

# NEXT

ThermoFisher  
SCIENTIFIC

No. **65**

2023 / March

Science, Products and Information

サーモフィッシャーサイエンティフィック  
ライフサイエンス情報誌

NEXT Interview

## iPS細胞の特性を活かした 免疫再生医療の実現に向けて

多様なアプローチを支えるiPS細胞共通プラットフォームの構築へ

金子 新 氏(京都大学iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門教授)

- P. 04 PMDA承認 再生医療等製品材料適格性確認書
- P. 05 CTS Rotea Counterflow Centrifugation System
- P. 06 Genexus Purification システム | Genexus Integrated システム
- P. 07 SeqStudio Flex ジェネティックアナライザ
- P. 09 TrueMark Infectious Disease Research Panel
- P. 11 TaqMan Gene Expression アッセイ
- P. 13 Slide-A-Lyzer G3 Dialysis Cassettes
- P. 15 CTS DynaCollect Magnetic Separation System  
Herasafe 2030i クラスIIタイプA2安全キャビネット
- P. 16 Neon NxT Electroporation System





## iPS細胞の特性を活かした 免疫再生医療の実現に向けて

多様なアプローチを支えるiPS細胞共通プラットフォームの構築へ

金子 新氏

京都大学iPS細胞研究所増殖分化機構研究部門教授

### 電撃的なiPS細胞との出会い

私はもともと、基礎研究も行える臨床医になろうと考えていました。医学部を卒業した1990年代後半は、ちょうど世界的に遺伝子治療が現実味を帯びてきた頃。遺伝子導入によって細胞を思い通りに制御し、病気を治療できるという、ある意味"神の領域"の技術が可能になると知り、造血幹細胞とT細胞の遺伝子治療研究の道に進みました。

所属した医局では、白血病に対する遺伝子

京都大学iPS細胞研究所(CiRA)は現在、移植の際に免疫拒絶反応が起きにくい組み合わせ(ホモ接合体)を持つiPS細胞を保管する「再生医療用iPS細胞ストックプロジェクト」を推進しています。CiRA教授である金子新氏らはこのプロジェクトをさらに飛躍させるため、iPS細胞にゲノム編集を施すことで、移植先の患者のHLA型に関わらず免疫拒絶がほぼ起きないT細胞等の作成に取り組んでいます。一方、がんを対象とした免疫再生医療法の開発では、自家細胞でも他家細胞でもiPS細胞の段階でゲノム編集を施すことで、標的細胞への攻撃性や生存活性を高めたT細胞等を作成し、検証を進めています。さらにiPS細胞から多様な免疫細胞への分化誘導法を開発し、目的に応じて免疫細胞を使い分ける可能性を拡げています。増殖性が高く、遺伝子改変に適したiPS細胞を介する免疫再生医療の推進とiPS細胞共通プラットフォームの構築を金子氏に伺いました。

治療の臨床研究を立ち上げ、その中で、T細胞の機能を落とさずに体外で増殖させ、遺伝子導入を行うための手法の改善に取り組みました。このような遺伝子治療が困難な理由の一つは、T細胞が増殖とともに疲弊していくことです。遺伝子治療を行うためには患者さんからT細胞を取り出し、遺伝子導入したり外部刺激を加えたりしながら活性化させますが、そのようなプロセスを経れば経るほどT細胞は疲弊し、弱ってしまいます。

そんな時に出会ったのが、iPS細胞でした。T細胞を初期化し、iPS細胞(T-iPS細胞)にすると、疲弊状態はリセットされ、再び元気な細胞に戻ります。一方で、標的抗原を認識するためのT細胞受容体(TCR)の配列は、T-iPS細胞となっても保存されたままです。さらにiPS細胞は、T細胞への再分化前に遺伝子改変が自由に行えるというメリットがあります。「この細胞こそが遺伝子治療の正解じゃないか」と思い至り、抗原特異的ヒトT-iPS細胞の研究に取り組み始めたのです。

## 免疫再生治療を 実現するための3つの軸

現在、研究室ではT-iPS細胞と共に、HLAホモストックのiPS細胞にTCRやキメラ抗原受容体(CAR)を遺伝子導入したiPS細胞(TCR-iPS細胞、CAR-iPS細胞)をソースに幅広い疾患への応用を目指し、以下の3つの軸で研究を進めています。

- 臨床現場で使用可能な細胞製剤の開発
- 免疫再生治療の効果を上げる
- 他家iPS細胞に対する拒絶反応の抑制

まず1つ目の軸では、フィーダー細胞やウシ血清といった動物由来成分を含まずに、iPS細胞由来のT細胞を大量に分化・培養できる系を確立しました。2つ目の軸では、以下の細胞と患者を対象に固形がんを含む3つのパイプラインを番号順に進めています。

- ① iCAR-ILC/NK (CAR-iPS細胞から分化させたNK細胞)：卵巣がん患者対象
- ② iCAR-T (CAR-iPS細胞から分化させたT細胞)：固形がん(がん種非公開)患者対象
- ③ TCR-iPS細胞の再分化T細胞：GPC3陽性固形がん患者対象

①については、2021年9月より進行再発卵巣がんがんで腹膜播種を有する患者を対象とし、腹腔内に直接iCAR-ILC/NK細胞を投与する臨床試験を進めています。なぜT細胞ではなく

まずNK細胞なのか。NK細胞の良いところは副作用が少ない点で、T細胞のように強い移植片対宿主病(GVHD)を起こさないので安全性が比較的高く、また、寿命が短いため、もし副作用が現れてもその持続期間は短いと考えられます。さらに、腹腔投与されたNK細胞は全身に拡がらず、副作用が局所的に抑えられるという利点もあります。NK細胞が持つこれらの安全上の利点を鑑み、iPS細胞を用いた臨床試験の第一歩としてT細胞ではなくNK細胞を用いました。臨床試験は今のところ大きな副作用もなく順調に進んでいます。

②と③に関しては、iPS細胞から分化させたT細胞を用いて、②は国内の製薬企業と、③はベンチャー企業と共同研究を行い、臨床試験に向けて準備を進めています。実際に細胞製剤として完成させて広げるためには、民間企業も含めた様々なエキスパートの協力が必要であり、そのようなネットワーク作りにも努めています。

## ステルスファイターT細胞の開発

3つめの軸についても研究を進めています。細胞移植には「自家移植」と「他家移植」があり、前者のメリットは拒絶反応が起きないこと、後者のメリットはあらかじめ免疫細胞を用意できるためコストを抑え、スピーディーに治療に繋げられることです。最終的には両方の手法が共に世に出てくると考えています。私たちの研究室でも患者自身のT細胞を用いる自家移植の研究と、他家移植のためのiPS細胞共通プラットフォームの構築や独自の研究を進めています。

これまでCiRAが進めてきた「再生医療用iPS細胞ストックプロジェクト」は非常に有用で、現在、約40%の日本人をカバーできる段階にまで達しました。一方で、まだ60%はカバーできていないことから、新たな道も模索しています。その一つが、「ステルスファイターT細胞」の開発であり、移植先の患者さんの免疫システムからの攻撃を回避(ステルス性)しつつ、がん細胞を攻撃(ファイター性)することを目指しました。

作製法は、iPS細胞の段階でゲノム編集によりHLAクラス1分子およびクラス2分子を発現しないように処理し、さらにNK細胞の活性に関わるリガンド部分を2カ所改変します。この操作により、レシピエントのキラーT細胞からの免疫反応を回避した上で、HLA分子がないことで逆に活性化されるNK細胞の免疫反応からも回避できるのです。さらにCAR遺伝子などの病態を改善する遺伝子を組み込

んでT細胞に分化させます。動物実験では、この細胞が免疫拒絶を起こさず、腫瘍細胞を攻撃することを確認しています。

## 未来の免疫再生医療へ

10年から20年後にはCAR-T療法が一般化し、自家移植だけでなく他家のiPS細胞由来のCAR-T療法も実現していると思っています。私自身は、遺伝子改変した異なるキャラクターの免疫細胞を再生して、疾患ごとに使い分ける治療法を考えたりしています。CD8キラーT細胞やNK細胞だけでなく、マクロファージやCD4ヘルパーT細胞や制御性T細胞なども活用できればと思っています。それとは逆に1種類の細胞で、多くの疾患や患者さんに対応できるスーパー細胞の創出を目指す方向性もあるかもしれません。免疫再生医療は始まったばかりなので、多様なアプローチを試しながら、それを支えるiPS細胞共通プラットフォームを充実させたいと思っています。

## 若い人へのメッセージ

新たな領域の研究に移る時も、それまでの知識や身につけたスキルが何かに活かさないか、と考えを巡らせてほしいと思います。私自身は、造血幹細胞から免疫細胞、iPS細胞、そしてそれらを貫く分化誘導方法の探索…と様々な研究を行ってきました。それぞれ単体では多くの研究室で扱われているテーマかもしれませんが、それらを組み合わせると唯一無二の研究につながっていく可能性があります。積み重ねてきた経験や知識を、次の分野に持ち込むことで新しい風を巻き起こし、面白い研究につなげていってほしいと思います。



金子 新(かねこ しん) 1995年筑波大学医学専門学群卒業、2002年同大学院医学研究科博士課程修了後、筑波大学講師、サンラファエル科学研究所(ミラノ)客員研究員、東京大学助教などを経て20年より京都大学iPS細胞研究所教授。また、22年より同研究所副所長を務める。専門は、iPS細胞の特性を生かした免疫再生治療。

# 細胞治療・遺伝子治療に最適な材料選択をサポート

## POINT

高品質な細胞培養製品を60年以上にわたって提供するGibco™ 製品では、細胞治療・遺伝子治療の開発を強力にサポートするため、PMDA (医薬品医療機器総合機構) が審査・承認する "生物由来原料基準 (生原基)" を満たす製品について、「再生医療等製品材料適格性確認書」の取得を積極的に進めています。すでに2023年3月までに取得済みの20製品に加え、新しく2製品を追加しました。

## CTS Vitronectin

### 多能性幹細胞用マトリックス試薬

Gibco™ CTS™ Vitronectin (VTN-N) Recombinant Human Protein, truncatedは、ヒト多能性幹細胞 (PSC) のフィーダーフリー培養用に適した細胞外マトリックスです。動物由来成分不含のため、PSC培養におけるばらつきやコンタミネーションリスクを低減します。



## CTS NK-Xpander Medium

### NK細胞療法の研究開発に適したNK細胞の拡大培養培地

Gibco™ CTS™ NK-Xpander™ Mediumは、他家NK細胞療法の研究者のニーズに応えるために開発されました。フィーダー細胞の使用の有無にかかわらず、機能的なヒトナチュラルキラー (NK) 細胞を高収量で増殖させることができるように設計されています。

## ▶ Gibco CTS製品とは？

幹細胞研究、組織工学および免疫療法研究を臨床研究に移行する際、押さえておくべき重要なことは、製品の品質と適切なドキュメンテーションです。Gibco™ CTS™ 製品は、品質マネジメントシステム規格ISO 13485認証を取得している施設で製造されており、製造方法および工程管理は米国のcGMPに準拠しています。また、分析証明書 (Certificates of Analysis) や原産地証明書 (Certificates of Origin) などのトレーサビリティ文書が用意されています。Gibco CTS 製品は基礎から臨床研究まで、お客さまをサポートします。



### cGMP製造

- 21 CFR Part 820 / USP <1043> / Ph Eur 5.2.12に準拠
- 製造サイトはFDA登録済みで ISO 13485を取得。監査を定期的実施



### 分析試験各種文書

- トレーサビリティ文書の管理 (ドラッグマスターファイル、原産地証明書、レギュラトリーサポートファイル)
- 徹底した分析試験 (エンドキシン試験、マイコプラズマ試験、無菌試験など)



### 豊富な実績

- バイオ医薬の原材料として30年以上の実績と経験

「再生医療等製品材料適格性確認書」に関するお問い合わせ窓口はこちらから → [thermofisher.com/jp-sbi-cert](https://thermofisher.com/jp-sbi-cert)  
ご依頼やご相談を受け付けています。2023年3月までに取得済み製品一覧 (20品目) も掲載しています。

製品名	サイズ	製品番号	価格*
CTS Vitronectin (VTN-N) Recombinant Human Protein, truncated	1 mL	CTS279S3	¥34,200
CTS NK-Xpander Medium	500 mL	A5019001	¥34,400
	5 L	A5019002	¥411,700

\*2023年4月からの希望小売価格です。

川堀真人 氏(北海道大学大学院医学研究院 神経病態分野脳神経外科教室 助教)

## 骨髄由来間葉系幹細胞の自家移植による脳梗塞の治療法開発に向けて 治療法の一般化に向けて閉鎖系細胞処理システムCTS Roteaを検討



脳卒中の大部分を占める脳梗塞は、日本全国で1年間に約30万人が新たに発症し、その多くが死亡もしくは後遺症を残す重篤な疾患です。高齢化が進んだ2025年には520万人の後遺症による要介護者が推定され、それに伴う社会的負担も増大すると予想されることから、より有効な治療法が求められています。「私たちは脳梗塞の周辺部に、患者さん自身から採取した骨髄幹細胞を直接投与して症状を改善させる治療法の確立を目指しています。現在、細胞移植治療は自家移植よりも他家移植法の開発が盛んですが、他家移植に伴う免疫拒絶の問題は完全にはクリアされていません。一方自家移植では培養にかかる労力やコストが問題となります。私たちは安全性と有効性に優れ、コストを抑えた新たな自家移植の治療法を開発中です」と北海道大学の川堀真人氏は語ります。

### 自家移植の安全性を確認

「2017年から3年ほどかけて、私たちのグループは脳梗塞急性期患者に対する自家骨髄幹細胞の直接投与と移植による新たな治療法を医師主導治験として実施しました。その結果、治験参加者7名で安全性を確認し、症状改善の可能性を見いだしました。この治験では、脳梗塞急性期の患者さんから採取した骨髄液を細胞培養室(Cell processing center: CPC)で4週間ほど培養増殖して間葉系幹細胞を取り出し、脳

内に直接投与し、その後1年にわたって安全性および有効性を確認しました。またこの治験に際して、安全な細胞培養法として動物由来製剤を使用しないヒト血小板溶解物を用いた細胞培養法や脳ナビゲーションによる安全な移植法、移植細胞を体外から確認できるSPIO標識法など新しい方法を開発しました。そして移植した細胞が脳内を移動する様子をMRIで確認しています」と続けます。

### 閉鎖系システムで自家移植の コストダウンへ

「他家移植では多数の患者さんに同じ細胞を使用するため、まとめて製造することでコストを抑えられますが、自家移植では患者さんごとにCPCのスペースを確保して細胞を培養するので設備費や人件費がかかります。自家移植用の細胞調製を一般化するためには、安全性と有効性を確保したうえでコストを抑える閉鎖系かつ自動化の細胞培養法の開発が必須でした。そこで2019年から企業と連携し、閉鎖系の自動細胞培養装置で培養法の最適化に努め、その結果、数十mLの骨髄液から3週間ほどで間葉系幹細胞を選択的に培養できるようになりました。次に課題となるのは、培養後に得られる数百mLの細胞懸濁液を洗浄濃縮して輸送に適した溶液に替えるかです」と川堀氏。「現在、閉鎖系で自動細胞処理が可能なGibco™ CTS™



Rotea™ Systemを検証中です。このシステムを使えば、使用中の細胞培養装置と閉鎖系で連結でき、目的の間葉系幹細胞を洗浄して数十mLまで濃縮し、輸送用溶液へ置換する過程を問題なく自動化できることを確認しています。今後もさらに検証を進める予定です」と続けます。

### 治療法の一般化を目指して

「医師として脳梗塞の患者さんを救うために、研究レベルではなく、実現性が高い治療法をいち早く一般化することを強く望んでいます。そのために私たちは大学発ベンチャーを立ち上げ、次の治験では社会的ニーズが高い慢性期の脳梗塞の患者さんを対象にする予定です。私たちがこれまで開発してきた、新規性の高い細胞培養・輸送・投与方法を採用して有効性と安全性を高めるとともに、これらをトータルパッケージとした知財戦略をとることで、一人でも多くの患者さんに新しい治療法が迅速に届くことを目指しています」と川堀氏は最後に語ります。

## CTS Rotea Counterflow Centrifugation System 柔軟性に富んだ閉鎖系自動細胞処理システム

Gibco™ CTS™ Rotea™ Counterflow Centrifugation System(CTS Rotea System)は、汚染の心配のない閉鎖系の自動細胞処理システムであり、細胞治療品の開発および製造システムに柔軟に対応します。実績あるカウンターフロー・遠心分離法により、CAR-T細胞療法や幹細胞療法、PBMC分離などの幅広い細胞処理アプリケーションに対応します。

- 細胞を洗浄・濃縮後、わずか5 mLでアウトプット
- 目的や用途に応じた広範なプロトコルをフレキシブルに作成・最適化可能なソフトウェア
- 穏やかな処理プロセスにより、高い細胞回収率と細胞生存率を実現
- 省スペース設計の機器本体と簡単に取り付け可能なシングルユースキット使用



製品名	サイズ	価格
CTS Rotea Counterflow Centrifugation System(2年保証/2年目点検付)	1 式	A47679-S2 お問い合わせ
CTS Rotea Counterflow Centrifugation System(2年保証/設置時IQOQ, AB Complete相当保証付)	1 式	A47695-S2-V お問い合わせ
CTS Rotea Single-Use Kit	10 パック	A49585 お問い合わせ

CTS製品は、研究用または細胞、遺伝子あるいは組織を使用した製品の製造に使用できます。注：診断目的の使用、ヒトおよび動物への直接的な使用はできません。

西尾美帆 氏(松阪市民病院中央検査室臨床検査技師) 宇城研悟 氏(同院医療技術部副部長/中央検査室技師長)

## 次世代シーケンサを新型コロナウイルスのゲノム解析やがんゲノム解析に活用 使いやすい統合型 Genexus システムで臨床応用への可能性を広げる



「昨年の1年間で松阪市内の新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に対するPCR検査を約15,000検体担当し、リアルタイムPCRシステムの解析により、検体を受け取った日のうちに結果を戻しています。また院内クラスターが発生した際には、陽性確認後の検体を呼吸器センターの医師と選別し、Ion Torrent™ Genexus™ Integrated システムで全ゲノム解析を行い、ウイルス変異を詳細に調べること、感染経路の推定や院内予防に役立てました」と松阪市民病院の西尾美帆氏と宇城研悟氏は語ります。「中央検査室では3年ほど前から、これからの臨床検査には遺伝子解析技術が欠かせないと判断から、遺伝子解析関連装置の設備を充実させてきました。最初にデジタルPCRを導入し、次にリアルタイムPCR、さらに昨年は次世代シーケンサ(NGS)も導入し、徐々に成果も出てきました」と宇城氏は語ります。

### 5年後を見据えて遺伝子解析技術を導入

「2019年に導入したデジタルPCRシステムは、肺がんのドライバー遺伝子である



左から宇城氏、西尾氏、中村早希氏(臨床検査技師)

EGFRの特定変異を精度よく検出できることを確認しました。また肺MAC症という肺の慢性感染症の原因菌を遺伝子解析で特定できるかどうかも試しました。通常、培養して菌を特定するには6-8週間ほどかかりますが、デジタルPCRで解析すれば2日で特定でき、さらには簡便に定量できました。この結果は呼吸器センターの医師たちと共にいくつかの学会や論文で発表しています」と西尾氏と宇城氏。「さらに2020年からは、松阪市でもSARS-CoV-2の感染が広がり、国からの補助を得て医療機器のリアルタイムPCR装置を導入し、流行時は1日200検体ほど検査してきました。臨床検査の現場で遺伝子検査の有用性を深く実感しました」と話します。

### ゼロから遺伝子解析に取り組む

「中央検査室に遺伝子解析装置を導入するにあたり、臨床検査技師2名に担当してもらうことにしました。ゼロからのスタートにはなりませんが、遺伝子検査に馴染みのないスタッフをあえて人選することで、固定概念にとらわれず、新しい技術や知識を偏りなく学んでほしいと思いました」と技師長の宇城氏。その時、担当になった西尾氏は「全く遺伝子解析の経験はありませんでしたが、デジタルPCRからリアルタイムPCR、そしてNGSと段階を踏むことで、無理なく装置を扱えるようになりました。当初、院内の医師たちからはNGSは取り扱いが難しく規模の小さな市民病院での導入は大変だと言われていました。しかしGenexusシステムは操作が簡便化されており、技術的な疑問点はサーモフィッ

シャーのテクニカルスタッフに問い合わせることで解決できています。各機器や技術ごとに専門のスタッフがいるので分かりやすく説明してもらって助かります。現在、NGSで検出された変異が信頼できるのか、データ解析や解釈について実データと照らし合わせつつ知識を深めています」と話します。西尾氏は、院内クラスターにおけるSARS-CoV-2の全ゲノム解析に関する研究を学会で発表予定です。

### 今後の展望について

「現在、GenexusシステムはSARS-CoV-2解析だけでなく、呼吸器センターの医師たちが進めている複数の肺がんゲノム解析に関する研究プロジェクトで活用しています。血漿や気管洗浄液、胸水などの液性検体の解析には主に50遺伝子を解析可能なOncomine™ Precision Assay GXを使用し、FFPE検体の解析には161遺伝子を解析可能なOncomine™ Comprehensive Assay v3 GXを使用しています。液性検体で肺がん手術の術前・術後・予後を時系列で解析し、病気の進行度を遺伝子からモニターできれば、患者さんの負担も少なく今後の医療にも貢献できると思っています。保険収載された遺伝子に限らず、幅広く遺伝子変異を確認する研究をサポートしていく予定です」と西尾氏。「すでにNGSを臨床の現場で役立てている全国の大学病院や県立病院等の技術者の方々とコミュニケーションをとりながら、さらに遺伝子解析の精度を高め、応用範囲を広げていきたいと思っています」と宇城氏は最後に語ります。

## Genexus Purification システム | Genexus Integrated システム シンプル操作で、これまでにない次世代シーケンス体験を

Ion Torrent™ Genexus™ Purification システムと Genexus Integrated システムからなる統合型次世代シーケンスシステムは、検体からレポートまでのワークフローを自動化し、2回のタッチポイントだけで1日で結果を提供します。一つのソフトウェアシステムで、核酸抽出、精製、ライブラリ調製、シーケンスおよび解析結果レポートまでを柔軟に組み合わせて自動化します。



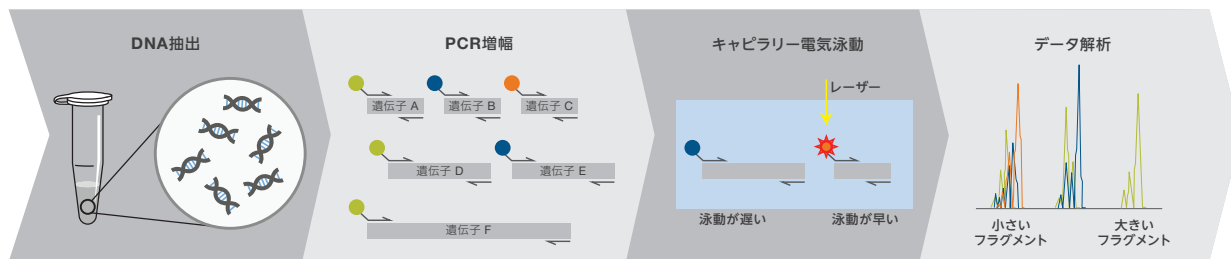
製品名	サイズ	製品番号	価格
Ion Genexus Purification システム(2年保証)	1 式	Ion PS-S2	お問い合わせ
Ion Genexus Integrated シーケンサシステム(2年保証)	1 式	Ion G s-S2	お問い合わせ

# キャピラリー電気泳動によるフラグメント解析で、DNA解析のさらなる向上へ

DNAフラグメント解析は、細胞株認証から異数体検出まで多岐にわたる応用に使えます。シーケンス解析がフラグメントや遺伝子断片における特定の塩基配列の決定に対し、フラグメント解析は、特定のターゲットDNA用に設計されたプライマーでPCRを実施し、得られた蛍光標識DNAフラグメントのサイズ決定や、相対的定量、およびジェノタイピングで実施します。

## ■ フラグメント解析ワークフロー

ターゲット領域を蛍光標識したプライマーでPCR増幅後、蛍光標識されたDNAフラグメントをキャピラリー電気泳動(CE)で分離して、サイズスタンダードとの比較からサイズを決定します。



## ■ フラグメント解析の応用例

フラグメント解析は、処理能力が高く、コスト効率に優れた方法として、幅広く活用されています。

各応用例の詳細はリンク先からご確認ください。

### 細胞株認証

多くの学会誌や資金提供機関において、使用した細胞株の真正性確認が求められています。ショートタンDEMリピート (STR) に対するフラグメント解析はシンプル、低コストで、細胞株の遺伝的「フィンガープリント」を提供します。  
thermofisher.com/cla

### マイクロサテライトマーカー解析

2~7塩基の反復塩基配列からなるマイクロサテライトマーカーは、メンデル性遺伝のDNA多型領域であり、反復数が異なる特定領域は、遺伝病や腫瘍学研究におけるマイクロサテライト不安定性 (MSI) などのアプリケーションに使用されます。  
thermofisher.com/microsatellite

### ゲノム編集

CRISPR-Cas9 システムは、広く活用されていますが、修復プロセスの効率や精度は完全ではありません。フラグメント解析は、形質転換した初代培養物の評価や、編集効率の判定に使用できます。  
thermofisher.com/genomeeditconfirmce

### リピート伸長変異

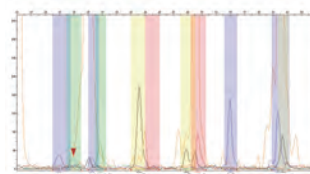
多くのリピート伸長変異領域は、GC含有量が高く増幅が困難です。ショートタンDEMリピート (STR) は、広範囲のゲノムDNAに存在し、30を超える遺伝性疾患研究に役立ち、フラグメント解析は選択肢の一つです。  
thermofisher.com/seqstudioapplications

### QF-PCR

相対蛍光定量PCR、あるいは定量蛍光PCR (QF-PCR) は、ピーク高やピーク面積をサンプル間で比較する方法です。ヘテロ接合性消失 (LOH) の評価、異数体アッセイ、大規模な染色体欠失の検出などをフラグメント解析で行えます。  
thermofisher.com/qfpcr

### SNP ジェノタイピング

一塩基多型 (SNP) ジェノタイピングは、遺伝的形質や疾患感受性や薬物耐性の評価に用いられます。Applied Biosystems™ SNaPshot™ Multiplex Kit で1塩基伸長反応を行えば、1チューブ、1キャピラリーで、最大10プライマーによるマルチプレックス反応で解析できます。  
thermofisher.com/snp



### MLPA

MLPA™ アッセイは、MRC Hollandが開発し商品化したフラグメント解析法であり、隣接する関心領域にハイブリダイズされるプローブペアを最大50まで同時解析できます。重複と欠失の探索方法として処理能力とコスト効率に優れています。  
thermofisher.com/seqstudioapplications

## SeqStudio Flex ジェネティックアナライザ

# 最大4プレートをいつでもフレキシブルにランセット



Applied Biosystems™ SeqStudio™ Flex ジェネティックアナライザは、8、もしくは24サンプルを同時解析できる、ミドルスループレットのキャピラリーシーケンサです。シーケンシングにもフラグメント解析にも信頼性の高い結果を提供します。

## 薬理ゲノミクス関連セミナー報告

薬の効きやすさや副作用を予測する、薬理ゲノミクス(Pharmacogenomics:PGx)バイオマーカーの活用に関するセミナーを報告します。サーモフィッシャーサイエンティフィックではPGxソリューションとして、多民族由来のPGx関連SNPを幅広く網羅し、医薬品の吸収・分布・代謝・排泄(ADME)に関連する1,191遺伝子、4,627個マーカーを搭載したApplied Biosystems™ PharmacoScan™ マイクロアレイを含むトータルソリューションを提供しています。また日本人集団に特化したPGxバイオマーカーを含むゲノムワイドな研究をサポートするApplied Biosystems™ ジャポニカアレイ® NEO\*を提供しています。目的に合わせてご利用ください。\*ジャポニカアレイは国立大学法人東北大学の登録商標です。



第96回日本薬理学会年会 / 第43回日本臨床薬理学会学術総会ランチョンセミナーより(2022年12月)

### 個別化薬物療法を目指したファーマコゲノミクス研究:ジェノタイプング法の選択

平塚真弘 氏

(東北大学大学院薬学研究所准教授)



医薬品の効果や副作用には遺伝的な個人差があり、患者個々への最適な薬物療法の実施に際しては、予測性の高いファーマコゲノミクス(PGx)マーカーの創出が広く求められています。特に薬物代謝酵素の遺伝子多型による酵素活性が消失・低下し、薬効や副作用発現が大きく変化する症例が多数報告されています。ただしシトクロムP450のような薬物代謝酵素は、塩基配列の相同性が高い分子種やコピー数バリエーションが多数存在するため、解析目的に合わせたジェノタイプング法を選択する必要があります。私たちはこれまで多様なジェノタイプング法を駆使してPGx研究を進めてきました。例えばTaqMan法を使って結核治療薬であるイソニアジドの副作用に影響するN-アセチル化転移酵素2(N-acetyltransferases 2, NAT2)の多型を簡便に検出したり、核酸クロマトストリップ法でアミノグリコシド系抗菌薬の副作用である難聴に関与するミトコンドリアゲノムの多型を高感度に検出する方法を開発しました。最近では、薬物動態が不明

だった治験薬(化合物X)をPGxに特化したマイクロアレイプラットフォームであるApplied biosystems™ DMET Plus\*を利用することで、化合物Xのトランスポーター候補を見出し、今後検体数を増やして検証を進めていく予定です。また東北大学病院ではクリニカルバイオバンクを構築し、抗がん剤の効果や副作用に関するPGxマーカー探索をジャポニカアレイNEO解析により進めています。例えば子宮がんや卵巣がんの抗がん剤であるパクリタキセルや大腸がんの抗がん剤であるフルオロウラシルについて解析を進め、フルオロウラシルに関しては代謝ステップの1つに関わる酵素遺伝子の変異から重篤な副作用が生じる例を確認しました。わずか0.03%というレアバリエーションですが、酵素活性が完全に消失する変異であり、今後は重要なレアバリエーションを含めて解析できるマイクロアレイプラットフォームの重要性が増すと考えています。

\*現在は、PGx用にバージョンアップしたApplied Biosystems™ PharmacoScan™ マイクロアレイを提供中です。

日本人類遺伝学会第67回大会共催セミナーより(2022年12月)

### 急増する炎症性腸疾患における臨床的課題を遺伝子解析からアプローチする

角田洋一 氏

(東北大学病院・消化器内科・助教)



クローン病(CD)・潰瘍性大腸炎(UC)に代表される炎症性腸疾患(IBD)は近年急増しており、指定難病でありながら国内に約30万人いると推定されています。多くは多因子疾患であり、欧米では数万人規模のゲノムワイド相関解析(GWAS)から240か所以上の疾患感受性領域が同定されています。これまでCDに最も相関が強い遺伝子が東アジア人ではTNFSF15であり、欧米人のNOD2とは全く異なるなど、その疾患感受性遺伝子には強い人種差が想定されていました。そこで、私たちは日本人に最適化されたジャポニカアレイを使った日本人IBDの解析を行い、中国人や韓国人を含む約15,000人の東アジア人集団のGWAS解析に発展させ、IBDの疾患感受性遺伝子を新たに81か所検出しました。一方、日々治療にあたる臨床医にとっては、遺伝子解析を患者に合わせた適切な治療選択へ活用することが期待されます。例えばIBDに対する基本治療薬であるチオプリン製剤は、欧米人よ

りも東アジア人で重篤な副作用を起こすことが問題になっています。私たちはジャポニカアレイによる解析から、チオプリン製剤の副作用とNUDT15遺伝子多型が強く相関することを日本人集団で確認し、2019年には保険適用検査として承認されました。チオプリンの副作用は、服用後3~4週間経過してから顕在化し、服用中止後も数週間継続するので、服用前の検査が推奨されます。実際に服用前に検査して該当者の服用法を工夫することで、治療継続性や入院率の改善がみられています。現在、この製剤の妊婦への影響やがん発症との関係性などを、動物実験をベースに調べています。疾患感受性遺伝子の探索や遺伝子型による薬剤選択では、遺伝子型と表現型を正しく繋ぐことが重要であり、特に臨床医には表現型を正確に把握して記録することが求められます。そのためには一元管理できる電子カルテの活用や患者さんの日常とつながるプロジェクトの推進にも力を入れています。



# TrueMark Infectious Disease Research Panel

## 感染症研究用リアルタイムPCRパネルで解析スピードと質を向上

### POINT

Applied Biosystems™ TrueMark™ Infectious Disease Research Panelは、呼吸器疾患、尿路疾患、性感染症、腔疾患および消化器疾患における感染症病原体を迅速かつ正確な検出と分類を可能にするリアルタイムPCR用の遺伝子解析パネルです。薬剤耐性解析にも対応し、Applied Biosystems™ QuantStudio™ リアルタイムPCR システムなどで使用できます。

- 自由なカスタム化：設計済みパネルだけでなく、カスタムパネルも選択可能
- 幅広い検査対象：複数の異なる疾患の病原体検出パネルを提供
- 信頼性の高い内在性コントロール：RNase P遺伝子のヒト内部コントロール、もしくは *Bacillus atrophaeus* の細菌スパイクコントロールと共に、各ウェル内でデュプレックス反応を行い信頼性の高いデータを提供

NEW!



### ▶ 最適化されたワークフロー

サンプルから結果入手まで約4時間です。



### ▶ 多彩なデザイン済みパネル

各種感染症に対して、10種類のデザイン済みパネルを96ウェルプレートフォーマットで提供しています\*。

<p><b>TrueMark Respiratory I Plus Panel</b></p> <p>A56284C</p> <p>Adenovirus Enterovirus Influenza A (Pan) Influenza B Respiratory Syncytial Virus A/B Rhinovirus Human Metapneumovirus SARS-CoV-2 ORF1ab</p>	<p><b>TrueMark Respiratory II Plus Panel</b></p> <p>A56286C</p> <p>Coronavirus 229E Coronavirus HKU1 Coronavirus NL63 Coronavirus OC43 Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Parainfluenza 4</p>	<p><b>TrueMark Respiratory III Plus Panel</b></p> <p>A56287C</p> <p><i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i></p>	<p><b>TrueMark Urinary I Plus Panel</b></p> <p>A56288C</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i></p>
<p><b>TrueMark Urinary II Plus Panel</b></p> <p>A56289C</p> <p><i>Corynebacterium riegelsii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Aerococcus urinae</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> <i>Actinobaculum schaalii</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i></p>	<p><b>TrueMark Urinary III Plus Panel</b></p> <p>A56290C</p> <p><i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Providencia stuartii</i></p>	<p><b>TrueMark STI Plus Panel</b></p> <p>A56291C</p> <p><i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma parvum</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> Herpes simplex virus type 1 and 2</p>	<p><b>TrueMark Vaginal Plus Panel</b></p> <p>A56292C</p> <p><i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Atopobium vaginae</i> <i>Prevotella bivia</i> <i>Mobiluncus curtis</i> <i>Bacteroides fragilis</i> Pan-Lactobacillus <i>Megasphaera Type 1</i> Bacterial vaginosis-associated bacteria 2</p>
<p><b>TrueMark Lesion Plus Panel</b></p> <p>A56293C</p> <p><i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Treponema pallidum</i> <i>Lymphogranuloma Venereum</i> Herpes simplex virus type 1 Herpes simplex virus type 2 Cytomegalovirus Varicella-zoster virus Pan-Candida</p>	<p><b>TrueMark Genital Plus Panel</b></p> <p>A56294C</p> <p><i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Trichomonas vaginalis</i></p>	<p>*呼吸器、尿路、腔、消化器の感染性疾患、薬剤耐性の検査に対応したカスタムパネル(96/384ウェル)の作製も可能です。弊社代理店または営業担当者またはカスタマーサービスまでお問い合わせください。</p>	
<p>サイズ</p> <p>1式(60検体分)</p>		<p>価格</p> <p>お問い合わせ</p>	
<p>製品はTrueMark/パネル5枚とAppliedBiosystems™ TrueMark™ Infectious Disease Panels 1-Step MultiplexMaster Mix (No ROX) で構成されたコンビネーションキット (Combo Kit) です。各キットの製品番号はパネル下に記載しています。詳細は営業にお問い合わせください。</p>			

# KingFisher Purification System シリーズアプリケーション紹介

サンプル精製の効率化と再現性の高いミドルスループットからハイスループット処理に適したThermo Scientific™ KingFisher™ Purification SystemとApplied Biosystems™ MagMAX™ 磁気ビーズキットを用いたアプリケーションの一部を紹介します。詳細はPDFをご覧ください。thermofisher.com/jp-kingfisher-appnote

## Application Note 1

### 高感度ウイルス核酸検出

感染症研究のためにApplied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation KitとKingFisherシステムを用いた核酸抽出によって、ヒト体液中のタイプが異なるサンプル中に加えたわずか50コピーのウイルス由来の核酸検出を検証しました。その結果、サイトメガロウイルス(CMV)とエプスタイン・バール・ウイルス(EBV)において、サンプルタイプが異なっても50コピーという少ないウイルス量をリアルタイムPCR解析で検出できました。



図1 解析ワークフロー

400 μLのヒト全血、尿、血漿に、既知量のCMVおよびEBVインタクトコントロールを添加して希釈系列を作成、抽出範囲を確認。リアルタイムPCRはApplied Biosystems™ TaqMan™ アッセイ(CMV用、EBV用)とTaqMan™ Fast Virus One-Step Master Mixを使い、Applied Biosystems™ QuantStudio™ 12K FlexリアルタイムPCRシステムで実施。

## Application Note 2

### ハイスループット病原体検出

呼吸器病原体陽性の種々の解析済みの臨床試験サンプル(>300)を入手し、Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen UltraKitとKingFisherシステムを用いてトータル核酸を分離し、リアルタイムPCRで解析しました。気管支肺胞洗浄液にウイルスや細菌を添加したスパイクインコントロールとスパイクなしサンプルを比較定量し、その後血漿・血清・鼻咽頭ぬぐい液などを同様に解析しました。その結果、異なるサンプルタイプを対象に多様な種類の病原体を96サンプル同時に単一手法で検出でき、市販の既存検査(分子診断検査、その他検査のいずれも)の結果と一致する優れた検出結果が得られました。

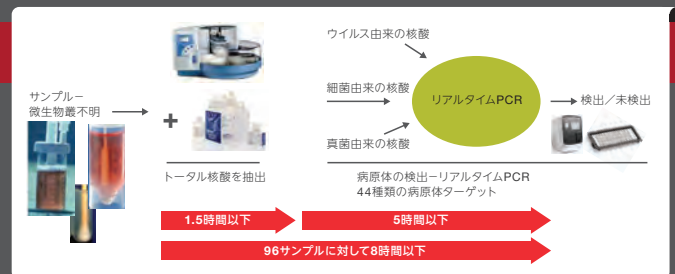


図2 呼吸器病原体の検出のための新しいハイスループットワークフロー

MagMAX Viral/Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation Kitでサンプルからトータル核酸を抽出し、Applied Biosystems™ TaqMan™ OpenArray™ プレートまたはApplied Biosystems™ TaqMan™ Array Card (TAC) パネルを用いて事前増幅有りなしでリアルタイムPCR解析を実施。44種類の病原体ターゲット(細菌、RNAウイルス、DNAウイルス、真菌)について、それぞれ検出/未検出を判定し、既存データと比較しました。

## Application Note 3

### ヒトマイクロバイオームのメタゲノム解析

ヒトマイクロバイオームのメタゲノミクスシーケンシングを実施するために、ヒト糞便などのさまざまな生体サンプルから高品質なDNAおよびRNAをApplied Biosystems™ MagMAX™ Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation KitとKingFisherシステムを用いて抽出しました。その結果、糞便、尿、唾液サンプルから精製したトータル核酸から、次世代シーケンシング(NGS)でのメタゲノム解析に適した高品質の細菌由来DNAおよびRNAを回収できたことが示されました。

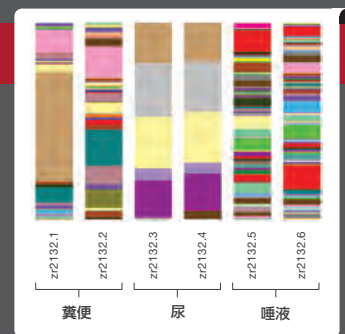


図3 ショットガンメタゲノムシーケンシングによる全遺伝子のメタゲノムプロファイル  
糞便、尿、唾液などサンプルごとに同定された操作分類単位(Operational Taxonomic Unit: OTU)で色分けしています。

## Application Note 4

### ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)サンプルからの核酸抽出

がん臨床研究用サンプルの多くは、病理組織学的検査と組織保存のためにホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)処理されています。そこで固形がん切除片、コア針生検、細針穿刺などのFFPEサンプルからApplied Biosystems™ MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra KitとKingFisherシステムを用いてキシレン以外の脱パラフィン剤を使用し、単一のワークフローで同一サンプルからDNAとRNAを連続的に個別に抽出しました。核酸回収を定量したところ、他社キットと同等またはそれ以上のDNA量およびRNA量を精製でき、さらにリアルタイムPCR解析を実施したところ、抽出したRNAサンプルはカラムを用いた抽出サンプルより一貫して低いCt値を示すことを確認しました。またNGSとがん遺伝子パネルによる解析でも良好な結果が得られました。

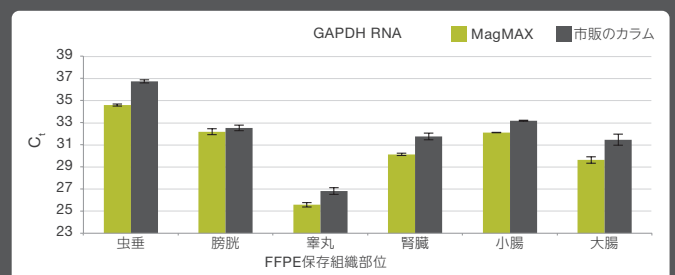


図4 RNAサンプルのリアルタイムPCR解析

FFPE組織片から抽出したRNAのGAPDH遺伝子を解析した結果、市販のカラムで分離したRNAよりも低いCt値を示しました。

吉田善紀 氏(京都大学iPS細胞研究所 増殖分化機構研究部門 准教授)

## iPS細胞由来の心筋細胞で移植医療や創薬を目指す 細胞の成熟度や細胞特性の確認にはTaqMan アッセイも活用



京都大学iPS細胞研究所の吉田善紀氏は、心筋梗塞や拡張型心筋症により心不全となった患者さんへの細胞移植治療や治療薬開発を目指して研究を進めています。「心筋移植では、iPS細胞を心筋細胞へ分化させて成熟度を見極め、バラバラにした細胞を懸濁液の状態で心臓に注入する治療法を想定しています。動物実験では、この移植法により生着率が高いことを確認しました」と話します。心筋細胞の成熟度や細胞の特性の確認には、遺伝子発現を始めタンパク質解析等、様々な方法で実施しているそうです。吉田氏に研究の概要と遺伝子発現解析用のアッセイについて伺いました。

### 移植における心筋成熟度の確認

「心筋移植の研究では、2016年に心筋梗塞モデルで免疫不全マウスにヒトiPS細胞から分化させた心筋を移植する実験を実施しました。すると6か月後には心臓の広い範囲に渡って生着していること、さらに心機能の回復や移植した細胞の成熟度が亢進していることを確認しています。このような形態で生着できれば心不全の治療にも効果があると考えられます。ここ数年のうちにはヒトへの臨床研究も想定して様々な準備を整えています」と吉田氏は語ります。「この移植の際に重要となるのが、心筋細胞の成熟度です。成熟しすぎるとうまく生着せずに脱落してしまい、逆に成熟度が足りないと十分な収縮力を発揮できないことが問題となります」と続けます。「私たち

の研究室では、移植時の心筋の成熟度やその特性の確認、また作製法が異なる心筋の比較等には、遺伝子発現解析を含め、フローサイトメーターやウェスタンブロッティングによるタンパク質解析等を幅広く実施して総合的に判断しています。その中で遺伝子発現解析法は、複数の遺伝子を同時解析でき、核酸の状態を試料を保存していれば後日簡便に解析できるので便利に使っています。継続的に確認する遺伝子の解析には、非特異的増殖が少なく信頼できるApplied Biosystems™ TaqMan™ アッセイを使い、気になる遺伝子を一時的に確認するときなどにはSYBR™ Green アッセイを使ったりします。ステップごとに違う成熟度や作製法が異なる細胞の特性の確認では、数種類の遺伝子を異なる組み合わせで調べています」(吉田氏)。

### 4つのテーマで研究を進める

「現在、研究室では①心筋再生、②疾患特異的iPS細胞の研究、③心筋分化誘導法、成熟制御法の開発、④多能性幹細胞(ES細胞/iPS細胞)の分化能を規定しているメカニズムの解明といった、4つのテーマに取り組んでいます。このうち③と④は、①と②の基盤にもなる研究です」と吉田氏。「心臓は、心室筋、心房筋、ペースメーカー細胞など、複数の種類の細胞から構成されています。各細胞種をiPS細胞から分化させるためには、時間経過とともに成長因子や環境を変化させていきます。心筋移植には心室筋細胞を使いますが、この



細胞は幼若だと収縮や拍動のリズムが揃わず、成熟するにしたがって収縮や拍動が揃ってくるので成熟度の見極めが大事です。また疾患モデル細胞の作製では、肥大型心筋症の患者さんから採取した細胞をiPS細胞化して心筋細胞に分化させる研究を行いました。患者さんから分化させた細胞では面積が徐々に増大し、サルコメア構造に乱れが生じ、特定の遺伝子が活性化しているなど病態を反映することを確認しました。現在、疾患モデル細胞の肥大化を抑制する化合物スクリーニングを製薬企業との共同研究で行い、治療薬候補を選出し、さらに検証を進めています。また2021年には、女性のX連鎖性鉄芽球性貧血(XLSA)患者さん由来のiPS細胞を樹立し、この疾患を引き起こす赤芽球分化障害を再現し、病態モデル細胞を作製しました。さらにこの細胞を用いて、化合物のアザシチジンが女性のXLSA患者さんから作製した細胞の赤血球生成を改善し、治療薬となり得ることを示しました」と吉田氏。「今後も4つの研究を協調して進めながら、iPS細胞研究を臨床応用につなげていきたい」と最後に語ります。

## TaqMan Gene Expression アッセイ 信頼性と特異性に優れた遺伝子発現解析を!



Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression アッセイは、確かな実績に裏付けられた性能と幅広いラインアップで研究をサポートします。高精度のリアルタイムPCR実験を、どなたでも簡単・迅速に行えます。

- 条件検討不要: 全て同一のPCR条件で使用できるよう設計済み
- MGBプローブを採用し、高い特異性を発揮
- 32生物種、280万種類以上のデザイン済みTaqManアッセイを提供
- 全てのアッセイは保証対象。ワークしない場合は別デザインと無償交換
- 豊富な引用文献
- 当社全てのリアルタイムPCR装置で使用可能

製品名	サイズ		価格
TaqMan Gene Expression Assay (FAM), inventoried	XS (75 反応/75 µL)	4453320	¥21,800
	S (250 反応/250 µL)	4331182	¥38,200
TaqMan Gene Expression Assay (FAM), made to order	XS (75 反応/75 µL)	4448892	¥21,800
	S (360 反応/360 µL)	4351372	¥57,400

## 骨髄の間葉系幹細胞の細胞周期解析や PrimeFlowアッセイをAttune NxT フローサイトメーターで検証



荒井 誠 氏 (東京大学先端科学技術研究センター 代謝医学分野 特任助教)

### ご研究概要を教えてください。

加齢とともに骨粗鬆症が増え、骨折しやすくなります。骨粗鬆症では骨の恒常性が乱れ、骨形成を行う骨芽細胞が減り、骨吸収を行う破骨細胞が増えることで全体の骨量が減少します。現在、多くの国で高齢化が進んでいることから骨粗鬆症の治療薬開発は盛んですが、多くは骨吸収抑制薬、つまり破骨細胞を抑える薬で、骨形成促進薬の開発はあまり進んでいません。一方、効果的な治療法として、最近では骨吸収抑制薬の前に骨形成促進薬を投与することが推奨されています。そこで私は骨芽細胞を研究対象として、骨粗鬆症の発症原因の解明や治療法の開発に役立つ研究に取り組んでいます。

### 応募のきっかけを教えてください。

現在、骨芽細胞への分化経路を調べています。この細胞の源は骨髄の間葉系幹細胞ですが、骨髄中には間葉系幹細胞以外にも血球細胞や免疫細胞など多くの種類の細胞が存在し、また間葉系幹細胞は骨以外にも脂肪や軟骨にも分化します。そのため間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化経路に関与する因子の抽出には骨髄を含む骨組織を一塊として扱う解析は困難で1細胞ずつ解析する必要があります。これまでにシングルセルRNAシーケンス(RNA-seq)を実施しており、今後はその結果に基づいてフローサイトメーター解析に取り組むためにこの企画に応募しました。

具体的には、以前から興味があった遺伝

子Xの欠損マウスで骨の表現型を調べ、野生型と比較して骨量が低下しており、骨形成が抑制されていることを確認しました。そこで骨細胞を単一細胞化して血球系細胞を除去してシングルセルRNA-seq解析を行い、野生型と欠損マウスで発現量が異なる複数の遺伝子を見出しました。この中から注目する遺伝子に対して、フローサイトメーターで解析を行うことにしましたが、使用可能な抗体のラインナップは限られるため、タンパク質ではなくRNAを特異的に蛍光標識して検出するInvitrogen™ PrimeFlow™ RNA アッセイを使ってみることに。この方法を使えばRNA-Seqの結果ともダイレクトに相関するはずですが、アッセイ系の条件検討では、ある程度まとまった時間でフローサイトメーターを使用する必要がありますが、所属する研究室には装置がなく、共通機器を使うと時間制限がありました。この企画でフローサイトメーターを集中的に使う時間を確保できるとも思いました。

### 使ってみてよかったところを教えてください。

まずはシステムの起動が速く助かりました。共同実験室の機器は少し古いモデルなのでレーザーの安定に20分、ビーズ校正に7分ほどかかり、その間に何度か手入力が必要になります。これに対してInvitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometerは、レーザーの安定とビーズ校正がそれぞれ3分ほどで終わり、操作もボタン一つで済みます。しかも直感的に操作できるのでストレスなく実験を行え

ました。週に3-4回の頻度で2か月間使用しましたが、サンプルが詰まることもなく、PrimeFlowアッセイの条件検討を進め、今後の研究に必要な細胞周期の実験まで行いました。細胞周期は間葉系幹細胞の培養細胞株で調べましたが、論文にも使用できる高品質のデータが得られています(図参照)。また1サンプル(50,000イベント)を5分程度で測定できたので、12サンプルの測定が1時間程度でした。マウス組織から始めてフローサイトメーターまでの実験を行うとなると時間がかかりますが、このように簡便かつスムーズにデータが取得できれば、サンプル数が増加しても当日中に測定できると思います。

### 他にコメントがあれば教えてください。

本企画とは別の機会に、新製品のInvitrogen™ Attune™ Cytpix™ Flow Cytometerでデータ解析を行いました。システムの特徴である解析データと連動した細胞形態の画像取得を行いました。それがPrimeFlowアッセイの条件検討の際にとっても有用でした。通常フローサイトメーターのデータだけでは判断できない場合でも、細胞形態から正常に機能しそうな張りのある細胞と機能不全で壊れたように見える細胞を見分けることで結果の解釈に役立ったからです。ソーティングすれば採取した分画を顕微鏡で確認できますが、Attune Cytpix Flow Cytometerだとターゲット以外の分画でも気になった細胞集団を測定中に画像で確認でき、その点の実験の解釈に有用だと思います。

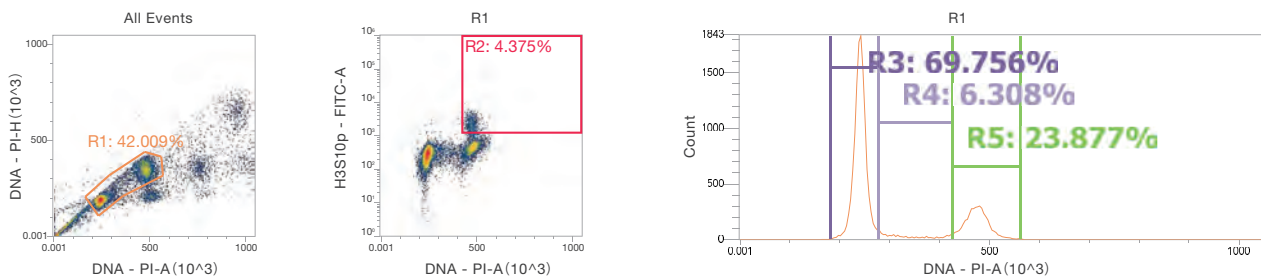


図 間葉系幹細胞の細胞周期解析

間葉系幹細胞をPI染色後、Attune Flow Cytometerで解析。細胞周期(G0/G1,S,G2/M)の割合やM期マーカーであるH3S10pの併用によって明確なデータが得られました。

次回の製品評価プログラムは、ハイスピードカメラを搭載したAttune Cytpix Flow Cytometerで実施予定です。ぜひご応募ください。

## Slide-A-Lyzer G3 Dialysis Cassettes

# 操作が簡便で、サンプル回収率の高い透析用カセット

POINT

Thermo Scientific™ Slide-A-Lyzer™ G3 Dialysis Cassettes は、3~125 mLのさまざまな容量のサンプルを簡便かつ効率的に透析するカセットです。従来の透析チューブのような煩雑な取り扱いや回収時のロスを抑え、再生セルロース膜とサンプルとの接触面積を最大にしたことでサンプル回収時の損失を最小限に抑えます。



- ピペットを使用する容易なサンプル添加と回収
- 95%以上のサンプル回収率
- 結び目や留め金が必要なく、緩みやリークが起きない設計
- サンプルあたりの膜表面積が広いため、透析チューブよりも短時間で透析

NEW!



### ▶ 従来のチューブ型透析よりも簡便で高い回収率

Slide-A-Lyzer G3 Dialysis Cassettesは、汎用されてきたチューブ型透析よりもいくつかの利点があります。

		取り扱い	回収率	リーク	透析効率
Slide-A-Lyzer		煮沸不要(水和:1~2分間)。ピペットやシリンジで溶液を添加・回収	シリンジで95%以上回収可能	ピペットで安全にサンプル添加でき、リークを抑制	大きい比表面積で、従来チューブ型よりも迅速に透析
従来のチューブ型		煮沸(または1時間以上の水和)が必要。水和後の取り扱いが煩雑	透析チューブ両端に残るサンプルの回収が困難	煮沸後の破損でリークするリスクあり	円柱型なので比表面積が比較的小さい

### ▶ さらに使いやすく、さらにコンパクトに

新しい第3世代(G3)デザインは、人間工学的(エルゴノミクス)に扱いやすいデザインが施されています。

#### エルゴノミクスの向上

前世代のSlide-A-Lyzer G2に比べ、格段とコンパクト、しかも軽量化された新設計フレームによりサンプルローディングや回収がより容易です。



G2(前世代) G3(新製品)

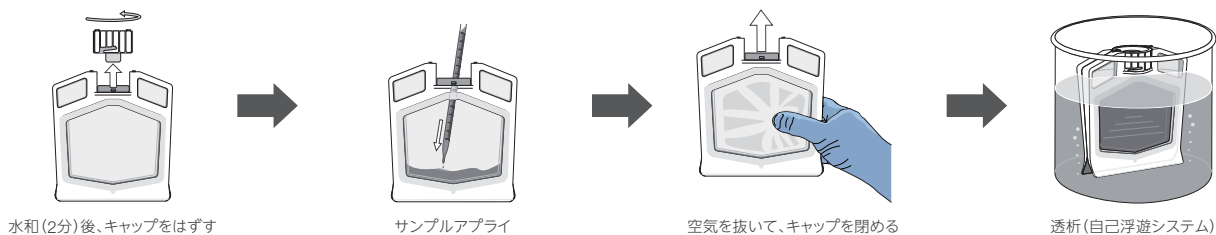
#### 新しいキャップデザイン

新しくスクリューキャップ式となり、前世代より簡単に確実に開閉できます。これによりサンプルの液漏れも防ぎます。



### ▶ シンプルなワークフロー

煩雑な作業なしで迅速に透析が行えます。



水和(2分)後、キャップをはずす

サンプルアプライ

空気を抜いて、キャップを閉める

透析(自己浮遊システム)

### Slide-A-Lyzer G3 Dialysis Cassettes

分子分画サイズ(MWCO) 容量	包装	2K	3.5K	10K	20K
		製品番号			
3 mL (1 - 3 mL)	10 カセット	A52961 ¥28,400	A52966 ¥29,200	A52971 ¥29,200	A52976 ¥28,400
15 mL (5 - 15 mL)	8 カセット	A52962 ¥34,500	A52967 ¥34,800	A52972 ¥36,300	A52977 ¥35,800
30mL (10 - 30 mL)	6 カセット	A52963 ¥28,400	A52968 ¥30,600	A52973 ¥30,600	A52978 ¥32,100
70mL (25 - 70 mL)	6 カセット	A52964 ¥31,800	A52969 ¥31,800	A52974 ¥34,900	A52979 ¥34,900
125 mL (65 - 125 mL)	6 カセット	A52965 ¥36,000	A52970 ¥36,000	A52975 ¥39,500	A52980 ¥39,500

サーモフィッシャーサイエンティフィックジャパングループは、2022年10月に東京本社内にThermo Fisher Scientific Creative Experience Lab for regenerative medicine (T-CEL)を新設しました。T-CELは、再生・細胞医療・遺伝子治療を推進するための製品を展示・運用し、最新技術を通じたお客様との共創拠点です。今回、バイオ3Dプリンタの開発を基盤に新たな再生医療の実現を目指す、株式会社サイフェーズ代表取締役の秋枝静香氏と研究員の鳥井蓉子氏に事業展開やT-CELの活用について伺いました。



## サイフェーズ独自の バイオ3Dプリンタ技術とは？

スキャフォールドなどの人工材料を用いることなく、細胞のみから成る立体的な組織・臓器「3D細胞製品」を構築する技術です。使用する細胞の自己凝集能を利用し、直径0.5mm程度のスフェロイドを作製後、装置にセットすると、バイオ3Dプリンタのロボットがスフェロイドを仮止め用の細い針に積層していきます。この針は生け花で使う「剣山」のように並んでおり、専用のソフトウェアで入力した3Dデザイン通りにスフェロイドを積層することで、立体的な組織を構築します。単純にスフェロイドを積み重ねただけでは、細胞がダメージを受けて大きな組織を作製できませんが、針と針の隙間に酸素や栄養分が供給されることで立体組織の構築が可能です。スフェロイド同士は数日で融合するので、その後仮止め用の針を抜けば細胞のみから成る立体的な構造体ができます。用途や対象疾患部位に合わせて、ブロック型やチューブ型など様々な形を構築でき、また技術的にはスフェロイドを形成できれば使用する細胞種に制限はありません。

## 多面的な事業展開

現在、①再生医療、②創薬支援、③デバイスの3領域で事業を展開しています。①では、神経・血管・骨軟骨再生に対する臨床試験を進めています。神経と血管の再生では患者さんの皮膚から得た線維芽細胞を用いてチューブ型の細胞構造体を作製し、自家移植することで組織の再生を促します。骨軟骨の再生では、厚みのあるブロック型で脂肪由来の間葉

系幹細胞を欠損部に埋め込み、軟骨再生と骨再生を同時に進行させます。安全性の確認から機能面への検証を進め、早ければ2025年頃の再生医療等製品の承認申請を目指しています。また②では、ヒトの肝細胞のみから作製した3D肝臓構造体を、毒性や薬効評価用に製薬企業等へ提供しています。③については、共同研究ベースでバイオ3Dプリンタを国内外で販売しています。1号機のRegenovaに続き、コンパクトなS-PIKEを開発し、次世代機も開発中です。

## 基礎研究から ベンチャー企業の立ち上げへ

当時九州大学医学部整形外科の中山功一先生(現佐賀大学 教授)の技術発明をもとに、JSTから事業化のシーズ研究として支援を受け、九州大学発ベンチャーとして当社を立ち上げました。2010年にはNEDOの橋渡し研究に採択頂き、その後もAMED等をはじめとする公的機関や多くの組織・パートナー企業に支えられ、研究開発を続けてきました。そして、多くの方々からのご支援のお陰で、昨年12月には東京証券取引所グロース市場に上場でき、企業として少しずつ成長していることを実感しています。また、創業から10年が過ぎたことから、昨年、大学のラボから新しいオフィスに移転しました。オフィスビルにラボを設置し、次世代型のCPC(細胞培養加工施設)を構築しました。ラボエリアをガラス張りにし、訪問者が通路から気兼ねなく見学できるようにしました。ここにはThermo Scientific™ Herasafe™ 2030iクラスIIタイプA2安全キャビネットを導入しており、側面が透明であるため、見学通路

から細胞培養の様子がよく見えます。またキャビネット内にS-PIKEを設置する際には、耐荷重を強化した特注のステンレス製ワークトレイに変更できるので助かりました。海外のラボでも、サーモフィッシャーの安全キャビネット内に当社装置を設置しており、研究開発をスムーズに進められます。

## 最後にT-CELへの コメントをお願いします

細胞の拡大培養のステップでは大量に細胞を培養するので、細胞回収や濃縮、洗浄の作業が大変でした。そんな時、サーモフィッシャーのスタッフからT-CELにも展示中の細胞自動処理システムのGibco™ CTS™ Rotea™ Counterflow Centrifugation Systemを紹介されました。迅速な対応はもちろん、現場を熟知されたスタッフからの提案やアドバイスが当社の事業展開にも大いに役立っています。T-CELには製造工程に沿って展示や説明があり、最新機器の実機見学もできるため、当社スタッフもよく活用しています。今後も患者さまのため、再生医療ならびに新しい産業の創出のため、様々な形で共創していければと思います。



秋枝氏(左)と鳥井氏(右)

## CTS DynaCollect Magnetic Separation System

### プロセス開発から商用生産まで、次世代の細胞治療を支援



#### POINT

Gibco™ CTS™ DynaCollect™ Magnetic Separation Systemは、細胞治療用の医薬品製造において、マグネットを利用して細胞の分離、活性化、ビーズ除去プロセスを自動で行う閉鎖系細胞分離システムです。本製品は、T- CEL施設でご覧いただけます。

- ロッキング機構上に配置したマグネットで、細胞とビーズを自動的に混合
- カスタマイズ可能なプロトコルを使用して、プロセス開発から商用生産まで柔軟に対応
- 閉鎖系の自動化システムなので、オペレーターの手技に依存せず製造エラーを最小限に抑え、コンタミネーションリスクを低減

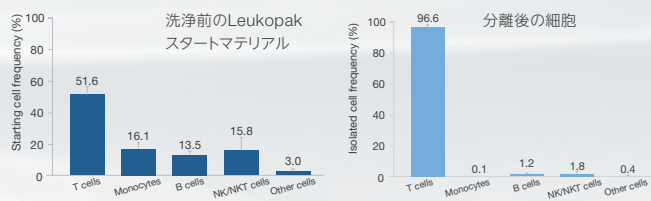


#### ▶ 高純度で標的細胞を分離

標的細胞分離用の磁気ビーズを使用して標的細胞を高純度に分離します。

図1 スタートマテリアルおよび分離後の濃縮された標的細胞の細胞表現型

CTS Dynabeads CD3/CD28およびCTS DynaCollect Magnetic Separation Systemを使用して細胞を分離。洗浄前の標的細胞純度(約52%)が、分離後には標的細胞(CD4陽性およびCD8陰性)純度は約97%でした。

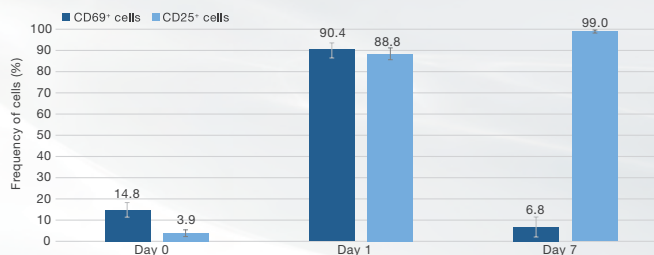


#### ▶ 分離細胞の活性化

目的に合わせてプロトコルをカスタマイズでき、機能を保持したまま高純度で細胞を分離します。

図2 分離された標的細胞の活性化の確認

Day 1にCTS Dynabeads CD3/CD28を使用すると、Early activationマーカーのCD69の発現が向上し、Day 7までに減少。Late activationマーカーのCD25はDay 1に発現し、Day 7まで継続して発現しました(n=4)。



製品名	サイズ	製品番号	価格
CTS DynaCollect Magnetic Separation System (2年保証/2年目点検付)	1 式	A55867-S2	お問い合わせ
CTS DynaCollect Magnetic Separation System (2年保証/設置時IQOQ, AB Complete 相当保証付)	1 式	A55868-S2-V	お問い合わせ

CTS製品は、研究用または細胞、遺伝子あるいは組織を使用した製品の製造に使用できます。注：診断目的の使用、ヒトおよび動物への直接的な使用はできません。

## Herasafe 2030i クラスIIタイプA2安全キャビネット

### NSF規格に適合した安全性と快適な操作性を両立

Thermo Scientific™ Herasafe™ 2030i シリーズは、「サンプル」「オペレーター」の安全性を守る基本性能に妥協することなく、快適な操作性を融合。直観的な操作を可能にするタッチスクリーンインターフェースには、エアフローバランス等のパフォーマンスをリアルタイムで表示。カスタマイズも可能でバイオ医薬品の製造で求められる高度な要求事項に対応します。

- エアフローバランスを自動補正し風速をリアルタイムモニタリング
- 清掃時はサッシを全面開放可能：庫内全面にアクセスでき、中型機器の設置が可能
- エルゴノミクスデザインによるシンプルな操作性とお客様のニーズに応じたカスタマイズも可能



製品名	サイズ	製品番号(本体/スタンド)	価格
Herasafe 2030i クラスIIタイプA2安全キャビネット	1 式(外寸幅1300mm)	51032334/50155689	¥1,926,000
	1 式(外寸幅1900mm)	51032335/50155691	¥2,336,000

## Neon NxT Electroporation System

## ロングセラーの電ポレーターがリニューアル!

## POINT

Invitrogen™ Neon™ NxT Electroporation Systemは、リポフェクションによる遺伝子導入が難しい細胞株においても、特許取得済の電ポレーションチップ技術により、高い導入効率と生存率を実現します。

- 高い遺伝子導入効率と細胞生存率
- 140以上の細胞株で最大90%の遺伝子導入効率
- ピペットチップ技術によるサンプルロスの低減
- あらゆる細胞種やペイロードに対応する単一の試薬キット
- 細胞密度、ペイロード、細胞の種類、アプリケーションの範囲を容易にカスタマイズ
- TransfectionLabにより、遠隔でのカスタマイズ  
およびプロトコルとプレートレイアウトの自動同期が可能

COMING  
SOON!

製品詳細はこちらから → [thermofisher.com/neonnxt](https://thermofisher.com/neonnxt)

製品名	サイズ	製品番号	価格
Neon NxT Electroporation System	1 式	NEON1	¥1,398,000
Neon NxT Starter Kit	1 キット	NEON1SK	¥1,538,000

## NEXT 3月号はいかがでしたか?

特集は、京都大学iPS細胞研究所の金子新氏に、iPS細胞の特性を活かした免疫再生医療の実現やiPS細胞共通プラットフォームの構築について伺いました。今号は再生医療関係の記事を多く掲載しています。自家移植で脳梗塞治療への細胞移植を目指す北海道大学の川堀真人氏、心筋梗塞治療にiPS細胞から分化させた心筋移植を目指すiPS細胞研究所の吉田善紀氏、再生医療を目指してバイオ3Dプリンタを開発した株式会社サイフーズ代表取締役の秋枝静香氏からお話を伺いました。また統合型次世代シーケンサを活用する松阪市民病院の事例や薬理ゲノミクス関連のセミナー報告、Attune NxT製品評価プログラム参加者のコメント等もご参考ください。新製品情報やテクニカルレビューもお役に立ていただけると幸いです。



NEXT読者アンケートはこちらから → [thermofisher.surveymonkey.com/r/NEXT\\_reader](https://thermofisher.surveymonkey.com/r/NEXT_reader)

photographs: ryuichi morikawa (p.02-03) / science writing: satoshi miyauchi (p.02-03) / art direction & design: opportune design inc. / editing: yuko hashimoto

■ NEXT バックナンバーは、こちらから → [thermofisher.com/NEXT](https://thermofisher.com/NEXT)

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

記載の価格は2023年3月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。●実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

●価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。●標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://thermofisher.com/jp-tc) LSG115-A2303HS

サーモフィッシャーサイエンティフィック  
ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ [jptech@thermofisher.com](mailto:jptech@thermofisher.com)  
オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584  
営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://facebook.com/ThermoFisherJapan) [@thermofisherjp](https://twitter.com/thermofisherjp)

[thermofisher.com](https://thermofisher.com)

販売店