトリゲル上でのプレ培養時間などを最適化する必要があると考えられる。今後は、適宜、我々の分化プロトコルへの適用を行い、ヒト iPS 細胞から肝細胞

への分化プロトコールの最適化を行う。

E. 結論

ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコールの収集を通して、研究室間で大きく異なる点が存在することが分かった。次年度は、安定的に肝細胞を分化誘導するための分化プロトコールの標準化を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takayama K., Nagamoto Y., Mimura N., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Kawabata K., Mizuguchi H. Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes. *Stem Cell Rep.*, 1, 322-335 (2013)
- 2) 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 TGF receptor 2 expression determine the hepatoblast fate decision. *Development*, 141, 91-100 (2014)
- 3) Watanabe H., Takayama K., Inamura M., Tachibana M., Mimura N., Tashiro K., Nagamoto Y., Sakurai F., Kawabata K., Furue MK., Mizuguchi H. HEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin. *PLoS ONE*, 9, e90791 (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-xL mutant gene. *Cell Transplantation*, in press.

2. 学会発表

- 1) Takayama K., Nagamoto Y., Kawabata K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Long-term culture of hepatoblast-like cells derived from human pluripotent stem cells, Boston, June, 2013
- 2) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana F., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Comparative analysis of transplantation efficacy of human iPS cell-derived hepatic cells at various differentiation stages in mice. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting, Boston, June, 2013
- 3) Takayama K., Nagamoto Y., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Long-term culture of hepatoblast-like cells derived from human ES/iPS cells、第20回大会、肝細胞研究会、大阪、2013年9月
- 4) Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana F., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xL mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human

- iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice、第 20 回大会、肝細胞研究会、大阪、2013 年 9 月
- 5) Takayama K., Morisaki Y., Furukawa N., Higuchi M., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. Comparison of Hepatic Functions Between Genetically Identical Primary Human Hepatocytes and Human iPS-Derived Hepatocyte-Like Cells、第 28 回日本薬物動態学会年会、東京、2013 年 10 月
- 6) 高山和雄、長基康人、田代克久、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之、ヒト多能性幹細胞から分化誘導した肝幹・前駆細胞の維持と複製、第 36 回日本分子生物学会、神戸、2013 年 12 月
- 7) Takayama K., Nagamoto Y., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. Generation of long-term expandable hepatoblasts differentiated from human iPS cells enables large-scale preparation of hepatocytes for drug discovery and development. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (iPS Cells in Drug Discovery & Development)、大阪、2014 年 1 月
- 8) 長基康人、高山和雄、田代克久、立野知世、櫻井文教、立花雅史、川端健二、池田一雄、田中靖人、水口裕之、活性型 Bcl-xL (FNK) 過剰発現によるヒト iPS 細胞由来肝細胞のマウス生着効率向上、京都、第 13 回再生医療学会総会、2014 年 3 月
- 9) 長基康人、高山和雄、田代克久、立野知世、櫻井文教、立花雅史、川端健二、池田一雄、田中靖人、水口裕之、活性増強型 Bcl-xL (FNK) 過剰発現を利用したヒト iPS 細胞由来肝細胞のマウス肝置換効率向上、熊本、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月
- 10) 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 iPS 細胞由来肝細胞の腎被膜下への移植、熊本、日本薬学会第 134 年会、2014 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

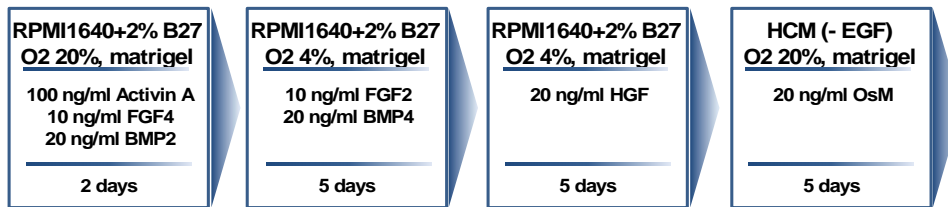
該当無し

3. その他

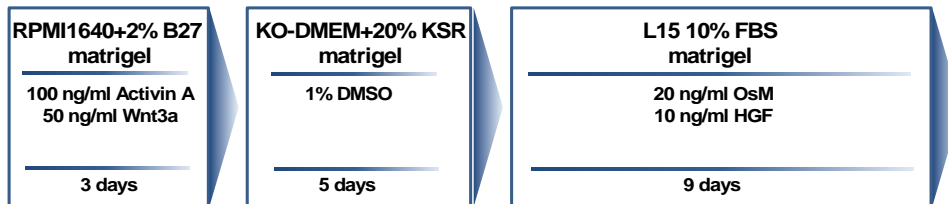
該当無し

Stephen Duncan Lab.

図 1



David Hay Lab.



Ludovic Vallier Lab.

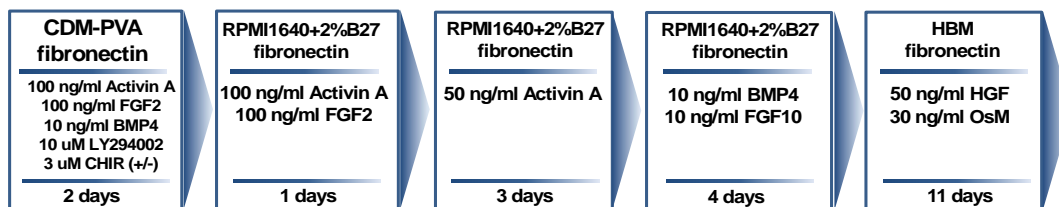


図 1 .Stephen Duncan 研、David Hay 研、Ludovic Vallier 研におけるヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコール

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	第6章 ヒトiPS 細胞の供給と標準化	小島肇夫	<i>In vitro</i> 毒性・動態評価の最前線	シーエム シー出版	東京	2013	81-87
菅 三佳、 古江 楠田 美保	GMPに準拠した細胞プロセシングにおける無血清培地組成の考え方.	末盛弘文	実験医学別冊「ES・iPS細胞実験スタンダード」	羊土社	東京	2013	44-52
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	第1章 作動原理と疾患、 生命現象とのかわり 新規iPS/ESマーカー抗体とその応用	門松健二、 遠藤玉尾、 岡昌吾、 北川祐之	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	東京	2013	129-133

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
Watanabe H, et al	HHEX Promotes Hepatic-Lineage Specification Through the Negative Regulation of Eomesodermin.	PLoS One	9	e90791	2014
Kinehara M, et al	Protein Kinase C-induced Early Growth Response Protein-1 Binding to SNAIL Promoter in Epithelial-Mesenchymal Transition of Human	Stem Cells and Development		Jan 11. On line	2014

	Embryonic Stem Cells.				
Takayama K, et al	CCAAT/enhancer binding protein-mediated regulation of TGF receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision.	Development	141(1)	91-100.	2014
古江 - 楠田美保	TOPIC : ヒトiPS細胞研究の海外動向	HUMAN SCIENCE 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	Vol.24 No.3	p24-27	2013
Yamada, R et al.	Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and -globulin."	Journal of Bioscience and Bioengineering.		doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.02.009	2014
Yamaguchi T., et al	Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells.	Stem Cells Dev.,	22	726-734	2013
Taura A., et al	Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfi1 and Gfi1b, in murine cultured mast cells.,	Biol. Pharm. Bull.	37(1)	81-6.	2014
山口朋子、川端健二	iPS細胞由来マスト細胞を用いた難治性疾患の新規治療薬開発へ向けて、	Biophilia電子版	2	21-25	2013
Yao C, Hirata T, Soontrapa K, Ma X, Takemori H, Narumiya S.	Prostaglandin E promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase.	Nat Commun.	4	1685	2013
Takayama K.,et al	Long-term self-renewal of human ES/iPS-derived hepatoblast-like cells on human Laminin 111-coated dishes.	Stem Cell Rep.	1	322-335	2013