

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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古江美保

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

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 研究代表者 古江-楠田 美保	1
--	---

II. 分担研究報告

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	13
--	----

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	26
--------------------------------------	----

中胚葉分化誘導の標準化と評価 研究分担者 川端 健二	42
-------------------------------	----

iPS 細胞由来分化細胞の品質の検証 研究分担者 山田 弘	51
----------------------------------	----

iPS 細胞等の代謝解析 研究分担者 竹森 洋	59
----------------------------	----

iPS 細胞の品質変動と実用化を目指した培養技術の標準化に関する研究 研究分担者 櫻井 文教	65
---	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	74
----------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	76
------------------------	----

**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

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：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 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 工学部 生物系 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)、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、H25 年度に引き続き、栗崎、大沼、古江、竹森が担当した。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、比較評価を開始した。古江は、未分化状態の iPS 細胞の状態を免疫染色により評価するアッセイ系を確立し、検証を進めた。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細胞内エネルギー代謝の解析を検討した。また、大沼は、細胞の継代時の操作の違いを評価する方法の検証を行った。また、iPS 細胞の分化

プロトコルの策定や分化細胞の品質検証については、川端、古江、櫻井、大沼、山田が担当した。川端は、中胚葉細胞への分化プロトコールについて検証を行った。古江は、外胚葉細胞への分化プロトコールについて検証を行った。櫻井は、内胚葉細胞への分化プロトコールについて検証を行った。大沼は、微小流体制御培養システムを用いた分化誘導アッセイによる iPS 細胞の比較評価について検証した。山田は、iPS 細胞由来幹細胞様細胞の品質評価を開始した。詳細についてはそれぞれの分担研究報告を参照されたい。

本総括研究報告においては、古江の担当研究について報告する。(i) 培養手技 (培養技術) の違いが iPS 細胞の品質に及ぼす影響についての科学的・客観的な定量的検証方法を策定したので、その詳細を報告する。また、(i) 三胚葉への分化プロトコールの標準化を目指し、外胚葉の分化プロトコールの標準化について検証をおこなったので、その詳細を報告する。

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、H25 年度に、ピペ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。今年度は、201B7 株の染色体数異常クローン株である 201B7-1A 株を用いて、本法による検証を行った。

具体的には、以下に方法を示す。細胞 (201B7-1A) 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。剥離した細胞塊を砕かないよう慎重に 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 : 20 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。検討するピペッティング回数 2 回、5 回、または 20 回。1 条件につき 5 ウェルずつ実験を実施した。

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 MarkerX 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。

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の検証-

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ない、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 年度に、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、調査した。これまでの調査により、公表されている神経分化誘導プロトコールにおいては、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ールにおいては、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。

今年度は、収集した神経分化プロトコールのうち、遺伝子導入操作を行わなくとも比較的短期間で神経幹細胞まで分化誘導でき、且つ比較的再現性が高いと評されるプロトコールについて、検証を行った。

具体的には、UKN1 と命名された神経幹細胞分化誘導法(Krug et al. 2013、Weng et al. 2012)によるヒト iPS 細胞の分化誘導を次に示すとおり実施した。

培養用の試薬は、mTeSR1 及び Gentle Cell Dissociation Reagent (Stemcell Technologies)、KnockOut™ DMEM/F-12、DMEM, low glucose, pyruvate、Ham's F-12 Nutrient Mixture、N2 Supplement、TrypLE™ Select、Glutamax、MEM Non-Essential Amino Acids Solution、2-Mercaptoethanol (以上、Life Technologies)、マトリゲル(Matrigel、BD Biosciences)、Noggin (R&D systems)、SB431542 (TOCRIS)、Y-27632、dorsomorphin、StemSure® Serum Replacement (和光純薬)、bFGF (片山化学)を使用した。

ヒト iPS 細胞株 iPS-DF-19-9-7T はマトリゲルコーティングした培養用ウェルプレート上で mTeSR1 培地中で 37℃、5% CO₂ で維持培養した。継代播種後 2 日目より毎日培地交換をした。細胞継代は Gentle Cell Dissociation Reagent を使用して剥離し、希釈率 (スプリット) を 1 : 2 ~ 1 : 4 にして播種した。

2 重 SMAD 阻害法 (Balmer et al. 2012; Chambers et al. 2009; Weng et al. 2012) によってヒト iPS 細胞株 iPS-DF-19-9-7T の分化誘導を行った。分化誘導のスケジュールは下記の図 2 に示すとおりである。ヒト iPS 細胞を TrypLE™ Select で剥離して単一細胞とし、マトリゲルコーティングしたウェル上に 18,000 cells/cm² の細胞密度で 10 μM の ROCK 阻害剤 (Y-27632) と 10 ng/ml bFGF を含む馴化培地中に再播種した。培地は 2 日間、10 ng/ml bFGF を含む馴化培地を毎日交換した。分化は再播種の 3 日後に培地を KSR 培地 (Knockout DMEM/F12 に 15% の StemSure® Serum Replacement, 2 mM の Glutamax, 0.1 mM の MEM non-essential amino acids, 50 μM の 2-Mercaptoethanol が含まれている) に置換し、そこへ 35 ng/ml の noggin, 600 nM の dorsomorphin, 10 μM の SB-431642 を添加することで開始した。分化開始 4 日後から、KSR 培地を 25% ずつ N2 培地 (DMEM/F12 培地に 1% の Glutamax, 1.4 mg/ml の glucose, 0.1 mg/ml の apotransferrin, 25 μg/ml の insulin, 100 μM の putrescine, 30 nM の selenium, 20 nM の progesterone が含まれている) に段階的に置換した。

誘導開始後 10 日目に細胞を固定し、神経幹細胞への分化効率を判定するため、SOX2 および Nestin の免疫染色を行った。インセルアナライザー 2000 を用いて画像を取得し、SOX2 ポジティブ細胞、Nestin ポジティブ細胞、さらに SOX2/Nestin ダブルポジティブ細胞の割合を解析した。SOX2/Nestin ダブルポジティブ細胞が神経幹細胞として判定される。

(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

培養技術

201B7-1A 細胞を用いて、継代作業時のピペティング回数（2回、5回、20回）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。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、MarkerX 強陽性（MarkerX++）細胞、及び Oct3/4 陽性細胞（Oct3/4+）について解析を行った（図1）。

染色体数が正常な 201B7 細胞株とは異なり、12 番染色体がトリソミーとなった 201B7 細胞株のクローンである 201B7-1A 細胞株では、1：20 という非常に低い播種密度で実験を実施した場合であっても、播種2日目以降に非常に細胞増殖速度が増大するため、播種後6日目には細胞増殖が過剰に進み、オーバーコンフルエントとなった。

染色体数が正常な 201B7 細胞では同じ播種密度（1：10）であってもピペティング回数（2回、5回、20回）の差によって6日後の細胞数や MarkerX 強陽性細胞数に大きく影響が出たが（H25年度成果として報告）、同じ実験方法では 201B7-1A 細胞株ではほとんど影響が出ないことが明らかとなった。しかしその一方で、このアッセイ方法によって、201B7-1A 細胞株のような染色体異常の起こった増殖速度に異常がある細胞を定量的且つスピーディーに検出できることも明らかとなった。

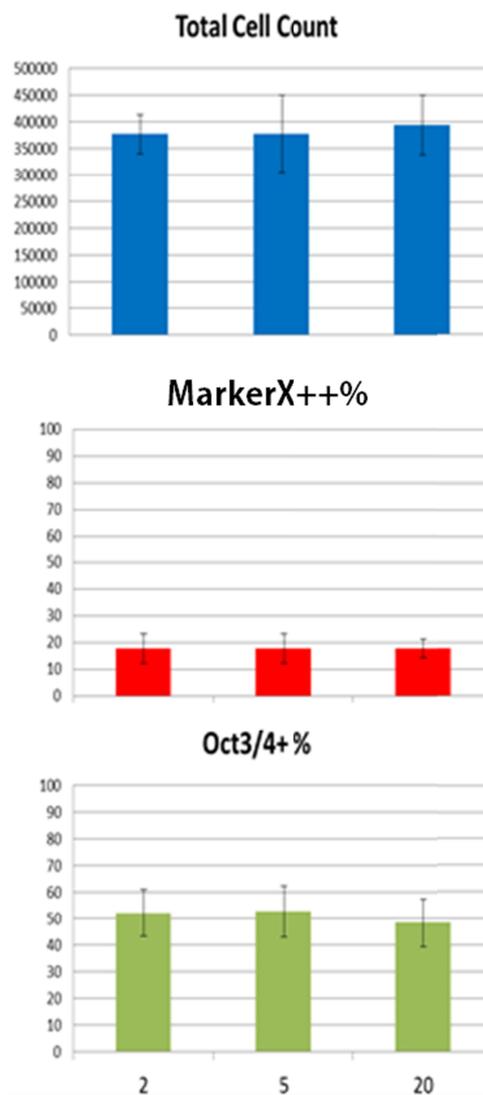
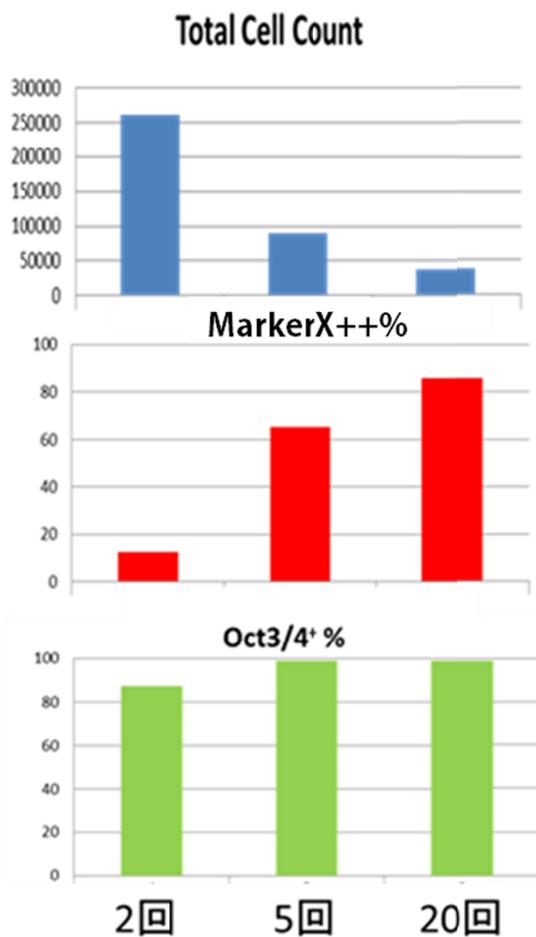


図1 201B7-1A 細胞の免疫染色解析結果 播種時にピペティングする回数を2回、5回、または20回にし、6日間培養した。ピペティング回数に依らず細胞数は過剰となり、Oct3/4の陽性率は低い。MarkerX 強陽性の細胞は20%程度である。グラフの値は5回の平均値と誤差で示す。

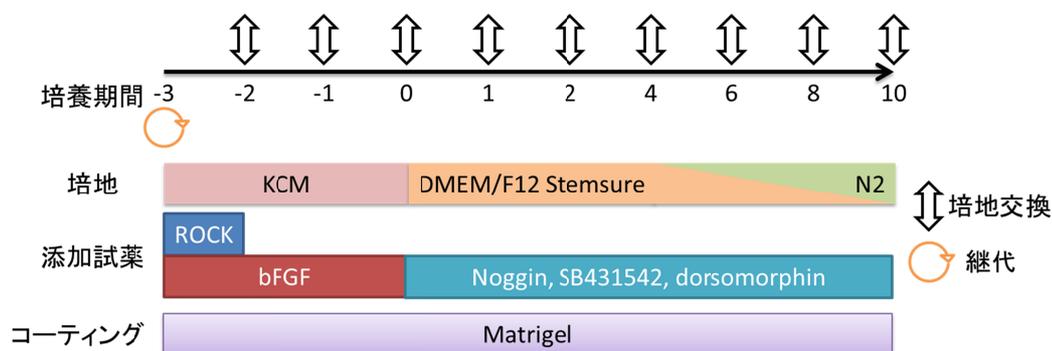


分化プロトコルの標準化のためのプロトコルの検証

ヒト iPS 細胞株 iPS-DF-19-9-7T を用い、UKN1 プロトコールに従って分化誘導を行った(図1)。コンディショニングメディウム (KCM) を準備せねばならないが、比較的安定に神経系へ誘導できることが今回の検討で明らかとなった。

UKN1 プロトコールでは、適正な細胞播種密度は 18,000 cells/cm² と指定されているが、実際は 9,000 cells/cm² のときに最も神経幹細胞 (SOX2(+)/Nestin(+)) ダブルポジティブの割合が高くなることが免疫染色の解析により明らかになった。分化誘導実験開始の際の細胞密度は非常に重要なファクターであり、その差が顕著に結果に表れた。また、このように、分化効率などの分化誘導後の細胞の品質を免疫染色により検証できることがわかった。

参考 201B7 細胞の免疫染色解析結果 (H25 年度報告より転載)
 全体の細胞数と MarkerX 強陽性細胞数はピペティング回数に依存する。



(図 2) 神経系細胞への分化プロトコール (UKN1)

本法では、実験開始から 2 週間以内 (誘導開始から 10 日目) に神経幹細胞へ分化誘導が可能である。

播種細胞数		細胞数	(%)
36,000 cells/cm ²	全細胞数	136989	-
	SOX2(+)	10618	7.8
	Nestin(+)	9059	6.6
	SOX2(+)/Nestin(+)	5008	3.7
18,000 cells/cm ²	全細胞数	148686	-
	SOX2(+)	22113	14.9
	Nestin(+)	11671	7.9
	SOX2(+)/Nestin(+)	8716	5.9
9,000 cells/cm ²	全細胞数	82005	-
	SOX2(+)	33444	40.8
	Nestin(+)	38711	47.2
	SOX2(+)/Nestin(+)	28391	34.6

(表 1) 神経系細胞への分化プロトコール (UKN1) により 10 日間分化誘導した細胞の免疫染色解析結果

適正な細胞播種密度は 18,000 cells/cm² とされるが、実際は 9,000 cells/cm² のときに最も神経幹細胞 (SOX2(+)/Nestin(+)) の割合が高くなった。2 回の実験の平均値を示す。

D . 考察

ヒト iPS 細胞由来機能細胞を薬剤安全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が国際的に期待されている。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である。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、2005 年より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、熟練した作業員が高い培養技術を持っていることが前提とされている。産業化するためには、技術の底上げが必要である。技術を習熟していない作業員により細胞の品質にどのような変動を与えるのかを明確にし、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、ヒト iPS 細胞 201B7 を用いて、ピペティングという継代播種時に不可欠な、培養において基本的な操作について、継代播種後の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。今後、より詳細な解析を行い、報告する予定である。

一方、長期にわたって継代維持培養すると起こりやすいとされる染色体異常を持つ細胞株は、継代時のピペティング操作、その他の培養操作にエラーがあった場合にも、大きな影響は出ず、継代播種後に過剰に増殖し続けるため、実際はヒト ES/iPS 細胞の培養初心者であっても培養しやすい。その点は、いわゆる一般の細胞株、つまり「がん細胞」に似ている。今年度の検証においては、染色体数異常株 201B7-1A のような異常な性質をもつ細胞株では、過剰なピペティングをおこなっても細胞へのダメージとならない、つまり培養操作によって細胞

自体の「品質変動」が顕著に現われにくい、ということが実証された。しかし、このように過剰な増殖能をもつ細胞の出現も「品質の低下」と考えるべきである。

以上の解析結果により、細胞継代時のピペティング回数のような、正常な性質をもつヒト iPS 細胞の細胞培養に影響を与える細胞培養の手技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。また、細胞培養の手技の差がその後の培養に影響しない異常な性質をもつ細胞の検出にも応用できることが示唆された。

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 UKN1 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た。H27 年度は、複数の細胞株で UKN1 による分化誘導を実施し、詳細なプロトコルの策定を行っていく予定である。UKN1 においても、マトリゲルやコンディションメディウムなど、ロット差の大きいマテリアルが使用されることが問題点の一つである。より再現性の高いプロトコルを策定するためには、ロット差のない組成が明らかなマテリアルの使用、あるいは、マテリアルのロット管理(ロット毎の品質チェック)が必要であろう。細胞自体の品質に加え、アッセイに使用するマテリアルの品質の管理も重要である。

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。本検証結果は、国内外の幹細胞研究者の注目を浴びつつある。引き続き、H27 年度も検証を行っていく予定である。

F . 健康危険情報

特記事項なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suga M, Kii H, Niikura K, Kiyota Y and **Furue MK**, Development of a monitoring method for non-labeled human pluripotent stem cell growth by time-lapse image analysis.

STEM CELLS Translational Medicine
(in press)

- 2) Andrews P, Baker D, Benvenisty N, Miranda B, Bruce K, Brüstle O, Choi M, Choi YM, Crook J, de Sousa P, Dvorak P, Freund C, Firpo M, **Furue MK**, Gokhale P, Ha HY, Han E, Haupt S, Healy L, Hei Dj, Hovatta O, Hunt C, Hwang SM, Inamdar M, Isasi R, Jaconi M, Jekerle V, Kamthorn P, Kibbey M, Knezevic I, Knowles B, Koo SK, Laabi Y, Leopoldo L, Liu P, Lomax G, Loring J, Ludwig T, Montgomery K,

Mummery C, Nagy A, Nakamura Y, Nakatsuji N, Oh S, Oh SK, Otonkoski T, Pera M, Peschanski M, Pranke P, Rajala K, Rao M, Ruttachuk R, Reubinoff B, Ricco L, Rooke H, Sipp D, Stacey G, Suemori H, Takahashi T, Takada K, Talib S, Tannenbaum S, Yuan BZ, Zeng F, and Zhou Q. Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCB). *Regen Med.* (2015) Mar;10 (2 Suppl): 1-44. DOI: 10.2217/rme.14.93.

- 3) Ozawa M, Ozawa Y, Iemura M, Kohara A, Yanagihara K, **Furue MK**, A simple improvement of the conventional cryopreservation for human ES and iPS cells. *Protocol Exchange* (2014) DOI:10.1038/protex.2014.012
- 4) Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Ohnuma Y, Chan T, Michiue T, **Furue MK**, Asashima M. Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations. *SCIENTIFIC REPORTS* (2014) 4, 4646 DOI: 10.1038/srep04646
- 5) Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, **Furue MK**, Mizuguchi H. HHEX promotes hepatic-lineage

specification through the negative regulation of eomesodermin. *PLoS One* (2014) 9, e90791 DOI: 10.1371/journal.pone.0090791. eCollection 2014.

著書

- 1) **古江-楠田美保**(2014)第15章ヒト多能性幹細胞の利用技術開発、生命科学から創薬へのイノベーション 第部 **新たな創薬のための革新的技術 開発** 南山堂 P105-112
- 2) 菅-三佳、**古江-楠田 美保** (2014) ヒト多能性幹細胞培養用培地の開発の現状と課題 **生物工学会誌** 第92巻 9号 P487-490

2. 学会発表

国内学会：一般講演

- 1) 加藤竜司、岡田光加、長坂理紗子、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-楠田美保** コロニー形態情報を用いた iPS 細胞株の特性解析 第14回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2015年3月19日-21日
- 2) 加藤竜司、吉田啓、岡田光加、長坂理紗子、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-楠田美保** 細胞形態情報を用いた iPS 細胞培養手技の定量化 第14回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2015年3月19日-21日
- 3) 太刀川彩保子、菅三佳、**古江-楠田美保**、大沼清、二次元イメージングサイ

トメトリーは単層培養でのヒト多能性幹細胞コロニーの自己複製解析に適している 第14回再生医療学会総会 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2015年3月19日-21日

- 4) 長坂理紗子、岡田光加、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-楠田美保**、加藤竜司 細胞画像解析による iPS 細胞リアルタイム 品質評価法の開発 第66回日本生物工学会大会 札幌コンベンションセンター (北海道) 2014年9月9日-11日
- 5) 城戸理紗子、岡田光加、松本恵、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、**古江-楠田美保**、加藤竜司 画像解析を用いた iPS 細胞のリアルタイム 品質モニタリング技術 第21回 HAB 研究機構学術年会 昭和大学上 條講堂 (東京) 2014年5月16日-17日
- 6) Okamura M, Yanagihara K, Kanie K, YuJung L, Nikawa H, Kato R, **Furue MK** *Bioinformatics based approach to predicting endodermal differential efficiency in human ES/iPS cells.* 第87回日本組織培養学会 2014年5月29日-30日

国内学会：シンポジウム・ワークショップなど

- 7) 吉田啓、長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、清田泰次郎、本多裕之、**古江-楠田美保**、蟹江慧、加藤竜司 コロニートラッキングを応用した iPS 品質状態のモニタリング 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール (東京) 2015年1月13日

8) 太刀川彩保子、藤木彩香、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、**古江-楠田美保**、浅島誠、大沼清、2価イオンの制御によるヒト細胞シートの回収と細胞間結合の遮断 細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京) 2015年1月13日

9) 長坂理紗子、岡田光加、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、**古江-楠田美保**、加藤竜司 iPS細胞培養手技標準化のための形態評価 モデル細胞アッセイ研究会 東京大学生産技術研究所コンベンションホール(東京) 2015年1月13日

招待講演

10) **古江-楠田美保** 再生医療に果たす工学の役割 - ヒト多能性細胞の培養において求めてられるマテリアル - 第64回日本歯科理工学学会 アステールプラザ(広島) 2014年10月4日-5日

11) **古江-楠田美保** ヒト多能性幹細胞の品質管理と精度管理 第41回日本毒性学会学術年会 神戸コンベンションセンター(兵庫) 2014年7月2日-4日

学会座長

12) 柳原佳奈 Recent developments of Stem Cell Applications-leaders in industrialization JAACT2014 国際会議 北九州大会 北九州国際会議場(福岡) 2014年11月11日-14日

13) **古江-楠田美保** 再生医療に求められる細胞培養 第14回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜(神奈川)

2015年3月19日-21日

14) **古江-楠田美保** 臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞用培地の品質管理 iPS細胞ビジネス協議会 京都リサーチパーク(京都) 2014年11月26日

国際学会：一般講演

15) Yanagihara K, Okamura M, Kanie K, Kato R, **Furue MK.** *Prediction of differentiation tendency of human pluripotent stem cells toward endoderm* International Society for Stem Cell Reserch (ISSCR) 12th Annual Meeting, 2014.6.18-21 Vancouver, Canada

16) Suga M, Kii H, Uozumi T, Kiyota Y, **Furue MK.** Establishment of a noninvasive method for counting human pluripotent stem cell numbers by live cell imaging. ISSCR 12th Annual Metting 2014.6.18-21 Vancouver, Canada

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許出願
PCT/JP2014/08221 判定装置、観察システム、観察方法、そのプログラム、細胞の製造方法、および細胞 株式会社ニコン 清田 泰次郎、紀伊 宏昭、**古江 美保**、菅 三佳、志賀 正武

2. 実用新案登録
特記事項なし

3. その他
特記事項なし

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

**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**

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 in vitro 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。本年度は平成 26 年度に着手した、最近国内外でも広く使われ出したセンダイウイルスを用いたインテグレーションフリーのヒト iPS 細胞の樹立実験を継続し、樹立されたヒト iPS 細胞の評価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

ヒトiPS細胞の培養

昨年度樹立したiPS細胞は、医薬基盤研究所・JCRB細胞バンクから

入手したヒト線維芽細胞 TIG-114 (細胞番号: JCRB0534) にセンダイウイルスを用いて Oct4/Sox2/Klf4/cMyc の 4 因子を導入して作製したものである。TIG-114 細胞は、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 °C で培養した後、2 種類のセンダイウイルスに感染させて樹立した。

また、ヒト iPS 細胞の培養はゼラチンコートしたディッシュに播種した MMC 処理したマウス線維芽細胞(SNL76/6, 大日本住友製薬)をフィーダーとして用いた。SNL76/6 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を使用し、5%CO₂、37 °C で培養した。ヒト iPS 細胞培地は DMEM/F12 (和光) 500mL に Stemsure SR (和光) 125mL、Non-Essential amino acid 5mL、L-Glutamine 6.25mL、Penycillin/ Streptomycin 5mL を加えて調製した。bFGF (Peprotech) は終濃度 5ng/mL となるように毎回培地交換のたびにディッシュに直接添加した。また iPS 細胞の継代にはヒト ES 細胞用解離液 (0.25% Trypsin、1mg/ml Collagenase IV、1 mM CaCl₂、20% KSR を PBS 水

溶液で調製した物を用いた。

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。

定量 RT-PCR 解析

ヒト iPS 細胞は、ISOGEN (Nippon gene) を用いて溶解・回収し、chloroform を加え 15 秒間ボルテックスし、室温で 10 分間放置した後、12,000rpm、4 で 15 分間遠心を行った。その後、水相を新しいチューブにとり、isopropanol を加えて混和後、室温で 10 分間放置し、12,000rpm、4、10 分間遠心した。沈殿に 70% ethanol を加え、室温で 5 分間放置した後、7,500rpm、4 で 5 分間遠心した。沈殿に DEPC 処理水を 20 μ L 加えて吸光度を測定した。その後 PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を合成した。Oligo dT primer を 1 μ L、dNTP mixture 1 μ L 添加したものに、吸光度で測定しておいた 1 μ g の total RNA サンプルを加え、RNase-free dH₂O で 10 μ L にメスアップし、65 で 5 分間保温して氷上で急冷した。さらに、5 \times Prime Script Buffer を 4 μ L、RNase Inhibitor を 0.5 μ L、Prime Script RTase を 1 μ L を混合し、RNase-free dH₂O で 20 μ L にメスアップした。その後、42 で 60 分間反応させた後、70 で 15 分間処理し酵素を不活性化した。次に、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR

Mix (TOYOBO) を 10 μ L、100 μ M Forward Primer、100 μ M Reverse Primer を 0.6 μ L、cDNA サンプルを 2 μ L、DW を 6.8 μ L を混合し、各種特異的プライマーを用いて qPCR を行った。qPCR は CFX96 (Bio RAD) を用いて測定した。

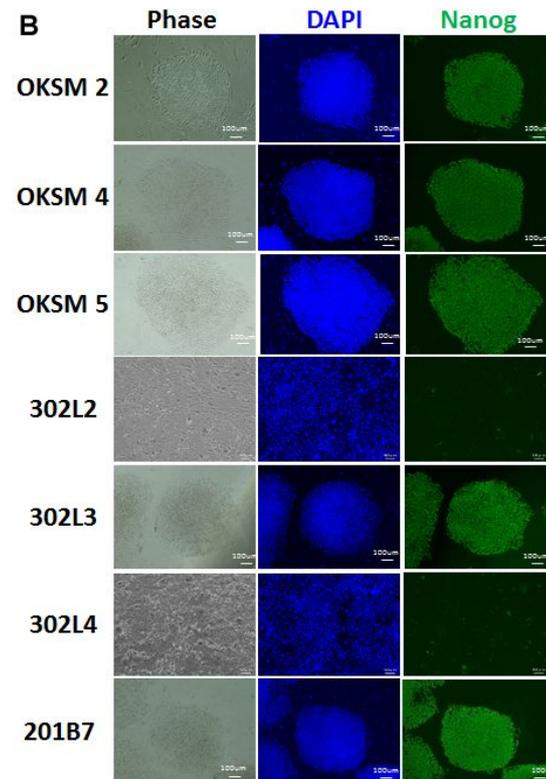
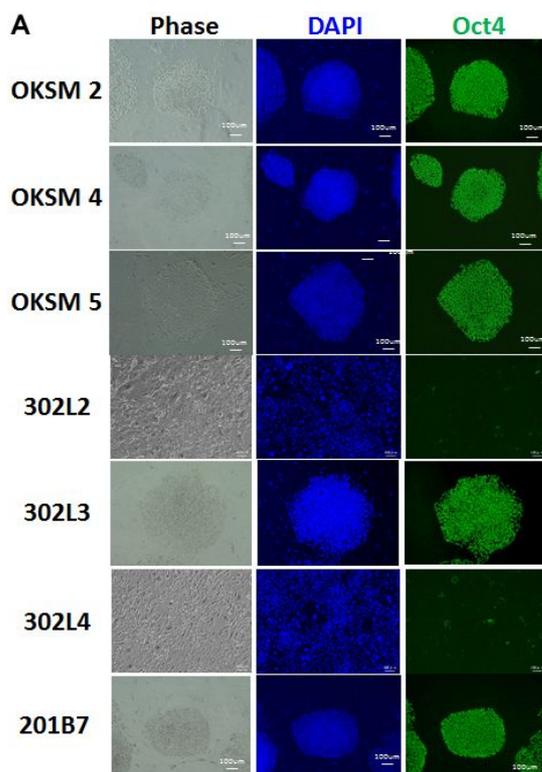
C. 研究結果

平成 26 年度は、昨年度にインテグレーションフリーな方法で樹立したヒト iPS 細胞を安定化するまで 14-15 継代ほど継代培養を続けた後、多能性幹細胞マーカーの発現を検証した。さらに優良な株については浮遊培養条件下で胚葉体を形成させ bFGF 非存在下で培養することで自由分化させ、外肺葉、中胚葉、内胚葉の初期マーカーの発現を定量的 RT-PCR で解析した。さらに核型解析を行い、マクロ的な見地から染色体異常の有無について検討を行うとともに、微生物検査もを行い、ウイルス感染や最近の混入、センダイウイルスの残存などの問題がないことを確認し、医薬基盤研究所と長岡技術大学に細胞を譲渡した。

樹立したヒト iPS 細胞の多能性幹細胞マーカーの発現解析

ヒト線維芽細胞 TIG-114 に、Oct4/Sox2/Klf4/cMyc 4 因子を安定発現させるセンダイウイルスベクター(OSKM-SeVdp ベクター)を用いて染色体 DNA への挿入なく 4 因子を安定発現させることでヒト iPS 細胞株を 7 株樹立した。本研究ではこれらを OSKM 株と呼び、樹立した 7 株を OSKM1 から OSKM7 と命名した。また、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 iPS 細胞で発現する miR302 のターゲット配列を導入して、iPS 細胞樹立後にセンダイウイルスを除去しやすくした改変版(OSKM-302L-SeVdp ベクター)を利用してさらに 7 株樹立

した。これらのヒト iPS 細胞株は OSKM-302L 株と呼び、OSKM-302L1 から OSKM-302L7 と順に命名した。レトロウイルスで樹立した場合と同様に、センダイウイルスで樹立した当初も iPS 細胞の維持は比較的不安定であり、十数継代維持し続けることで細胞の状態が安定化してきた。これらのヒト iPS 細胞の性状を免疫蛍光染色や定量的 RT-PCR により 201B7 とも比較することにより評価した。



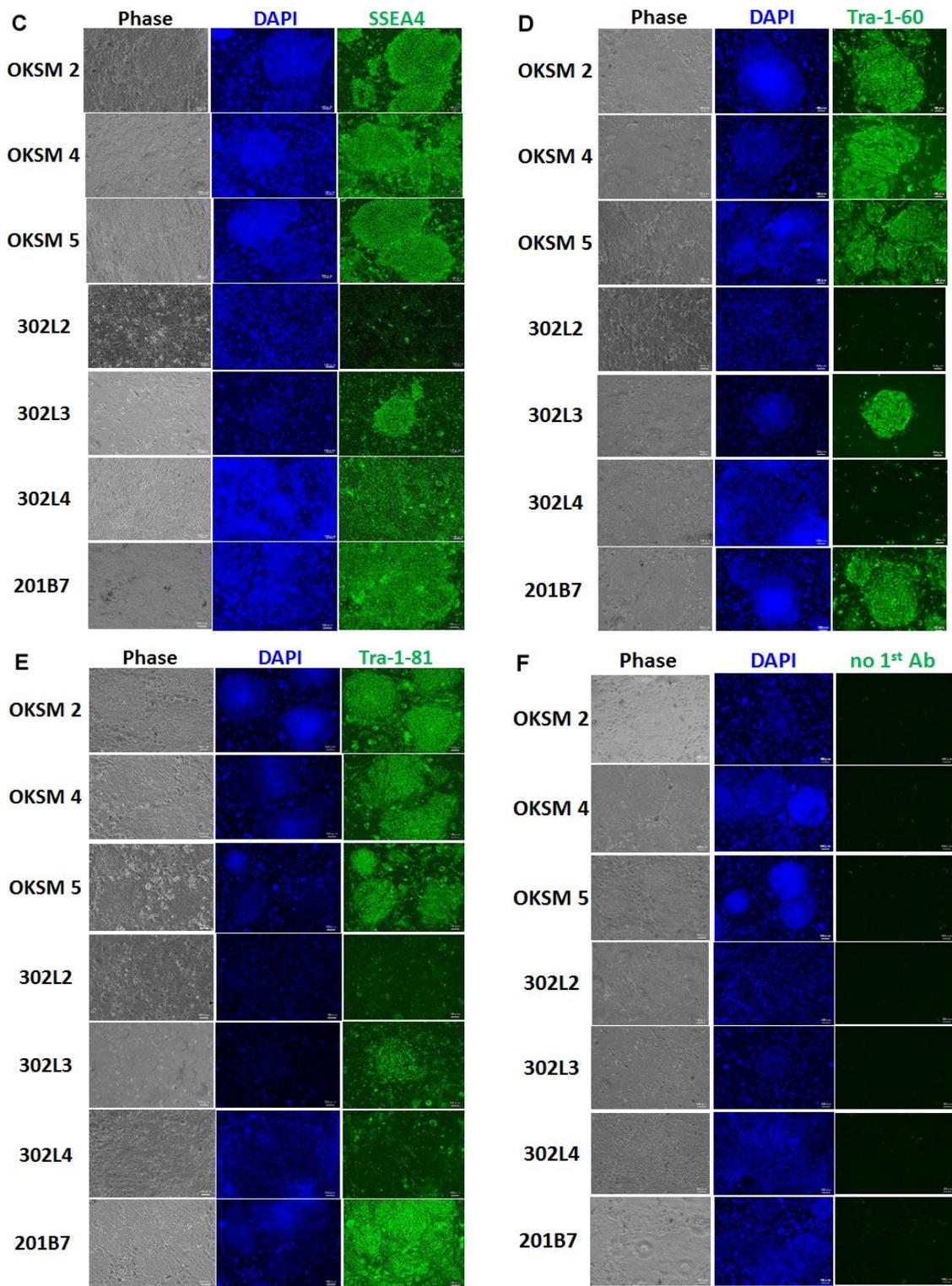


図1. センダイウイルスベクターを用いてTIG-114線維芽細胞から樹立したヒトiPS細胞における未分化マーカーの免疫蛍光染色。2種類のセンダイウイルスで樹立した比較的安定して継代が進んだヒトiPS細胞における多能性幹細胞マーカーの発現を京都大学でレトロウイルスを用いて作製された201B7株をコントロールと比較した。A.Oct4、B.Nanog、C.SSEA4、D.Tra-1-60、E.Tra-1-81、F.1次抗体なしのネガティブコントロール。

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

見られないコロニーが多く見られた。

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

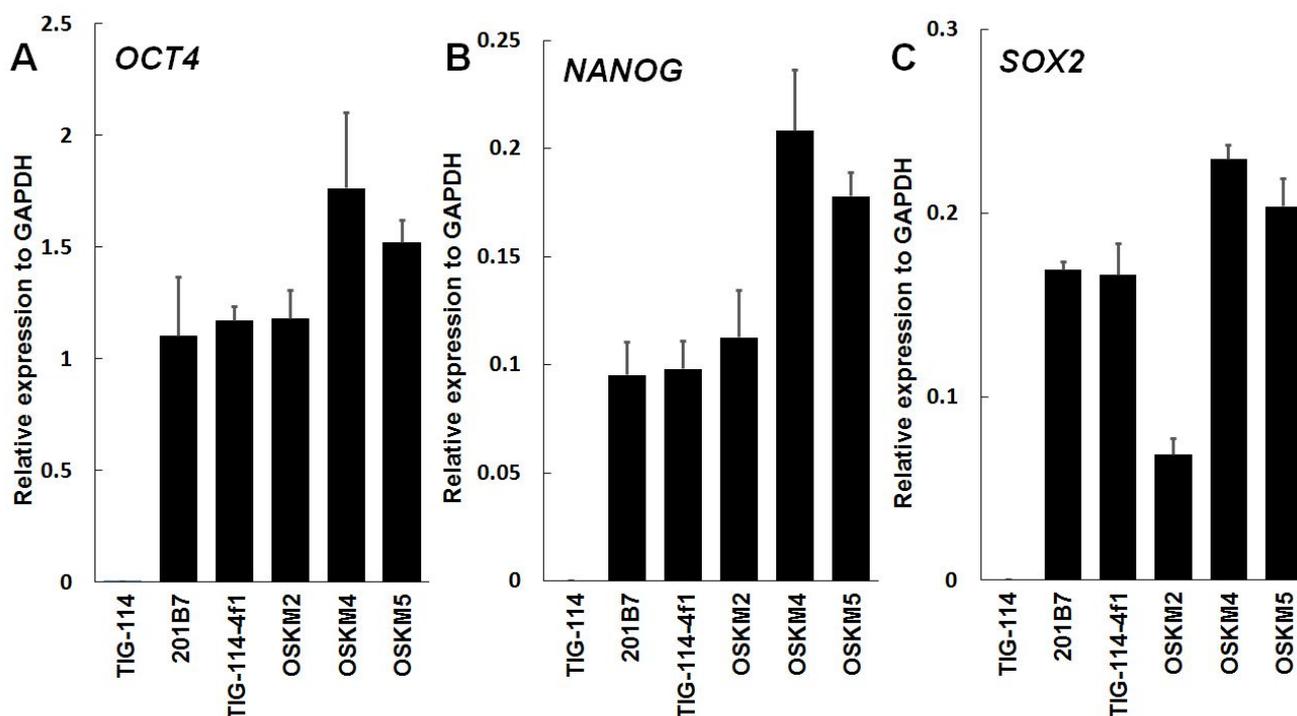


図 2. センダイウィルスベクターを用いて樹立したヒト iPS 細胞の未分化マーカーの定量的 RT-PCR を用いた発現解析。OSKM4 因子を発現するセンダイウィルスで樹立したヒト iPS 細胞における多能性幹細胞マーカーの発現を京都大学でレトロウィルスを用いて同じ TIG-114 線維芽細胞から作製された TIG-114-4f1 株や別の線維芽細胞から樹立された 201B7 株をコントロールに比較した。

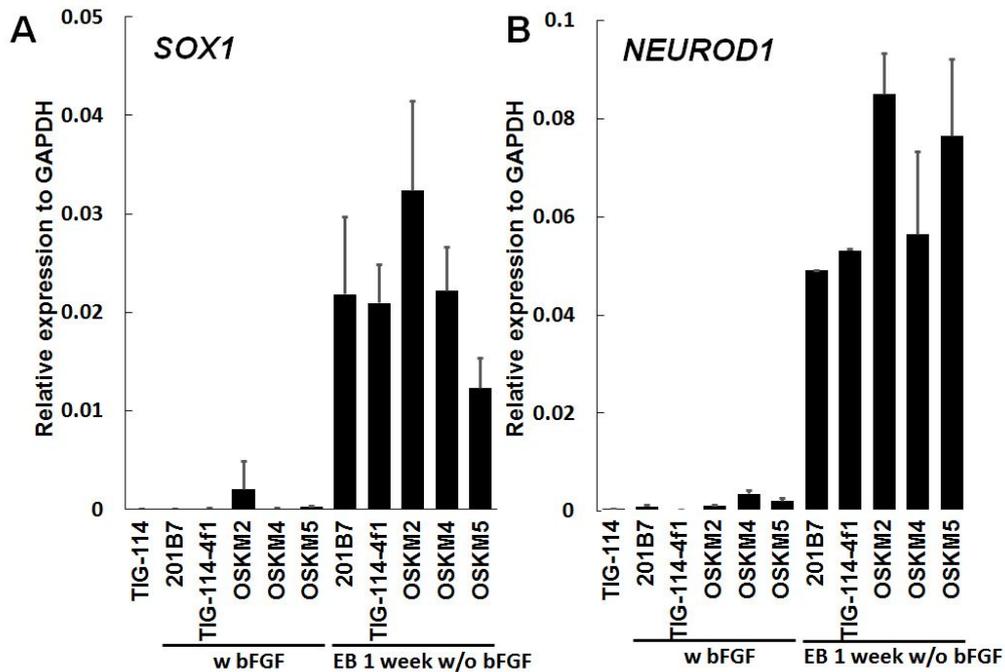


図3．ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期外肺葉マーカーの発現。w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を 1 週間浮遊培養させた分化細胞。

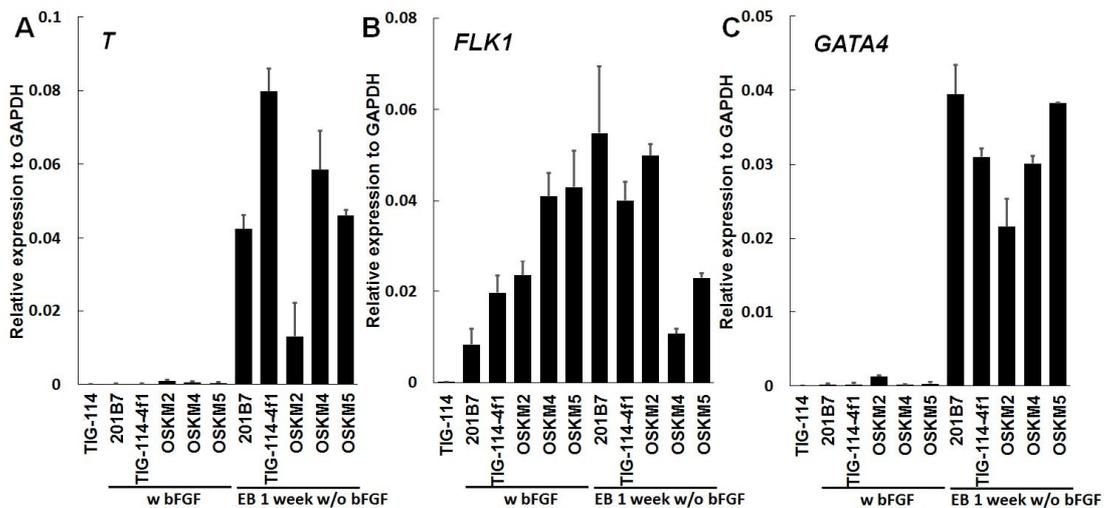


図4．ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期中肺葉マーカーの発現。w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を 1 週間浮遊培養させた分化細胞。

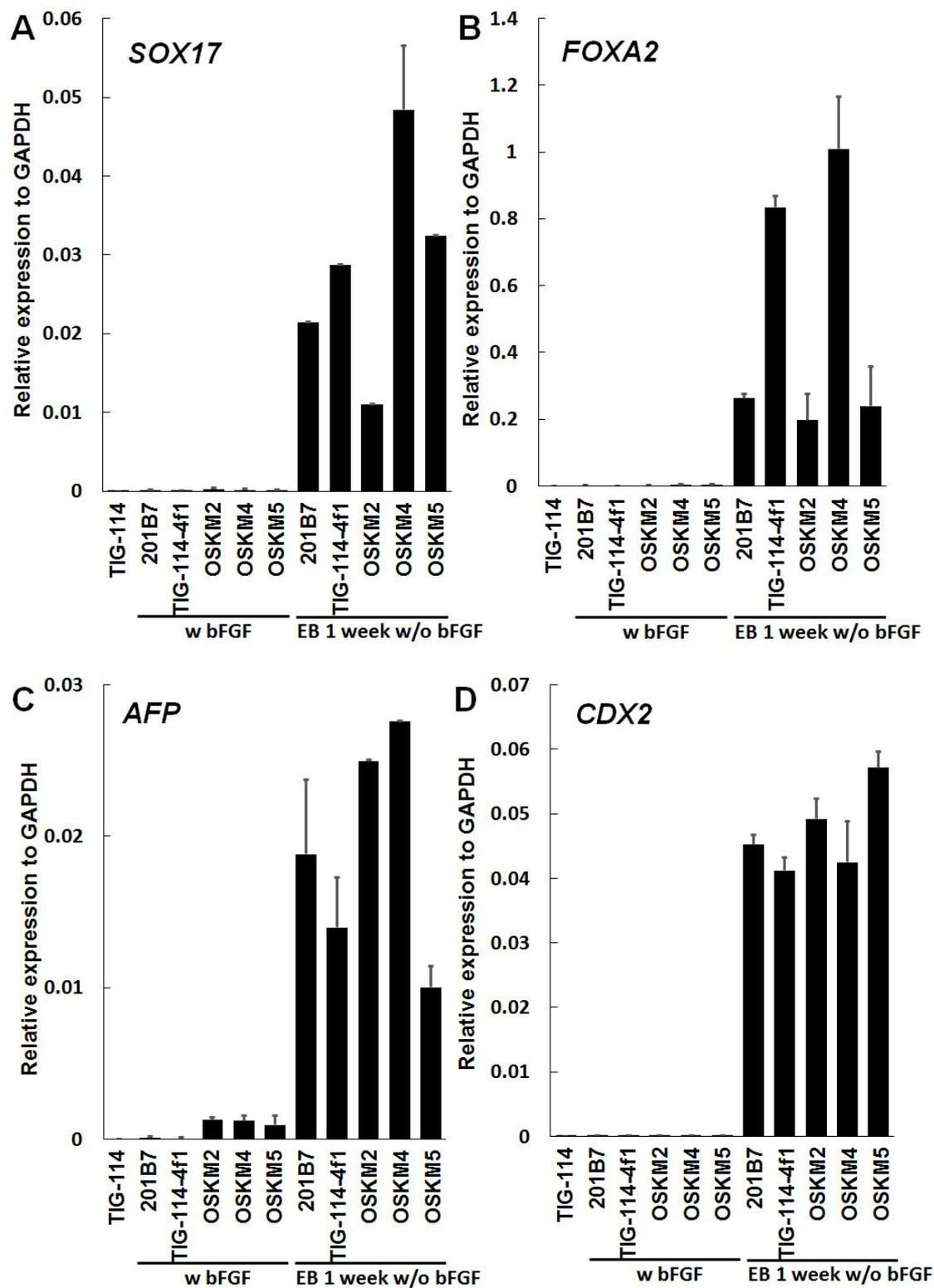


図5 . ヒト iPS 細胞を胚葉体形成法で自由分化させた際の各種初期内肺葉マーカーの発現。 w bFGF: bFGF 存在下で通常の維持培養したヒト iPS 細胞。 EB 1week w/o bFGF: bFGF 非存在下で胚葉体を 1 週間浮遊培養させた分化細胞。

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

倫理面の配慮

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

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

また、文部科学省からの通知(平成 20 年 2 月 21 日付 19 文科振第 852 号)にある禁止事項(着床前のヒト胚へのヒト iPS 細胞の導入、ヒト iPS 細胞から除核卵への核移植などにより個体を発生させる研究、ヒトへのヒト iPS 細胞の移植、ヒト iPS 細胞を導入した着床前の動物胚からの個体産生、生殖細胞の作製)は行っていない。

本研究は、法令及び、独立行政法人 産業技術総合研究所の所内規定を遵守し、外部委員を含む産総研所内のヒト由来試料倫理委員会で審査を経た上で、限られた研究員が利用できる専用の実験室内で行った。また、本研究で使用したセンダイウイルスでヒト iPS 細胞を樹立する実験を行うに当たっては、上記の産総研所内のヒト由来試料倫理委員会でヒト線維芽細胞 TIG-114 細胞

の使用、ヒト iPS 細胞の培養・樹立の計画を申請し承認済みであり、また、産総研所内の組換え DNA 実験委員会でセンダイウイルスを用いてヒト iPS 細胞を樹立する計画は承認済みである。さらに、将来有用な医療に繋がる可能性を秘めたヒト幹細胞研究が、社会の理解を得て適正に実施・推進されるよう、個人の尊厳と人権を尊重し、かつ、科学的知見に基づいて有効性及び安全性を確保できるよう厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従い、研究を行った。

D . 考察

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

らかではないが、これまでのところ 302miR を発現する KOSM-302L タイプでもこれまでのところ siRNA のトランスフェクションなしで容易にセンダイウイルスを除去することには成功しておらず、本方式のみでウイルスフリーのヒト iPS 細胞の樹立を簡便に行うには至っていないことから、OSKM-302L タイプはもう少し最適化を必要と考えられる。

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

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

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

E . 結論

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

細胞の性状を慎重に解析する必要がある。本年度は、樹立し継代培養の末に安定化させた複数の株について未分化マーカーの発現と分化能の解析、核型解析や微生物検査で異常がないことを確認し、ヒト iPS 細胞としてある程度信用できる株を選択し、医薬基盤研究所と長岡技術科学大学へ譲渡することができた。以上、本分担研究は当初の計画どおり順調に研究が進行している状況にある。

F . 参考文献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**, 861-72.
2. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-1720.
3. Nishimura K., et al., *Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming*. J Biol Chem. 2011 **286**, 4760-4771.

4. Nishimura T., et al., *Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. *Cell Stem Cell*. 2013 **12**, 114-126.
5. Wakao H, et al., *Expansion of functional human mucosal-associated invariant T cells via reprogramming to pluripotency and redifferentiation*. *Cell Stem Cell*. 2013 **12**, 546-558.

G . 研究発表

1 . 原著論文

- 1) Watanabe-Susaki K, Takada H, Enomoto K, Miwata K, Ishimine H, Intoh A, Ohtaka M, Nakanishi M, Sugino H, Asashima M, Kurisaki A. (2014). Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 32(12):3099-3111.

2. 学会発表

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

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

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

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

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

iPS 細胞の培養・ハイスループット分化評価

研究分担者 大沼清

長岡技術科学大学・工学部・生物系

准教授

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

そこで本分担研究では、iPS 細胞の未分化維持に於ける品質変動の評価と、微細加工技術を用いたハイスループット分化評価を行う。本年度は、細胞の継代時の操作による違いを評価する方法の確立と、微小流体制御培養システムを用いた分化アッセイシステムでのヒト iPS 細胞の分化の検証と異なる株での検証と、分化の方向性の検証を行った。

A. 研究目的

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

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

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

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

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

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

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞の KSR-MEF 培養

ヒト iPS 細胞の維持培養は一般的に行われている培養法に準じた[1, 5, 6]。ヒト iPS 細胞 201B7 株[1]と 253G1 株[7]は理研 BRC 細胞バンク(つくば、茨城)より、ナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて入手した。ヒト iPS 細胞の Tic 株(胎児肺線維芽細胞、MRC-5、由、JCRB1331)[8]は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク(大阪)より入手した。細胞の培養は以下の通り。D-MEM/F12 に KSR、2-mercaptoethanol、MEM 非必須アミノ酸、bFGF、ペニシリン・ストレプトマイシンを加えた培地(KSR培地)を用いて、フィーダ細胞(MEF)上で培養した。インキュベータは 37 °C、5% CO₂ に設定した。継代は、培養皿から培地を除き、ヒト iPS 細胞解離液(CTK 溶液[5])を加えて 3 分間静置した。その後、ヒト iPS 細胞解離液を除き、KSR 培地を 2 mL 加えてピペティングし、細胞懸濁液を 15 mL チューブに移した。このチューブを 10 × g、1 分間遠心し、上清を除き、KSR 培地を 1 mL 加えた。MEF を培養している培養皿から MEF 培地を除き、KSR 培地に 5 μM ROCK inhibitor[4]を加え、ヒト iPS 細胞を元の培養皿の 1/6 ~ 1/3 量を播種した。継代の 2 日後から毎日、培地を交換した。MEF は、D-MEM に 0.9% Penicillin-Streptomycin、9% FBS

を加えた培地を用い、同じインキュベータで培養した。フィーダ細胞は、継代 3 ~ 4 回目の MEF を mitomycin C で 90 分間処理し、翌日に 10% DMSO 入りの培養液で凍結保存し、それを解凍して 0.1%ゼラチンコート培養皿に播種したものを使用した。

ヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダ培養

全ての実験で、ヒト iPS 細胞を KSR-MEF 培養から、無血清・無フィーダ培養に移した後、少なくとも 1 回以上継代培養してから実験に使用した。無血清培養(ESF9a)の組成は以下の通り。基礎培地は hESF-Gro medium (Cell Science & Technology Institute、宮城)。これに以下を添加した。10 μg/mL ウシ膵臓由来インスリン(Sigma I-5500)、5 μg/mL ヒトアポトランスフェリン(Sigma T-1147)、10 μM 2-メルカプトエタノール(Sigma M-7522)、10 μM エタノールアミン(Sigma E-0135)、20 nM セレン酸ナトリウム(Sigma S-9133)、0.5 mg/mL の脂肪酸不含のウシ血清アルブミンのフラクシオン V に結合した 4.7 μg/mL のオレイン酸(Sigma O-3008)、100 ng/mL ブタの腸粘膜由来のヘパリン・ナトリウム塩(Sigma H-3149)、10 ng/mL 塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF、Wako)、2 ng/mL ヒトアクチビン A (338-AC R&D Systems、Minneapolis、MN、USA)。

培養皿は、 $2\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ のファイブロネクチンでコートした [6, 9]。継代はまず、培養皿からhESF-9a培地を除き、 $0.2\text{-}0.5\ \text{unit}/\text{mL}$ dispase、hESF-9a培地から成る解離液を $0.5\ \text{mL}$ 加え5分間 37°C で静置した。その後、解離液を除きhESF-9a培地を $2\ \text{mL}$ 加えてピペティングした後、細胞懸濁液を $15\ \text{mL}$ 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 $1\ \text{mL}$ 加えた。 $1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ファイブロネクチンコート培養皿にhESF-9a培地を $4\ \text{mL}$ 、 $5\ \mu\text{M}$ ROCK inhibitorを加え、ヒトiPS細胞懸濁液を $0.2\ \text{mL}$ 加え、播種した。播種2日後から毎日培地を交換した。

アポトーシス・生細胞・接着率

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

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

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

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

細胞生着率の測定

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

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

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

生細胞数アッセイ

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

微小流体制御培養システムによるヒト iPS 細胞の無血清・無フィーダー培養

微細フォトリソグラフィで鋳型を作り、2液混合の熱硬化性のシリコンゴムPDMSで模りした[10, 11]。

ヒトiPS細胞を無血清・無フィーダー培養した培養皿から培地を除き、

PBSで2回洗浄し、0.02% EDTA-PBSを加えて10分間静置した。そこに培地を1 mL加えてピペティングして一細胞レベルまで分散した後、300 \times g、3分間遠心して回収した。5 μ M ROCK inhibitor を添加したESF-9a培地を加えて、 4.2×10^5 cells/mL細胞懸濁液を調整した。

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

微小流体制御培養システム内での免疫染色

微小流体制御培養システムの培養液リザーバに、0.5 mM カルシウム入り、0.5 mM マグネシウム入りPBS (PBS⁺⁺)を各リザーバに400 μ L加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。4% Formalin Solutionを各リザーバ150 μ L加えて30 kPa加圧し、室温で20分間静置して細胞を固定した。固定後、PBS⁺⁺を各リザーバ400 μ L加えて、30 kPa加圧し、洗浄した。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS⁺⁺を各レーン150 μ L加えて30 kPa加圧し、室温

で90分静置し、透過、ブロッキングを行った。0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS⁺⁺でそれぞれ希釈し1次抗体を各リザーバ150 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、アルミ箔で被った箱に入れ、室温で3時間静置した。DAPIを0.2% Triton X-100、10 mg/mL BSA-PBS⁺⁺で希釈し、各レーンリザーバ μL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 μL加えて、30 kPa加圧し、洗浄し、オールインワン顕微鏡を用いて観察した。

倫理面の配慮

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

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

C. 研究結果

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

継代操作が与える影響の評価 1 : アポトーシスの定量的評価法

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

れている。Annexin V は Ca^{2+} 存在下でフォスファチジルセリンに対して強い親和性を持つため、蛍光標識した Annexin V はアポトーシスの良いマーカーとなる。継代作業の違いがはっきり表れると予想される条件として、 $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ 不含の溶液を用いて細胞を単一細胞に分散した場合と、 Ca^{2+} を添加して細胞塊のまま分散した場合とを比較した。回収し、再播種して4時間後に Annexin V で染色して写真を撮り、その後FACS解析をした。

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

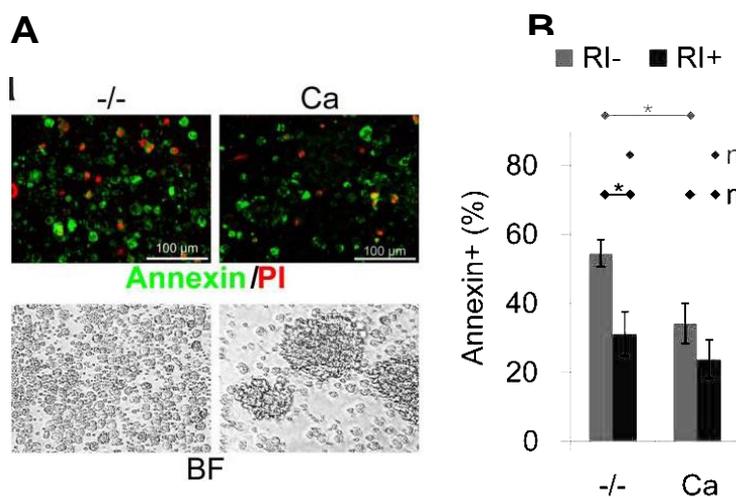


図 1: 継代作業によるヒト iPS 細胞へのダメージの定量的な評価。

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

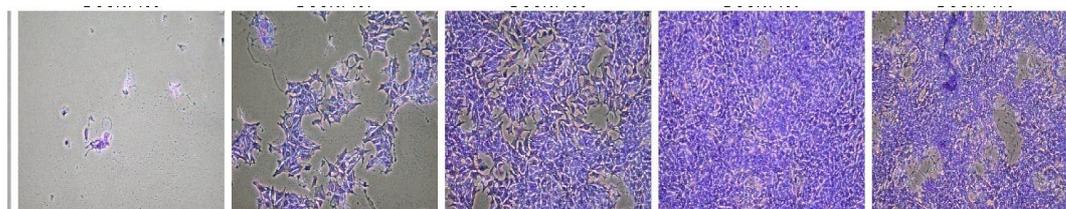
B: FACS 解析による Annexin V 陽性細胞数の定量。RI はアポトーシス抑制剤 (ROCK 阻害剤)。

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

継代操作が与える影響の評価 2 : 再接着率・生細胞数の測定

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

まず、生着細胞数の推定するため、



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

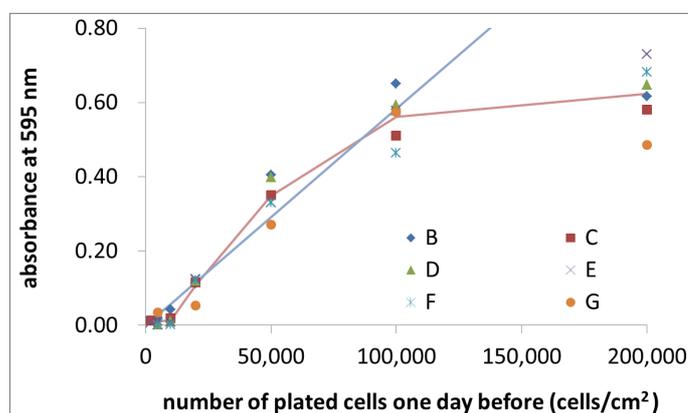


図 2 : クリスタルバイオレットを用いたヒト iPS 細胞の再接着の定量。

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

いは、ヒトiPS細胞の形態を観察し、生細胞数を定量するのに適している。

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

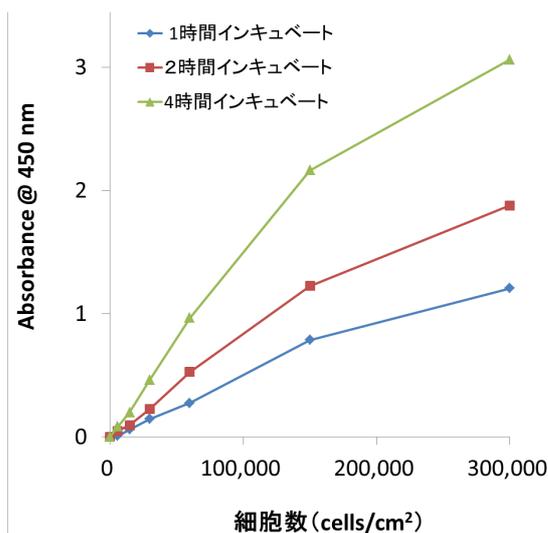


図 3: Cell counting kit-8 を用いたヒト iPS 細胞の再接着の定量。

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

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

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

微小流体制御培養システムにおける異なるヒト iPS 細胞の分化誘導

昨年度までの研究で、小流体制御培養システム内で未分化維持培養と分化誘導が可能である事を調べた。分化誘導試薬は、胚胎外組織の方向へ分化誘導する因子として知られている骨形成因子 4 (BMP-4) を用いた。本年度は、このシステムを用いた分化誘導が他の細胞株でも働くかどうかを調べた。ヒト iPS 細胞は株により反応性が異なるため、複数の株を調べることが重要となる。そこで京都大学山中研で樹立されたヒト iPS 細胞

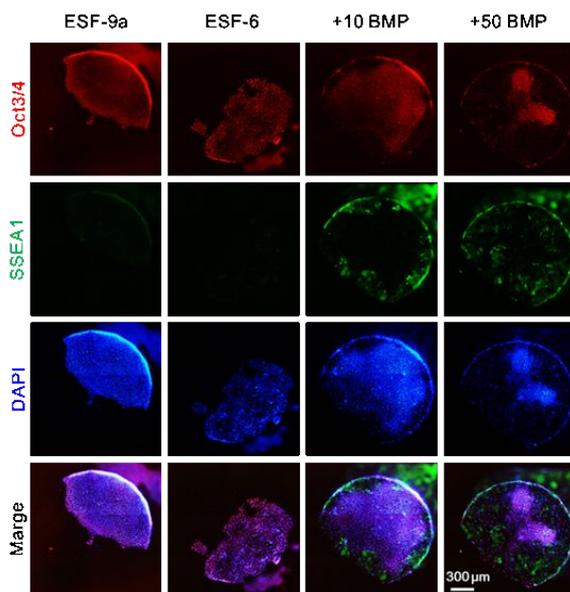


図 4：微小流体制御培養システムでのヒト iPS 細胞の分化誘導を、異なる iPS 細胞、Tic 株での確認。

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

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

昨年度と同様、無血清・無フィーダ培養したヒト iPS 細胞を微小流体制御培養システムに導入して静置し、1日後に細胞が生着していることを確認した後、4種類の培地へと交換した。4種類の培地は、未分化維持培地 (hESF-9a) bFGF などの未分化維持因子を除いた培地 (hESF-6) 分化を誘導するために hESF-6 に低濃度 (10 ng/mL) の BMP-4 を入れた培地 (+10 BMP) 分化を誘導するために hESF-6 に高濃度 (50 ng/mL) の BMP-4 を入れた培地 (+50 BMP) を灌流した。

各培地に交換した後、3日間灌流培養をし、未分化マーカーの OCT3/4、初期分化マーカーの SSEA1 で免疫染色を行った。その結果昨年度と同様に、未分化維持培養条件ではほとんどの細胞が OCT3/4 陽性 (赤) かつ SSEA1 陰性であったのに対し、分化誘導培地では OCT3/4 陰性かつ SSEA1 陽性 (緑) の細胞が多かった (図 4)。

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

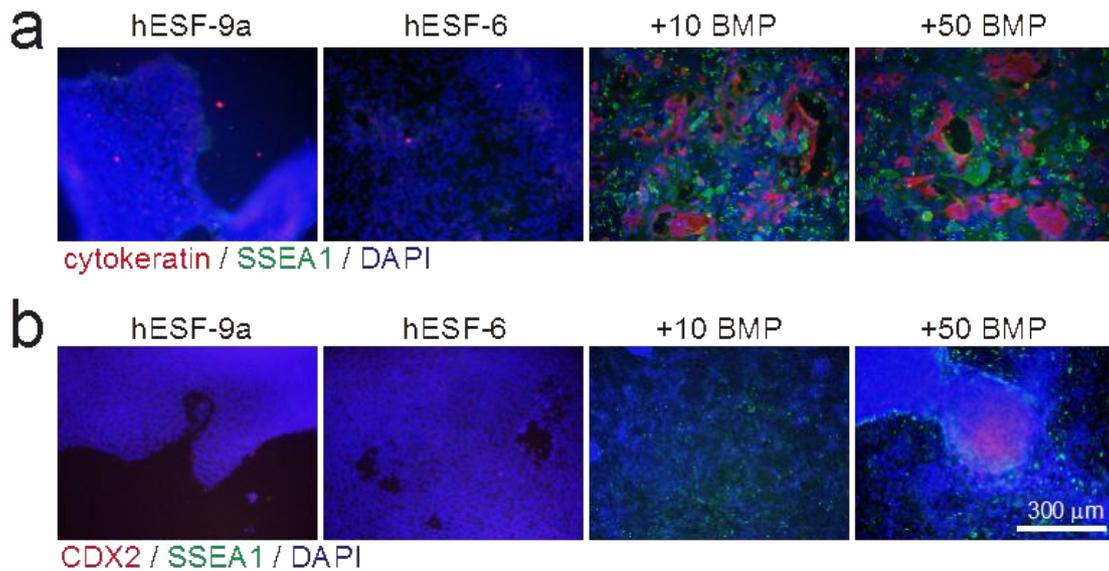


図 5：ヒト iPS 細胞の BMP 初期分化： 正しい方向へと分化していることを確かめるために長く分化した時の細胞分化を免疫染色で確認した。分化誘導から 1 週間の時点での初期分化を SSEA1 (a, b)、胚胎外組織方向への分化を cytocheratin (a) と CDX2 (b) 青色は DAPI による核染色。

微小流体制御培養システムにおけるヒト iPS 細胞の分化誘導系の確認

昨年度までの研究で、小流体制御培養システム内で未分化維持培養と分化誘導が可能である事を調べた。分化誘導試薬は、胚胎外組織の方向へ分化誘導する因子として知られている骨形成因子 4 (BMP-4) を用いた。ただし、未分化・初期分化マーカーでそれを確認したのみで、分化が正しい方向に向かっているかどうかは確認できていなかった。そこで、より長期に培養し、分化が進んだ段階で免疫染色し、分化の方向性が正しいかどうかを確認した。

無血清・無フィーダ培養したヒト iPS 細胞を播いて 1 日後に細胞が生着していることを確認した後、4 種類の培地へと交換した。4 種類の培地は、

未分化維持培地 (hESF-9a)、bFGF などの未分化維持因子を除いた培地 (hESF-6)、分化を誘導するために hESF-6 に低濃度 (10 ng/mL) の BMP-4 を入れた培地 (+10 BMP)、分化を誘導するために hESF-6 に高濃度 (50 ng/mL) の BMP-4 を入れた培地 (+50 BMP) を使用した。昨年度は 3 日間のみであったが、今年度は 1 週間培養した後、初期分化マーカーの SSEA1 と胚胎外組織分化の初期に現れるサイトケラチンと CDX2 で免疫染色した。その結果、未分化維持培地 (hESF-9a) や未分化維持因子を除いた培地 (hESF-6) ではほとんどの細胞が理両方の分化マーカー陰性だったのに対し、分化誘導培地では両方に陽性の細胞が見つかった (図 5)。従って、この分化誘導系が正しく機能していることが確認できた。

D . 議論

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

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

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

E . 結論

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

F . 参考文献

1. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
2. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
3. 古江-楠田, 美., *日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化 : その 2 分化能の評価*. 組織培養研究, 2009. **28**(2/3/4): p. 129-133.
4. Watanabe, K., et al., *A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(6): p. 681-6.
5. Suemori, H., et al., *Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **345**(3): p. 926-32.
6. Hayashi, Y., et al., *Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions*. PLoS ONE, 2010. **5**(11): p. e14099.
7. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nature biotechnology, 2007. **26**(1): p. 101-106.
8. Nishino, K., et al., *DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells over Time*. PLoS Genetics, 2011. **7**(5): p. e1002085.
9. Kusuda Furue, M., et al., *Advantages and difficulties in culturing human pluripotent stem cells in growth factor-defined serum-free medium*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010.
10. Sugiura, S., et al., *Pressure-driven perfusion culture microchamber array for a parallel drug cytotoxicity assay*. Biotechnol Bioeng, 2008. **100**(6): p. 1156-65.
11. Yoshimitsu, R., et al., *Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions*. Biotechnology and Bioengineering, 2014. **111**(5):

p. 937-947.

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

G . 研究発表

1 . 原著論文

- 1) Yamada R, Hattori K, Tagaya M, Sasaki T, Miyamoto D, Nakazawa K, Sugiura S, Kanamori T, Ohnuma K*. Plasma-patterned polydimethylsiloxane surface with single-step coating of a mixture of vitronectin and albumin enables the formation of small discs and spheroids of human iPS. Plasma Medicine. 2014;4(1-4):165-76.
- 2) Ninomiya H, Mizuno K, Terada R, Miura T, Ohnuma K, Takahashi S, et al. Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2014 (e-pub 15 Aug 2014)
- 3) Yamada, R., K. Hattori, S. Tachikawa, M. Tagaya, T. Sasaki, S. Sugiura, T. Kanamori and K. Ohnuma* (2014). "Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned polydimethylsiloxane coated with vitronectin and γ -globulin." Journal of Bioscience and Bioengineering. 118, 315-322 (Sept 2014).
- 4) Yoshimitsu, R., Hattori, K., Sugiura, S., Kondo, Y., Yamada, R., Tachikawa, S., Satoh, T., Kurisaki, A.,

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

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

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

2. 学会発表

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

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

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

4) 太刀川彩保子、藤木彩香、林洋平、伊藤弓弦、小沼泰子、セン徳川、道上達男、楠田-古江美保、浅島誠、大沼清、「2価イオンの制御によるヒト細胞シートの回収と細胞間結合の遮断」、細胞アッセイ研究会、2015年1月13日(東京大学生産技術研究所コンベンションホール)

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

京大学生産技術研究所コンベンションホール)

6) 太刀川彩保子、菅美香、古江美保、大沼清、「二次元イメージングサイトメトリーは単層培養でのヒト多能性幹細胞コロニーの自己複製解析に適している」、再生医療学会、2015年3月20日(パシフィコ横浜)

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

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

フィコ横浜)

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

10) 山田遼太郎、服部浩二、太刀川彩保子、多賀谷基博、佐々木徹、杉浦慎治、金森敏幸、大沼清、「プラズマ照射と複合コートによるヒト iPS 細胞の 2 次元パターンの作製」、第 21 回 HAB 研究機構学術年会、2014 年 5 月 16 日~17 日(昭和大学上條講堂)

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
(分担) 研究報告書

中胚葉分化誘導の標準化と評価

研究分担者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部
幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究は、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液細胞等）への分化プロトコルを標準化し、個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証することを目的とする。平成 26 年度は、昨年度に引き続き iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化プロトコルの収集を行い、適切なプロトコルの抽出を試みた。その結果、胚様体形成法を用いることで実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞を分化誘導可能であった。また、ヒト iPS 細胞株が異なった場合でも再現性良く血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞が分化誘導可能であったことから、胚様体形成法はコントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコルとなり得る可能性が示された。

研究協力者

岡田淳雅：独立行政法人医薬基盤研究所

田代克久：独立行政法人医薬基盤研究所

山口朋子：独立行政法人医薬基盤研究所

A . 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞（human induced pluripotent stem cells；ヒト iPS 細胞）は自己複製能と分化多能性を有しており、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞は創薬研究などへの応用が期待されている。近年、様々な分化誘導法が発表されている一方、同じ iPS 細胞

株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多く、ヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。そこで本研究では、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液細胞等）への分化プロトコルを標準化し、個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証することを目指す。平成 26 年度は、昨年度に引き続き、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液前駆細胞等）への分化プロトコルの収集および再現性の高いプロトコルの抽出を試みた。

B . 研究方法

B-1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 (京都大学、山中伸弥教授から供与)、Tic (JCRB Cellbank から供与 ; JCRB Number : JCRB1331)、NEPB (筑波大学、須磨崎亮教授から供与) は 5 ng/mL の fibroblast growth factor 2 (FGF2 : 片山化学) を含む ReproStem 培地 (ReproCELL) を用いて、マイトマイシン C 処理済のマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) 上で培養した。ヒト iPS 細胞株は 4-5 日ごとに 0.1 mg/ml dispase (Roche) またはコロニーのピックアップにより継代した。

[血管内皮]

B-2. 胚様体 (embryoid body : EB) 形成法による血管内皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導は以下の方法で行った。Accutase を用いてヒト iPS 細胞を回収後、20 ng/mL BMP4、2 ng/ml Activin A、10 μ M Rho-associated coiled-coil forming kinase (ROCK) inhibitor (Y-27632 : Wako) を含む StemPro-34 培地 (StemPro-34 Nutrient Supplement (Life Technologies)、50 μ g/ml Ascorbic acid (Sigma)、450 μ M 1-thioglycerol (MTG ; Sigma)、2 mM L-Glutamine (Life Technologies)、120 μ g/ml streptomycin および 200 μ g/ml penicillin を含む StemPro-34 Serum Free Medium (Life

Technologies)) に懸濁後、96 穴 Lipidure-coat プレート (Thermo Scientific) の各ウェルに 2×10^4 個の細胞を播種し EB を形成させた。2 日間培養後、中胚葉へと分化させるために 20 ng/mL BMP4 および 5 ng/ml VEGF を含む StemPro-34 培地に置換してさらに 2 日間培養し、培養 4 日目に 20 ng/mL BMP4、5 ng/ml VEGF および 5 μ M transforming growth factor (TGF) β inhibitor (SB431542 ; Wako) を含む StemPro-34 培地で 2 日間培養した。培養 6 日目に EB を回収し、20 ng/ml VEGF、2 ng/ml FGF2 および 5 μ M SB431542 を含む StemPro-34 培地で置換し、3 - 4 日間 (培養 9 - 10 日間まで) ペトリディッシュ上で培養した。また、目的の細胞集団をセルソーターにより分離し、100 ng/ml Endothelial cells growth supplement (ECGS : Sigma)、100 ng/ml heparin (Sigma) および 20 ng/ml FGF2 を含む StemPro34 培地に懸濁した後、 5×10^4 cells/well (48 well) の密度で 20 μ g/cm² の濃度でフィブロネクチンをコートしたプレートに播種した。その後、2 日おきに培地を置換しながら接着培養を行い、血管内皮細胞を誘導・増幅した。

B-3. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離

培養 9 日目の EB を回収し、Trypsin/EDTA (Life Technologies) を加えて 37 °C で 5 分反応させた後、ピペッティングにより単細胞に解離させた。その後、allophycocyanin (APC) 標識抗ヒト CD34 抗体 (clone 581 ; BioLegend) および phycoerythrin (PE) 標

識抗ヒト VE-Cadherin 抗体 (clone 16B1 : eBioscience) を 4、遮光で 40 分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、フローサイトメーター (BD LSRFortessa II ; BD Bioscience) を用いて CD34 発現 (+)VE-Cadherin+ 細胞の割合を解析した。

[血液前駆細胞]

B-4. EB 形成による血液前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞を Accutase により培養ディッシュから剥離し、10 μ M Y27632 を含む EB 形成培地 [50 μ g/ml Ascorbic acid、450 μ M MTG、付属のサプリメントを加えた mTeSR (Stem Cell)] 中でピペッティングすることにより単細胞に解離した。その後、1 x 10⁶ 個の iPS 細胞と前日放射線処理した 6 x 10⁵ 個 C3H10T1/2 細胞を 1 ng/ml ActivinA、10 ng/ml BMP4、10 μ M ROCK inhibitor を含む EB 形成培地に懸濁し、ペトリディッシュに播種した。2 日後 (Day 2)、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF を含む EB 分化培地 [50 μ g/ml Ascorbic acid、450 μ M MTG、2 mM L-Glutamine、インスリントランスフェリン (Life Technologies) を加えた IMDM (Sigma)] に置き換えた。その 2 日後 (Day 4)、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10 μ M SB431542 を含む EB 分化培地で半分培地を交換し、更に 2 日培養した。分化誘導から 6 日目 (Day 6) に、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10 ng/ml stem cell factor (SCF; Pepotech)、10 ng/ml Thrombopoietin (TPO; Peprotech) を含む EB 分化培地に培地を交換

した。2 日後 (Day 8) に半分培地交換を行い、血液前駆細胞の誘導を行った。

B-5. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離

培養 9 日目の EB を回収し、Trypsin/EDTA (Life Technologies) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 5 分反応させた後、ピペッティングにより単細胞に解離させた。その後、APC 標識抗ヒト CD34 抗体および fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD43 抗体 (clone 1G10; BD Biosciences) を氷上、遮光で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、セルソーター (SONY SH-800) を用いて CD34 陽性 CD43 陽性細胞の割合を解析した。

C . 研究結果

C-1 . ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導

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

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

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

また、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能かどうかについて 201B7 株を用いて検討した。その結果、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能であった (Figure 2) ことから、胚様体形成法はコントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコルとなり得る可能性が示された。

C-2 . ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導

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

ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へ分化誘導する方法として、支持細胞との共培養法、単層培養法や胚様体形成法などが報告されている。昨年度いくつかの手法で検討した結果、胚様体形成法がもっとも安定的にヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へと分化誘導可能であることを示した。昨年度に引き続き、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導プロトコルを収集した。本年度は、コロニー状のヒト iPS 細胞を分化誘導開始時に用いて実験を行った。本手法は、まず、ヒト iPS 細胞をコロニー状でマトリゲル上に播種し、2-3 日増殖させた後に培地交換を行うことで分化を開始する手法であり、ヒト iPS 細胞から肝細胞を分化させる際に汎用されている手法である。Activin A 存在下で培養し、中内胚葉系細胞を誘導した後に BMP4 および SCF、TPO などの血液細胞分化を支持するサイトカイン存在下で培養することにより中胚葉・血液前駆細胞様細胞の誘導を試みた。その結果、本手法では再現性良く血液前駆細胞を誘導することが出来なかった (data not shown)。

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

また、実験者が異なった場合でも安定的に

血液前駆細胞へ分化誘導可能かどうかについて、NEPB 株および 201B7 株を用いて検討した。その結果、実験者が異なった場合でも安定的に血液前駆細胞へ分化誘導可能であった (Figure 4) ことから、胚様体形成法は、血管内皮細胞だけでなく、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化においてもコントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコールとなり得る可能性が示された。

D . 考察

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

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

E . 結論

実験者が異なった場合でも再現性高くかつ安定的に血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞を分化誘導可能であったことから、胚様体形成法はコントロールとして使用できる分化プロトコールとなり得る可能性が示された。これらの結果は、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞を用いた創薬研究の基盤技術となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

HHEX promotes hepatic-lineage specification through the negative regulation of eomesodermin. *PLoS One.* 3: e90791 (2014)

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

2. 学会発表

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

blood brain barrier model; International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting, Vancouver, Canada, June, 2014

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

3. その他
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

川端健二、山口朋子

成熟マスト細胞の作製方法及び得られた成熟マスト細胞

出願番号：特願 2013-103582

出願日：平成 25 年 5 月 15 日

川端 健二、田代 克久

多能性幹細胞から脳血管内皮細胞を製造する方法

出願番号：特願 2014-038105

出願日：平成 26 年 2 月 28 日

2. 実用新案登録

該当なし

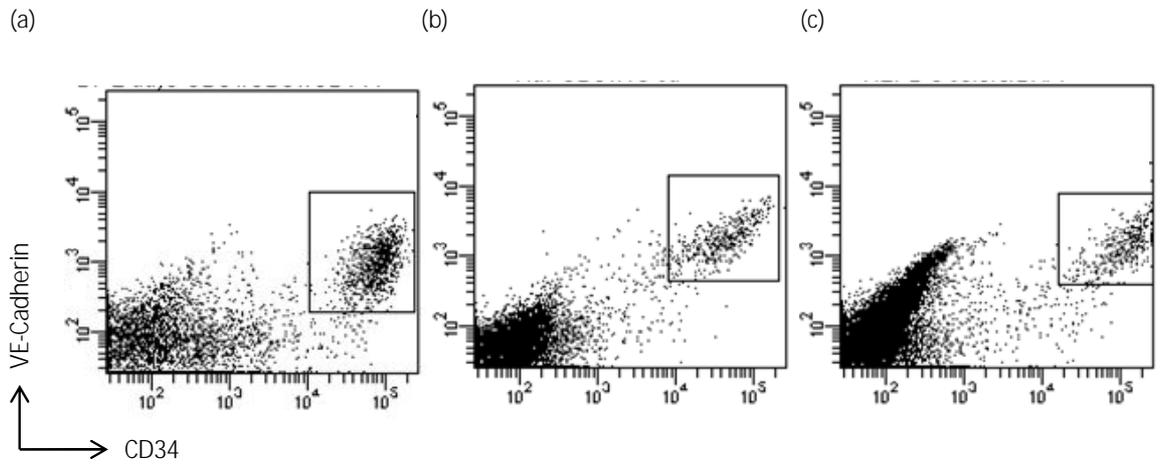


Figure 1 異なるヒトiPS細胞株から血管内皮細胞への分化誘導効率の違い
 (a) 201B7株、(b)Tic株、(c) NEPB株からそれぞれ血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にフローサイトメーターにてCD34およびCD144 (VE-カドヘリン)の発現について検討した。

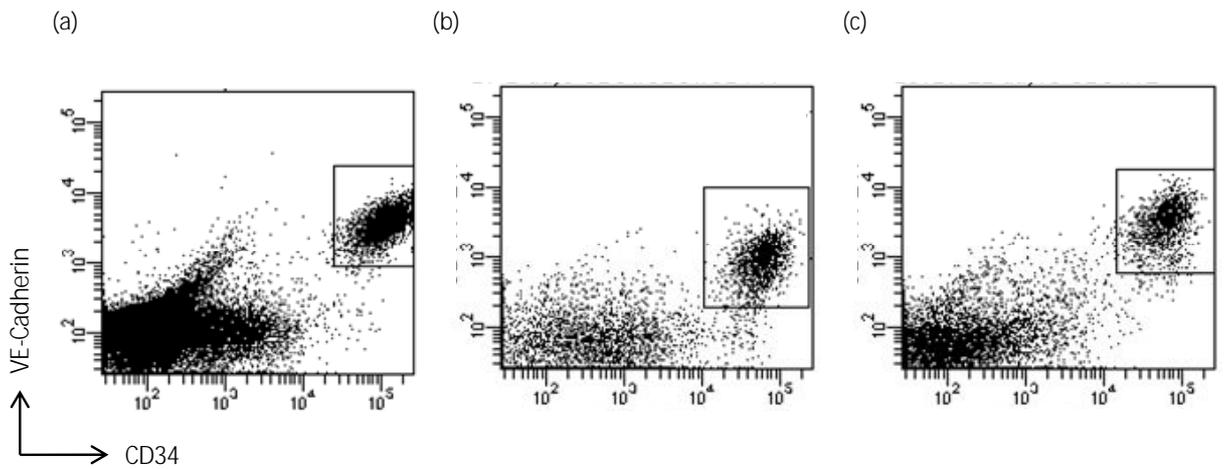


Figure 2 実験者が異なる場合における201B7株から血管内皮細胞への分化誘導効率の違い
 201B7株からそれぞれ異なる実験者(3名)が独立して血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にフローサイトメーターにてCD34およびCD144 (VE-カドヘリン)の発現について検討した。

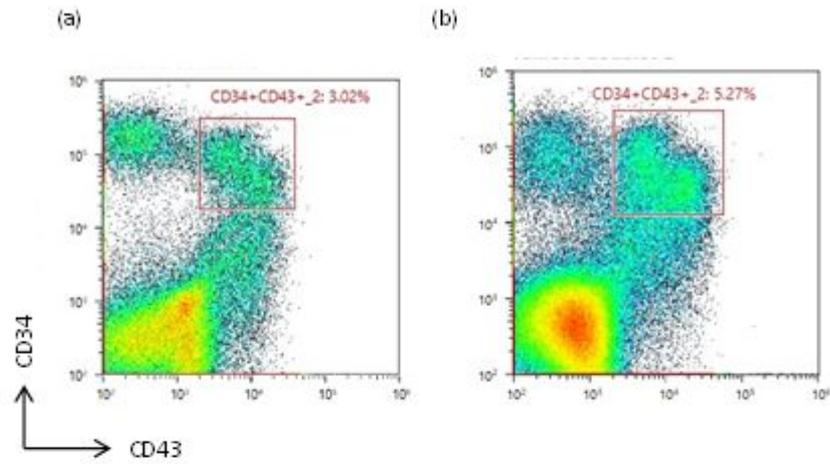


Figure 3 異なるヒトiPS細胞株から血液前駆細胞への分化誘導効率の違い
 (a) 201B7株、(b) NEPB株からそれぞれ血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にセルソーターにてCD34およびCD43の発現について検討した。

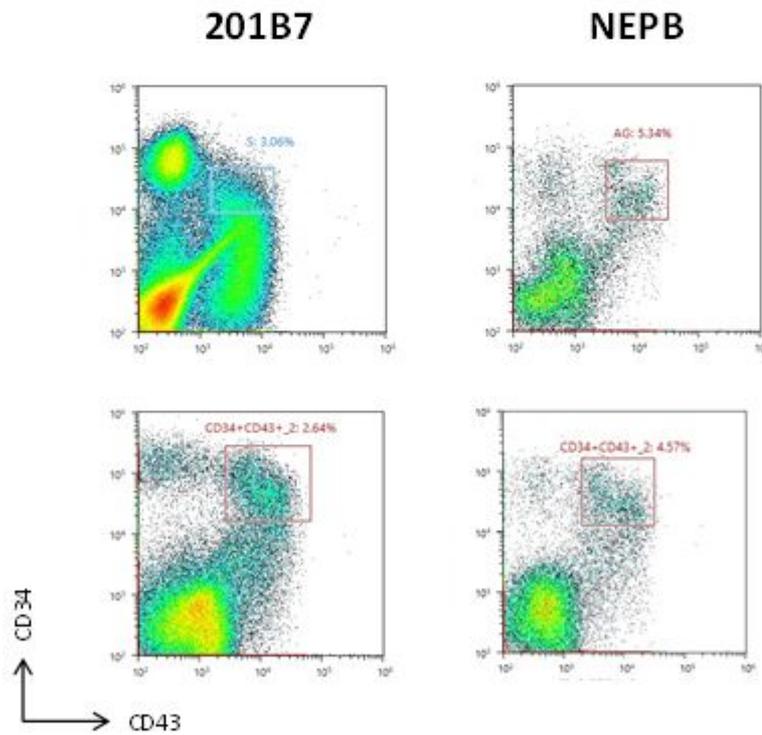


Figure 4 実験者が異なる場合における201B7株およびNEPB株から血液前駆細胞への分化誘導効率の違い
 201B7株およびNEPB株からそれぞれ異なる実験者(2名)が独立して血液前駆細胞への分化誘導を行い、9日目にセルソーターにてCD34およびCD43の発現について検討した。

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

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨

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

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

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

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

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

研究協力者

中津 則之 (独立行政法人 医薬基盤研究所)

五十嵐芳暢 (独立行政法人 医薬基盤研究所)

保が不可欠となる。

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

A. 研究の目的

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

来分化細胞の品質変動に関わる要因を明らかにすることを目的としている。トキシコゲノクスデータベースには、医薬品を中心とした約 170 種の化合物をヒト初代培養肝細胞に曝露した際の遺伝子発現情報が蓄積されている。データベース構築においてはヒト肝細胞を用いているが、曝露した化合物の多くは薬効メカニズムが知られた医薬品であることから、単に肝毒性に関わる遺伝子発現変化だけでなく、薬理作用に起因した変化も捉えられる可能性がある。従って、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)測定サンプル

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

(2)網羅的遺伝子発現測定

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

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

(3)遺伝子発現データの解析

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

(倫理面への配慮)

本年度、特に関連する事項はなかった。

C. 研究結果

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

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

偏りの原因を明らかにして行く予定である。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

administered antigen. *J. Immunol.*

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

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

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

2. 学会発表

【招待講演】

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

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

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

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

【ポスター発表】

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

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

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

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

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

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

H. 知的財産所有権の出願・登

録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 hiPS 由来肝細胞様細胞(3ロット)間での遺伝子発現レベルの相関性

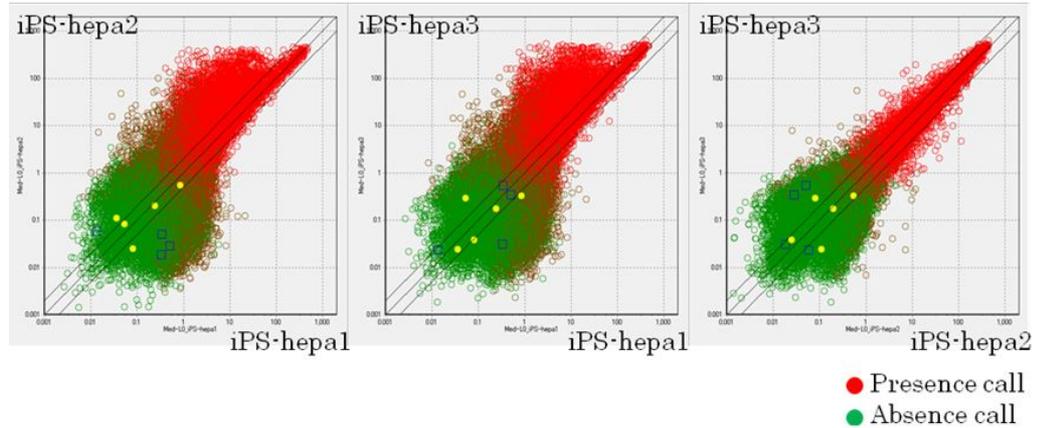
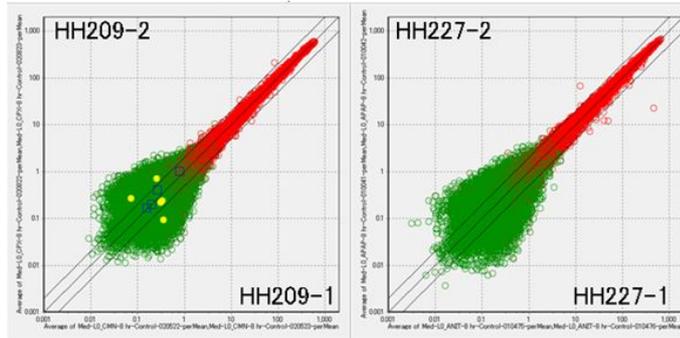


図2 ヒト初代肝細胞におけるロット内及びロット間でのプロットの収束性

1) ロット内でのプロットの収束性(2ロット)



2) ロット間でのプロットの収束性(3ロット)

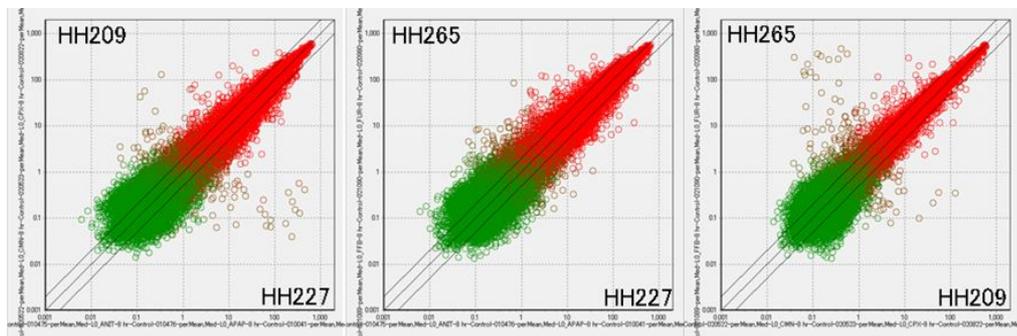
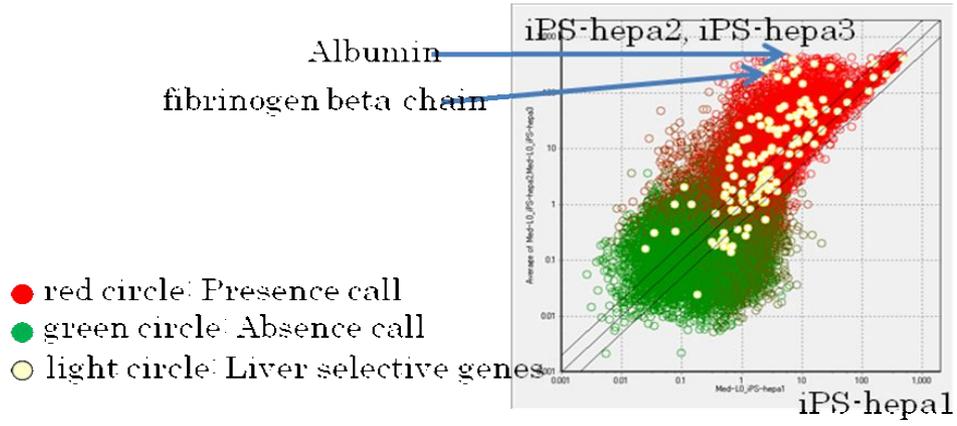


図3 hiPS 由来肝細胞様細胞のスクアタープロットにおける肝臓選択的遺伝子の分布



※ 生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)
(分担) 研究報告書

iPS 細胞等の代謝解析

研究分担者 竹森 洋

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部

代謝疾患関連タンパク探索プロジェクト プロジェクトリーダー

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

ミトコンドリアの膜電位の測定にはJC-1

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

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

(倫理面への配慮)

ヒトiPS細胞の利用は医薬基盤研究所倫理委員会の承認の元で行った。

C. 研究結果

昨年度は、細胞生存を測定するkitを活用して、ATP、細胞質NADH、ミトコンドリアNADHを簡便に測定する系を構築した。また、細胞外酸素消費計及び培地酸性度評価を活用して、ミトコンドリアでのATP産生に伴う酸素消費量と解糖系からのATP産生を予測した。その結果、ヒトiPS細胞は、解糖系を主要なATP産生源として利用していることが示唆された。一方で、継代が重なり、

質が低下していると予想される細胞は、ミトコンドリア利用度が高まってことが予想された。

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

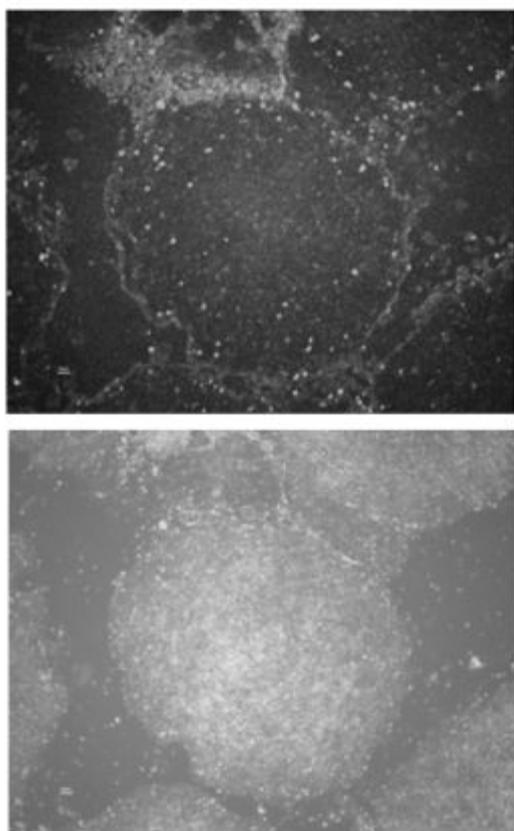


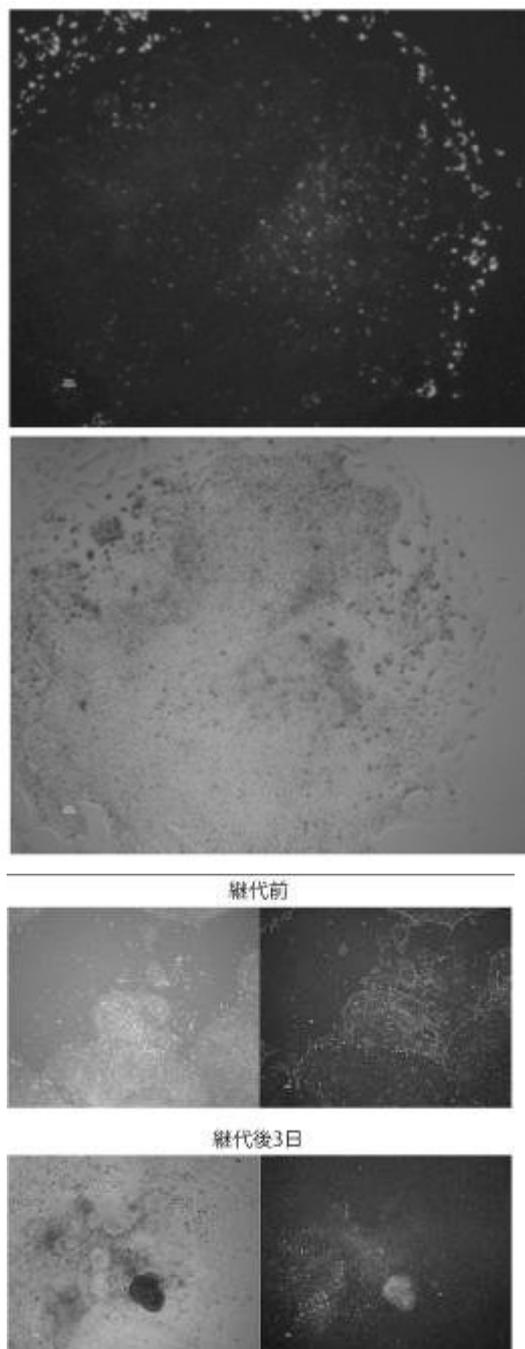
図1 ヒト iPS 細胞の JC-1 染色(上)と、位相差像(下)

が、解糖系が亢進しているためにミトコン

ドリアを利用していない細胞や死んでいる細胞は、JC-1 の細胞質側への拡散で終わり、赤色蛍光を発生しない。

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

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



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

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

図 3 JC-1 強染色の細胞集団の継代

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

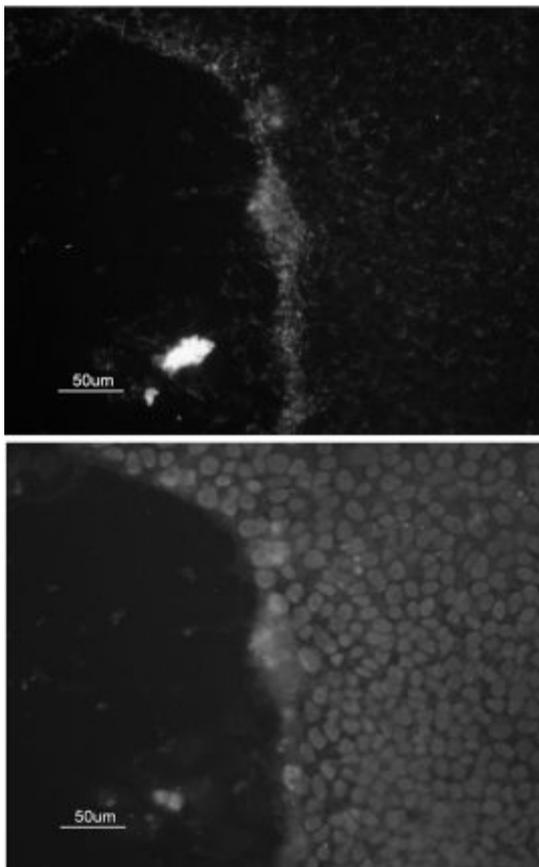


図 4 JC-1 染色(上)と OCT3/4 染色(下)

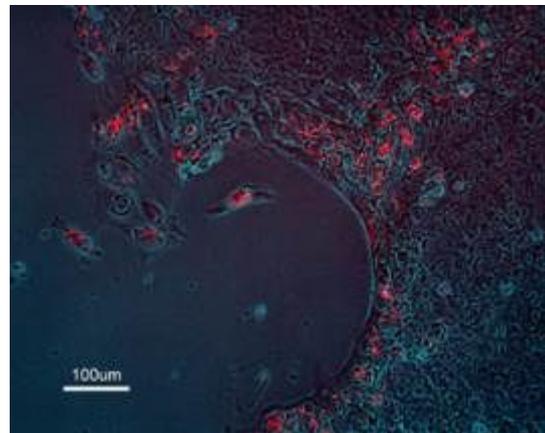


図 5 ヒト iPS 細胞集団における内部での JC-1 強陽性領域

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

D. 考察

本年度は、ヒト iPS 細胞の質を細胞内エネルギー代謝（ミトコンドリア利用度）で比較評価できないか検討を行った。特に、個別の細胞での評価方法を検討し、JC-1 による染色がヒト iPS 細胞の質との相関の一部を反映している可能性が示唆された。ま

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

E. 結論

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

F. 参考文献

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

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

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

PLoS ONE (2014) 9:e95771

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

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

pp114-120

2. 学会発表

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

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

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

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

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

5) 佐々木勉、竹森 洋、渡辺彰弘、由上登志郎、北川一夫、望月秀樹. 脳虚血における CRTC1-PGC-1 α シグナルの動態についての検討

第 51 回日本臨床分子医学会 (東京) 2014 年 4 月 11 日

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

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

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

8. 黒井 梓、伊東祐美、淵野裕之、山原 年、川原信夫、竹森 洋

ワラビ成分 Pterosin B の皮膚炎症疾患への応用

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

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

メラニン産生制御効果のある植物エキスの網羅的解析

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

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

GRID2 はメマンチンの作用機序における新しい調節因子である

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

11. 伊東祐美、佐野坂真人、熊谷彩子、淵野裕之、川原信夫、竹森 洋

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

第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 18 日

G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

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

2) 特願 2014-130876「プ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）

(国内優先権主張)、米国

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)

(分担) 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

研究分担者 櫻井 文教

大阪大学大学院 薬学研究科

分子生物学分野 准教授

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

研究協力者

水口裕之

大阪大学大学院薬学研究科

独立行政法人 医薬基盤研究所

高山和雄

大阪大学大学院薬学研究科

独立行政法人 医薬基盤研究所

A. 研究目的

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

ト iPS 細胞の品質が大きく変動することが深刻な

問題となっている。ヒト iPS 細胞由来製品

を創薬応用するには、再現よく分化誘導できる高品質なヒト iPS 細胞

を培養する技術を開発することが急務である。本課題では、(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プロトコルを収集する。さらに、複数の代表的な肝細胞分化プロトコルを用いて肝細胞を作製し、分化プロトコルの評価を開始した。

B. 研究方法

B.1. ヒト iPS 細胞の培養

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

B.2. ヒト iPS 細胞から内胚葉への分化誘導

肝細胞への分化を開始する前に、ヒト iPS 細胞を dispase で剥離し、Matrigel 上に継代し、

MEF-conditioned medium を用いて 3-4 日間培養した。ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法は図 2 を参照にされたい。

B.3. FACS

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

B.4. アルブミン (ALB) 産生能の評価

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

C. 研究結果

これまでに公表されているヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコルの収集を行った。図 1 に記載する通り、Stephen Duncan 研 (Stem

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

図 1 の 3 つの分化プロトコール
(一部改編)のうちどのプロトコール
が最も再現性良く高機能な肝細胞
を作製できるか調べるために、図
2 に示す 3 プロトコールを用いて
ヒト iPS 細胞から肝細胞を作製し
た。作製したヒト iPS 由来肝細胞の
肝機能を評価するため、ASGR1 陽性
細胞率を FACS により評価するとと
もに、ALB 産生量を ELISA により計
測した。プロトコール 1 を用いて作
製した肝細胞の ASGR1 陽性率は 80%
以上であったが、プロトコール 2 お
よび 3 を用いて作製した肝細胞の
ASGR1 陽性率はいずれも 30%以下で
あった(図 3A)。また、プロトコ
ール 1 を用いて作製した肝細胞の
ALB 産生量は $11 \mu\text{g/ml}/24\text{hr}/\text{mg}$
protein 程度であったが、プロトコ
ール 2 を用いて作製した肝細胞の
ALB 産生量は $7 \mu\text{g/ml}/24\text{hr}/\text{mg}$

protein であった(図 3B)。以上の
ことから、プロトコール 1 を用いる
ことにより、プロトコール 2, 3 よ
りも高い肝機能を持つヒト iPS 由
来肝細胞を作製できることが示唆
された。図 3 の結果は独立した 3 回
の分化誘導結果であることから、プ
ロトコール 1 はプロトコール 2, 3
よりも高い肝機能を有するヒト iPS
由来肝細胞を再現よく作製できる
ことが示唆された。

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagamoto Y., Takayama K.,
Tashiro K., Tateno C.,

- Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. Cell Transplantation, in press.
- 2) Takayama K., Morisaki Y., Kuno S., Nagamoto Y., Harada K., Furukawa N., Ohtaka M., Nishimura K., Imagawa K., Sakurai F., Tachibana M., Sumazaki R., Noguchi E., Nakanishi M., Hirata K., Kawabata K., Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A., 2014; 111:16772-7.
- 3) Kuno S., Sakurai F., Shimizu K., Matsumura N., Kim S., Watanabe H., Tashiro K., Tachibana M., Yokoi T., Mizuguchi H. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector

expressing human CYP3A4. Drug Metab Pharmacokinet. 2014; 29: 296-304.

2. 学会発表

- 1) 長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 細胞由来肝細胞の肝障害マウスへの効率良い移植法の開発、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 2) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下移植と組織化の検討、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 3) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；同一遺伝情報を有するヒト iPS 細胞由来肝細胞とヒト初代培養肝細胞の肝機能の比較解析、第 21 回大会肝細胞研究会、東京、2014 年 6 月
- 4) Takayama K., Morisaki Y., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Comparison of capacity for drug metabolism between genetically matched human hepatocytes and

- iPS-derived hepatocyte-like cells、ISSCR 12th Annual meeting、Vancouver、2014年6月
- 5) Nagamoto Y., Takayama K., Ohashi K., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Human iPSC-derived hepatocyte sheet transplantation enhances the survival rate of acute liver failure mice、ISSCR 12th Annual meeting、Vancouver、2014年6月
 - 6) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒトES/iPS細胞由来肝細胞のマウス腎被膜下への移植法の検討、第64回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014年9月
 - 7) 高山和雄、三村菜摘、萩原康子、立花雅史、櫻井文教、神田勝弘、川端健二、水口裕之；ヒト多能性幹細胞由来肝細胞を用いた次世代型創薬の実現を目指した基盤技術創成、第64回日本薬学会近畿支部総会・大会、京都、2014年10月
 - 8) 今川和生、高山和雄、磯山茂美、野口恵美子、新開真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、須磨崎亮、水口裕之；疾患特異的iPS細胞由来分化誘導肝細胞を用いた進行性家族性胆汁うっ滞症2型の病態再現、第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月
 - 9) 岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；マウス腎被膜下への分化誘導肝細胞の移植法の開発、第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月
 - 10) 塙守史、高山和雄、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒトES/iPS細胞を用いた肝分化誘導系におけるHNF アイソフォームの機能解析、第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月
 - 11) 高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；同一遺伝的背景を持つヒトiPS細胞由来肝細胞と初代培養肝細胞の間における薬物代謝能・薬物応答能の比較解析、第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月
 - 12) Takayama K., Morisaki Y., Ohtaka M., Nishimura K., Nakanishi M., Tachibana M., Sakurai F., Kawabata K., Mizuguchi H. ; Prediction of inter-individual differences in drug metabolism and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocyte-like cells. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (iPS Cells for Regenerative Medicine)、大阪、2015年1月

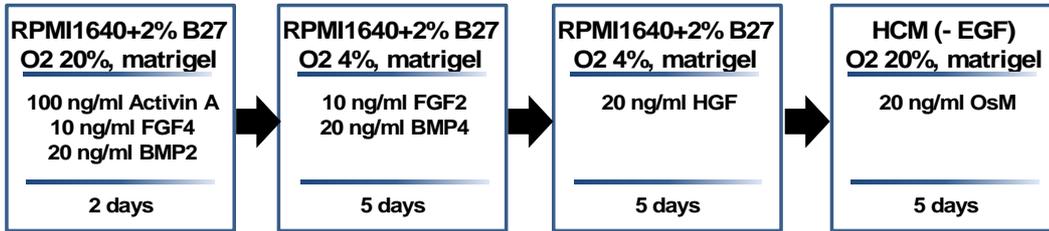
- 13)長基康人、高山和雄、大橋一夫、岡本涼太、櫻井文教、立花雅史、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 細胞由来肝細胞シートを用いた効率良い新規移植法の検討、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
- 14)高山和雄、森崎悠太、大高真奈美、西村健、中西真人、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之；ヒト iPS 由来肝細胞を用いた薬物応答能の個人差の予測 CYP2D6 遺伝子の SNP の相違による個人差の再現、第 14 回日本再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月
- 15)岡本涼太、長基康人、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、末永洋志、川端健二、水口裕之；マ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

細胞移植における最適なヒト ES/iPS 細胞株の探索、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月

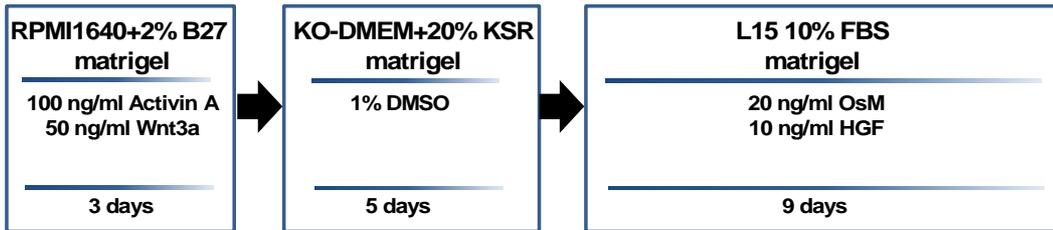
G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し。
2. 実用新案登録
該当無し。
3. その他
該当無し。

Stephen Duncan Lab.



David Hay Lab.



Ludovic Vallier Lab.

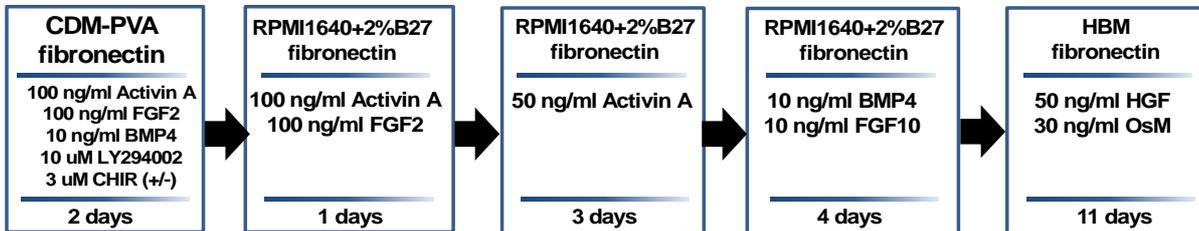
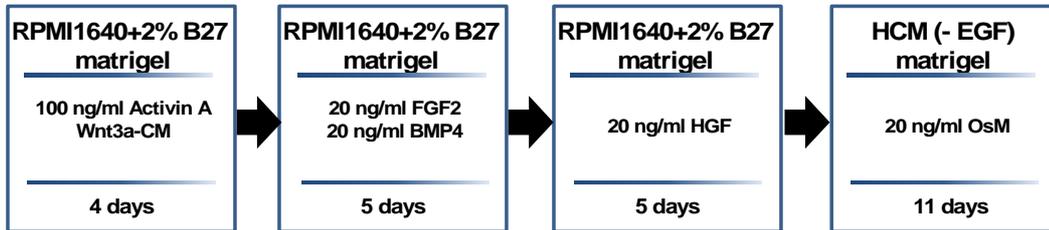
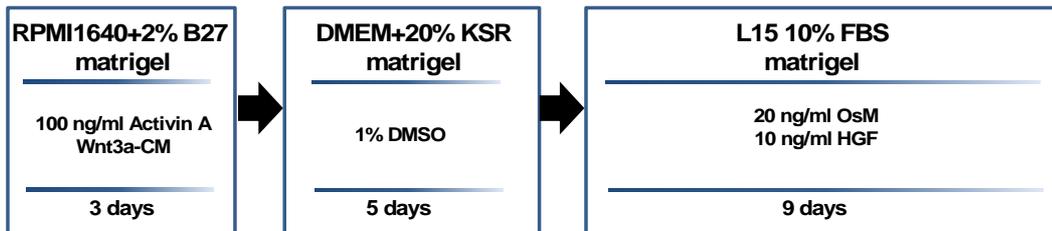


図1 . Stephen Duncan 研、David Hay 研、Ludovic Vallier 研におけるヒト iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコール

Protocol 1



Protocol 2



Protocol 3

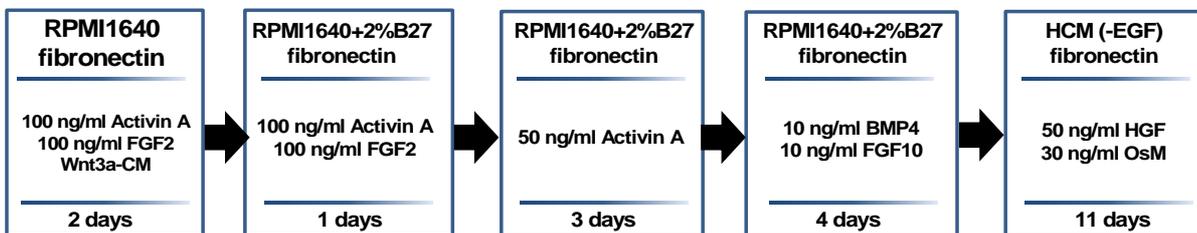


図2 . 本実験にて検討した3分化プロトコールの概略

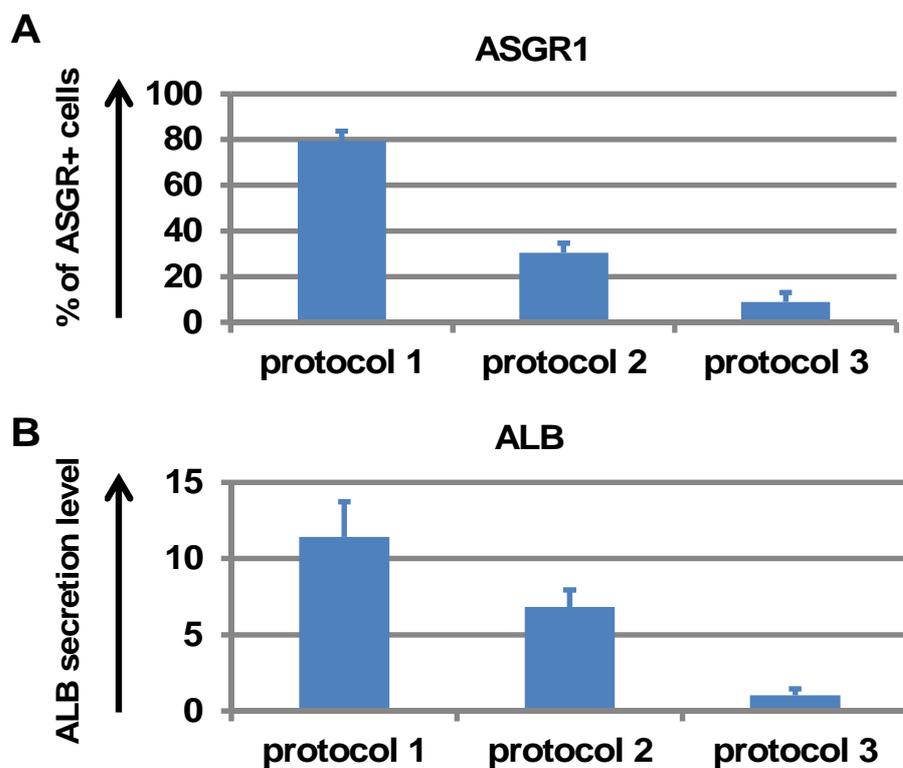


図3．複数の肝細胞への分化プロトコールの比較

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

別添 4

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Andrews P. , et al	Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications	Regen Med	10(2)	1-44	2015
Ozawa M., et al	A simple improvement of the conventional cryopreservation for human ES and iPS cells	Protocol Exchange		DOI: 10.1038/prote x.2014. 012	2014
Ohnuma K. , et al	Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations	SCIENTIFIC REPORTS	4	DOI: 10.1038/srep0 4646	2014
Watanabe- Susaki K., et al.	Biosynthesis of ribosomal RNA in nucleoli regulates pluripotency and differentiation ability of pluripotent stem cells	Stem Cells	32(1 2)	3099-3111	2014
Yamada R ,et al.	Control of adhesion of human induced pluripotent stem cells to plasma-patterned	Journal of Bioscience and Bioengineering.	118	315-322	2014

	polydimethylsiloxane coated with vitronectin and -globulin.				
Yamada R., et al.	Plasma-patterned polydimethylsiloxane surface with single-step coating of a mixture of vitronectin and albumin enables the formation of small discs and spheroids of human iPS.	Plasma Medicine	4(1-4)	165-76	2014
Takayama K., et al	Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	47	16772-16777	2014
Tashiro K., et al	Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow	Stem Cells Dev	18	2202-10	2014
Igarashi, Y., et al	Open TG-GATEs: a large-scale toxicogenomics database.	Nucleic Acids Res	43(Database issue)	921-927	2015
Kumagai A., et al	Altered Actions of Memantine and NMDA-Induced Currents in a New Grid2-Deleted Mouse Line.	Genes	5	1095-1114	2014
Sanosaka M., et al	SIK3 deficiency exacerbates LPS-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of proinflammatory molecules in mice	Immunology		In press	2015
Kuno S., et al	Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector expressing human CYP3A4.	Drug Metab Pharmacokin	29	296-304	2014