

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
井ノ上逸朗	-ゲノム科学の臨床へのインパクト-多因子病の遺伝要因をどのように考えるべきか		最新医学 62巻9月増刊号(別冊)	最新医学社		2007	140 (2124)-149 (2133)
柳田薫	顕微授精	日本生殖医学会	生殖医療ガイドライン 2007	金原出版	東京	2007	302-310
吉村泰典、 苛原稔、 柳田薫	最適な不妊治療の選択指針	日本生殖医学会	生殖医療ガイドライン 2007	金原出版	東京	2007	230-232
柳田薫	顕微授精	鈴木光明 吉村泰典	産婦人科専門医に聞く最新の臨床	中外医出版	東京	2007	181-182
柳田薫、 片寄治男、 藤倉洋子	ICSIの実際	柴原浩章、 森本義晴、 京野廣一	臨床不妊症学入門	中外医出版	東京	2007	213-223
柳田薫	ICSIの基礎研究	柴原浩章、 森本義晴、 京野廣一	臨床不妊症学入門	中外医出版	東京	2007	28-40

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sullivan S, Dieter E, Akutsu H, DouglasAM, Kevin E, ChadA.Cowan	Derivation of human embryonic stem cell lines	Human Embryonic Stem Cells		35-51	2007
Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H	Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach	Reprod Biomed Online.	16(1)	41-50	2008
Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K.	Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice.	Mol Reprod Dev.	75(1)	150-5	2008

Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N.	Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos.	Biochem Biophys Res Commun	364(4)	838-43.	2007
Takemura Y., Osuga Y., Yoshino O., Hasegawa A., Hirata T., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Yano T., Taketani Y.	Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells.	J Clin Endocrinol Metab.	92	3213-3218	2007
Hirata T., Osuga Y., Hamasaki K., Yoshino O., Ito M., Hasegawa A., Takemura Y., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Saito S., Yano T., Taketani Y.	Interleukin (IL)-17A Stimulates IL-8 Secretion, Cyclooxygenase-2 Expression, and Cell Proliferation of Endometriotic Stromal Cells.	Endocrinology	149	1260-1267	2008
Fu L., Osuga Y., Morimoto C., Hirata T., Hirota Y., Yano T., Taketani Y.	Dienogest inhibits BrdU uptake with G(0)/G(1) arrest in cultured endometriotic stromal cells.	Fertil Steril.			in press
Hasegawa A., Yoshino O., Osuga Y., Hirata T., Yano T., Taketani Y.	High soluble CD44 concentration in peritoneal fluid in endometriosis.	Fertil Steril.			in press
Osuga Y., Koga K., Hirata T., Hiroi H., Taketani Y.	A case of hydrosalpinx associated with the menstrual cycle.	Fertil Steril.			2007
Hirota Y Osuga Y., Nose E Koga K. Yoshino O., Hirata T., Yano T., Tsutsumi O, Sakuma S Muramatsu T, Takenami Y	The Presence of midkine and its possible Implication in human Ovarian Follicles	Am J Reprod Immunol	58	367-373	2007
Yazawa H, Yanagida K, Sato A	Human round spermatids from azoospermic men exhibit oocyte-activation and Ca ²⁺ oscillation-inducing activities.	Zygote	15	337-346	2007
柳田薫、藤倉陽子、片寄治男、岩本晃明	不妊因子からみたARTの成績	へるす出版	33	825-829	2007
柳田薫、高田智美	顕微授精での受精障害	医学の歩み	223	85-89	2007

柳田薫、片寄治男、藤倉洋子、岩本晃明	顕微授精 産婦人科診療Data Book	産婦人科の実際	56	1639-1644	2007
柳田薫	不妊治療と遺伝子異常 ARTで認識すべき 遺伝子異常	臨床婦人科産科	61	1482-1487	2007
片寄 治男, 高山 智子, 菅沼 亮太, 林 章太郎, 柳田薫, 佐藤 章	精子核の質的評価と体外胚発生能	J.Mamm.Ova.Res	24	153-160	2007
柳田 薫	体外受精・顕微授精	日本医師会雑誌			2007(印刷中)
T. Sato, M. Kurokawa, Y. Nakashima, T. Ida, T. Takahashi, Y. Fukue, M. Ikawa, M. Okabe, K. Kangawa and M. Kojima	Ghrelin deficiency does not influence feeding performance	Regul Pept	145(1-3)	7-11	2007
Y. Ueda, R. Yamaguchi, M. Ikawa, M. Okabe, E. Morii, Y. Maeda and T. Kinoshita	PGAP1 knock-out mice show otocephaly and male infertility	J Biol Chem	282(42)	30373-80	2007
H. Umehara, T. Kimura, S. Ohtsuka, T. Nakamura, K. Kitajima, M. Ikawa, M. Okabe, H. Niwa and T. Nakano	Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3	Stem Cells	25(11)	2705-11	2007
M. Okabe and J. M. Cummins	Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals	Cellular and Molecular Life Sciences	64 (15)	1945-1958	2007
磯谷綾子、岡部勝	X-linked GFPマウスを用いた雌雄分別と生殖細胞の動態	蛋白質 核酸 酵素	52 (16)	2060-2066	2007

IV 研究成果の刊行物・別冊

● 多因子病のゲノム研究は今

多因子病の遺伝的要因をどのように
考えるべきか

東海大学医学部 教授

井ノ上 逸朗 Ituro Inoue

|| 要 旨 ||

この1年で多くの疾患で大規模なゲノム全域アソシエーション・スタディがなされ、革新的な成果が上がっている。糖尿病、心筋梗塞などの多因子疾患の感受性遺伝子が続々と報告され、追試までなされている。わずかな違いながら確実な感受性遺伝子同定ができている。その経緯を述べるとともに、今後の展開について考えてみたい。

はじめに

生命現象は複雑系である。ゲノムサイエンス以前の時代には、この複雑系を生物学的手法で包括的に理解することは不可能であった。同様に、複雑な要因が関与する多因子疾患を古典的遺伝学で理解することは困難である。ゲノムサイエンスによりシステム生物学が登場し、複雑系の包括的理解が試みられるようになった。また、多因子疾患へのアプローチ法も変革してきた。多因子疾患の遺伝的要因をどのように同定するか、この10年来、遺伝学者の議論の中心にあった。30年前、2型糖尿病を遺伝学者の悪夢と称した James Neel を引用するまでもなく、多因子疾患の遺伝的要因へのアプローチは混沌としたものであっ

キーワード：ゲノム全域アソシエーション・スタディ、多因子疾患、
疾患遺伝子研究

た。ところが、ヒトゲノム配列決定、一塩基多型 (SNP) データベースの拡充、国際 HapMap 計画の完了といった流れの中で、ゲノム全域を網羅する SNP タイピングプラットフォームが開発され、一気に事情が変わってきた。ゲノム全域を密に網羅する 30~50 万 SNP のアソシエーション・スタディにより、続々と疾患感受性遺伝子多型が同定されており、同時に追試もなされ再現性が確認されている。感受性遺伝子が同定されると、疾患発症への機能的関与、他の遺伝要因、かつ環境要因との相互作用も検証がなされるであろう。今、疾患遺伝子研究は時代のうねりの中にある。もう大波はきている。大波に押しつぶされるか、波にうまく乗れるか、どっちだろうか。

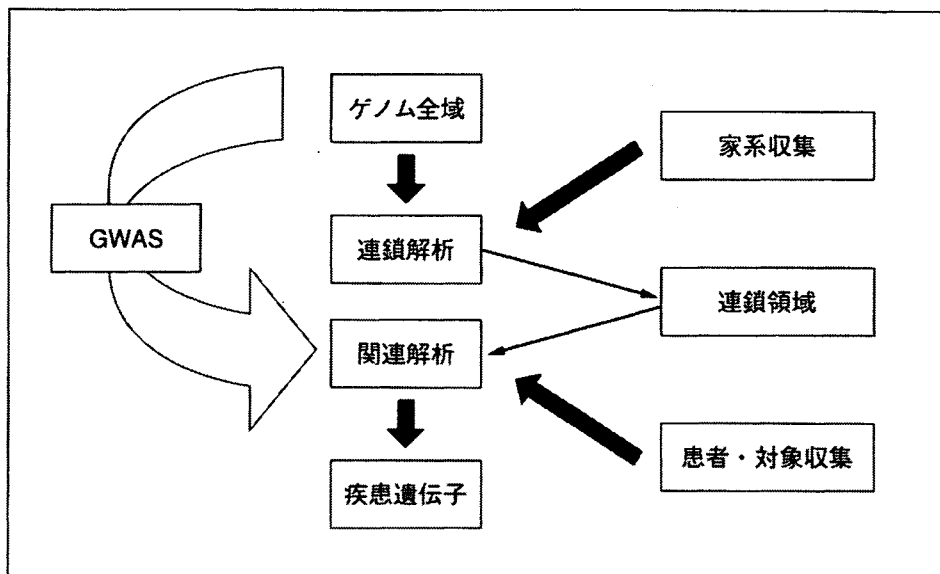
多因子疾患の遺伝要因を同定する困難さ

まず多因子疾患の遺伝解析における古典的な問題点を挙げよう。

- ① 遺伝的浸透率が低い
- ② メンデルの遺伝法則に従わない
- ③ 世代を隔てた家系収集が困難
- ④ 表現模写の存在 (遺伝要因が存在しないのに発症)
- ⑤ 遺伝的異質性の存在 (ローカス, アレル)
- ⑥ 遺伝子間, 遺伝子-環境要因間相互作用の存在

多因子疾患では一つひとつの遺伝要因の効果は小さいと考えられる。1つの遺伝子変異により発症する単一遺伝病との大きな違いである。当然、遺伝的に浸透率は小さくなり、そのためメンデルの遺伝法則には従わない。また、関与する遺伝要因の検出も困難となる。家系収集し連鎖解析で遺伝子座を特定する手法は、単一遺伝病では効果的であった。しかしながら、多因子疾患では上記のようメンデル遺伝に従わないことに加え、高齢発症が多いため多世代の家系が困難であること、家系内非罹患者でも未発症の可能性がある、などの理由でモデルを設定しない罹患者対連鎖解析が行われる (図1)。この手法では組換え情報が入らないため、遺伝子座のピンポイントができず、連鎖領域は通常 20 cM に及ぶことが多い。また、通常遺伝子座は複数特定される。そうするとゲノムの 1% 以上の領域をアソシエーション・スタディにより徹底的に調べ抜く必要が生じる。そんなことなら

図1 多因子疾患のゲノム解析



GWAS：ゲノム全域アソシエーション・スタディ

始めからゲノム全域でアソシエーション・スタディを試みる手法が効果的と議論されてきた。図1に示すよう連鎖解析，アソシエーション・スタディと順を追うより，初めからゲノム全域アソシエーション・スタディ（GWAS）を行った方が効率的となってきたかも知れない。

ゲノム全域アソシエーション・スタディ（GWAS）

すでに10年前に Risch と Merikangas により，遺伝的効果の弱い因子の検出にはアソシエーション・スタディの方が有利なことが示されていた¹⁾。ただ，それは未知の感受性遺伝子にヒットしたと想定しての統計遺伝学的検討であった。当時，連鎖解析のための遺伝マーカー（マイクロサテライト）は解析に十分な間隔で装備されていたので，家系数さえ十分ならゲノム全域解析で遺伝子座を特定できる確率は高かった。しかしながら，アソシエーション・スタディのための遺伝マーカー（SNP）は密に存在しておらず，また網羅的なタイピング法も開発されていなかった。この2年で様相は一変し，GWAS が盛んに行われるようになった。Affymetrix, Illumina 両社により，続々とスケールアップされる形でタイピングプラットフォームが開発されている。Affymetrix は 906,600 の SNP，946,000 コピー数変異検出のた

めのプローブが配置された Genome-wide SNP Array 6.0[®]を出している。一方, Illumina には 550,000 SNP をタイピングできる Human-Hap550 Genotyping BeadChip[®]がある。

この1年で“Nature”, “Nature Genetics”, “Science” 誌に論文掲載された GWAS の例を示す(表1)。一目瞭然であるが, 膨大な数の成果が出てきている。それぞれが大規模スタディであり, 注目すべきは糖尿病における TCF7L2 のように異なるスタディで再現性が得られていることである。その中でも最も大規模なアソシエーション・スタディの結果を紹介する。Wellcome Trust Case Control Consortium において7疾患について2,000例ずつの患者群と3,000例の対照でのアソシエーション・スタディが報告されている²⁾。対象となった疾患は躁うつ病, 冠動脈疾患, クロウン病, 関節リウマチ, 1型糖尿病, 2型糖尿病そして高血圧である。タイピングプラットフォームは Affymetrix GeneChip 500K Mapping Array Set[®]が採用されている。統計解析は Armitage trend test を用いており, 5×10^{-7} 以下を強いシグナルとしている。躁うつ病で1個, 冠動脈疾患で1個, クロウン病で9個, 関節リウマチで3個, 1型糖尿病で7個, 2型糖尿病で3個の SNP が同定された。高血圧では強いシグナルを得ることはできなかった。既報の結果を再現した SNP も多く, 間違いのない遺伝要因を検出できていると考えていいだろう。

すべての遺伝要因を現在のプラットフォームで検出できるか。答えはもちろん no である。さらに, わずかな違いを起す遺伝要因の検出には膨大な数の検体数を要する。もちろん, そのような遺伝要因を膨大なコストをかけて検出する意義についても疑問であろう。Common disease の原因は common variant であると, Eric Lander らにより提唱された, いわゆる common disease-common variant (CD-CV) hypothesis である³⁾。ありふれた病気の原因は頻度の高い多型による (common variant), またその多型は共通の祖先から生じている (common variant) という考えである。一方, common disease-rare variant も存在する。実際に血中 HDL コレステロール値を遺伝的に規定している遺伝子多型は, 頻度が低いが効果の強いことが示されている⁴⁾。Rare allele はチップ上に搭載されていないので, そもそ

表1 ゲノム全域アソシエーション・スタディ (GWAS) による疾患遺伝子解析

疾患	検体数	結果 SNP 遺伝子	有意差	Odds ratio	SNP Number	Publication Year	Author	Journal
2型糖尿病	1,464 cases, 1,467 controls	rs10811661	5.4×10^{-15}	1.2	500k SNPs	2007	Broad Institute	Science 316, 1331-1336
		CDKN2A/CDKN2B						
		rs20769013	4.1×10^{-11}	1.12				
		CDKAL1						
		rs7903146	1.0×10^{-46}	1.37				
2型糖尿病	1,924 cases, 2,938 controls 3,757 cases, 5,346 controls 1,161 cases, 1,174 controls	TCF7L2	3.7×10^{-8}					
		rs780094						
		GCKR						
		replicated			500k SNPs	2007	Zeggini et al.	Science 316, 1336-1341
		replicated			315k SNPs	2007	Scott et al.	Science, 316, 1341-1345
2型糖尿病	1,363 cases, 1,353 controls 2,617 cases, 2,894 controls	rs7903146	1.5×10^{-34}	1.65	393k SNPs	2007	Sladek et al.	Nature 445, 881-885
		TCF7L2						
		rs1326634	6.1×10^{-8}	1.53				
		SLC30A8						
		rs7903146	1.8×10^{-10}	1.38	300k SNPs	2007	Steinthorsdottir et al.	Nat Genet 39, 770-775
肥満	1,399 cases, 5,275 controls	TCF7L2						
		rs7756992	7.7×10^{-9}	1.2				
		CDKAL1						
		rs9939609	3×10^{-35}	1.67	400k SNPs	2007	Frayling et al.	Science 316, 889-894
		FTO						
冠動脈疾患	322+311 cases, 312+326 controls 23,000 participants 4,587 cases, 12,767 controls	rs10757274	1.2×10^{-20}	1.28	100k SNPs	2007	McPherson et al.	Science 316, 1488-1491
		CDKN2A/CDKN2B						
		rs2066843	2.86×10^{-9}		300k SNPs	2007	Helgadóttir	Science, 316, 1491-1493
		CARD15						
		rs11209026	5.05×10^{-9}		308k SNPs	2006	Duerr et al.	Science 314, 1461-1463
クローン病	567+547 cases, 571+548 controls	IL23R						
		rs2241880	4.0×10^{-8}		200k SNPs	2007	Hampe et al.	Nat Genet 39, 207-211
クローン病	735 cases, 368 controls	ATG16L1						

疾患	検体数	結果 SNP 遺伝子	有意差	Odds ratio	SNP Number	Publication Year	Author	Journal
クローン病	988 cases, 1,007 controls	rs2241880 ATG16L1	6.4×10^{-8}		318k SNPs	2007	Rioux et al.	Nat Genet 39, 596-604
乳癌	4,398 cases, 4,316 controls 21,860 cases, 22,578 controls (2nd stage)	rs224136 ZNF365	7.9×10^{-6}					
乳癌	1,600 cases, 11,563 controls 4,554 cases, 17,577 controls	rs2981582 FGFR2	2×10^{-76}	1.63	228k SNPs	2007	Easton et al.	Nature 447, 1087-1093
乳癌	1,145 cases, 1,142 controls 1,776 cases, 2,072 controls	rs3803662 rs1219648 FGFR2	5.9×10^{-19} 1.1×10^{-10}	1.28 1.64	300k SNPs 528k SNPs	2007 2007	Stacey et al. Hunter et al.	Nat Genet 39, 865-869 Nat Genet 39, 870-874 Nat Genet 39, 631-637 Nat Genet 39, 645-649
前立腺癌	1,453 cases, 3,064 controls	rs1447295	6.4×10^{-18}	1.53	300k SNPs	2007	Gudmundsson et al.	Nat Genet 39, 631-637
躁うつ病	1,172 cases, 1,157 controls	rs6983267	9.42×10^{-13}	1.26	550k SNPs	2007	Yeager et al.	Nat Genet 39, 645-649
冠動脈疾患	2,000 cases, 3,000 controls	rs420259 OALB2/NDUFAB1	6×10^{-8}	2.08	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
クローン病	2,000 cases, 3,000 controls	rs1333049 CDKN2A/CDKN2B	1.8×10^{-14}	1.9	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
関節リウマチ	2,000 cases, 3,000 controls	rs11805303 IL23R	6.45×10^{-13}	1.86	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
1型糖尿病	2,000 cases, 3,000 controls	rs10210302 ATG16L1	7.1×10^{-14}	1.85	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
2型糖尿病	2,000 cases, 3,000 controls	rs6679677 PTPN22	4.9×10^{-26}	3.32	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
	2,000 cases, 3,000 controls	rs6679677	1.1×10^{-26}	5.19	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
	2,000 cases, 3,000 controls	rs17696736 ten genes	2.17×10^{-15}	1.94	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
	2,000 cases, 3,000 controls	rs4506565 TCF7L2	5.7×10^{-13}	1.36	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678

も検出不可となる。

残念ながら、我が国の GWAS への対応は遅れていると言っているだろう。1,000 例を超える症例で GWAS を行った報告はない。また、個々の研究者が有する症例数は、GWAS に耐える数ではないようである。日本でも多施設共同研究の推進が急がれるし、アジア全体を見据えた共同研究を行う研究体制も考慮していかなければならない。

わずかな効果の間違いない感受性遺伝子の検出

膨大な検体数での GWAS は、わずかな差ながら確実な遺伝要因の検出を統計的頑健さで可能とした。表 1 を再び参照いただきたい。有意差の強い SNP が示されているが、オッズ比は 1.2 ~ 1.6 と小さいことが見て取れるだろう。では、そのわずかな違いは意味があるのだろうか、また個人差医療へ利用できるものであろうか。遺伝要因は生まれながら有する危険因子かつ原因そのものなので、関与する遺伝子から病気のメカニズムをうかがい知ることができる。通常、*in vitro*, *in vivo* での機能的解析により、感受性遺伝子多型がどのように疾患にかかわるかの検討が行われる。オッズ比 1.2 ~ 1.6 くらいの多型では生物学的実験で 10 ~ 20 % 程度の差にしかならず、その検出は現実的に困難である。中年以降の発症なら、発症まで長年遺伝要因の影響を受けてきたことは想像できるだろう。いわゆる蓄積があるので、一時的な実験で示すことは困難となる。しかしながら、原因遺伝子同定により疾患に関与するパスウェイを知ることができ、当然治療ターゲットになる可能性がある。また、環境要因との相互作用解析から、関与する環境要因をあぶりだし、予防に役立てることが期待できる。

また、病巣となっている組織でマイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現が検討されている。遺伝的要因となっている遺伝子発現は病巣において変化していることが予想され、ゲノム全域における SNP 解析と遺伝子発現を組み合わせた検討がなされるであろう。

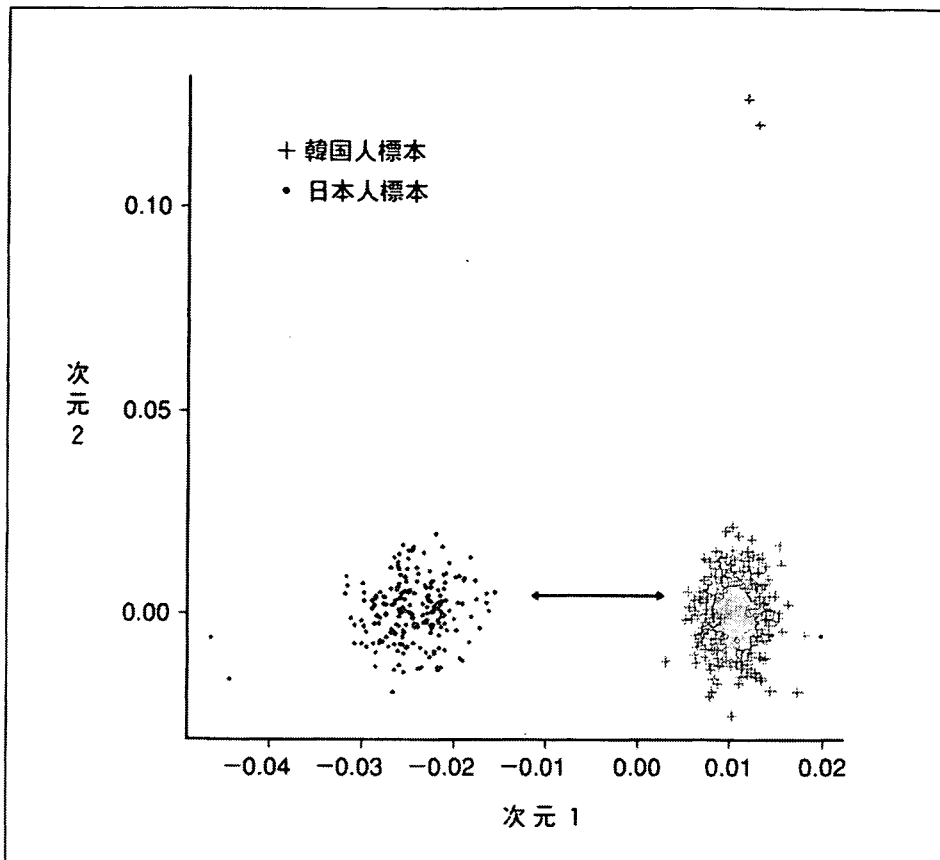
集団の階層化

アソシエーション・スタディでは集団階層化が問題となる。患者と対照の遺伝背景を同一にすることにより、患者 = 疾患との関連をとら

えることができる。よく言われる例え話がある。サンフランシスコベイエリアにおいて、箸の使い方のうまさとはヒト白血球抗原 (HLA) との関連を調べた。結果、HLA-A1 タイプと箸をうまく使える形質が関連していた。HLA-A1 は chopstick gene だった？ もちろんそんなことはなく、サンフランシスコでのスタディ集団は中国系と白人集団が混在しており、中国系集団では HLA-A1 頻度が高いことによりこのような結論となった。言うまでもなく、集団中に混在していた中国系集団が箸をうまく使う。このような極端な例はないだろうが、わずかな差を検出するアソシエーション・スタディにおいて集団の階層化は常に大きな問題で注意を要する。日本人集団は均一性の高い集団と考える向きもある。比較の問題ではあるが、予想していたよりは多様性が高いと思った方がよい。そのためには対象とする集団の階層化を事前に確認しなければいけない。少ない数の遺伝子多型をタイピングしていた時代には検出できなかったことであるが、30 万～50 万 SNP をタイピングする時代となり、わずかな集団の階層化を精度良く確認できるようになった。

Purcell, et al の提唱している方法での検討例を示そう。ゲノム全域のほぼ独立な (連鎖不平衡にない) SNP セットを用いて個体対の同状態 (identical by state: IBS) アリルの共有数をカウントし、IBS 共有割合を個体間の類似性の尺度として用いるものである。IBS 0 は {AA, aa} の対、IBS 1 は {Aa, AA} または {Aa, aa} の対、IBS 2 は {Aa, Aa}, {AA, AA} または {aa, aa} の対のように数える。これを 1 から引いたものを個体間の IBS 距離とする。IBS 距離をすべての標本対に対して計算することにより、IBS 距離行列が得られる。これはサンプルサイズを N とすると、 $N \times N$ 対称行列である。この IBS 距離行列は、サンプル内のすべての個体間の相対距離を表しており、個体間の関係性を最大で $N-1$ 次元空間で表現していることになる。IBS 距離行列の持つ多次元情報を、より情報量が多く、個体間の関係性 (特に離れ具合に着目する) を有効に表現できる低次元射影を可視化する 1 つの方法として、多次元尺度法 (multidimensional scaling) がある。これは統計解析パッケージ R (<http://www.r-project.org>) などを用いれば簡単に実行できる。多次元尺度法を日本人標本と韓国人

図2 日本人標本と韓国人標本からなるデータに対する多次元尺度法の適用例



欧米人やアフリカ人などと比べると相対的に非常に小さなスケールでの違いであるが、くっきりと分離している。この程度の違いでもアレル頻度分布は劇的に異なる。プロット上部の韓国人標本の2個体は、類似性が比較的高く、ほぼ第2親等程度の血縁関係が示唆される。そのため、その個体対の距離が主クラスターに属する個体との距離に比べて相対的に小さすぎてしまい、はずれた点に位置する結果となったと考えられる。なお、縦軸と横軸のスケールの違いにも注意されたい。

標本からなるサンプルに適用した例を図2に示す。日本人と韓国人では集団に大きな違いがあることが見て取れるだろう。

おわりに

ここまで述べたことの繰り返しになるが、多因子疾患の遺伝解析は今、時代の大きなうねりの中にある。ゲノム全域アソシエーション・スタディにより、わずかな差であるが確実な遺伝子多型を検出できるようになり、新たな治療法の開発、予防法の開発が加速されることは疑いない。疾患遺伝子研究は収穫期を迎えている。今は刈り込みに集中する時期かもしれないが、得られた成果をどのように利用するか、

特に遺伝子間相互作用の検出など開発すべき問題が山積みである。

文 献

- 1) Risch N, et al: The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517, 1996.
- 2) The Wellcome Trust Case Control Consortium: Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-678, 2007.
- 3) Lander ES: The new genomics: global views of biology. *Science* 274: 536-539, 1996.
- 4) Cohen JC, et al: Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 305: 869-872, 2004.

4

Derivation of human embryonic stem cell lines

STEPHEN SULLIVAN¹, DIETER EGLI¹, HIDENORI AKUTSU², DOUGLAS A. MELTON³, KEVIN EGGAN¹ AND CHAD A. COWAN⁴

¹*Stowers Medical Institute and Harvard Stem Cell Institute, Department of Cellular and Molecular Biology, Harvard University, 7 Divinity Avenue, SF 457, Cambridge, MA 02138, USA*

²*National Research Institute for Child Health and Development Department of Reproductive Biology 2-10-1 Okura, Setagaya, Tokyo 157-8535, Japan*

³*Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, 7 Divinity Avenue, Cambridge, MA 02138, USA*

⁴*Massachusetts General Hospital, Center for Regenerative Medicine, Cardiovascular Research Center, and Harvard Stem Cell Institute, Richard B. Simches Research Center, 185 Cambridge Street, Boston, MA 02114, USA*

Introduction

Human embryonic stem cells are culture artifacts derived from ICM cells placed in a culture system selecting for the capacity to proliferate. They are an important new experimental system for studying human development and modelling human disease (Trounson, 2005). There is, and will continue to be, a need for deriving new human ES cell lines for both basic research and clinical applications due to loss of genetic and epigenetic stability during human ES cell culture and manipulation (Cowan *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2006; Buzzard *et al.*, 2004; Maitra *et al.*, 2005) and the considerable variance within the human genome between individuals (Redon *et al.*, 2006).

It is still not known why specific lines have different levels of robustness and proclivities to differentiate into specific lineages, although variables in culture history and genetic background of the lines will likely play a large part (Allegrucci and Young, 2006). How such variables affect these innate characteristics of the lines is currently a focus of interest in the field. There is also interest in how ICM cells change in culture to become human ES cells and how these cells can change in culture. The more lines that are generated, the clearer an idea we will have as to what is happening.

Traditionally, human ES cells have been derived from day 5/day 6 blastocysts and propagated on mouse feeder layers. Using the method presented here, components of animal origin are present in the culture; however, this is likely only to be a concern for clinical applications. At present, this derivation method is still a robust method

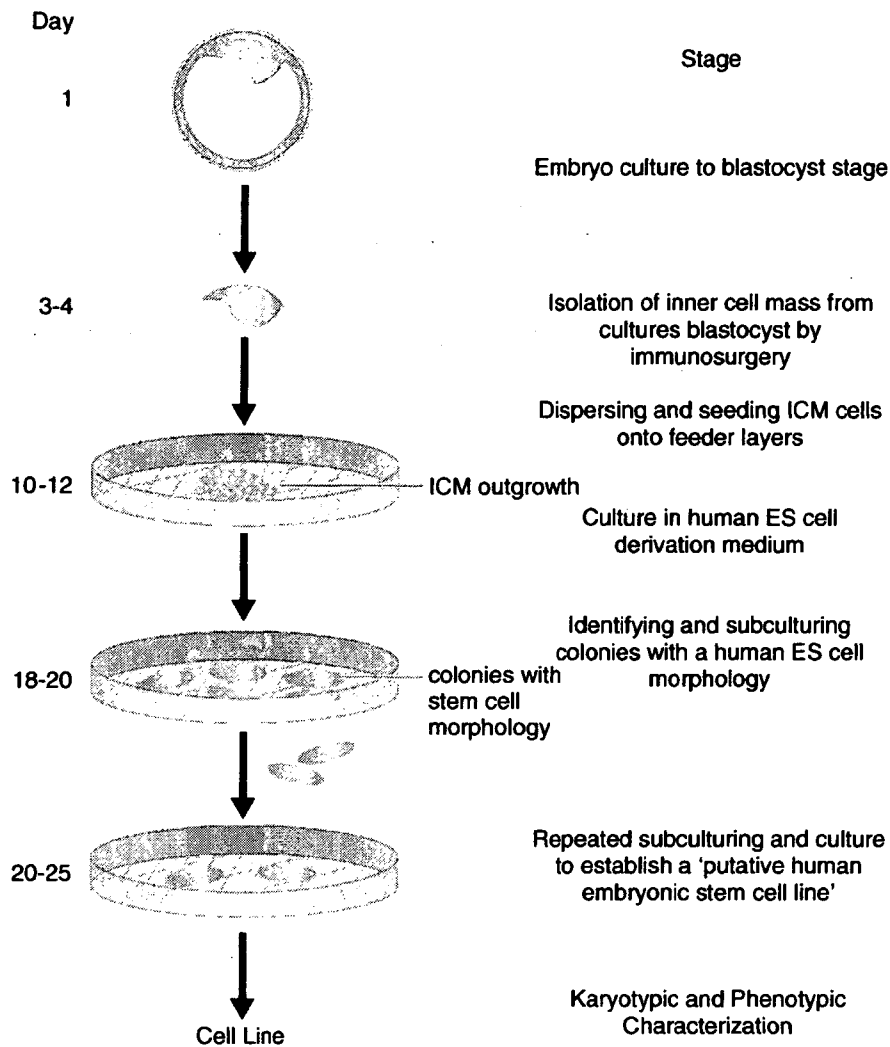


Figure 1 Overview of human embryonic stem cell derivation. Deriving new human ES cell lines requires more than 3 weeks uninterrupted and focused effort. Human embryos are cultured to blastocyst stage as described in Chapter 3. The ICM is removed from the blastocyst by immunosurgery and large clumps of ICM cells are transferred to a good quality feeder layer. After several days, ICM outgrowths will appear. Those with a human ES cell morphology (i.e. cells with prominent nucleoli tightly packed together, growing in a flat 2-D morphology) are isolated and subcloned. Successive culture and subcloning produce 'putative human ES cell lines'. These should be extensively characterized (see Chapters 7, 8, 9 and 10 for details) to verify they are new human ES cell lines.

for deriving new human ES cell lines, requiring fewer embryos than for derivations under xeno-free conditions (Lee *et al.*, 2006). Given the scarcity of human embryos available to most laboratories worldwide, this method will likely be the most used protocol for some time to come. This process of derivation consists of several steps that are highlighted in **Figure 1**.

Overview of protocol

This chapter assumes the human embryos have been cultured to blastocyst stage as described in **Chapter 3**. The derivation process lasts typically between 3 and 6 weeks and involves preparation of mitotically-inactivated feeder layers, isolation of the inner cell mass (ICM) from cultured blastocysts, seeding the ICM clumps on feeders layers, culturing these explants in human ES cell derivation medium and subculturing resulting outgrowths bearing a human ES cell morphology.

Materials, reagents and equipment

Sterile phosphate buffered saline without Ca^{2+} and Mg^{2+} (PBS), pH 7.2 (INVITROGEN/GIBCO, Cat#1404-133)

Gelatin, Type A from porcine skin (SIGMA Cat#G1890)

10 and 15 cm tissue culture dishes (FALCON, Cat#35-3005 and Cat#35-3025 respectively)

Industrial single-edged razor blades (VWR, Cat#55411-050)

Knockout Dulbecco's modified Eagle medium (Knockout DMEM; INVITROGEN/GIBCO, Cat#10829)

KO-Serum Replacement (INVITROGEN/GIBCO, Cat#10828-018)

Plasmanate (BAYER, Cat#0026-0613-20)

Fetal bovine serum (HYCLONE, Cat#SH30070.03)

Glutamax-I (INVITROGEN/GIBCO, Cat#35050-061)

Non-essential amino acids (INVITROGEN/GIBCO, Cat#11140050)

50 units/mL penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (INVITROGEN/GIBCO, Cat#15070-063)

β -mercaptoethanol (INVITROGEN/GIBCO, Cat#21985-023)

12 ng/mL recombinant hLIF (CHEMICON INTERNATIONAL, Cat#LIF1010)

basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, INVITROGEN/GIBCO, Cat#13256-029)

0.05% trypsin/EDTA (INVITROGEN/GIBCO, Cat# 25300-054).

Acid tyrodes (SPECIALTY MEDIA, Cat#MR004-D)

Derivation media (SIGMA, Cat#S1-1939)

Collagenase IV (INVITROGEN/GIBCO, Cat#21985-023)

Rabbit anti-human RBC antibodies (INTERCELL TECHNOLOGIES, Cat#AG28840)

Guinea pig sera complement (SIGMA, Cat#S1639)

Isopropanol

0.22 μ m 500 mL steritop filter units (MILLIPORE Cat#SCGPS05RE)

Mitomycin C (Sigma Cat#M-0503)

Mycoalert Mycoplasma Detection Assay (Cambrex, Cat#LT07-218)

Equipment

37°C water bath

Flame pulled thin capillaries

Mouth-controlled suction device or Stripper micropipettor (MID-ATLANTIC DIAGNOSTICS Cat#MXL3-STR) with 175 μ m capillary tubes (MID-ATLANTIC DIAGNOSTICS Cat#MXL3-175)

Dissection microscope

Inverted microscope

Heated microscope stage

Laminar air hood with a HEPA filter

Tissue culture incubator

CO₂ monitor

Thermometer

Hygrometer

Sterile door strips/ gloves/

Media/Solutions

MEF Medium (90% Dubelbecco's Modified Eagles Medium, 10% Fetal Bovine Serum, 50 units/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin).

Freezing Medium (90% Fetal Bovine Serum, 10% DMSO)

Human ES cell derivation medium (80% Knockout DMEM, 10% KO-Serum Replacement, 10% Plasmanate, 2 mM Glutamax-I, 1% non-essential amino acids, 50 units/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin, 0.055 mM beta-mercaptoethanol, and 5 ng/mL bFGF).

Human ES cell growth medium (80% Knockout DMEM, 20% Serum Replacement, 4 ng/mL bFGF, 2 mM Glutamax-I, 0.055 mM beta-mercaptoethanol)

Complement solution (dilute sera complement 1:10 in human ES cell derivation medium prior to use. Aliquot prior to use.)

0.1% Gelatin (1 g gelatin in 1 L MilliQ quality water, followed by sterile filtering)

Mitomycin C solution (1 mg mitomycin C powder is dissolved in 100 mL KO-DMEM and filter sterilized. Aliquot prior to use.)

Protocols

Derivation of mouse embryonic fibroblasts (MEFs)

Cull a pregnant ICR mouse (12.5–13.5 days post coitum) in accordance with local animal welfare guidelines. Use two methods of culling (e.g. CO₂ or avertin exposure followed by cervical dislocation) to verify the animal is dead prior to dissection.

1. Place the mouse facing upward on the bench and soak its fur with 70% ethanol. Soaking the fur minimizes the risk of contamination with mycoplasma and other organisms and also prevents fur getting in the way of the dissection.
2. Dissect the abdomen, unravelling and pushing the intestinal tract to one side to reveal the uterine horns. Extract the uterine horns by snipping above the genitalia and just below the ovaries as shown in **Figure 2(A)**.
3. Transfer the uterine horns to a fresh dish of 1× PBS supplemented with 1× Pen/Strep (PBS+P/S). Cut the uterine wall between individual embryos and using a forceps, tease the embryos into the PBS+P/S by tearing the mesometrium with two sets of sharp tipped forceps. Day 12.5–13.5 embryos should resemble those shown in **Figure 2(B)**.
4. Transfer the embryos to a fresh 10 cm Petri dish with 10 mL PBS+P/S. Hold the head of the embryo with one pair of blunt forceps, and carefully remove all the red viscera using sharp forceps with a pecking motion.
5. Cut off the limbs and tail of the embryo using the forceps. Finally, remove the head of the embryo and transfer the remaining trunk to a new Petri dish with PBS+P/S.
6. Mince the eviscerated embryo sections very well with two razor blades and transfer the pieces to several milliliters of prewarmed 1× trypsin EDTA (2 mL/embryo). Triturate the cells continuously until the trypsin solution becomes cloudy with liberated cells. Be careful not to over-trypsinize the cells as this will lead to lysis, clumping and loss of cells. About 5 minutes continuous vortexing of the embryo pieces should be sufficient.
7. Neutralize the protease with MEF medium (1 mL/embryo) (serum in the medium contains trypsin inhibitor and so stops the reaction).
8. Let the cell suspension sit for 5 minutes. Adipose tissue will generally float to the top of the supernatant, and cell clumps will fall down to form a pellet. Remove

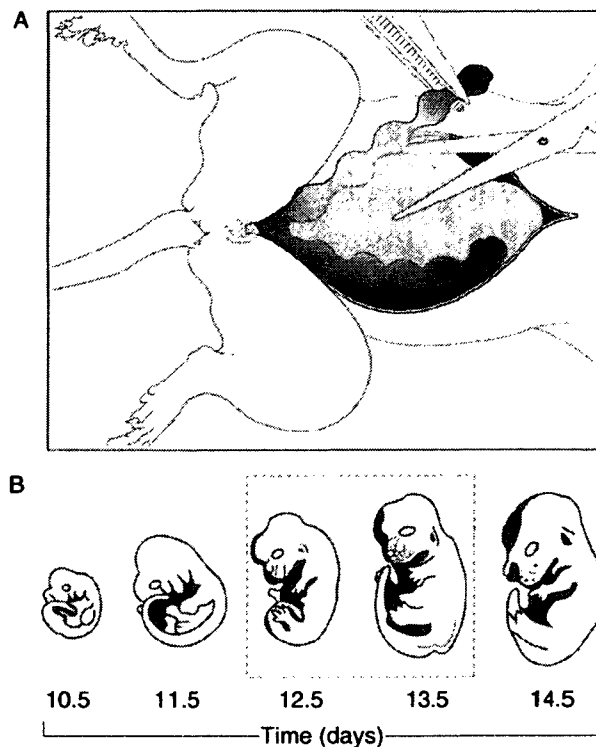


Figure 2 Murine embryo extraction for feeder preparation. (A) The uterus from a 12.5–13.5 dpc pregnant mouse is removed as follows: After a longitudinal section is made from above the diaphragm to the genitalia, the intestinal tract is unwound and pushed to one side, revealing the uterine horns behind. The uterine horns are held up with forceps and a sharp scissors is used to snip the mesometrium so they can be separated from the abdominal cavity. Subsequently, the embryos are removed from the uterine horns. (B) Typical embryos from day 12.5 to 13.5: the embryos should be similar in size and development to those shown.

the fat with a pipette, and carefully transfer the cell suspension to a fresh 15 mL centrifugation tube without disturbing the pellet.

9. Pellet the cells by centrifugation (300 g /~1,000 rpm for 5 min).
10. Resuspend the cells in MEF medium (1 mL/embryo). Measure cell number by counting an aliquot of the cells using a haemocytometer and seed the flask or dish to be used for generating feeder layers with 1×10^5 MEFs/cm².
11. Add additional MEF medium to the dishes/plates so the medium is at least 0.5 cm in depth.