

lineages only on fibronectin or laminin. Thus, our findings suggested that laminin regulates mESCs differentiation into trophoblast in the defined culture condition. Previous studies using serum or serum replacement which contain a variety of ECM components most likely associated with an ill-defined cocktail of growth factors. We have suggested that serum hampers the elucidation of the biological mechanisms and gives rise to apparently different conclusions on the ability of ESCs to differentiate into trophoblast.

hESCs have been reported to express trophoblast markers after treatment with BMP4 in vitro (Xu et al. 2002). Previous studies reported that mouse epiblast stem cells or a subpopulation of epiblast-like mESCs express trophoblast markers in response to BMP4 (Brons et al. 2007; Hayashi et al. 2008). Mouse epiblast stem cells resemble hESCs more closely than mESCs (Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007; Hayashi et al. 2008). We have previously found polarized cell morphology and the upregulation of *Fgf5* expression and downregulation of some self-renewal marker gene expression in mESCs cultured on laminin or fibronectin (Hayashi et al. 2007). These are characteristics of epiblast cells. In this study, cells were treated with BMP4 on laminin in our defined culture conditions. Our findings suggest that the differentiation via an epiblast-like state is important for mESC differentiation into trophoblast, and BMP4 can induce from both human and mouse pluripotent stem cells to differentiate into trophoblast.

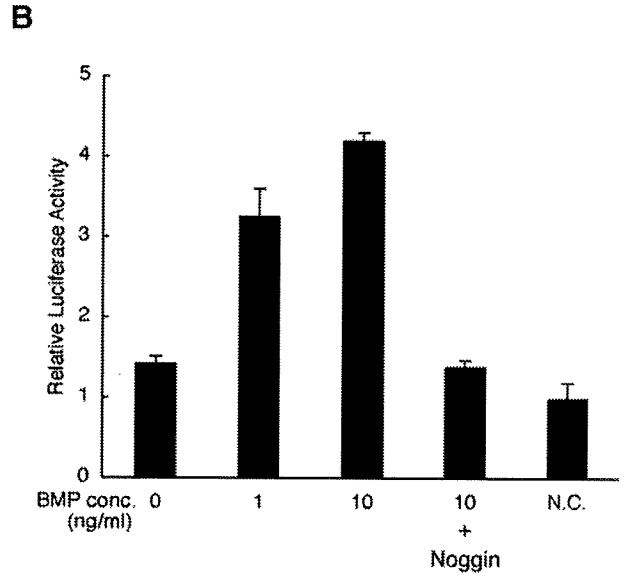
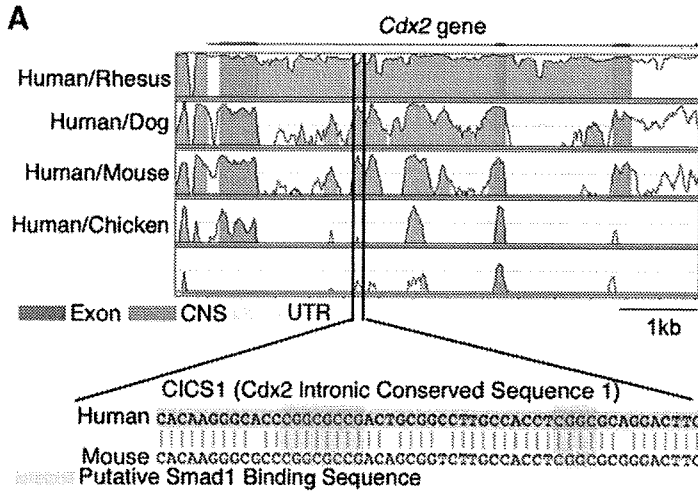
As described above, BMP4 is a key component promoting trophoblast differentiation from both mESCs and hESCs (Xu et al. 2002). These findings contradict previous reports in which BMP4 supported cell self-renewal. However, that was observed with BMP4 in conjunction with LIF (Ying et al. 2003; Qi et al. 2004). BMP4 supports mESC self-renewal by inhibiting neural differentiation which is not inhibited by LIF. We have shown in this study that LIF inhibits trophoblast differentiation by BMP4. These results suggest that LIF and BMP4 reciprocally inhibit differentiation of mESCs into neural or trophoblast lineages and lead to maintain self-renewal of mESCs. Previous studies have also reported that BMP4 is also thought to be involved in mesoderm differentiation from ESCs (Johansson and Wiles 1995; Wiles and Johansson 1999; Nostro et al. 2008; Sumi et al. 2008). These studies employed other signal activation by cytokines or tight cell–cell attachments. Our results suggest that BMP4 induces differentiation into trophoblast in defined conditions in the absence of other activating signals and that differentiation was perturbed by the addition of serum. Thus, BMP4 may function as trophoblast inducer when it acts alone and as mesoderm inducer when it is coordinated with other as yet unidentified signals.

Figure 7. Direct activation of *Cdx2* by BMP–Smad pathway. (A) Conserved sequence domain in the genomic region of *Cdx2* gene in vertebrates. Colored peaks (purple, coding; pink, non-coding) indicate the regions of at least 100 bp and 60% homology. Magnified sequence of CICS1 compared between human and mouse is shown in the bottom part. Putative Smad1 protein binding sequences (GCCG or CGGC) are enclosed in green box. (B) Dual-luciferase assay of CICS1 transcriptional activity by BMP4. The cells carrying the reporter vectors constructed with the sequence containing CICS1 were cultured in BMP4-supplemented ESF5 medium for 48 h. N.C. indicates empty vectors. The values are the mean \pm SEM ($n=4$). (C) EMSA of CICS1 bound by Smad1 and the cofactor, Smad4. (D) ChIP assays of CICS1 bound by pSmad1. Genomic fragments of CICS1, 4 kb upstream or 4 kb downstream regions bound by pSmad1/5/8 protein, were immunoprecipitated with anti-pSmad1/5/8 antibody and were analyzed by PCR. (E) Quantitative graphs of ChIP assays calculated from the ratio of the amount of bound anti-pSmad1 antibodies to the amount of control IgG. The values are the mean \pm SEM ($n=4$). * indicates $p<0.05$ by Student's *t* test.

We demonstrate that the BMP4–Smad pathway is involved in mESC differentiation into trophoblast. Components of BMP–Smad pathway are expressed in extraembryonic tissues and affect their development (Lechleider et al. 2001; Tremblay et al. 2001). Previous study reported that Nanog protein, which maintains mESC self-renewal, binds to Smad1 protein and inhibits the transcriptional activity of Smad1 protein in mESCs (Suzuki et al. 2006). Our results reveal that the expression of Nanog protein was absent from cells cultured with BMP4 in ESF5 but expressed in cells in the presence of LIF. Thus, *Nanog* expression induced by LIF might inhibit mESC differentiation into trophoblast.

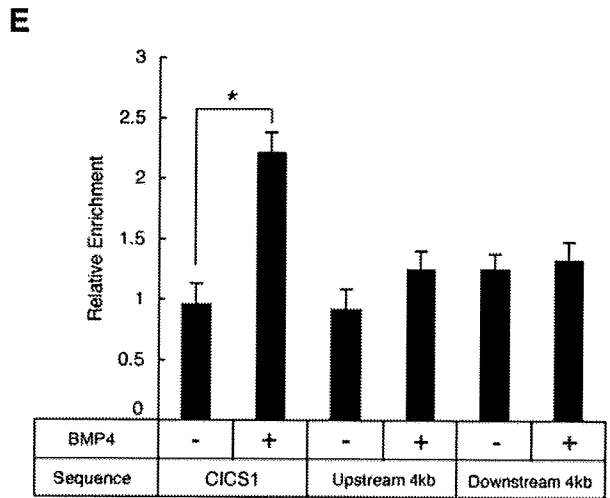
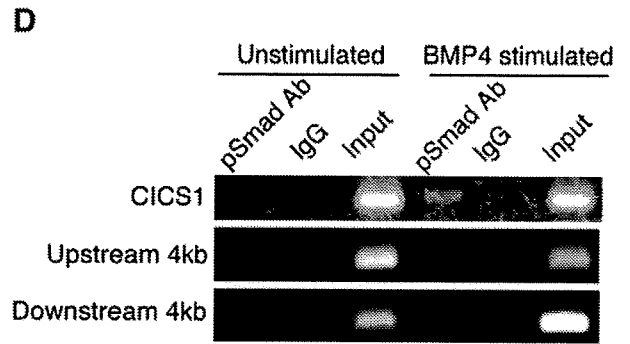
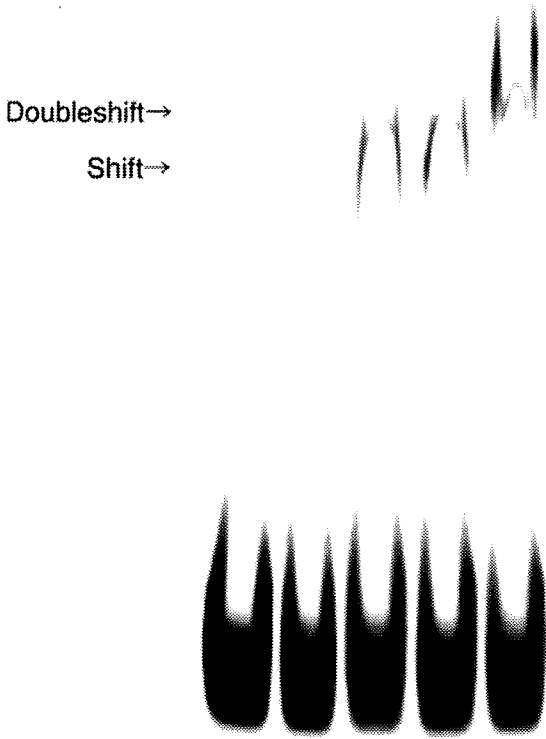
Our knockdown experiment showed that the cells which have reduced *Cdx2* expression did not express *Esx1*, *Psx1*, and *Cdh3*. *Cdx2* is essential for trophoblast lineages development in vivo (Niwa et al. 2005; Strumpf et al. 2005). Thus, our data imply that these cells may differentiate into cell lineages other than trophoblast. Although the characterization of these cell lineages is interesting for further experiment, they may be induced by BMP4 and not express *Cdx2*.

We also demonstrate that BMP–Smad pathway activates the *Cdx2* expression during the differentiation of mESCs into trophoblast and that the *Cdx2* expression is directly regulated by the BMP–Smad pathway through binding of Smad1 protein with evolutionary conserved intronic enhancer in *Cdx2* gene. Correlation between BMP–Smad pathway and *CDX2* expression is reported in human gastric cancer cell lines (Barros et al. 2008). Together with the fact that BMP4 increases the trophoblast marker gene expression in hESCs (Xu et al. 2002), we conclude that common developmental and molecular mechanisms are involved in the differentiation of mammalian pluripotent stem cells into trophoblast. We believe that our methods and findings in this study provide a better understanding of the molecular mechanisms that regulate the differentiation of pluripotent



C

GST-Smad4				+	+
GST-Smad1			+		+
GST		+			
Probe	+	+	+	+	+



stem cells into trophoblast and placenta during early mammalian development.

Acknowledgements We would like to thank Prof. J. Rossant for the valuable comments and discussions on the manuscript and Drs. T. Yokota and K. Imamura for generously providing plasmid vectors. This study was supported by the following: Grants-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan to M.K.F. and M.A.; Grants from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. to M.A.; Grants-in-aid for scientific research from the Japan Society for the Promotion of Science to Y.H. and H.D.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Anson-Cartwright L.; Dawson K.; Holmyard D.; Fisher S. J.; Lazzarini R. A.; Cross J. C. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat Genet* 25: 311–314; 2000.
- Barros R.; Pereira B.; Duluc I.; Azevedo M.; Mendes N.; Camilo V.; Jacobs R.; Paulo P.; Santos-Silva F.; van Seuning I.; van den Brink G.; David L.; Freund J. N.; Almeida R. Key elements of the BMP/SMAD pathway co-localize with CDX2 in intestinal metaplasia and regulate CDX2 expression in human gastric cell lines. *J Pathol* 215: 411–420; 2008.
- Beddington R. S.; Robertson E. J. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105: 733–737; 1989.
- Brons I. G.; Smithers L. E.; Trotter M. W.; Rugg-Gunn P.; Sun B.; de Sousa C.; Lopes S. M.; Howlett S. K.; Clarkson A.; Ahrlund-Richter L.; Pedersen R. A.; Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191–195; 2007.
- Chun J. Y.; Han Y. J.; Ahn K. Y. Pbx homeobox gene is X-linked and specifically expressed in trophoblast cells of mouse placenta. *Dev Dyn* 216: 257–266; 1999.
- Cross J. C.; Flannery M. L.; Blannar M. A.; Steingrimsson E.; Jenkins N. A.; Copeland N. G.; Rutter W. J.; Werb Z. Hxt encodes a basic helix–loop–helix transcription factor that regulates trophoblast cell development. *Development* 121: 2513–2523; 1995.
- Danno H.; Michiue T.; Hitachi K.; Yukita A.; Ishiura S.; Asashima M. Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5408–5413; 2008.
- Evans M. J.; Kaufman M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154–156; 1981.
- Faria T. N.; Ogren L.; Talamantes F.; Linzer D. I.; Soares M. J. Localization of placental lactogen-I in trophoblast giant cells of the mouse placenta. *Biol Reprod* 44: 327–331; 1991.
- Frazer K. A.; Pachter L.; Poliakov A.; Rubin E. M.; Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 32: W273–279; 2004.
- Furue M.; Okamoto T.; Hayashi Y.; Okochi H.; Fujimoto M.; Myoishi Y.; Abe T.; Ohnuma K.; Sato G. H.; Asashima M.; Sato J. D. Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41: 19–28; 2005.
- Guillemot F.; Caspary T.; Tilghman S. M.; Copeland N. G.; Gilbert D. J.; Jenkins N. A.; Anderson D. J.; Joyner A. L.; Rossant J.; Nagy A. Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat Genet* 9: 235–242; 1995.
- Handyside A. H. Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 45: 37–53; 1978.
- Hayashi Y.; Furue M. K.; Okamoto T.; Ohnuma K.; Myoishi Y.; Fukuhara Y.; Abe T.; Sato J. D.; Hata R.; Asashima M. Integrins regulate mouse embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 25: 3005–3015; 2007.
- Hayashi K.; Lopes S. M.; Tang F.; Surani M. A. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* 3: 391–401; 2008.
- He S.; Pant D.; Schiffmacher A.; Meece A.; Keefer C. L. Lymphoid enhancer factor 1-mediated wnt signaling promotes the initiation of trophoblast lineage differentiation in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 842–849; 2008.
- Hogan B.; Tilly R. In vitro development of inner cell masses isolated immunosurgically from mouse blastocysts. II. Inner cell masses from 3.5- to 4.0-d p.c. blastocysts. *J Embryol Exp Morphol* 45: 107–121; 1978.
- Johansson B. M.; Wiles M. V. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 15: 141–151; 1995.
- Kunath T.; Saba-El-Leil M. K.; Almousaillekh M.; Wray J.; Meloche S.; Smith A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 134: 2895–2902; 2007.
- Lechleider R. J.; Ryan J. L.; Garrett L.; Eng C.; Deng C.; Wynshaw-Boris A.; Roberts A. B. Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Dev Biol* 240: 157–167; 2001.
- Lescisin K. R.; Varmuza S.; Rossant J. Isolation and characterization of a novel trophoblast-specific cDNA in the mouse. *Genes Dev* 2: 1639–1646; 1988.
- Li Y.; Behringer R. R. Esx1 is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat Genet* 20: 309–311; 1998.
- Lu C. W.; Yabuuchi A.; Chen L.; Viswanathan S.; Kim K.; Daley G. Q. Ras-MAPK signaling promotes trophectoderm formation from embryonic stem cells and mouse embryos. *Nat Genet* 40: 921–926; 2008.
- Lu H.; Hesse M.; Peters B.; Magin T. M. Type II keratins precede type I keratins during early embryonic development. *Eur J Cell Biol* 84: 709–718; 2005.
- Luo J.; Sladek R.; Bader J. A.; Matthyssen A.; Rossant J.; Giguere V. Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta. *Nature* 388: 778–782; 1997.
- Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 7634–7638; 1981.
- Masui S.; Nakatake Y.; Toyooka Y.; Shimosato D.; Yagi R.; Takahashi K.; Okochi H.; Okuda A.; Matoba R.; Sharov A. A.; Ko M. S.; Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9: 625–635; 2007.
- Morasso M. I.; Grinberg A.; Robinson G.; Sargent T. D.; Mahon K. A. Placental failure in mice lacking the homeobox gene Dlx3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 162–167; 1999.
- Ng Y. K.; George K. M.; Engel J. D.; Linzer D. I. GATA factor activity is required for the trophoblast-specific transcriptional regulation of the mouse placental lactogen I gene. *Development* 120: 3257–3266; 1994.
- Nishioka N.; Inoue K.; Adachi K.; Kiyonari H.; Ota M.; Ralston A.; Yabuta N.; Hirahara S.; Stephenson R. O.; Ogonuki N.; Makita R.;

- Kurihara H.; Morin-Kensicki E. M.; Nojima H.; Rossant J.; Nakao K.; Niwa H.; Sasaki H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophoblast from inner cell mass. *Dev Cell* 16: 398–410; 2009.
- Niwa H.; Miyazaki J.; Smith A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372–376; 2000.
- Niwa H.; Toyooka Y.; Shimosato D.; Strumpf D.; Takahashi K.; Yagi R.; Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell* 123: 917–929; 2005.
- Nose A.; Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 103: 2649–2658; 1986.
- Nostro M. C.; Cheng X.; Keller G. M.; Gadue P. Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell* 2: 60–71; 2008.
- Qi X.; Li T. G.; Hao J.; Hu J.; Wang J.; Simmons H.; Miura S.; Mishina Y.; Zhao G. Q. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6027–6032; 2004.
- Russ A. P.; Wattler S.; Colledge W. H.; Aparicio S. A.; Carlton M. B.; Pearce J. J.; Barton S. C.; Surani M. A.; Ryan K.; Nehls M. C.; Wilson V.; Evans M. J. Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature* 404: 95–99; 2000.
- Schenke-Layland K.; Angelis E.; Rhodes K. E.; Heydarkhan-Hagvall S.; Mikkola H. K.; Maclellan W. R. Collagen IV induces trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 25: 1529–1538; 2007.
- Simmons D. G.; Cross J. C. Determinants of trophoblast lineage and cell subtype specification in the mouse placenta. *Dev Biol* 284: 12–24; 2005.
- Simmons D. G.; Rawn S.; Davies A.; Hughes M.; Cross J. C. Spatial and temporal expression of the 23 murine prolactin/placental lactogen-related genes is not associated with their position in the locus. *BMC Genomics* 9: 352; 2008.
- Smith A. G.; Heath J. K.; Donaldson D. D.; Wong G. G.; Moreau J.; Stahl M.; Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336: 688–690; 1988.
- Strumpf D.; Mao C. A.; Yamanaka Y.; Ralston A.; Chawengsaksophak K.; Beck F.; Rossant J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoblast in the mouse blastocyst. *Development* 132: 2093–2102; 2005.
- Sumi T.; Tsuneyoshi N.; Nakatsuji N.; Suemori H. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, activin/nodal and BMP signaling. *Development* 135: 2969–2979; 2008.
- Suzuki A.; Raya A.; Kawakami Y.; Morita M.; Matsui T.; Nakashima K.; Gage F. H.; Rodriguez-Esteban C.; Izpisua Belmonte J. C. Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10294–10299; 2006.
- Tanaka S.; Kunath T.; Hadjantonakis A. K.; Nagy A.; Rossant J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282: 2072–2075; 1998.
- Tesar P. J.; Chenoweth J. G.; Brook F. A.; Davies T. J.; Evans E. P.; Mack D. L.; Gardner R. L.; McKay R. D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448: 196–199; 2007.
- Tolkunova E.; Cavaleri F.; Eckardt S.; Reinbold R.; Christenson L. K.; Scholer H. R.; Tomilin A. The caudal-related protein cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 24: 139–144; 2006.
- Toumadje A.; Kusumoto K.; Parton A.; Mericko P.; Dowell L.; Ma G.; Chen L.; Barnes D. W.; Sato J. D. Pluripotent differentiation in vitro of murine ES-D3 embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39: 449–453; 2003.
- Tremblay K. D.; Dunn N. R.; Robertson E. J. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* 128: 3609–3621; 2001.
- Wen F.; Tynan J. A.; Cecena G.; Williams R.; Munera J.; Mavrothalassitis G.; Oshima R. G. Ets2 is required for trophoblast stem cell self-renewal. *Dev Biol* 312: 284–299; 2007.
- Wiles M. V.; Johansson B. M. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res* 247: 241–248; 1999.
- Williams R. L.; Hilton D. J.; Pease S.; Willson T. A.; Stewart C. L.; Gearing D. P.; Wagner E. F.; Metcalf D.; Nicola N. A.; Gough N. M. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336: 684–687; 1988.
- Xu R. H.; Chen X.; Li D. S.; Li R.; Addicks G. C.; Glenmon C.; Zwaka T. P.; Thomson J. A. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20: 1261–1264; 2002.
- Yamamoto H.; Flannery M. L.; Kupriyanov S.; Pearce J.; McKercher S. R.; Henkel G. W.; Maki R. A.; Werb Z.; Oshima R. G. Defective trophoblast function in mice with a targeted mutation of Ets2. *Genes Dev* 12: 1315–1326; 1998.
- Ying Q. L.; Nichols J.; Chambers I.; Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115: 281–292; 2003.
- Ying Q. L.; Wray J.; Nichols J.; Batlle-Morera L.; Doble B.; Woodgett J.; Cohen P.; Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453: 519–523; 2008.
- Zheng-Fischhofer Q.; Kibschull M.; Schnichels M.; Kretz M.; Petrasch-Parwez E.; Strotmann J.; Reucher H.; Lynn B. D.; Nagy J. I.; Lye S. J.; Winterhager E.; Willecke K. Characterization of connexin31.1-deficient mice reveals impaired placental development. *Dev Biol* 312: 258–271; 2007.

日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化：その2 分化能の評価

古江一楠田 美保

独・医薬基盤研究所・生物資源研究部門・細胞資源研究室
京都大学再生医科学研究所・附属幹細胞医学研究センター・細胞プロセッシング

要旨 1998年にヒト胚性幹 (ES) 細胞が樹立され、2007年にはヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞が開発された。これらの細胞を用いて、発生過程におけるメカニズムの解明、あるいは再生医療や創薬などへの応用にむけて、国内外で研究が盛んに進められている。ヒト ES 細胞は受精卵の内部細胞塊由来であることから、成体組織を構成するすべての細胞に分化する可能性をもつ。また、ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞様に分化能を有している。これらのことから、ヒト ES/iPS 細胞を樹立する際には、多能性の確認が重要であると言われている。この総説では、ヒト ES/iPS 細胞の分化能の評価法について概説する。

キーワード： ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞、分化能、胚様体

序 文

1998年 Thomson らにより¹⁾ ヒト ES 細胞が樹立され、日本においては2004年に中辻らのグループにより^{2,3)} ヒト ES 細胞株が樹立された。2006年山中らのグループによりマウス人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞⁴⁾、2007年ヒト iPS 細胞の樹立が発表された⁵⁾。2009年8月には文部科学省によるヒト ES 細胞使用研究指針が緩和され、国内でも ES/iPS 細胞研究がさかんとなってきた。

前回の総説でも述べたが⁷⁾、ヒト ES/iPS 細胞は従来の一般的な培養細胞とは異なる点が多い。また、研究室間による研究結果や技術の差も大きい。

連絡者：古江一楠田美保

独立行政法人 医薬基盤研究所 生物資源研究部門 細胞資源研究室
〒567-0085 茨木市彩都あさぎ1-6-8
TEL:072-641-9811 内線 (3210)、FAX:072-641-9851
E-mail: mkfurue@nibio.go.jp

細胞株間の差も大きい。英国シェフィールド大学 Andrews 教授がリーダーとして推進している International human ES cell initiatives (ISCI) プロジェクトでは、日本を含めた世界11カ国の研究者らが共同でヒト ES 細胞株の特徴を比較し、ヒト ES 細胞研究の標準化が進められている^{8,9)}。これまでに ISCI プロジェクトでは、細胞の登録、樹立の方法、未分化/分化マーカーの発現などの解析方法と結果を webpage に公表している。(http://www.stemcellforum.org/isici_project/download_data.cfm)。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様の特徴を持つことから、これらの解析方法は、iPS 細胞にも応用されるべきであるとの認識が持たれている。ヒト ES 細胞の培養経験がない場合には、上記のサイトを参考にしてヒト ES 細胞の一般的な基準を把握する必要があるだろう。ES/iPS 細胞の未分化性は不安定であり、また培養している間に形質が変化する。使用している ES/iPS 細胞が標準通り培養で

きているかどうか、随時確認を行う必要がある。異常クローンが出現した場合、3 継代でほとんどの細胞集団が入れ替わると言われており、5 代に 1 度の確認が望ましいと言われている。細胞資源研究室では、継代10代ごとに確認を行っている。

ヒト ES 細胞研究は、海外では経験値として語り伝えられる事項が多くあり、それらは論文となってデータに示されることは少ない。ヒト ES 細胞研究経験の少ない日本においては、ほとんどこれらの経験が伝えられていないのが現状である。そこで、正確なデータとして表示できないような内容も含めて、今回はヒト ES/iPS 細胞の分化能について概説する。

(1) 分化能について

ヒト ES 細胞は、受精卵の内部細胞塊由来であることから、成体組織を構成するすべての細胞に分化する可能性をもつため、ヒト ES/iPS 細胞を樹立する際には、多能性の確認が重要であると言われる。確かに、ヒト ES/iPS 細胞の未分化性維持機構解明、ヒトの発生過程の解明などを行うためには多能性であることは必要不可欠な条件であろう。一方、再生医療や創薬などへの応用を目指す場合、目的の分化細胞が得られればよく、必ずしも多能性を持つ必要はないのではないだろうか。ISCI プロジェクトに参加する海外のトップ研究者達は、特定の細胞に分化することが可能であればよい、と口にしていく。情報として必要なのは、株の分化傾向や目的細胞への分化効率だろう。他の細胞株と比較して、効率よく神経に分化する細胞株はどれか？ 心筋に分化しやすい細胞株どれか？ 産業応用にはこれらのことがもっとも求められている情報だろう。このような分化傾向の評価は、一般的に ES/iPS 細胞を凝集させて胚様体 (Embryoid body; EB) を作成させて分化誘導し、1 週間から 3 ヶ月程度培養を行って分化マーカー遺伝子の発現を解析している^{9,10)}。ただし、EB 形成に用いる細

胞の状態が分化に影響を与える。また、培養に使用する血清によっても分化誘導効率が異なるといわれている。再生医療や創薬応用のためには、誤差をできるだけ少なくして分化能を評価することが必要である。これまでに様々な分化細胞へのプロトコルが報告されているが、必ずしも再現性の高いわけではない。今後、それぞれの分化誘導法が検討され、各種プロトコルを用いた分化能評価が行われることになるだろう。

(2) EB 作成時の培養条件

一般的には、通常の継代通り細胞を分散し、細胞接着のための処理のされていないペトリディッシュに播種する。その際に使用する培地は、(i) FGF-2 を含む ES/iPS 細胞未分化維持用培地、(ii) FGF-2 を含まない ES/iPS 細胞未分化維持用培地、(iii) 10%ウシ血清・低グルコース DMEM+2-メルカプトエタノールなどの条件が用いられる。(iii) の血清を含む培地を用いた場合、細胞死が多く見られ、EB を形成しないことも多い。一般的には、(ii) の FGF-2 を含まない未分化維持培地を用いるとされているが、(i) の FGF-2 を含む未分化維持培地を用いると、安定して EB が作成できることが多いと言われる。筆者の経験では、これら 3 種の培養条件のうち、(i) の条件が効率よく EB を形成する株が多い。EB を形成させた後は、徐々に (iii) の血清を含む培地に変えていき、1 週間 EB を培養した後は、2-メルカプトエタノールを含まない培地で培養を行っている (表 1)。

(3) EB の大きさ

EB の大きさを調整することは難しい (図 1)。スフェロイド作成用の 96 ウェルプレート (スミロンスフェロイド) を使用すると、ある程度の大きさはそろえられるが、ウェル内で小さな EB を複数形成することなどもある。また、培養皿底面に小さなマイクロウェルが刻まれているようなブ

日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化

表 1. JCRB におけるヒト ES、iPS 細胞の EB 形成の手順*

手 順	時 間
培地を吸引。 1 unit/ml Dispase [®] (Roche/解凍後 3 日以内に使用) を 1 ml 入れる。 37°C・CO ₂ インキュベーターに入れてインキュベーション。 Dispase を吸引。 hES 培地 10 ml を入れて、10 ml ピペットをつけたピペットエイド (強にする) で培地を吹きかけるようにしてコロニーをはがす (できるだけ回数を少なくする。2 回程度のピペッティングでコロニーがはがれないような場合は、セルスクレーパーを使用してコロニーをはがす)。 顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する。	3~10 min [®]
15 ml チューブに細胞浮遊液を入れて、300 rpm にて遠心 (大きいコロニーのみを回収する)。 新しい hES 培地を入れて細胞浮遊液とする (ピペッティングはしない)。 10 cm 細菌培養用ペトリディッシュに 3-5 × 10 ⁶ にて播種 顕微鏡でコロニーの分散状態を確認。	2 min
CO ₂ インキュベーターに入れて培養。 EB 用培地を必要量準備	3 日間
37°C ウォーターバスで培地を温める。 EB と培地を合わせてチューブに回収し、EB 用培地**を加える。 浮遊細胞培養用 25 cm ² フラスコ 5 つに分種 CO ₂ インキュベーターに入れて、培養。 1 週間に 2 回、2-ME を含む培地で交換をおこない、その後は 2-ME なしの培地で交換をおこなう DNA/RNA 回収***	5 分

* (林田、小澤、松村、その他、論文投稿準備中)

** 10%FBS + 0.1 mM 2-ME / DMEM (low glucose)

*** 初期分化であれば 10 日間程度の培養により様々な分化マーカーが発現していく。十分な分化を見るためには、一般的には 1 ヶ月から 3 ヶ月間培養が必要だと言われている。

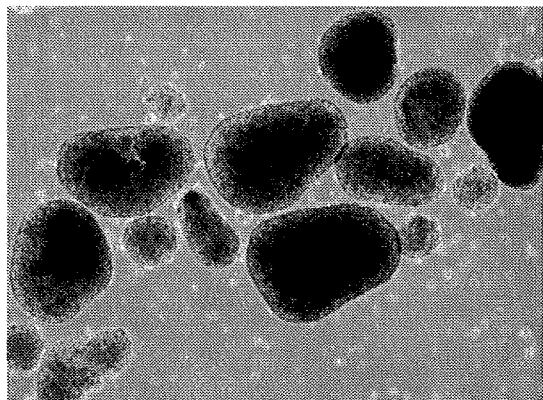


図 1: 京都大学樹立ヒト ES 細胞 KhES-1 の EB (40 倍)

レート (AggreWell400、ベリタス) などが各種開発されている。簡単な方法としては、トリプシン/EDTA により細胞をシングルセルに分散させ、

細胞密度を調整し、ROCK インヒビターを用いて細胞を播種する。細胞密度が高ければ大きな EB となり、細胞密度が低ければ、小さな EB となる。

(4) EB 作成による分化能の評価

EB を作成後、1 週間から 3 ヶ月間培養を行ったのち、RNA を抽出して RT-QPCR により遺伝子発現を解析する。遺伝子をリストアップして発現解析を行うか、あるいは、PCR アレイ、あるいはマイクロアレイ解析などが行われる⁹⁾。ISCI の報告によれば、未分化状態の ES 細胞であっても分化マーカーと認識されている遺伝子発現も見られる。実際のヒト ES/iPS 細胞の維持培養においては、すべての細胞が未分化状態を示しているわけではなく、分化能を有した株であれば、様々な細胞に分化した細胞が混在する。また、未分化性に関与が

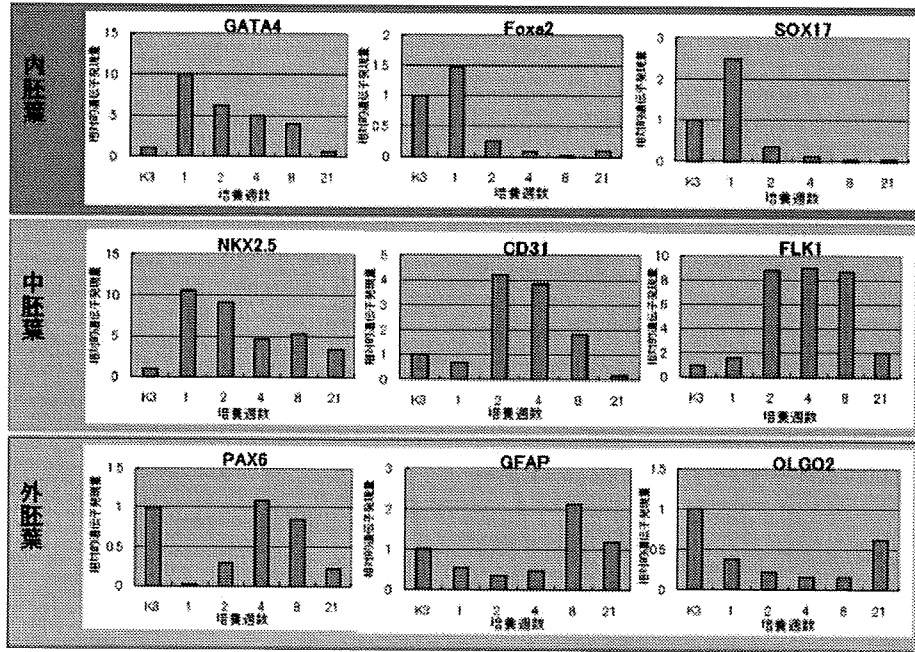


図2：EBの時間経過的遺伝子発現

成育医療センター梅澤ら樹立ヒトiPS細胞JCRB1331 (Tic)のEBにおける経時的遺伝子発現を解析した。表1の手順によりEBを形成させ、培養1週間、2週間、4週間、8週間、21週間後にRNAを抽出し、RT-QPCRにより遺伝子発現解析を行った。他のクローンと比較することを目的としているために、京都大学樹立ヒトES細胞KhES-3の未分化状態の遺伝子発現を1として換算している(平田、松村、林田、その他、論文投稿準備中)。

解明されていない遺伝子の発現なども考えられ、必ずしも期待する分化マーカーの発現が、未分化状態よりEBの方が高いとは限らない。プレリミナリーなデータとなるが、経時的なJCRB1331 (Tic)のEBにおける遺伝子発現をみると、培養期間が1週間から2ヶ月まではそれぞれの遺伝子発現の増減が見られる(図2)。三胚葉の遺伝子を単純に選んだだけでは、分化能を評価することができないことがわかる。また、遺伝子を解析する時期も重要であることが示唆される。これらの遺伝子の発現の増減が株間でどのくらいの差があるのか、現在、検討中である。

(5) そのほかの分化能評価法

ヒトES/iPS細胞をヌードマウスやSCIDマウスなどに移植をして、テラトーマ形成をさせるのが

もっとも簡単で正確な評価法であると言われる。しかし、技術的な問題や細胞の生着率の効率もあり、正確に分化能を反映していると断言するのは難しい。また、EUにおいては、動物愛護の観点から動物実験の許可が難しく、テラトーマ形成能をES/iPS細胞の分化能評価として利用されることは多くない。これらのことから、ヒトES/iPS細胞の分化能の評価は、テラトーマ形成を必須であるとまではされていない。

謝 辞

ヒトiPS細胞研究に関与している独・医薬基盤研のすべての皆様に感謝します。なお、ヒトES、iPS細胞に関する本研究は、厚生労働省科学研究費補助金によりサポートされています。

日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化

文 献

- 1) Thomson, J. A., et al.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147, (1998)
- 2) Suemori, H.: [Establishment of human embryonic stem cell lines and their therapeutic application]. *Rinsho Byori*, 52, 254–258, (2004)
- 3) Suemori, H., et al.: Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 926–932, (2006)
- 4) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676, (2006)
- 5) Takahashi, K., et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861–872, (2007)
- 6) 古江－楠田美保、et al.: iPS 細胞の産業的応用技術、iPS 細胞を活用した安全性・有効性評価系の構築、218–224、シーエムシー出版 (2009)
- 7) 古江－楠田美保：日本における ES、iPS 細胞研究の標準化. *Tissue Culture Research Communications* (2009)
- 8) Andrews, P. W., et al.: The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat Biotechnol*, 23, 795–797, (2005)
- 9) Adewumi, O., et al.: Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*, (2007)
- 10) Osafune, K., et al.: Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 26, 313–315, (2008)
(Accepted 25 December 2009)

Standardization of human embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell research in Japan: How to detect differentiation potency of human ES/iPS cells

Miho Kusuda Furue

Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan

Abstract In 1998, human embryonic stem (hES) cells have been established. In 2007, human induced pluripotent stem (hiPS) cells have been developed. Since then, the hES/iPS cells have been used as a tool for understanding the mechanisms in human development and regeneration application research in the world. hES cells are retrieved from the inner cell mass of human blastocysts. Therefore, it has been considered that hES cells should possess the possibility to differentiate into all cell types in human body. hiPS cells might have the similar characteristics to those of hES cells. To develop hES/iPS cell lines, it should be important to determine the pluripotency of the cells. In this review, I have summarized the differentiation potency of human ES and iPS cells.

Key Words human ES cells, human iPS cells, embryoid body, differentiation

1. 培養液

古江 - 楠田 美保

要言

ヒト胚性幹 (ES) 細胞や間葉系幹細胞などのヒト幹細胞は臨床用の移植ソースとしてだけでなく、分化細胞を用いての創薬や薬効・毒性評価などにも使用されると予想される。現在、ヒト幹細胞の多くがウシ血清や未知なる物質を含む動物由来成分を用いて培養されている。このような条件では、培養液にロット差が生じ、高品質のヒト幹細胞を安定して維持するのは難しい。添加因子の影響を正確に解析することも困難である。病原体混入の可能性もある。ヒト幹細胞を臨床に応用するためには、すべての組成が明らかにされた合成培地を用いて培養されるべきだろう。本稿では、ヒトES細胞、iPS細胞用培養条件の問題点と、いくつかの培養液を紹介する。

キーワード

ヒト胚性幹細胞, chemically defined serum-free culture, 無血清培養法, knockout-serum replacement (KSR), 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2), N2 サプリメント, B27 サプリメント

はじめに

培養細胞では、用いる培養液によって細胞の増殖や分子生物学的性質が大きく変化することがある。特に、ヒト胚性幹 (ES) 細胞ならびにヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞は、その性質上、体細胞に比べて培養環境の影響を受けやすい。継代するうちに異なる細胞集団になることも多いため、高品質を維持することはたいへん難しい。用いる培養液の性質をよく把握して培養を行う必要がある。

I. 一般的なヒト ES 細胞用培養液

ヒト ES 細胞や iPS 細胞は、現在、一般的にマウス胎児組織由来フィーダー細胞上で、ウシ血清、あるいは代替血清 knockout-serum replacement® (KSR) と線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) を添加した培地を用いて培養されている。国際的に広く使用されている培養条件を表①に記した。また、マトリゲルとフィーダー細胞の培養上清を使用したフィーダー細胞を用いない培養方法もクローニングなどの目的ではよく用いられている²⁾。

1. 培養液の問題点

表①の培養条件は、様々な不確定物質を含んだ培養条件となる³⁾。さらに、このような条件で培養した細胞にヒト以外の動物の細胞表面に存在するシアル酸-N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) が確認され⁴⁾、臨床応用における安全性が懸念されはじめた。従来から治療に使われる細胞は、既知の因子による合成培地を用いた無血清培養か自家血由来の血清を使用して培養されており、ようやくヒト幹細胞においても培養液の重要性が理解されたと言うべきだろう。

癌細胞などにおいては、血清添加の条件で問題なく培養維持できる細胞株は多い。マウス ES 細胞やヒト ES 細胞も、血清や代替血清 KSR を用いた培養液の中で安定して培養維持されていると考えられがちである。しかし、血清には細胞増殖因子だけでなく、分化促進因子、接着因子やホルモン、また未知の因子が含まれている。適切なタイミングで培地交換や継代を行わねば、分化細胞が現れ、増殖能の高いクローンのみが生き残り、異なる細胞集団となっていく。ロット差があるために、実験結果にもロット差が出てしまう。例えば、ES 細胞から embryoid body (胚様体) を作製する際に、

表① ヒト ES 細胞用培地 (文献 1, 17 より)

最終濃度	ストック	Invitrogen 番号
80% Knockout DMEM*		10829-018
20% Knockout SR		10828-028
1% non-essential amino acid solution	100x MEM non-essential amino acid solution	11140-035
1mM L-glutamine	0.146g in 10mL PBS	21-51-016
0.1mM β -mercaptoethanol	14.3M β -mercaptoethanol	Sigma M-7154
4mg/mL human bFGF**	2 μ g/mL in PBS with 0.1% BSA	13256-029

* : DM/F12 が使用されることも多い。

** : 研究室によって使用濃度は少しずつ異なっているため、実際に培養を開始する際には、その細胞に添付されているプロトコルを参照のこと。

【手順】

- ① L-glutamine/ β -mercaptoethanol 液の作製
10mL の CMF-PBS に、0.146g の L-glutamine を 15mL チューブに入れる
7 μ L の β -mercaptoethanol を入れてよく混ぜる
- ② 225mL のフィルターユニットに以下を入れる

Knockout DMEM	160mL
Knockout SR	40mL
L-glutamine/ β -mercaptoethanol 液	2mL
100x non-essential amino acid solution	2mL
human bFGF	400 μ l
- ③ フィルターする
- ④ 4℃ にて保存し、2 週間以内に使用する

使用する血清のロットによって分化誘導されてくる組織が異なることはしばしばみられる。さらに、プリオンやウイルスなどの病原体を含んでいる可能性がある。KSR は無血清であると言われているが、ロット差のある動物由来成分を含む。品質の安定性や病原体をできるだけ排除するためにも、未知の成分を含まない無血清培養が望ましいと考えられる。

II. defined medium の開発

1. サプリメント

無血清培養とは、既知の成分よりなる合成培地を用いた培養条件、すなわち chemically defined serum-free culture⁹⁾ であり、単に血清を除いた基礎培地のみによる培養ではない。1975 年に Sato ら¹⁰⁾ が、血清の役割とは、それに含まれるホルモン、増殖因子、接着因子などが細胞の増殖を促進することであり、これらの因子を基礎培地に加えることにより血清を代替できることを提言した。1979 年に Bottenstein ら¹¹⁾ により、神経細胞の無血清培養用として、N2 サプリメント (インスリン、トランスフェリン、プロゲステロン、セレンウム、プトレッシン) が開発された。その後、N2 サプリメントは 5 因子 (インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、2-メルカプトエタノール、セレン酸) ある

いは 6 因子 (+オレイン酸) に改良された。その結果、神経細胞だけでなく様々な細胞の無血清培養を行うことが可能となり、血清添加の条件で培養されていた細胞が既知の因子により培養できるようになった¹²⁾。このような既知の組成からなる培養液を用いることにより、細胞の増殖や分化に必要な因子の要求性など細胞の機能が正確に解析でき、機能性培養法とも呼ばれている。一方、1993 年に Price らのグループによって、神経細胞の無血清培養用にインスリンを含む 20 因子から構成されている B27 サプリメント¹³⁾ が開発されたが、濃度は公開されていない。さらに 1998 年に Price らは、KSR を開発した。上述したように、現在ヒト ES 細胞用培地のサプリメントとして広く用いられているが、組成は公開されていない。

2. ヒト ES 細胞用無血清培地 TeSR1 培地と hESF9

これまでに、ヒト ES 細胞用の培養条件は、市販品も含めて 10 例前後報告されている。しかし、完全に組成が既知因子からなり公開されているのは、Ludwig らによる TeSR1 培地¹⁴⁾ と、筆者らが開発した hESF9¹⁵⁾ のみである。TeSR1 培地 (StemCell Technologies USA より販売) は、DM/F12 を基礎培地として改良し、pipecolic acid, インスリン, トランスフェリン, メルカプトエタノール, 脂質群, GABA, FGF-2, TGF- β ,

Wnt シグナルを活性化する LiCl_2 などを加えた条件となっている。接着因子はマトリゲルの代わりに、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、IV型コラーゲンを混合したものを用いている。多くの細胞株で培養が安定して培養が可能であるようである。

一方、筆者はマウス ES 細胞の未分化性を維持することのできる無血清培養条件 ESF7 を開発した¹⁴⁾(細胞科学研究所より販売)。さらに、英国シェフィールド大学幹細胞センター Andrews 教授らとの共同研究により、ヒト ES 細胞用の無血清培地 hESF9 を開発した¹⁵⁾(特許申請中)。hESF9 は、筆者らが独自に開発したヒト ES 用 ESF (細胞科学研究所より販売) を基礎培地として、上述の 6 ファクターに、FGF-2 とヘパリンのみを加え、接着因子としては I 型コラーゲンをを用いている。非常にシンプルな組成となっているため、添加因子の影響が高感度に解析できる。

安定した培養維持が行えるのは TeSR1 培地と思われるが、増殖因子や分化促進因子などの影響や細胞内シグナルなどの解析には hESF9 が向いているだろう。それぞれの目的に合わせて使用するのが望ましいと考える。

III. 標準化培養

現在、英国やアメリカ合衆国などを中心として、臨床で使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、品質保証などにわたる取扱基準規格の構築が行われている。臨床用だけでなく非臨床用に使用されるとしても、臨床用に準じた方法で分離・維持されるべきであろう。臨床用ヒト ES 細胞用の培養液は、すべての組成を明らかにして、薬害などができるだけ発生しないよう安全性や危険性を多くの研究者により多角的に検討される

べきであると考えられる。しかし、培養の基礎知識のないまま使用されるために、培養液の機能を十分に発揮できていないことも多い。例えば、ボトルにすべての添加因子が添加されているような場合、そのボトルを繰り返し温めて使用する研究者が多い。しかし、添加されている増殖因子などのタンパク質は温められるごとに劣化し、 CO_2 が抜けて pH は上昇する。幹細胞は、弱酸性には強いがアルカリ性には弱い¹⁶⁾。このような培養液を用いていれば、幹細胞の品質は維持できない。様々な問題を克服して高品質の細胞を安定して供給するためには、培養細胞をただの材料として扱うのではなく、体系的な細胞培養学の中で標準的な培養法を確立していかななくては難しいだろう。

❖ おわりに

ヒト ES 細胞は、その樹立の方法や培養液が研究室により異なることもあり、株間の差が大きく、ヒト ES 細胞に関連する報告が追試できないことも多く、国際的に標準化が求められている。シェフィールド大学 Andrews 教授がリーダーとして推進している International Human ES Cell Initiatives (ISCI) プロジェクトでは、日本で樹立された細胞も含めて世界中で研究用に使用されている 59 種類のヒト ES 細胞株の特徴を比較し、2007 年 6 月に Nature Biotechnology に報告をした¹⁶⁾。現時点では、海外においてもヒト ES 細胞の実用化は実施されていない。しかし、分化細胞を含めヒト ES 細胞製剤が個人輸入される日は遠くないだろう。国内においても、ヒト ES 細胞、iPS 細胞の培養法と応用法、その安全性と危険性を多くの研究者によって検討されることが望まれる。

■ 参考文献

- 1) Amit M, et al : Dev Biol 227, 271-278, 2000.
- 2) Xu C, et al : Nat Biotechnol 19, 971-974, 2001.
- 3) 古江 - 楠田美保 : Medical Science Digest 33, 107-115, 2007.
- 4) Martin MJ, et al : Nat Med 11, 228-232, 2005.
- 5) Barnes DW, Sirbasku DA, et al : Methods for preparation of media, supplements, and substrata for serum-free animal culture, Alan R Liss Inc, 1986.
- 6) Sato GH : Biochemical Actions of Hormones, 391-396, Academic, 1975.
- 7) Hayashi I, Sato GH : Nature 259, 132-134, 1976.
- 8) Bottenstein J, et al : Methods Enzymol 58, 94-109, 1979.
- 9) Sato JD, Kawamoto T, et al : J Exp Med 165, 1761-1766, 1987.
- 10) Sato JD, et al : Basic Cell Culture: A Practical Approach 2nd Ed, 227-274, Oxford University Press, 2002.
- 11) Brewer GJ, et al : J Neurosci Res 35, 567-576, 1993.
- 12) Ludwig TE, et al : Nat Biotechnol 24, 185-187, 2006.
- 13) Furue MK, et al : Proc Natl Acad Sci USA 105, 13409-13414, 2008.
- 14) Furue M, et al : In Vitro Cell Dev Biol Anim 41, 19-28, 2005.
- 15) Hayashi Y, et al : Stem Cells 25, 3005-3015, 2007.
- 16) Adewumi O, et al : Nat Biotechnol 25, 803-816, 2007.
- 17) Sheffield TUo : Human Embryonic Stem Cell culture 2007 Protocol Handbook, 2007.

古江・楠田美保

フロンティア

- 1986年 広島大学歯学部歯学科卒業
 1990年 同大学院歯学研究科歯学臨床系卒業（歯学博士）
 同歯学部附属病院第一口腔外科医員
 1991年 神奈川県立こども医療センター 歯科シニアレジデント
 1993年 神奈川県歯科大学 化学講師
 2004年 同大学院 指導教員
 2005年 英国シェフィールド大学 幹細胞生物学センター 客員講師
 2007年 京都大学再生医科学研究所 客員准教授
 神奈川県歯科大学 高次口腔科学研究所 准教授
 2008年 (独) 医薬基盤研究所 生物資源研究部門細胞資源研究室 研究員
 2009年 同研究リーダー

研究分野：幹細胞生物学、培養学
 研究テーマ：ヒト幹細胞からの口腔諸器官への分化誘導、創薬ツールとしての培養細胞応用開発

10 iPS細胞を活用した安全性・有効性評価系の構築

古江一楠田美保*¹, 山田 弘*², 水口裕之*³

10.1 要約

医薬基盤研究所では、ヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発を行うとともに、医薬品開発に応用可能な新しい安全性・有効性の細胞評価系の構築を行っている。当研究所と全国の関係研究機関と連携した研究課題（「ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築」）は内閣府、文部科学省、厚生労働省、経済産業省が平成 20 年度に公募を行った「スーパー特区（先端医療開発特区）」に採択された。iPS 細胞を創薬応用のためのスクリーニングに用いるためには、まず iPS 細胞の標準化を行う必要がある。次に、その細胞を安定して供給できることが重要となってくる。厚生労働省細胞バンクにおける 20 年以上の公的バンクとしての豊富な経験と知識のもとに、iPS 細胞の標準化を行って品質管理法を確立し、iPS 細胞コレクション、誘導された分化細胞コレクションを分譲する予定である。構築される品質管理・分譲システムや細胞評価データベースは、当研究所の世界最大規模のトキシコゲノミクス・データベースと連携することにより、創薬研究の加速、ヒト特異的毒性の予測精度向上など、医薬品の安全性向上、さらに大きな経済的メリットにつながる。

10.2 はじめに

医薬品候補化合物の開発中止原因として「毒性の判明」が占める割合は 20% 程度ある¹⁾ (図 1)。医薬品開発過程において、将来起こる可能性の高い潜在的毒性を研究開発の初期段階から予測できれば、より安全性の高い医薬品を効率よく開発することができる。しかし、現在のデータベースは主に実験動物を用いたデータベースとなっている。動物実験には「種差の壁」の限界があり、ヒトに特異的に起こる毒性についての予測性は十分とはいえない。利便性・汎用性の観点から、また実験動物使用制限の観点からも、ヒト培養細胞を用いた、より良い安全性予測系・有効性評価系の開発が期待されている。

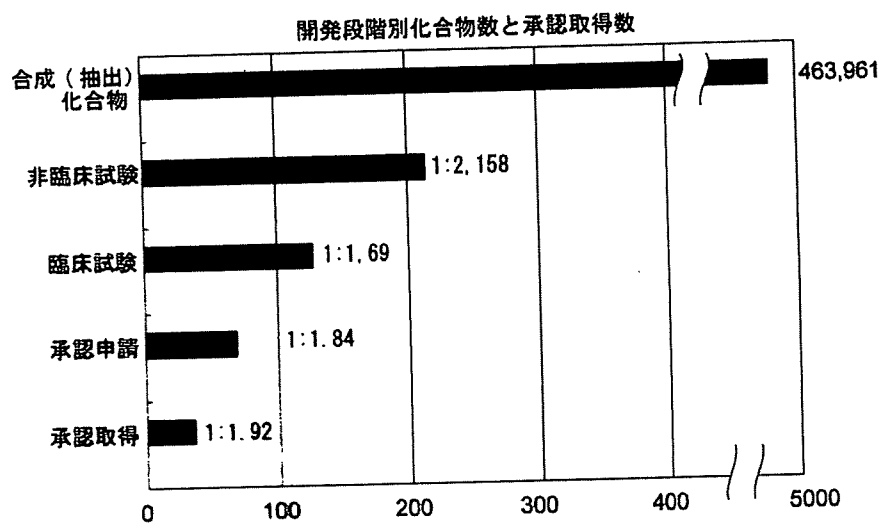
創薬研究に用いられる実用性・汎用性の高い細胞評価系を構築するためには、ヒト生体機能を

*1 Miho Kusuda Furue (独)医薬基盤研究所 生物資源研究部門 細胞資源研究室 プロジェクトリーダー

*2 Hiroshi Yamada (独)医薬基盤研究所 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト サブ・プロジェクトリーダー

*3 Hiroyuki Mizuguchi (独)医薬基盤研究所 遺伝子導入制御プロジェクト プロジェクトリーダー

第7章 iPS細胞の各々の拠点の紹介



日本製薬工業会:2000~2004より

図1 開発段階別化合物数
日本製薬工業会調査報告より

反映できるものであること、安定的に生産・供給できること等の要件を満たすことが求められる。性別、年齢、病態などの種々のバリエーションを有したヒト細胞コレクションの構築、標準化された細胞の安定供給、品質管理法の開発、目的の機能を有する細胞への高効率な分化誘導技術の開発が必要不可欠である。さらに、トキシコゲノミクス解析による新規 *in vitro* 医薬品毒性評価システムの構築、薬事申請のためのガイドライン案の作成へとつながる。従来のヒト培養細胞を用いた *in vitro* アッセイは様々な毒性等評価に用いられているが、生体組織との性質・機能の乖離が大きいため測定可能な評価項目は限られている。また、日本においては、ヒト臓器由来培養細胞の安定供給が困難であり、最適なスクリーニング系は構築されていなかった。一方、iPS細胞は様々な体細胞から作製でき、あらゆる細胞に分化することが可能であり、また、倫理上の問題点も少ないことから、新規 *in vitro* 毒性評価系の最適なツールとなりうる。

当研究所においては、関係研究機関と連携して、創薬研究の加速化、およびヒト安全性の予測精度向上のため、ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系の構築を行っており、その内容を概要する(図2)。

10.3 iPS細胞の標準化

ヒト ES 細胞は、その樹立の方法や培養条件が研究室により異なることも多く²⁾、株間の差が大きく³⁾、ヒト ES 細胞に関連する報告が追試できないことも多いことが知られている。ヒト

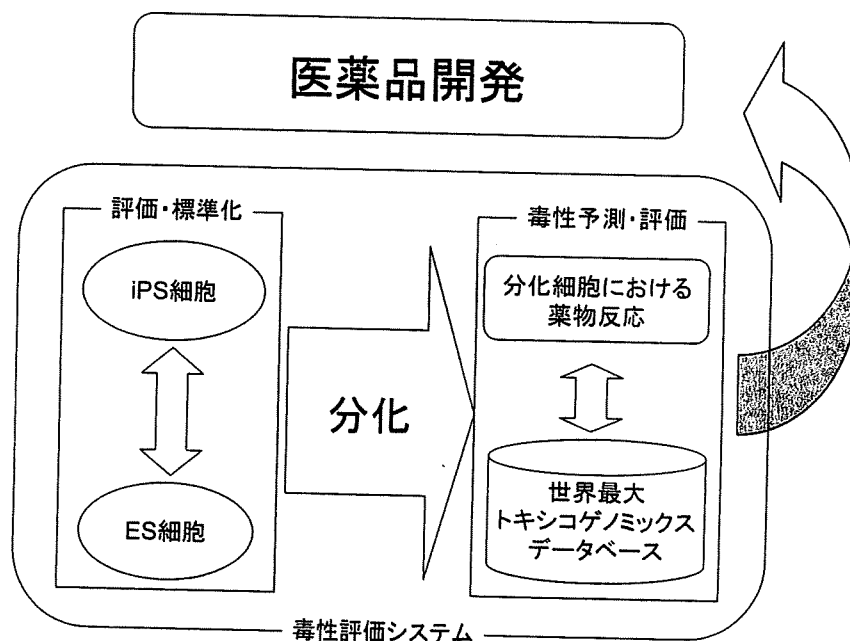


図2 iPS細胞を活用した安全性・有効性評価系の構築を目指した研究の概要

iPS細胞についても同様で、各研究室で作製方法や培養方法が異なる。さらに、同じ細胞から作製されたiPS細胞であっても、クローン間で形質が異なる。創薬研究に応用するためには、まずiPS細胞の標準化から始める必要がある。ヒトES細胞については、シェフィールド大学P. Andrews教授がリーダーとして推進している国際プロジェクトInternational human ES cell initiatives (ISCI)で、日本で樹立された細胞も含めて、世界中で研究用に使用されている細胞株の特徴を比較している^{4,5)}。当研究所では、国内でヒトES細胞樹立が許可されている京都大学や成育医療センターとともに、シェフィールド大学やハーバード大学などと連携をもち、国際レベルでヒトES細胞と比較を行いながら、iPS細胞の標準化を行っている。

10.4 既知の因子による無血清培養法の必要性

ヒトES、iPS細胞は、一般的にマウス胎児組織由来フィーダー細胞上で、牛血清、あるいは、代替血清・knockout-serum replacement[®] (KSR) と、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を添加した培地を用いて培養されている⁶⁾。血清は、増殖因子だけでなく、未知の分化促進因子やウイルスなどを含んでいる可能性がある。マウス胎児由来フィーダー細胞は、血清添加の条件で準備され、またロット差があり、未知なる因子を分泌している。KSRは無血清であると言われていたが、ロット差のある動物由来成分を含み、組成が公開されていない。フィーダー細胞の代わりに使用されるマトリジェルはマウス肉腫由来であり、数種のマトリックスだけでなく、増殖

第7章 iPS細胞の各々の拠点の紹介

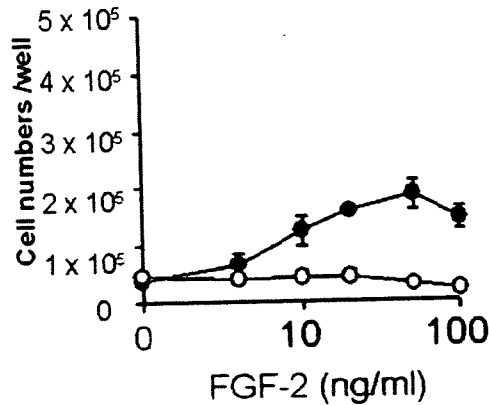


図3 培養条件による FGF-2 の細胞増殖効果の違い
従来の培養条件 (○) においては、FGF-2 の細胞増殖効果を検出できない。一方、hESF9 を用いた培養条件 (●) においては、FGF-2 の細胞増殖効果を検出できた。
(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13409-14, 2008 図 6 より)

因子や未知の因子が含まれている。これらに対して、品質の安定性のあるロット差の少ない合成培地を用いた無血清培養⁷⁾が、望まれている。ヒト ES 細胞用の無血清培養条件は、市販品を使用したものも含めて十数例が報告されている。筆者は、マウス ES 細胞をフィーダー細胞なしに未分化性を維持することのできる機能性無血清培養条件 ESF7 を開発した⁸⁾。この条件に改良を加え、ヒト ES 細胞用無血清培地 hESF9 を開発した⁹⁾。フィーダー細胞や KSR 存在下においては検出できなかった形質が、フィーダーを用いないこの機能性無血清培養条件を用いることにより明らかにできる。ヒト ES 細胞における FGF-2 の細胞増殖の影響は、フィーダーあるいは KSR 存在下においては検出できなかったが、hESF9 で培養を行うと FGF-2 による増殖効果が明らかとなった (図3)。hESF9 を用いることにより、iPS 細胞の細胞特性を正確に解析することが可能であり、現在詳細な解析を行っている。

10.5 評価と品質管理

毒性評価などのスクリーニングに用いる細胞の条件として、再現性のある安定した試験が可能なこと、その細胞を十分量安定供給できることなどが重要である。作製された iPS 細胞コレクション、分化細胞コレクションは他の研究機関に配布・分譲する予定である。これらの幹細胞は、癌細胞はもとより他の幹細胞に比べてデリケートで、高品質を維持することは大変難しい。分化しやすく、継代するうちに異なる細胞集団になることも多い。細胞分散法を間違えば、ほとんどの細胞がアポトーシスを起こして死んでしまうこともまれではない。培養維持している間に、細

胞の品質は変化する可能性が高い。標準化された iPS 細胞を他の研究機関に安定的に供給するためには、iPS 細胞の品質管理が必要となる。当研究所・厚生労働省細胞バンクにおける 20 年以上の公的バンクの豊富な経験と知識のもとに、iPS 細胞の培養法、保存法、凍結法などを、未分化性、多分化能、染色体安定性といった観点から詳細に検討し、高品質 iPS 細胞の評価基準を製作中である。また、昨今、世界的に培養細胞のクロスコンタミネーションが問題になってきている¹⁰⁾。当細胞バンクにおいては、ヒトゲノム内に存在する特異的ローカスの STR 分析 (short tandem repeat analysis) によるデータベースを構築して比較解析をすることにより、クロスコンタミネーションの可能性の分析を行っている¹¹⁾。これらの問題を克服して高品質の細胞を安定して供給するためには、細胞培養を技術として捉えるだけでなく、体系的な細胞培養学を確立していかななくては難しいだろう。細胞培養を再考しなくてはならない時代が来ていると考える。品質のよいヒト iPS 細胞を維持するためには、その特徴を十分に把握したスタッフが必要であり、当研究所において、培養法を標準化して指導する準備を行っている。

10.6 高効率分化誘導法の開発および分化誘導細胞コレクションの作製

肝細胞は血液細胞や血管内皮細胞などと比較し、幹細胞からの分化誘導が困難であることが知られている。そこで、従来の液性因子を用いた分化誘導法に加え、当研究所・水口らの独自技術である改良型アデノウイルスベクター等を用いた高効率遺伝子導入法を応用することにより、医薬品毒性スクリーニングに適した肝細胞への高効率分化誘導法を開発中である。アデノウイルスベクターは既存の遺伝子導入ベクターの中では最も効率に優れ、染色体への遺伝子組み込み能を有さないため、一過性の遺伝子発現を示すことを特徴とする。従来のアデノウイルスベクターは遺伝子導入がアデノウイルス受容体 (CAR) の発現に依存していたが、水口らはウイルス表面タンパク質を改変することで、感染域を自在に制御可能な改良型アデノウイルスベクターを開発し、様々な細胞種に対し、高効率 (従来型の 100 倍) な遺伝子発現が可能となった^{12,13)}。従来の液性因子添加法と組み合わせて、細胞分化に関連する遺伝子を、これら改良型アデノウイルスベクターを用いて iPS 細胞に作用させることで、より効率よく分化細胞が得られると考えられ、遺伝子発現プロファイリングの解析等により肝細胞への分化誘導に必要な導入遺伝子を決定し、分化誘導方法の最適化を行っている。

10.7 トキシコゲノミクス解析による医薬品毒性評価システムの開発

日本の化学物質 (薬剤等) の分子毒性解析技術は世界トップクラスであるが、さらに、当研究所は世界最大規模 (8 億件) の毒性と遺伝子発現に関するトキシコゲノミクス・データベースを有している^{14,15)}。当研究所の漆谷・山田らは、このデータベースを用いて iPS 細胞から分化誘導

第7章 iPS細胞の各々の拠点の紹介

した細胞に対してトキシコゲノミクス解析を行うことにより、医薬品の毒性に関する新規 *in vitro* 細胞評価系を確立する。その特徴は、種々の毒性既知化合物を用いて判定基準設定のためのバリデーションが実施可能なことである。当研究所が保有するトキシコゲノミクス・データベースの情報を基にして抽出したエンドポイントを *in vitro* 評価系に設定した後、種々の毒性既知化合物を用いて判定基準設定のためのバリデーションを実施する。種々のiPS細胞由来の分化細胞を使うことにより、個々人の体質の違いによる副作用を事前に予測することが可能になり、将来のテーラーメイド医療に向けた基盤を構築できる。

10.8 おわりに

iPS細胞を利用した安全性・薬効評価系を構築することにより、医薬品の安全性向上、創薬初期段階での正確かつ簡便な毒性評価が可能となる。それによって、これまでの医薬品開発において課題となっていた創薬後期段階での開発中止のリスクが低減するとともに、近年世界的に実施が制限され「種差の壁」の限界を有する動物実験に代わる評価システムが構築されることとなる。新薬開発コストの低減、新薬開発期間の短縮などが実現して数千億円の経済効果が生じるとともに、個々人の体質の違いによる副作用を事前に予測することが可能になるなど、テーラーメイド医療実現に向けての基盤が整備される。新規細胞評価系構築は一つの技術だけでできるものではなく、iPS細胞コレクション作製、品質管理、分化誘導、毒性評価等に関する様々な要素技術を融合させて推進していくことが不可欠である。これらは数千億円の経済効果とともに、合理的な医薬品審査へも寄与し、もって国民の健康の増進に資することになるであろう。

文 献

- 1) Frank, R. and Hargreaves, R., Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2, 566-80 (2003)
- 2) 古江一楠田美保, 日本におけるES, iPS細胞研究の標準化. *Tissue Culture Research Communications* (2009)
- 3) Osafune, K., *et al.*, Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.*, 26, 313-5 (2008)
- 4) Andrews, P. W., *et al.*, The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat. Biotechnol.*, 23, 795-7 (2005)
- 5) Adewumi, O., *et al.*, Characterization of human embryonic stem cell lines by the Interna-

- tional Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* (2007)
- 6) Amit, M., *et al.*, Feeder layer-and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.*, 70, 837-45 (2004)
 - 7) Hayashi, I. and Sato, G. H., Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*, 259, 132-4 (1976)
 - 8) Furue, M., *et al.*, Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 41, 19-28 (2005)
 - 9) Furue, M. K., *et al.*, Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, 105, 13409-14 (2008)
 - 10) Chatterjee, R., Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science*, 315, 928-31 (2007)
 - 11) 水澤博ほか, STR分析によるヒト培養細胞の迅速同定法。実験医学, 26, 1395-1403 (2008)
 - 12) 水口裕之ほか, 改良型アデノウイルスベクターを用いた造血幹細胞, 間葉系幹細胞, ES細胞への効率的遺伝子導入。Inflammation and Regeneration, 25, 447-451 (2005)
 - 13) Kawabata, K., *et al.*, Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol. Pharm.*, 3, 95-103 (2006)
 - 14) 堀井郁夫, 山田弘, 非臨床試験—ガイドラインへの対応と新しい試み— 創薬段階での非臨床安全性評価—ハイスループット・トキシコロジー, 419-440, エル・アイ・シー (2008)
 - 15) 堀井郁夫, 山田弘, 非臨床試験—ガイドラインへの対応と新しい試み— 創薬段階での非臨床安全性評価—分子毒性学的アプローチ, 441-479, エル・アイ・シー (2008)