

200906017A

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

新規生理活性ペプチドにより分化を抑制したヒト造血幹細胞増幅法に関する研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 杉山 大介

平成 22 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告 新規生理活性ペプチドにより分化を抑制したヒト造血幹細胞増幅法に関する研究 杉山大介	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	15
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	16

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

新規生理活性ペプチドにより分化を抑制したヒト造血幹細胞増幅法の開発に関する研究

研究代表者 杉山 大介

研究要旨

造血幹細胞は造血システムの最高位に位置し、自己複製能と多分化能を有する事で赤血球・白血球・血小板を持続的に供給し、生体のホメオスタシスを維持している。造血幹細胞移植療法は約30年前より臨床応用され、造血器疾患のみならず自己免疫疾患・悪性固形腫瘍・再生医療などに幅広く応用されている。現状では移植用造血幹細胞の供給源は自家骨髄・ドナー骨髄・臍帯血が使用されている。ドナー骨髄や臍帯血を使用する場合、移植造血幹細胞絶対数の不足・ドナー不足、更に免疫応答による生着不全・移植片対宿主病が問題になっており、より安全性の高い治療の開発が望まれている。したがって、自家骨髄由来自己造血幹細胞、人工多能性幹細胞由来自己造血幹細胞あるいは免疫反応が比較的少ない臍帯血造血幹細胞を試験管内で増幅してその絶対数を増やし移植出来れば、大きく現代医療の可能性が広がる。

現在までサイトカイン添加・遺伝子導入などによる増幅法が試みられて来たが、造血幹細胞の増幅効率・分化・腫瘍化が問題になり、臨床応用されていない。申請者は造血幹細胞の生理的増幅部位であるマウス胎仔肝臓より新規生理活性ペプチド（KS-13）を考案し、造血幹細胞の試験管内増幅に有効な知見を得た。KS-13は細胞内に取り込まれる事で細胞死を誘導する事無く分化を抑制する事が示唆されており、結合タンパクの解析では細胞シグナル・転写因子群・代謝・発生に関わるタンパク質との相互作用が確認されている。マウス胎仔肝臓造血幹細胞集団を用いて、サイトカインを含む培地に添加しコロニーアッセイを行

ったところ、容量依存的にコロニー形成を阻害しているにも関わらず、Mix コロニー（造血幹細胞に近い前駆細胞を反映する）のサイズは大きい傾向が認められ、分化が抑制されている知見が得られた。KS-13 をヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞集団へ添加培養し体外増幅を試みた所、コントロールに比し細胞数は増殖させないものの、既存のサイトカインによる造血幹細胞試験管内増幅法と遜色無く Mix コロニーの形成を増幅した。

そこで本研究提案では、KS-13 を応用した再生医療における革新的治療技術の開発を目指し、以下を目的とした研究を推進する。

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

A. 研究目的

造血幹細胞を体外に取り出して培養し、腫瘍化させることなく増幅する事が出来れば、移植関連問題の多くは解決され造血幹細胞移植療法の適応が広がる。更に将来的に iPS 細胞から誘導された臓器特異的幹細胞の移植療法開発へ発展し、新しい再生医療を開拓する可能性がある。

現在まで開発されてきた造血幹細胞増幅法においては、以下の問題点が挙げられる。

1. HoxB4 遺伝子を導入すると増幅するが、急性白血病が誘導される。
2. サイトカイン添加により成熟血球の分化が誘導され、造血幹細胞の未分化性維持が難しい。
3. 脱メチル化剤の添加で増幅効率は上がるが、エピジェネティクスに影響を与えるため安全性の確認が必要である。

造血幹細胞は自己複製能と多分化能という一見相反する能力を併せ持ち、サイトカインなどの刺激を受けて分化すると成熟血球が産生される。つまり造血幹細胞を増幅するためには、自己複製にアクセルをかけながら、様々な細胞系譜への分化にブレーキをかける必要がある。上記問題点を回避しながら新しい造血幹細胞増幅法を開発するため、申請者は造血幹細胞の生理的増幅部位であるマウス胎仔肝臓に発現するタンパク質を元に、分化を抑制する新規生理活性ペプチドを作製した (13 アミノ酸より成り KS-13 と命名)。マウス胎仔肝臓造血幹細胞 (CD45 陽性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性) 集団を用いて、サイトカインを含む培地に添加しコロニーアッセイを行ったところ、容量依存的にコロニー形成を阻害しているにも関わらず、Mix コロニーのサイズは大きい傾向が認められ、分化が抑制されている知見が得られた。KS-13 をヒト臍帯血 CD34 陽性造血幹細胞集団へ添加培養し体外増幅を試みた所、コントロールに比し細胞数は増殖させないものの、既存の造血幹細胞試験管内増幅法 (SCF, TPO, Flt3L, IL-6, sIL-6R) と遜色無く Mix コロニーの形成を増幅した。本研究提案では期間を2年に設定し、以下の研究成果を目標とする。

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

KS-13 は分化を抑制することでヒト臍帯血において Mix コロニーを増幅させることが示唆される。この効果を増強するために、種々のサイトカインとの組み合わせにより最適条件を検討する。同時に作用を増強する KS-13 の修飾体の開

発も行う。KS-13 添加培養で増幅された細胞は NOD/Scid マウスなどに移植し、造血系の再構築を評価する。また移植後長期に飼育し、腫瘍発生などに関して安全性の評価を行う。

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology)によりマウス胎仔造血幹細胞における KS-13 伝達経路の解析を行ったところ、細胞シグナル・転写因子群・代謝・発生に関わるタンパク質との相互作用が確認された。よって、タンパク質の抽出条件を変えながら再現性の確認を行う。また、マウス・ヒト造血幹細胞を用いて KS-13 添加液体培養を行い、培養前後のサンプルを用いて micro array により遺伝子発現の推移を検討する。発現パターンに大きな変化が認められたものでは real-time PCR も行い、遺伝子改変マウスの作製を検討する。

B. 研究方法

<平成21年度>

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

*マウス細胞を用いたコロニーアッセイによる培養条件の最適化

KS-13（特許申請中のため配列一部非公開）はマウスとヒトでホモロジーが高く、マウスで集積されたデータが直接的にヒトへ反映されやすい。マウス胎仔肝臓より採取した CD45(+)c-Kit(+)Sca-1(+)細胞を KS-13 添加条件でコロニーアッセイしたところ、分化抑制は容量依存性に認められ、高容量（30 μ g/mL）使用においても未だプラトーに達していない。PI 染色による Flow cytometry 解析や Trypan-Blue 染色を用いた死細胞の判定においても、コントロールに比し大きな変化はなく、細胞毒性が少ないこともわかっている。そこで、まずマウス細胞を用いて KS-13 の添加最高容量を同定する。次に、サイトカインの組み合わせにより、培養条件の最適化を行う。

*脂肪酸修飾体を用いた効果の検討

また、KS-13 は細胞内に取り込まれて機能を発揮している可能性がある。これは KS-13 が細胞表面のリガンドに結合し、KS-13 と一緒にリガンドが細胞質内に内在化するために取り込まれる事が示唆される。細胞膜への介入において、所謂“油と油”の親和性がその透過性に寄与していることがわかっており、細胞膜に対するアンカーを付与するため、脂肪酸修飾体を用いて増幅効率を比較検討する。

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

*MudPIT による KS-13 結合タンパクの解析

近年 MudPIT を用いてあるタンパクの結合タンパク群を一挙に同定する事が出来るようになった。そこで、biotin 標識した KS-13 を胎齢 12.5 日目肝臓細胞と反応させ、Streptavidin-Microbeads で反応後 MACS を用いてカラムに標識細胞を吸着させ、引き続き 0.1% Triton で細胞膜を破碎する。破碎後、尿素とグリシン両者で KS-13 に結合したタンパク質の抽出を行い、MudPIT で解析を行う。プレリミナリーデータでは代謝に関わるタンパク質との相互作用が推測されたため、再現性を確認する。

*Micro arrayによる遺伝子発現解析

KS-13 添加液体培養前後のサンプルを用いて micro array (illumina, Expression Beadchips WG-6) を行い、遺伝子発現の推移を検討する。発現パターンに大きな変化が認められたものでは real-time PCR で遺伝子発現の定量を行う。

*造血幹細胞増幅メカニズムの解析

micro array の結果に基づき、造血幹細胞増幅・分化過程において real-time PCR で候補遺伝子の発現定量を行う。発現パターンに大きな変化が認められた遺伝子を造血幹細胞へ導入し、増幅に与える影響を検討する。

<平成22年度>

平成21年度の継続に加え、以下の研究を推進する。

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

*コロニーアッセイによる培養条件の最適化

平成21年度で得られるマウスの知見を参考にして既に開発されているサイトカイン添加培養条件 (SCF, TPO, Flt3L, IL-6, sIL-6R) に KS-13 を添加し、ヒト臍帯血 CD34(+)細胞 (理研 BRC より入手) を用いて Mix コロニーが最も増幅される条件を同定する。

既に KS-13 単独添加 (10 μ g/mL) で良好な結果が得られており、サイトカインとの混合条件で増幅されない場合、KS-13 単独添加条件で研究計画を継続する。

*増幅ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞の造血再構築能と安全性の検討

最適条件決定後 NOD/Scid マウスなどに移植し、造血系の再構築を評価する。また、マウス造血幹細胞でも最適条件を検討し、移植後長期に飼育し腫瘍発生などに関して安全性の評価を行う。

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

*造血幹細胞増幅メカニズムの解析

マウスで同定された造血幹細胞増幅に関与すると考えられる遺伝子の発現を、ヒト細胞を用いて検討する。

また、良好な結果が得られた場合、その生理的意義を解析するために遺伝子改変マウスの作製も検討する。

(倫理面への配慮)

本実験計画を遂行するにあたり、遺伝子組換え実験と動物実験における承認を既に得ている。

遺伝子組換え実験計画承認番号：18-93

動物実験承認番号：18-065-3

C. 研究結果

Aim1 : KS-13 を用いたヒト臍帯血造血幹細胞増幅法の開発及び安全性の評価

*マウス細胞を用いたコロニーアッセイによる培養条件の最適化

マウス胎仔肝臓より採取した CD45(+)c-Kit(+)Sca-1(+)細胞を KS-13 添加条件でコロニーアッセイしたところ、ロット間による差は認められたが、50-100 μ g/mL の濃度において分化抑制効果はプラトーに達した。

*脂肪酸修飾体を用いた効果の検討

KS-13 の分子量を小さくする事で細胞内の取り込み増大を期待し、KS-13 の両末端を欠失した KS-12A, B を作製し、10 μ g/mL の濃度で分化抑制効果を検討したが、KS-13 を比較し、コロニー形成数に変化は認められなかった。次に、ミリスチン酸修飾体を用いて同様に効果を検討したところ、10 μ g/mL の濃度でオリジナルの KS-13 と同等の分化抑制効果を認めた。

*ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞への添加培養

ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞へ KS-13 を添加し、1 1 日間の液体培養後、コロニー形成法によりどの血球系統において分化・増殖の抑制効果が認められる検討した。KS-13 添加群と不添加群を比較したところ、骨髓球系細胞への分化・増殖抑制が優位である事が明らかになった。

*多能性幹細胞への応用

KS-13 は造血細胞の中でも、特に骨髓球系細胞の分化を有意に抑制する事が明らかになった。この性質を応用し、多能性幹細胞であるマウス胚性幹細胞より中胚葉系細胞を誘導し、KS-13 を添加し培養した。培養4日目には、造血幹細胞に近い細胞と考えられている、HPP-CFC (High Proliferative Potential Colony-Forming Cells) を誘導する事に成功した。マウス人工多能性幹細胞において造血活性が高い細胞株の選別に成功した事より、現在この細胞を用いた実験も行っている。

Aim2 : KS-13 作用メカニズムの解析

*MudPITによるKS-13結合タンパクの解析と造血幹細胞増幅メカニズムの解析

MudPIT (Multidimensional Protein Identification Technology) 法により KS-13 へ結合するタンパク質を解析したところ、造血幹細胞が赤血球へ分化する過程において、ある一定の発現パターンを示す物質を同定出来た。造血幹細胞が赤血球へ分化するにつれて発現が低下するパターン、中間段階で発現が亢進するパターン、分化するにつれて発現が亢進するパターンへ分類出来、KS-13 へ結合するタンパク群が、分化に関与する事が明らかになった。

* ビオチン標識 KS-13 を用いた取り込み機序の検討

マウス骨髄細胞をビオチン標識した KS-13 で処理し、造血幹細胞のマーカーである CD45、c-Kit、Sca-1 に対する抗体で染色し、Flow cytometry で解析すると、造血幹細胞の一部の集団へ取込まれる事が明らかになった。また、免疫染色法に準じて、マウス胎仔肝臓切片を用いて c-Kit に対する抗体と共に二重染色したところ、一部の c-Kit 陽性細胞において、細胞膜直下及び核内に KS-13 が取り込まれる事が明らかになった。

D. 考察

本研究提案では、KS-13 を応用した再生医療における革新的治療技術の開発を目指し、まずマウス細胞を用いて KS-13 の至適濃度を検討したところ、50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において分化抑制効果はプラトーに達した。この結果より、マウス細胞において KS-13 は効果を認めるものの、ヒト細胞において効果が認められた 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ よりも高い濃度で作用する事が示された。KS-13 は 13 アミノ酸から構成されるペプチドである。ビオチン標識 KS-13 を用いた染色結果からは、KS-13 はレセプターを介して作用するのではなく、Endocytosis により細胞内に取り込まれて作用を発揮する事が示唆された。そこで Endocytosis 促進に有効と考えられた改変体を作製しその効果を検討したところ、ミリスチン酸修飾体はオリジナルの KS-13 と少なくとも同等の効果を持つ事が示唆された。しかしながら、KS-13 の N 末端、C 末端より 1 アミノ酸削除した改変体では効果は認められなかった。ヒト細胞における検討では、骨髄球系細胞の分化・増殖抑制が認められた。現在多能性幹細胞から造血幹細胞を誘導する試みが注目されているが、未だ安全かつ高効率な誘導法は確立されていない。多能性幹細胞を造血細胞分化条件において培養すると、効率にマクロファージが産生される。そこで、KS-13 を用いて多能性幹細胞からマクロファージへの分化・増殖を抑えながら、他系統の細胞へ分化を誘導する事を試みたところ、良好な結果が得られた。今後更に検討する予定である。また、MudPIT 法により KS-13 シグナルを解析し、造血幹細胞の分化に関与すると考えられる候補遺伝子を複数同定した。よって、KS-13 は分化を抑制する物質としての使用方法だけではなく、新しい分化関連因子の同定へ応用が可能な事が明らかになった。

E. 結論

KS-13 はマウス・ヒト造血細胞に作用し、特に骨髓球系細胞への分化・増殖を抑制する。より活性が高い改変体は作製出来なかったが、臍帯血造血幹細胞の増幅及び多能性幹細胞からの造血幹細胞誘導へ繋がるデータが集積されつつある。更に、KS-13 シグナルより造血幹細胞を制御する新規因子の同定に成功しており、今後更なる研究の推進が期待される。

F. 健康危険情報

国民の生命、健康に重大な影響を及ぼすと考えられる研究成果は得られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kulkeaw K, Horio Y, Mizuochi C, Ogawa M and Sugiyama D.

Variation in hematopoietic potential of induced pluripotent stem cell lines.

Stem Cell Reviews and Reports (in press)

2. 学会発表

杉山大介、Kulkeaw, Kasem、佐々木達哉、水落ちよ、堀尾有可
胎生期造血における肝芽細胞の役割

第71回日本血液学会学術集会総会. 2009年10月23-26日, 京都
口頭発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称：造血幹細胞の増殖促進剤およびペプチド、ならびに造血幹細胞の増幅法（特願 2009-224088）

発明者：杉山大介

出願人：九州大学

出願日：2009年9月29日

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

別紙4

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

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
Kulkeaw K, Horio Y, Mizuochi C, Ogawa M and Sugiyama D.	Variation in hematopoietic potential of induced pluripotent stem cell lines.	Stem Cell Reviews and Reports	in press		2010

Variation in Hematopoietic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell Lines

Kasem Kulkeaw · Yuka Horio · Chiyo Mizuochi ·
Minetaro Ogawa · Daisuke Sugiyama

© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Induced pluripotent stem (iPS) cells were originally generated from somatic cells by ectopic expression of four transcription factor genes: *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*. Currently, iPS cell lines differ in tissue origin, the combination of factors used to construct them, the method of gene delivery and expression of pluripotency markers. Thus to evaluate iPS cells for haemotherapy, the hematopoietic potential among iPS lines should be compared. Here, we compare differentiation capacity of six iPS lines into mesodermal cells and hematopoietic cells (HCs) through embryoid body (EB) formation. We show that the mouse embryonic fibroblast (MEF)-derived iPS lines 20D17 and 178B5 resemble CCE ES cells in terms of morphology in culture, number and size of EBs and differentiation capacity into mesodermal cells compared to iPS cells derived from adults, although all iPS lines could form EBs. The number of

mesodermal cells differentiated from MEF-derived iPS cell lines showed a 3.9–407-fold increase compared to that from iPS lines derived from adults. Furthermore, 178B5 iPS cells generated Ter119⁺ erythroid cells (3.35%) efficiently in culture. We conclude that hematopoietic potential differs among the six lines and that MEF-derived 20D17 and 178B5 iPS cells generate HCs more efficiently than adult-derived iPS cells.

Keywords Induced pluripotent stem cells · Embryoid body · Differentiation · Mesodermal cells · Hematopoietic cells

Introduction

Ectopic expression of four transcription factors (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc*) can reprogram somatic cells into pluripotent cells exhibiting properties similar to embryonic stem (ES) cells [1]. Such induced pluripotent stem (iPS) cells resemble ES cells in morphology, ability to differentiate into numerous cell types, teratoma formation in immuno-deficient mice, and generation of chimeric mice with germline transmission [2]. iPS cells should become extremely valuable tools for regenerative medicine, developmental biology, and drug screening. *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc*-carrying retroviruses were first used for reprogramming of somatic cells [1]. Since both transduction of the *c-Myc* oncogene and retroviral infection are associated with malignancy, investigators have attempted to avoid using both, either by (1) omitting *c-Myc* [3], (2) using adenovirus [4], or (3) using plasmids to deliver genes into somatic cells [5]. To facilitate selection of iPS cells, *Fbx15* and *Nanog* reporter constructs have been used as pluripotency indicators. *Nanog*-selected mouse iPS cells are more similar to ES

Author Contributions Kasem Kulkeaw performed the experiments and analyzed data. Yuka Horio, Chiyo Mizuochi, and Minetaro Ogawa performed the experiments. Daisuke Sugiyama designed the experiments and wrote the manuscript.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12015-010-9150-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. Kulkeaw · Y. Horio · C. Mizuochi · D. Sugiyama (✉)
Department of Hematopoietic Stem Cells, SSP Stem Cell Unit,
Faculty of Medical Sciences, Kyushu University,
Station for Collaborative Research1 4F,
3-1-1 Maidashi, Higashi-Ku,
Fukuoka 812-8582, Japan
e-mail: ds-mons@yb3.so-net.ne.jp

M. Ogawa
Department of Cell Differentiation, Institute of Molecular
Embryology and Genetics, Kumamoto University,
2-2-1 Honjo,
Kumamoto 860-8011, Japan

Published online: 17 April 2010

cells than are Fbx15-selected cells in terms of gene expression, DNA methylation, and germline transmission [1, 2]. In addition to using varied transcription factors and reporters, investigators have reprogrammed different types of somatic cells such as mouse embryonic fibroblasts (MEFs), tail-tip fibroblasts (TTFs) [3], pancreatic β -cells [4], hepatocytes and gastric epithelial cells [6], B cells [7], and CD34⁺ cord blood cells [8, 9].

Investigators in the field of hematology have employed several methods to generate hematopoietic cells (HCs) from ES/iPS cells via mesodermal cells [10]. For example, ES cells can be induced to form embryoid bodies (EBs), cystic structures containing aggregates of endoderm, mesoderm, and ectoderm [11]. Myeloid and definitive erythroid cells are generated in EBs at differentiation days 6 to 10 [12, 13]. ES cells can also be directly co-cultured with OP9 stromal cells in the presence of cytokines to generate HCs [14, 15]. In addition, when ES cells are cultured on collagen type IV-coated dishes, Flk1⁺-mesodermal cells emerge, which further differentiate into HCs with additional culture time [16].

Efficient use of iPS cells for haematotherapy requires comparison of hematopoietic potential among iPS lines established by different methods. In the current study, we used EB formation to compare the differentiation capacity of mesodermal cells and HCs among six iPS cell lines of different origin and established by different methods.

Materials and Methods

ES and iPS Cell Maintenance

The origin of iPS cells, the method of induction, and reporters used for pluripotency analysis are summarized in Table 1. CCE ES and iPS cells were maintained on feeder cells,

mouse embryonic fibroblasts (MEFs), in StemMedium[®] (DS Pharma Biomedical, Hyogo, Japan) containing 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) and 1,000 U/ml mouse leukemia inhibitory factor (LIF) (prepared in Dr. Minetaro Ogawa's Laboratory). CCE ES and iPS cells were cultured in feeder-free conditions for 2–3 passages before differentiation.

Embryoid Body (EB) Formation

CCE ES and iPS cells (6×10^4) were cultured in 3 ml of Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO) containing 15% FBS (a pre-selected batch showing the highest efficiency in inducing HCs), 2 mM L-glutamine (SIGMA-ALDRICH), 0.0026% (vol/vol) monothioglycerol (MTG, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 50 μ g/ml L-ascorbic acid (Wako Pure Chemical Industries), 10 U/ml penicillin, and 10 μ g/ml streptomycin (SIGMA-ALDRICH). Petri dishes (60-mm in diameter, Kord-Valmark[™], Ontario, Canada) were used to generate EBs. On culture days 4, 5, and 6 cells were collected by gentle pipetting, washed once with PBS, and then incubated with Cell Dissociation buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA) at 37°C for 30 min. An equal volume of medium containing 10% FBS was added and mixed gently, and the cell suspension was passed through a 40-mm nylon mesh. The number of living cells was determined after staining with 0.4% Trypan blue (Life Technologies).

Flow Cytometry

To analyze mesodermal cells, cells were stained with an APC-conjugated anti-CD324 (E-cadherin) Ab (Alexa Fluor[®] 647, eBioscience, San Diego, CA), a Pacific Blue[™] anti-mouse Flk-1 (VEGFR2) Ab (BioLegend, San Diego, CA), a

Table 1 List of iPS cell lines

Cell lines	Origin and phenotype	Transcription factors	References
1. iPS-MEF-Ng-20D17	MEF-derived Nanog-GFP expression	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, T58A c-Myc</i>	[2]
2. iPS-MEF-Ng-178B5	MEF-derived Nanog-GFP expression	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4</i>	[3]
3. iPS-MEF-Ng-492B4	MEF-derived Nanog-GFP expression	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	[5]
4. iPS-TTF-DsRed-256H18	TTF-derived actb-DsRed expression	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4</i>	[3]
5. iPS-Hep-FB/gfp-98A-1	Hepatocyte-derived actb-GFP expression	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	[6]
6. iPS-Stm-FB/gfp-99-1	Gastric epithelial cell-derived actb-GFP expression	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc</i>	[6]

MEF mouse embryonic fibroblast, TTF tail-tip fibroblast, actb actin-beta

biotin-conjugated anti-mouse CD140 α (PDGFR α) Ab (eBioscience), and a PE-Cy7-conjugated anti-mouse c-Kit (CD117) Ab (eBioscience). After washing once in PBS, cells were incubated with streptavidin APC-Cy7TM (BD Biosciences, San Jose, CA). To stain dead cells, propidium iodide (PI, Life Technologies, Eugene, Oregon) was used for CCE ES and GFP-expressing iPS cells and TO-PRO[®]-1 iodide (515/531) (Life Technologies) was used for 256H18 iPS cells expressing DsRed. Cells were analyzed using a FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Data files were analyzed using FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA). For analysis of HCs, cells were stained with a APC-conjugated anti-mouse c-Kit Ab (BD Biosciences), a PE-Cy7-conjugated anti-mouse CD45 Ab (BioLegend), a biotin-conjugated anti-mouse CD71 (transferrin receptor) Ab (BD Biosciences) and PB-conjugated streptavidin (eBioscience), and an APC-Cy7-conjugated anti-mouse Ter119 Ab (eBioscience).

Cytology

Cytospin preparations were performed as follows: 5,000–10,000 cells were cytocentrifuged onto glass slides (Matsunami, Osaka, Japan) using a Shandon Cytospin[®]

3 cytocentrifuge (Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA) at 450 rpm for 7 min. Cells were observed under light microscopy after staining with May-Grünwald and Giemsa (Muto PureChemicals, Tokyo, Japan).

Results

iPS Cell Morphology and EB Formation

All iPS cell lines were cultured without feeder layers for 2–3 passages before induction of EB formation. Although 20D17, 178B5, and 492B4 iPS cells were maintained without feeder layers, they still expressed the pluripotency marker Nanog-GFP (Fig. 1). The morphology of all lines except 256H18 and Hep-98A-1 was similar to that of CCE ES cells in terms of roundness, large nucleoli, and low cytoplasmic content (Fig. 1). Morphologically, 256H18 iPS cells were not round, and Hep-98A-1 iPS cells were larger relative to other iPS lines (Fig. 1). All iPS cell lines were competent to form EBs, and their morphologies were similar to CCE ES cells (Fig. 2a). The size of EBs from

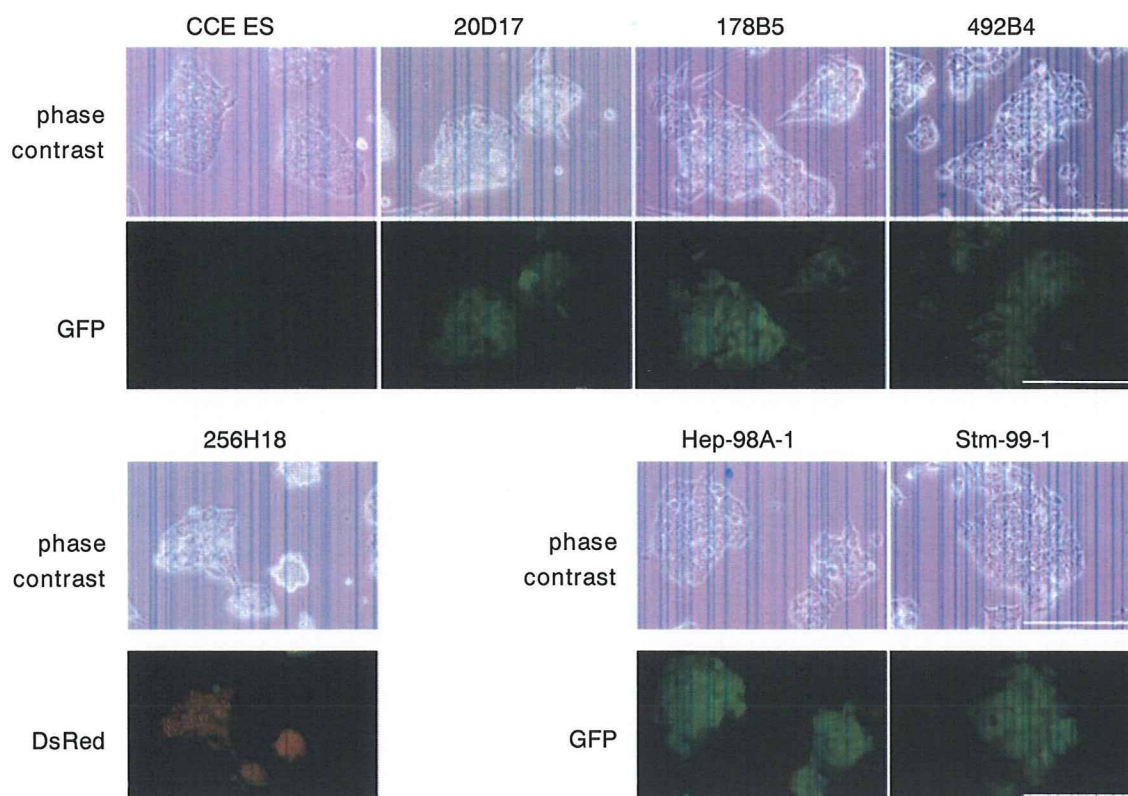


Fig. 1 Morphology of CCE ES and iPS cells. CCE ES and iPS cell lines maintained in feeder-free culture are shown by phase contrast, GFP fluorescence, and DsRed staining. MEF-derived iPS lines 20D17, 178B5, and 492B4 express Nanog-GFP. The adult somatic

cell-derived iPS line 256H18 constitutively expresses DsRed under control of the β -actin (*actb*) promoter, while Hep-98A-1 and Stm-99-1 constitutively express *actb*-GFP. Scale bars are 200 μ m