

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、どちらだろうか。

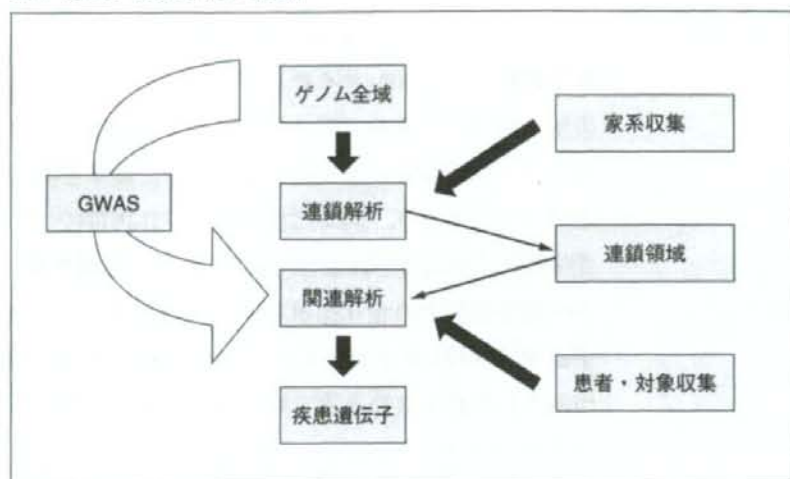
#### 多因子疾患の遺伝要因を同定する困難さ

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な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同胞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<sup>1)</sup>。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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>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<sup>2)</sup>。対象となった疾患は躁うつ病、冠動脈疾患、クローン病、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<sup>®</sup>が採用されている。統計解析は Armitage trend test を用いており、 $5 \times 10^{-7}$ 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、クローン病で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<sup>3)</sup>。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、頻度が低い効果が強いことが示されている<sup>4)</sup>。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	$5.4 \times 10^{-15}$	1.2	500k SNPs	2007	Broad Institute	Science 316, 1331-1336
		<i>CDKN2A/CDKN2B</i>						
		rs20769013	$4.1 \times 10^{-11}$	1.12				
		<i>CDKAL1</i>						
		rs7903146	$1.0 \times 10^{-68}$	1.37				
		<i>TCF7L2</i>						
		rs780094	$3.7 \times 10^{-8}$					
		<i>GCKR</i>						
		replicated			500k SNPs	2007	Zeggini et al.	Science 316, 1336-1341
2型糖尿病	1,924 cases, 2,938 controls 3,757 cases, 5,346 controls 1,161 cases, 1,174 controls	replicated			315k SNPs	2007	Scott et al.	Science, 316, 1341-1345
		rs7903146	$1.5 \times 10^{-34}$	1.65	393k SNPs	2007	Sladek et al.	Nature 445, 881-885
		<i>TCF7L2</i>						
		rs1326634	$6.1 \times 10^{-8}$	1.53				
2型糖尿病	1,399 cases, 5,275 controls	<i>SLC30A8</i>						
		rs7903146			300k SNPs	2007	Steinthorsdottir et al.	Nat Genet 39, 770-775
		<i>TCF7L2</i>						
		rs7756992	$7.7 \times 10^{-9}$	1.2				
肥満	38,759 participants	<i>CDKAL1</i>						
		rs9939609	$3 \times 10^{-35}$	1.67	400k SNPs	2007	Frayling et al.	Science 316, 889-894
		<i>FTO</i>						
冠動脈疾患	322+311 cases, 312+326 controls 23,000 participants 4,587 cases, 12,767 controls	rs10757274	$1.2 \times 10^{-20}$	1.28	100k SNPs	2007	McPherson et al.	Science 316, 1488-1491
		<i>CDKN2A/CDKN2B</i>			300k SNPs	2007	Helgadóttir	Science, 316, 1491-1493
					308k SNPs	2006	Duerr et al.	Science 314, 1461-1463
クローン病	567+547 cases, 571+548 controls	rs2066843	$2.86 \times 10^{-9}$					
		<i>CARD15</i>						
		rs11209026	$5.05 \times 10^{-9}$					
クローン病	735 cases, 368 controls	<i>IL23R</i>						
		rs2241880	$4.0 \times 10^{-8}$		200k SNPs	2007	Hampe et al.	Nat Genet 39, 207-211
		<i>ATG16L1</i>						

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	$6.4 \times 10^{-8}$		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	$7.9 \times 10^{-8}$					
乳癌	1,600 cases, 11,563 controls 4,554 cases, 17,577 controls	rs2981582 FGFR2	$2 \times 10^{-76}$	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	rs13387042	$1.3 \times 10^{-13}$	1.2	300k SNPs	2007	Stacey et al.	Nat Genet 39, 865-869
前立腺癌	1,453 cases, 3,064 controls	rs3803662	$5.9 \times 10^{-19}$	1.28	528k SNPs	2007	Hunter et al.	Nat Genet 39, 870-874
躁うつ病	1,172 cases, 1,157 controls	rs1219648 FGFR2	$1.1 \times 10^{-10}$	1.64	300k SNPs	2007	Gudmundsson et al.	Nat Genet 39, 631-637
冠動脈疾患	2,000 cases, 3,000 controls	rs1447295	$6.4 \times 10^{-18}$	1.53	550k SNPs	2007	Yeager et al.	Nat Genet 39, 645-649
クローン病	2,000 cases, 3,000 controls	rs6983267	$9.42 \times 10^{-13}$	1.26	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	rs420259 OALB2/NDUFAB1	$6 \times 10^{-8}$	2.08	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
1型糖尿病	2,000 cases, 3,000 controls	rs1333049 CDKN2A/CDKN2B	$1.8 \times 10^{-14}$	1.9	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
2型糖尿病	2,000 cases, 3,000 controls	rs11805303 IL23R	$6.45 \times 10^{-13}$	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	$7.1 \times 10^{-14}$	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	$4.9 \times 10^{-26}$	3.32	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	$1.1 \times 10^{-26}$	5.19	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
2型糖尿病	2,000 cases, 3,000 controls	rs17696736 ten genes	$2.17 \times 10^{-15}$	1.94	500k SNPs	2007	The Wellcome Trust Case Control Consortium	Nature, 447, 661-678
2型糖尿病	2,000 cases, 3,000 controls	rs4506565 TCF7L2	$5.7 \times 10^{-13}$	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 に耐えう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。

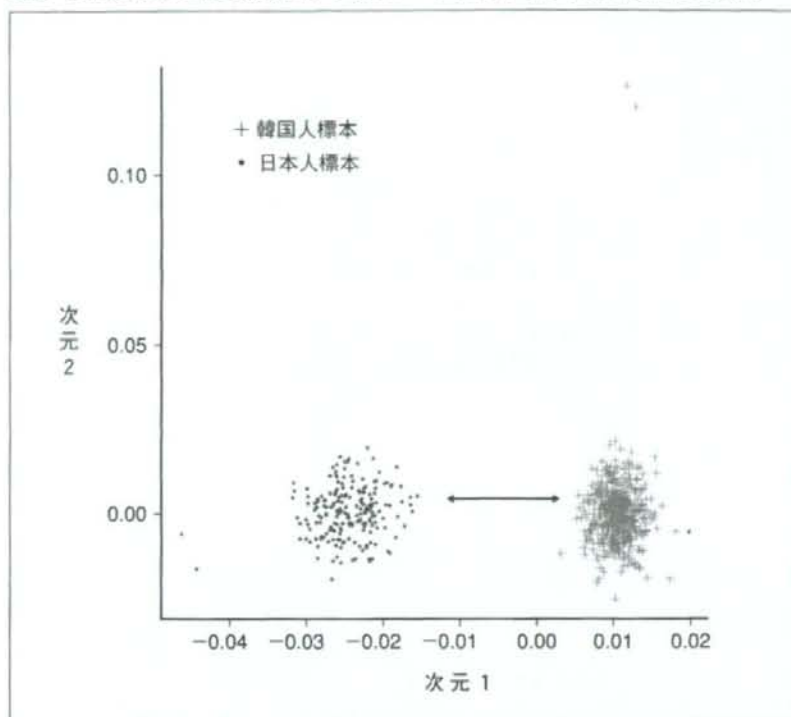
#### 集団の階層化

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 J.C, 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 SULLIVAN<sup>1</sup>, DIETER EGLI<sup>1</sup>, HIDENORI AKUTSU<sup>2</sup>, DOUGLAS A. MELTON<sup>3</sup>, KEVIN EGGAN<sup>1</sup> AND CHAD A. COWAN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*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*

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

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

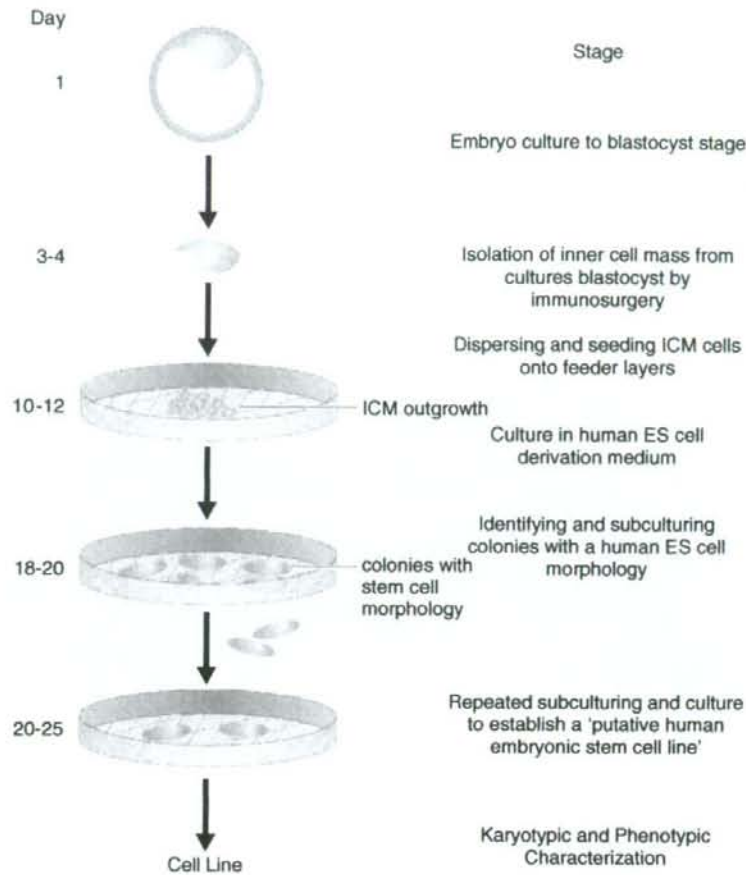
<sup>4</sup>*Massachusetts General Hospital, Center for Regenerative Medicine, Cardiovascular Research Center, and Harvard Stem Cell Institute, Richard B. Simches Research Center, 185 Cambridge Street, Boston, MA 02114, USA*

### 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  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (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)

$\beta$ -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  $\mu$ 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  $\mu$ 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

CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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)

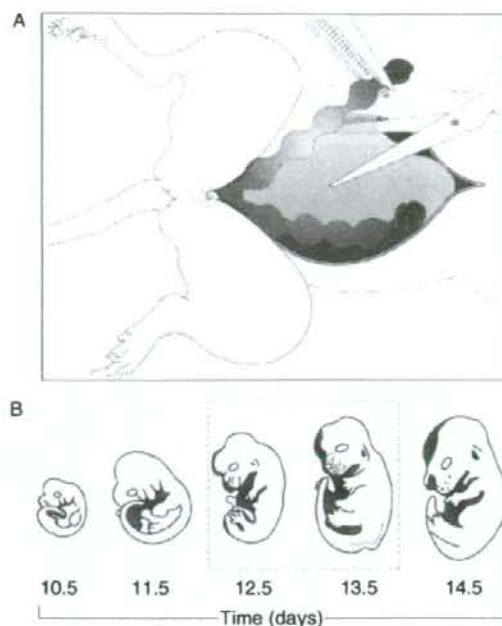
Mitomycin C solution (1 mg mitomycin C powder is dissolved in 100 mL KO-DMEM and filter sterilized. Aliquot prior to use.)

## 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. CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^5$  MEFs/cm<sup>2</sup>.
11. Add additional MEF medium to the dishes/plates so the medium is at least 0.5 cm in depth.

12. Leave the cells to sit down overnight in the incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) before expanding these cultures and mitotically inactivating them.

Note: Remember MEFs and other primary cell cultures are a common source of microbial contamination in the cell culture facility. To reduce the risk of contamination, always soak euthanized mice in 70% ethanol prior to embryo extraction, dip uterine horns in 70% ethanol before embryo removal, and culture the MEFs in medium supplemented with 1 × Pen/Strep for 2 days after the MEFs are derived.

Note: MEFs should be specifically screened for mycoplasma (See **Chapters 1 and 2** for more on mycoplasma) before being used as feeders for human ES cell culture. We recommend an enzymatic assay [Mycoalert mycoplasma detection kit made by Cambrex [www.Cambrex.com](http://www.Cambrex.com)] as a quick and straightforward way to screen cultures for mycoplasma. To increase the sensitivity of this assay, MEFs should have been cultured without antibiotics for at least 48 hr prior to the mycoplasma screening.

### Generation of mitotically-inactivated feeder layers

Proliferating MEFs will compete with human ES cells for media nutrients and space so feeder layers are mitotically-inactivated before human ES cells are seeded on them. There are two commonly-used ways to mitotically-inactivate MEFs: treatment with drug mitomycin C or exposure to  $\gamma$  irradiation.

#### *Mitomycin C treatment*

1. Culture the MEFs in 10  $\mu$ g/mL mitomycin C for 2 hr at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
2. It is important to wash as much mitomycin C away after the MEFs have been inactivated to form feeder layers, otherwise the human ES cells may themselves be affected by the drug. Aspirate the mitomycin C solution and wash the feeders thoroughly four times with PBS.
3. Disaggregate feeders with warm 0.25% trypsin/EDTA solution. It is important to minimize the exposure of the feeders to trypsin/EDTA as the cells will begin to senesce or lyse. After about 1 min, the cells will 'round up'. Repeatedly tap the flask off the bench to help dislocate the feeders and closely monitor them under the microscope to identify when most have been dislodged. All in all this process should take less than 2 min.
4. Add 0.5–1 volumes of serum-containing MEF medium to stop the trypsinization reaction. Pellet the feeders down by centrifugation (300 g/ $\sim$ 1,000 rpm, 5 min).
5. Seed flasks, dishes or wells with 1–2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>. Wash the cells three times in PBS to remove serum that will cause differentiation of human ES cells. Grow the cells in human ES cell medium overnight.



- If feeders are not immediately required or an excess has been generated, the cells should be frozen and stored in liquid nitrogen as described in **Chapter 5**.

#### *$\gamma$ irradiation*

- Culture freshly isolated MEFs to confluence and split 1:5 (generating passage 2 MEFs).
- Once these passage 2 MEFs are confluent, trypsinize and resuspend them in a few milliliters MEF media, (we routinely resuspend a pellet generated from a confluent T175 flask of MEFs into 3 mL MEF medium). Irradiate the MEF pellet for 25 min at 200–250 Rad/min for a total exposure of 5,000–6,250 Rad.
- Pellet the irradiated cells (300 g/ $\sim$ 1,000 rpm, 5 min).

#### Seeding feeder layers

- Treat the culture vessel with 0.1% gelatin and allow the gelatin to sit for at least 5 min before aspirating it off. This gelatine preparation prevents 'rolling-up' of confluent feeder layers.
- Mitotically inactivated MEFs should be seeded onto gelatinized culture vessels with a density of  $\sim$ 50,000 cells/cm<sup>2</sup>.

#### Isolation of the inner cell mass from cultured blastocysts

**Figure 3** shows high and low quality blastocysts prior to immunosurgery. Derivation efficiency is at a maximum when high-quality blastocysts are used. Immunosurgery



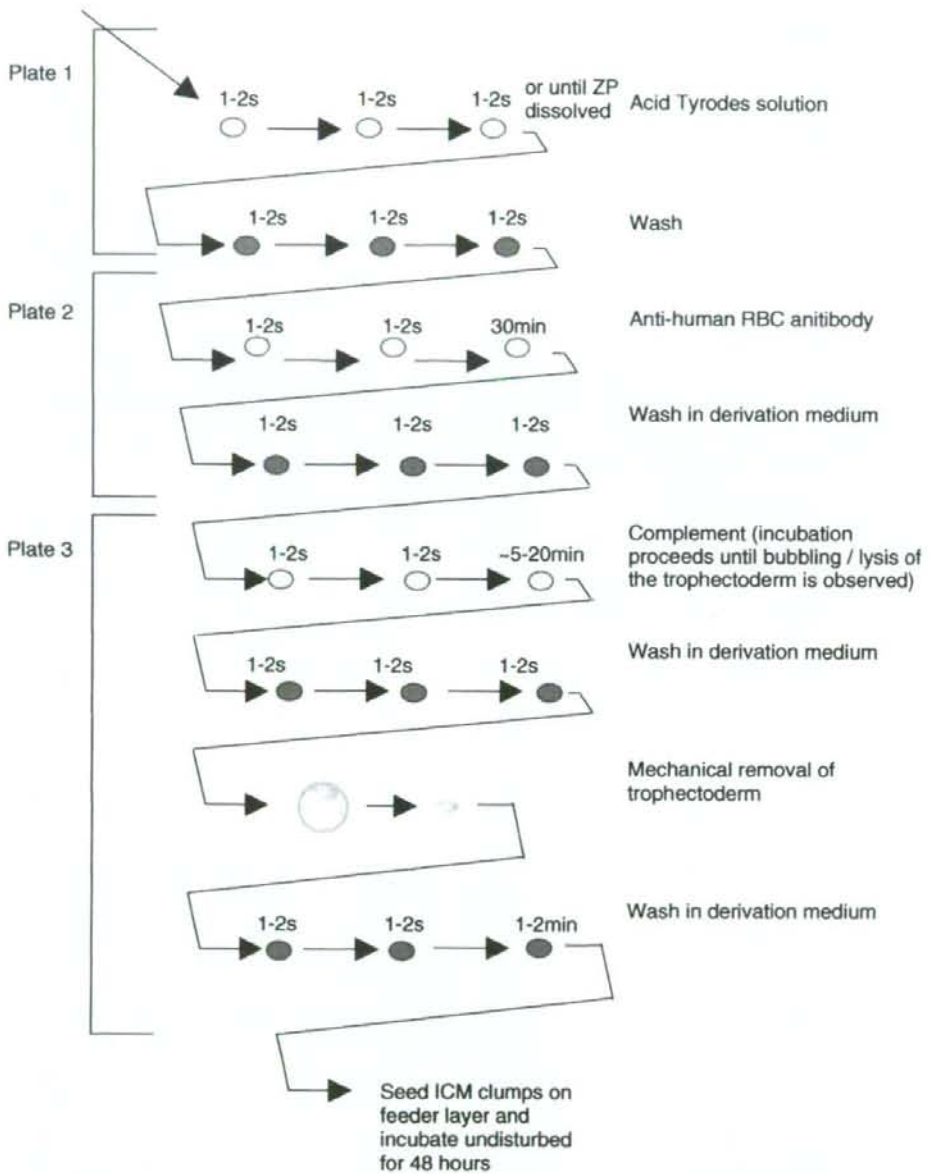
**Figure 3** Day 1 Embryos cultures to blastocyst stage. (A) A good quality blastocyst (there is obvious cavitation, and large numbers of cells in the ICM, no graininess or lysis). (B) shows a blastocyst with few ICM cells (this can still produce a human ES cell line). (C) shows a necrotic embryo (extensive graininess and lysis).

allows the removal of the ICM from individual blastocysts and consists of three main steps:

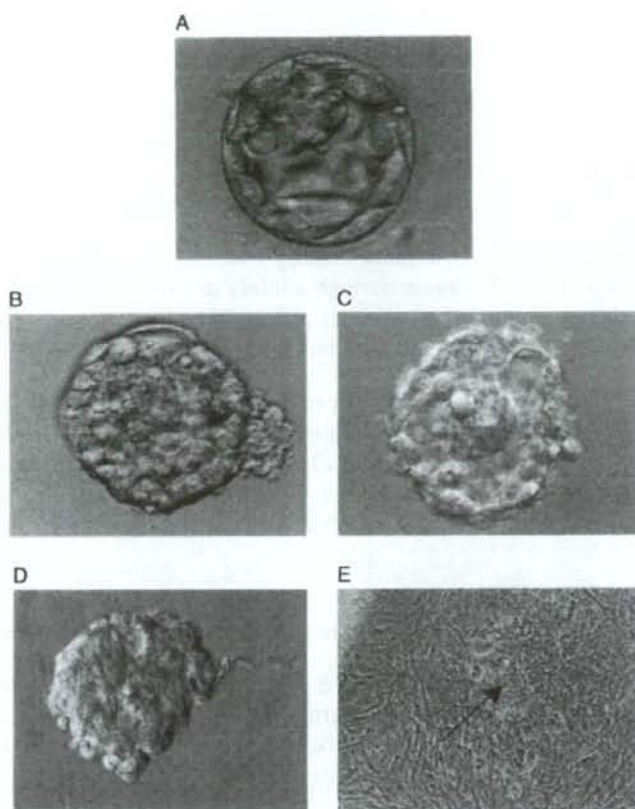
- (a) Dissolving the zona pellucida with acid tyrodes solution.
- (b) Selectively killing the trophoctoderm by complement-mediated lysis. The blastocyst is incubated with anti-human RBC antibody and subsequently complement. The cells of the trophoctoderm layer have tight junctions between them providing a physical barrier which protects the ICM cells such damage.
- (c) Removal of the ICM from the lysed trophoctoderm cells.

**Figure 4** shows an overview of the immunosurgery procedure and **Figure 5** shows blastocysts undergoing immunosurgery.

1. As the success of this procedure is dependent on exposing the blastocyst for the correct duration, and thus requires constant observation under the microscope, it is best to perform immunosurgery on one embryo at a time.
2. Prepare Petri dishes for embryo immunosurgery as follows: Make a series of 30  $\mu\text{L}$  microdrops across three plates (see **Figure 4**): three of acid Tyrodes solution, three of derivation medium in the first dish (Plate 1); three of antibody solution, three of derivation medium, and three of Complement in the second (Plate 2), and six of derivation medium for the third (Plate 3). The drops are covered with embryo-tested mineral oil (to prevent evaporation) and while Plate 1 is left at room temperature, Plates 2 and 3 are placed in an incubator (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C) for at least 1 hr and only removed directly prior to use.
3. Place a heating plate onto the stage of the dissection microscope and set the heating plate temperature to 37°C.
4. Prepare the mouth controlled suction device (assemble mouthpiece, rubber tubing, holder and glass pipette) and triturate  $\sim 200 \mu\text{L}$  FBS using the pipette. Coating the pipette with serum prevents the embryo sticking to the inside of the glass pipette during transfer. Avoid the aspiration of mineral oil into the glass pipette.
5. Remove dishes containing the embryo cultured to blastocyst stage, and the dish with microdrops from the incubator (See **Chapter 3** for details of human embryo culture). Locate the blastocyst under the microscope and transfer the embryo to the first microdrop of acid Tyrodes solution (AT) using a mouth pipette. Move the blastocyst from drop to drop as shown in **Figure 4**. The embryo should spend 1–2 s in each drop of AT. Watch the embryo carefully under the microscope as it is transferred from drop to drop. When the embryo has been transferred to the third drop of AT, the zona pellucida should have become thinner and be nearly digested. Transfer the embryo through the second row of microdrops containing derivation medium to neutralize the AT and then to the third row containing microdrops of the human antibody solution.



**Figure 4** Extracting ICM by immunosurgery. This schematic shows the various steps and incubation times for extracting the ICM from the blastocyst. The small ovals represent microdrops in the dishes between which the embryo is transferred. Acid Tyrodes treatment and initial washing of the embryo is done in Plate 1, antibody incubation, second washing and complement incubation is carried out in Plate 2. Additional washing and trophectoderm removal is carried out in Plate 3 after which the ICM is seeded on a feeder layer.



**Figure 5** Day 3–4 Isolation of inner cell mass from cultured blastocyst by immunosurgery. (A) Embryo before incubation acid tyrodes (AT) solution. (B) Embryo after AT incubation, see the thinning of the zona pellucida. (C) Collapsed embryo after immunosurgery, note the trophectoderm 'bubbling'. (D) ICM after stripping of lysed trophectoderm layer. (E) Clump of ICM cells attached to feeder layer.

6. Transfer the embryo from the first to the third drop of antibody solution (1–2 s in the first and second microdrops). Once the embryo is in the third drop of antibody solution, the dish is placed back in the incubator for 30 min.
7. Remove the dish and place it back on the heated stage. Resume transferring the embryo from drop to drop using the mouth pipette initially through the fourth row of derivation medium (to wash off excess antibody) and then the fifth row of complement (1–2 s in the first and second drops of complement). Once the embryo has been transferred into the third drop of complement, place the dish back in the incubator. Leave for 15 min.