

組織・血液と医療情報などを提供頂いた患者さんの診断名が変更された場合に、難病バンク内でその変更に対応して、提供いただいた病名を変更するために、難病バンク内では連結可能匿名化の状態で保管いたします。

※ MTA (Material Transfer Agreement: 試料提供契約)

研究試料（通常、特許を受けていない生物由来試料用）を提供する機関と研究試料を受け取る機関との間で交わされる、移転と使用の条件を規定し、所有権に由来する利益を保護し、試料の配布を制限する契約。

研究者が研究の途上で偶然に個人を識別してしまった場合は、識別された個人の記録を残さず、識別された個人の情報を他へ伝えないなどの配慮を行います。と同時に、研究者は、難病バンク管理責任者に個人が識別された経緯を報告します。この報告を受け難病バンクでは、個人情報保護の体制をさらに整える努力をいたします。

また、特に希少な疾患の場合は、医療情報などにより、個人が識別されないように、特に注意しながら事業を運用いたします。難病バンクが必要と判断した場合には、研究者との守秘契約を締結します。

これらの配慮を行うことで、難病バンクは個人情報保護に努めます。

4. 組織や血液と医療情報などの採取

皆様が診療を受けている医療機関において行われます。

今回の場合、採取した皮膚生検サンプル(あるいは毛髪、検査に使用した残りである骨髄細胞)から作製したiPS細胞(人工多能性細胞)をバンクへ提供することになるので、iPS細胞作製のため以外(たとえば、バンクへの提供目的等)では新しい採取は行いません。バンクへ登録する際に年齢、性別、疾患名、検査値を提供いたします

が上述(3、個人情報保護 参照)のようにバンクから研究者へ提供の際には連結不可
能化されますので、個人情報保護され、個人が特定されることはありません。

5. インフォームド・コンセントについて

難病バンク事業は、通常の研究計画と同様に、本説明文書を用いた説明及び
同意書への署名により、患者さんの本事業への協力の同意を得ることによって
可能となります。皆様の難病バンク事業への理解と協力なしには、本事業を行
うことはできません。ご協力よろしくお願いいたします。

尚、本人が成人に達していない、或いは病気等により難病バンクへの参加同
意について判断ができない場合は、代諾者による承諾をいただく必要がござい
ます。

また、難病バンク事業へのご協力は、患者本人・代諾者の自由意思によるも
のであり、ご協力が得られなかった場合も診療上の不利をこうむることはござ
いません。

6. 本事業への協力同意の撤回について

患者本人或いは代諾者は、本事業に係る協力の同意に関して理由の説明なし
に撤回を申し出ることができます。これは、同意文書とともに、皆様に配布い
たします協力同意撤回書によって行うことができます。

同意撤回文書は主治医から難病バンクへ郵送され、難病バンクが保存する組
織・血液と医療情報などを廃棄し、その証明書を手紙で主治医に郵送し、患者さん本
人が確認できるようにいたします。

難病バンクに移送された組織・血液と医療情報などは、研究者へ提供される
前に、誰のものかわからない匿名化の状態にいたします。このような事情があ
るために、難病バンクから研究者へ提供された組織・血液と医療情報などにつ
いては、協力同意の撤回ができないことをご理解ください。

7. 難病バンクの仕組み

◎所在場所

難病バンクは、先に述べた厚生労働省の事業として厚生労働省からの資金提供に基づいて、大阪にある独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部が中心となり、理化学研究所 BRC・細胞材料開発室、熊本大学・発生医学研究所が連携して実施いたします。

◎研究倫理指針による規制について

医学研究は政府が策定した研究倫理指針で規制されています。本事業は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月その後3回改正）文部科学省、厚生労働省、経済産業省」の元に事業を展開しております。私どもは皆様方の協力を元として主治医、医療機関と連携して、難病の研究を支援するために、皆様から提供された組織・血液と医療情報などを収集いたします。また、研究者への提供、研究者の研究利用も、研究倫理指針に従って行われます。将来その研究倫理指針が改正された場合には、改正された規制に従って運営されます。

◎医療機関から難病バンクへの提供について

医療機関が難病バンクへ協力する場合には、その医療機関の研究倫理審査委員会の審査を受けます。その後、難病バンクへの提供についての研究倫理審査は、難病バンク側でも行われます。皆様の組織・血液と医療情報などに関しては、①採取について、②難病バンクへの提供、及び③難病バンクの受け取りという、3つのポイントについて、2つの機関が研究倫理審査を行い、難病バンクで保管する段階となります。

◎難病バンクでの保存、管理について

ご提供いただいた「組織・血液と医療情報等及びそこから作成した培養細胞やiPS細胞（研究資源）」は、鍵の掛かる部屋に設置された冷蔵庫で保管されます。ご提供いただいた研究資源は、提供者自身（患者）による撤回の意思表示がない限り保存し続けます。研究資源の取り扱いに関しては、先に述べたゲ

ノム研究倫理指針に従って、難病バンクが責任を持って行います。基本的には、ご提供いただいた研究資源が難病を克服するための研究材料として利用できる範囲内で、利用させていただきます。また、ご提供いただいた研究資源の保存方針、取扱方針、難病バンク全体の運用方針等の中で倫理面に関わる問題については、研究倫理審査委員会に諮問し、その意見を尊重し、適切に運用していきます。

◎研究者への提供

研究者は基盤研の難病バンクのホームページから情報を得て、研究に必要な組織・血液と医療情報などを利用した研究を計画します。その研究計画書を、その研究者が所属する研究所の研究倫理審査委員会へ提出し、審査を受けます。

その後、難病バンクでも、それぞれの研究者の研究計画に関して、研究倫理審査が行われ、その後提供を受ける研究者と難病バンクの間で、覚え書が交わされて、組織・血液と医療情報などが研究者へ提供されます。

難病バンクの研究倫理審査委員会では、インフォームド・コンセントでの患者さんから得た同意内容と、研究計画書で示された研究目的の内容の整合性を主として、倫理的及び科学的側面から研究計画を審査いたします。

◎学術研究報告

研究成果は、学会や学術雑誌に論文として報告され、病気の解明や医療の向上に貢献します。この点をご理解賜りたいと存じます。通常の研究報告は多数の患者さんのデータを合わせた形で発表されますので、個人が識別される可能性はありません。また、個人が特定される可能性のある研究成果の発表については、個人が特定されないように特に注意いたします。

◎研究から生じた知的財産権の帰属について

研究から生じた知的財産権（特許など）は、その研究を行った研究者及びその所属する機関に帰属します。難病バンクや、研究に参加された患者の皆さま

には帰属しません。

◎研究成果の開示について

ご提供いただいた組織・血液と医療情報などは、誰のものかわからない状態にして、難病バンクから研究者に提供されます。そのために、提供いただいた患者さんの研究結果を開示することはできません。

難病バンクでは、どのような研究に皆様から提供いただいた組織・血液と医療情報が利用され、どのような成果がでていくのかについてホームページ上でお知らせしていくことを計画しております。

難病バンクへの質問等の連絡先

(独) 医薬基盤研究所 生物資源研究部

難病研究資源バンク 管理責任者・研究代表者

亀岡洋祐

研究倫理担当者

増井徹

連絡先 〒567-0085 茨木市彩都あさぎ7-8-6

電話番号 072-641-9899 電話・FAX 072-641-9829

Eメール: raredis@nibio.go.jp

同意書

(独) 医薬基盤研究所 難病研究資源バンク

研究代表者 亀岡洋祐 殿

平成 年 月 日

現住所〒

御氏名

患者本人が判断することができず、代理人が承諾する場合は、次の欄もご記入下さい。

代理人御氏名 (患者との関係)

代理人御住所 〒

1 採取・提供予定の血液・組織と医療情報など

- ① 治療・診断で採取された血液・組織の中から、医療に必要な部分を除いたもの
具体的に： なし
- ② 特に研究目的のためだけにいただく組織・血液
具体的に： iPS 細胞
- ③ 医療情報など
年齢： 性別： 病名：

2 留意事項

難病バンクにおいて連結不可能匿名化された組織・血液や医療情報等については、誰のものか分からなくなりますので、同意撤回できません。

3 患者記入欄

次の文末の () の中の該当するものを○で囲み、下線部位に署名してください。

培養細胞からiPS細胞を作成し、難病バンクから提供することに、

(同意します) ・ (同意しません)

提供した血液・組織や医療情報等を企業等で行う医薬品開発等の研究のために提供することに、

(同意します) ・ (同意しません)

4 医師記入欄

私は今回の難病バンクについて説明し、患者の意思が得られたことを確認し、署名します。

説明担当医師氏名 (自著)

病院名

科名

同意撤回書

(独) 医薬基盤研究所 難病研究資源バンク

研究代表者 亀岡洋祐 殿

平成 年 月 日

現住所 〒 _____

御氏名 _____

患者本人が判断することができず、代理人が承諾する場合は、次の欄も記入してください。

代理人御氏名 _____ (患者との関係 _____)

代理人御住所 〒 _____

私の組織や血液と医療情報などの取り扱いに関し、難病バンク事業への協力の承諾を撤回します。

難病バンクで保管中のものであって、私が提供した組織・血液と医療情報などとそれから派生した培養細胞/iPS 細胞について、保管の中止及び廃棄をお願いします。

撤回担当医師の署名

上記のごとく、組織や血液と医療情報などの取り扱いに関し、難病バンク事業への協力の同意について撤回がありましたので、お知らせします。適切に処理したことを証明する文書をお送り下さい。

医師署名 _____ (自著)

病 院 名 _____ 科 名 _____

住 所 〒 _____

ヒト皮膚からの皮膚線維芽細胞樹立

分担研究者 尹 浩信

熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野教授

協力者 神人正寿

熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野講師

研究要旨

症例数が限られる難治性疾患の生体試料提供体制を確立する事を目的として難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けて基盤研究を行なっている。そのために我々は、難治性疾患の皮膚から iPS 細胞を樹立する際の皮膚線維芽細胞の樹立について検討を行った。

A. 目的

症例数が限られる難治性疾患の生体試料は希少性が高いため、公平性を確保した提供体制が必要とされる。しかしながら、生体試料は有限であり、多くの研究者の要求に応じて幅広く提供する事は困難である。そこでこの問題を解決するために、難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けての基盤研究を行っている。

本研究では iPS 細胞を作製するためにその前段階として難治性疾患の皮膚から生検を行い、皮膚線維芽細胞を樹立する事を目的として研究を行った。

B. 背景

症例数が限られる難治性疾患の生体試料は希少性が高いため、公平性を確保した提供体制が必要とされる。しかしながら、生体試料は有限であり、多くの研究者の要求に応じて幅広く提供する事は困難である。そこでこの問題を解決するために、難治性疾患の生体試料から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の作成と作製した iPS 細胞のバンク化に向けての基盤研究を行っている。

患者試料から作製された iPS 細胞は、無制限に増幅させ、長期にわたり貯蔵可能であり、多くの研究者に必要時に容易に提供可能である。従って、さまざまな分野の研究

者が難治性疾患を研究する機会が増え、治療法の開発を促進する可能性がある。

iPS 細胞確立に際してはヒト皮膚からヒト皮膚線維芽細胞を培養増殖させ、SeVベクターによって初期因子 Oct-4、Sox-2、KLF4、c-Myc を一過性に発現させ、iPS 細胞を作製する事が外来因子フリー iPS 細胞を確立する事が最も簡単で、確実であると考えられる。

C. 方法

本研究は、皮膚試料を手術にて採取する事及び採取した皮膚からヒト皮膚線維芽細胞を培養増殖させその後 iPS 細胞を樹立する事を熊本大学倫理委員会に申請し、承認されている。

まず正常および難治性疾患患者に、研究目的、予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後同意（インフォームドコンセント）を得た上で皮膚生検を行なった。

局所麻酔薬を用いて麻酔後 4mm パンチ（直径 4mm）にて皮膚を採取後縫合した。採取した皮膚から皮下脂肪織を剥離後、培養液（Eagle's MEM）にて数回洗浄後、清潔条件でクリーンベンチに運搬後 0.5mm 角程度に細切除し、再切除した皮膚を間隔をあけながら真皮側をプラスチックシャーレに張り付けていく。Eagle's MEM に 10%FCS および抗生物質、抗真菌剤添加を加えたものを培養液として 37℃にてインキュベーターにて培養を行う。

D. 結果

顕微鏡にて観察したところ数日にてヒト

皮膚線維芽細胞がプラスチックシャーレ上に遊走・増殖し2-3週間後にはヒト皮膚線維芽細胞がプラスチックシャーレ上にconfluentに増殖した。トリプシン処理にてプラスチックシャーレよりヒト皮膚線維芽細胞を分離し、1:5の割合でプラスチックシャーレに播種し、ひと皮膚線維芽細胞を増殖する事ができた。また形態学的に100%ヒト皮膚線維芽細胞である事も確認できた。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

遺伝子挿入のない iPS 細胞を用いた分化誘導法の開発に関する研究

分担研究者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究所 教授

研究要旨

人工多能性幹細胞(iPS 細胞)の開発によって、難治性疾患の患者から iPS 細胞を樹立し、分化誘導すれば、疾患の発症機構の解明や治療に極めて有益な知見を得ることができる可能性が生まれてきた。そこで、本計画は難治性疾患由来の iPS 細胞の作製とバンク化を目的としている。特にセンダイウイルス(SeV)ベクターを使って、外来因子の遺伝子挿入を持たない iPS 細胞を作成、保存するのが特徴である。本分担研究では、バンク化された iPS 細胞を一般の研究者が利用しやすい様な分化誘導の技術開発を行い、情報を提供することを目指している。

A. 研究目的

人工多能性幹細胞(iPS細胞)の開発によって、難治性疾患の患者からiPS細胞を樹立し、分化誘導すれば、疾患の発症機構の解明や治療に極めて有益な知見を得ることができる可能性が生まれてきた。そこで、本計画は難治性疾患由来のiPS細胞の作製とバンク化を目的とする。特にセンダイウイルス(SeV)ベクターを使って、外来因子の遺伝子挿入を持たないiPS細胞を作成、保存するのが特徴である。

この分担研究では、バンク化されたiPS細胞を一般の研究者が利用しやすい様な技術開発を行い、情報を提供することを目的とする。難治疾患由来のiPS細胞はバンク化してそれぞれの研究者に役立ててもらうのが本研究の基本であり、分化誘導もそれぞれで行うことになる。しかし難治疾患治療に携わる大多数の研究者はiPS細胞の取り扱いには慣れていない。そ

れでもiPS細胞の維持法はほぼ確立されており、ホームページなどでも公開されているのに対し、分化誘導法はそれぞれの目的細胞によって異なり試行錯誤が必要である。そこで、正常人由来のiPS細胞をモデルケースとして分化誘導実験を行った。

B. 研究方法

ゼラチンコートした培養皿にマイトマイシン C 処理したマウス繊維芽細胞をまき、その上で iPS 細胞を培養した。山中伸弥博士が Oct3/4, Sox2, Klf4 の導入によって樹立した iPS 細胞(253G1)を使用した。また培養液は ReproCell 社の Primate ES cell culture medium に bFGF を添加して用いた。

iPS 細胞を ReproCell 社の細胞解離液で処理し、適当な大きさの塊に解離したのち、非接着性の培養皿(6 穴プレート)で1

週間浮遊培養して胚様体(Embryoid body)を形成させ、ゼラチンでコートした培養皿に接着させてさらに1週間培養した。この際、中胚葉誘導因子であるアクチビンの他、レチノイン酸などを加えて比較した。

(倫理面への配慮)

難治性疾患患者由来のiPS細胞ではなく、正常人由来のものをRIKENから購入して使用した。学内の倫理委員会での承認済みである。

C. 研究結果

アクチビンを全過程に添加したものは、全く因子を加えない場合に比較して、胚様体の発育がよく、内腔形成も良好であった。しかし胚様体同士の融合がみられ、均一な分化が難しい。96穴プレートにまいたものでは、大きさのコントロールはできるが、発育が劣っていた。いずれの場合も、細胞を単一に解離しないで行ったため、一つの胚様体を構成する細胞数を制御するのが難しかった。

現在iPSを完全に単一の細胞に解離した後、遠心して凝集させる方法(spin embryoid body法)を試みている。この方法の利点は細胞数を完全に制御することができることであるが、欠点として解離後の細胞生存率が低下する。実際、細胞死が多くみられており改善が必要である。

D. 考察

今回使用したのは、Oct3/4, Sox2, Klf4の3因子で山中らによって誘導されたオリジナルのiPS細胞であり、外来遺伝子

が染色体上に残存している。センダイウイルスベクターによる外来因子フリーiPS細胞は、より高い分化能を期待できるので、今後はこれを使って条件を検討したい。但し難治疾患由来のiPS細胞は個人情報保全等の法的整備が完了していないため、本分担研究では正常人由来のものを先行させる。もちろん計画全体としては難治疾患由来iPS細胞の使用整備を迅速に進める。

またES細胞やiPS細胞は、株によってばらつきがあることが知られており、分化条件が株によって異なることが予測される。株によっては目的の細胞系譜へ一切分化しないこともあり得る。本計画では各疾患から最低3株のiPS細胞を作ること为目标にしているが、これですべての分化誘導のニーズを満たすのは難しい。貴重なiPS細胞株がそれぞれ同等に未分化状態を維持し、分化能をもつのが望ましい。マウスのES細胞やiPS細胞では、そのようないわゆるground stateの条件が報告されているが、ヒトES/iPS細胞では確立されていない。最近JaenischらによってマウスES/iPS細胞のような形態とシグナル経路をもつヒトnaïve iPSが報告された(PNAS, 2010)。外来因子なしでの自己複製維持が10-15世代と一過性である欠点をもつものの、その間は単一細胞から継代でき、分化誘導には有益と考えられる。この方法も取り込んで、簡便で均一な分化誘導条件を確立したい。

E. 結論

iPS細胞の分化誘導法の開発を開始した。外来因子フリーiPS細胞を単一細胞に

解離し、細胞数を制御した条件での、簡便で均一な分化誘導条件を確立し、早期に科学コミュニティに還元したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

センダイウイルスベクターを用いた遺伝子挿入のない疾患由来iPS細胞株
の樹立に関する研究

研究分担者 房木ノエミ ディナベック株式会社
細胞治療・再生医療ユニット・リーダー

研究要旨： 熊本大学にて作製した難病疾患患者由来・線維芽細胞初代培養株から、染色体に傷をつけない細胞質増殖型 RNA ウイルスベクターであるセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いて iPS 細胞を作製した。糖原病患者由来線維芽細胞 A000001 からは 10 株、家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) 患者由来線維芽細胞 3 株：A000002, A000003, A000004 からはそれぞれ 22, 23, 22 株の iPS 細胞を樹立し、それぞれヒト ES マーカーの発現と、外来遺伝子がフリーになっていることを確認し、細胞を凍結保管した。次年度以降、樹立した iPS 細胞から分化細胞を誘導し、病態の再現と、さらに多くの難病疾患患者由来細胞より iPS 細胞の樹立を行い、バンク化をはかる予定である。

A. 研究目的

難治性疾患の生体試料は、希少性が高く有限であり、要求に応じて幅広く供給することは困難な部分が多い。そこで、この問題点を克服するために、難治性疾患由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)の委託作製と作製したiPS細胞のバンク化に向けての基盤研究を遂行中である。特に本研究では、国内で開発された最新のセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いた。この方法では、遺伝的背景が均一で外来因子フリーの細胞が簡便に、かつ、最も効率よく樹立され、従来法のもつ外来因子の遺伝子挿入という欠点を無くした画期的な方法である。本研究分担者は、本年度は難治性疾患細胞由来iPS細胞バンクのための、SeVベクターによる外来遺伝子フリーのiPS細胞の樹立を分担した。

B. 研究方法

熊本大学にて樹立された糖原病患者由来および家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)の3患者由来線維芽細胞を用い、山中四因子(ヒト*OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, *c-MYC*遺伝子)搭載SeVベクターにてiPS細胞の誘導を行った^{文献1)}。iPS細胞の誘導効率は、コロニーのヒトES細胞様形態と、アルカリホスファターゼ陽性を基準として判断し、播種した線維芽細胞数に対する陽性コロニー数にて誘導効率を算出した。得られたiPS細胞からRNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAを作製しRT-PCRを行い、SeVベクターの残存およびヒトES細胞マーカーの発現を確認した。SeVベクターの残存は、RT-PCRの他に、抗SeV抗体による免疫染色も行い、確実に除去されていることを再確認した。外来遺伝

子フリーを確認したiPS細胞株は、液体窒素タンクにて冷凍保管を行っており、バンクへ移行予定にしている。

(倫理面への配慮)

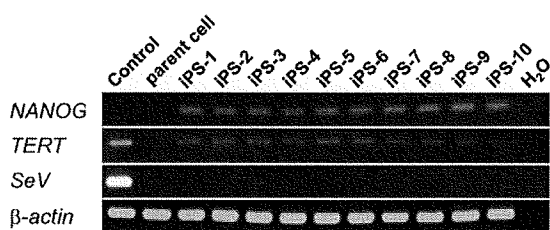
熊本大学にて樹立した患者由来初代培養線維芽細胞株は、匿名化され、社内倫理委員会を通し倫理面に問題がないことを確認してから受け入れを行った。

C. 研究結果

樹立中の糖原病由来iPS細胞



RT-PCRによるiPS細胞株の遺伝子発現の解析



糖原病患者由来線維芽細胞A000001からは10株、家族性アミロイドポリニューロパチー患者由来線維芽細胞3株:A000002, A000003, A000004からはそれぞれ22, 23, 22株のiPS細胞を樹立した。同時並行のiPS細胞誘導実験では、誘導効率はA000001では0.016% (実験回数n=1)、A000002では平均0.054% (n=3)、A000003では0.40% (n=3)、A000004では0.12% (n=3)となり、誘導元の線維芽細胞株により誘導効率が異なったが、すべての細胞でiPS細胞を誘導するこ

とに成功した。RT-PCRおよび抗SeV抗体による免疫染色により、継代数7~12 (誘導後約2~3ヶ月) にA000001の2株、A000003の1株を除き、上記74株すべてに於いてSeVベクターおよび導入遺伝子陰性を確認した。これらの外来因子フリー・難治性疾患由来iPS細胞株のヒトESマーカーの発現を、RT-PCRで解析し、すべての株で*NANOG*および*TERT*遺伝子が発現していることを確認した。このうち3株ずつを熊本大に移送し、病態の再現について解析中である。以上のiPS細胞株はすべて凍結保管しバンク化に備えている。

D. 考察

細胞質増殖型・RNAウイルス由来のSeVベクターを用いて、2疾患4患者由来線維芽細胞から短期間にて効率よく外来因子フリーのiPS細胞を計74株誘導することに成功した。これらのiPS細胞株は染色体にランダムに外来遺伝子が組み込まれる恐れもなく、本来の親細胞の遺伝的形質を維持しているものと考えられ、その後の難治性疾患の発症機序や病態解析、薬効スクリーニングなどの応用研究に、外来因子挿入のノイズのない材料提供が可能となったと考えられる。次年度以降、疾患数を増やし、バンク化の充実をはかると共に、得られたiPS細胞の機能解析や分化誘導、病態解析、遺伝子治療の可能性などの探索的な研究を熊本大学と共に進めていく予定である。

E. 結論

熊本大学で樹立した糖原病患者由来線維芽細胞A000001からは8株、家族性アミロ

イドポリニューロパチー(FAP)患者由来
線維芽細胞3株：A000002, A000003,
A000004からはそれぞれ22株のiPS細胞を
樹立に成功し、合計74株のiPS細胞に於い
て、ヒトESマーカ－：*NANOG*, *TERT*の発
現と、外来遺伝子フリーの確認を行い、
すべての株の凍結保管を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

房木 ノエミ、伴 浩志、佐伯 晃一、田
畑 寿晃、長谷川 護
細胞質型センダイウイルスベクタ
ーによる染色体を傷つけない外来因子フ
リーヒトiPS細胞の作製（日本分子生物学
会、横浜、2009.12.10）

Noemi Fusaki, Hiroshi Ban, Koichi Saeki,
Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa
Efficient induction of transgene-free huma
n pluripotent stem cells using Sendai viru
s vectors, the RNA virus vectors that do
not integrate into the host genome. (Keyst
one Symposium, 2010.2.16)

房木ノエミ、伴浩志、長谷川護
ゲノムを傷つけないiPS細胞の高効率作
製法：センダイウイルスベクターの利用
（日本再生医療学会、広島、招待講演、2
010.3.18）

伴浩志、房木ノエミ、佐伯晃一、長谷川
護安全で効率的なiPS細胞誘導：センダイ
ウイルスベクター(SeV)の優位性（日本再
生医療学会、広島、2010.3.18）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

IV 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Kitagawa, M Era, T	Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells.	Int. J. Hematol.	91	373-383	2010

V 研究成果の刊行物・別冊

Differentiation of mesodermal cells from pluripotent stem cells

Michinori Kitagawa · Takumi Era

Received: 29 October 2009 / Revised: 15 January 2010 / Accepted: 21 January 2010 / Published online: 12 March 2010
© The Japanese Society of Hematology 2010

Abstract The pluripotency of embryonic stem cells has been well demonstrated by a vast variety of studies showing the induction of differentiation into desired cell types that have the potential to be used not only in basic studies but also in medical applications. The induction of mesodermal cells, especially blood cells, from embryonic stem cells is notable from the point of view of transplantation, and the methods for this induction have improved over the last few years, with more defined culture conditions in place. Concurrently, the generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells opens the possibility of autologous transplantation. In fact, there are a growing number of reports demonstrating that several mesodermal cells can be differentiated from induced pluripotent stem cells using the same methods used for embryonic stem cells. This review summarizes recent advances in the differentiation of mesodermal cells from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.

Keywords Mesoderm · Pluripotent stem cells · ES cells · iPS cells

M. Kitagawa
Department of Phylogeny, Institute of Molecular Embryology and Genetics (IMEG), Kumamoto University,
2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan
e-mail: kitagawa@kumamoto-u.ac.jp

T. Era (✉)
Department of Cell Modulation, Institute of Molecular Embryology and Genetics (IMEG), Kumamoto University,
2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan
e-mail: tera@kumamoto-u.ac.jp

1 Introduction

Embryonic stem (ES) cells originate from the inner cell mass (ICM), the internal cell component of the blastocyst, and are pluripotent cell lines with the ability to self-renew, infinitely proliferate, and the potential to broadly differentiate into many cell types, including mesodermal cells and their descendants [1, 2]. Besides the sustained growth and pluripotency, the efficient homologous recombination in ES cells provides a useful system for genetic manipulation by creating gene-targeted mice. As ES cells have been shown to differentiate into various lineages under appropriate culture conditions *in vitro*, ES cells are also available as an experimental tool to elucidate the molecular mechanisms of embryonic development and differentiation. Moreover, the establishment of human ES cells has facilitated their utilization in research for regenerative therapies [3]. The advantages of using ES cells are as follows: (1) although the number of cells in the mouse ICM or adult tissue stem cells is too limited for direct analysis, ES cells are capable of proliferating and providing enough cells for this; (2) ES cells can also be manipulated genetically *in vitro*, and are available to generate chimeric mice, allowing the analysis of the function of a gene of interest *in vivo*. However, there are several disadvantages of using ES cells. Some canonical methods of differentiation tend to suffer from contamination by irrelevant cells because of the difficulties of separating the cells of interest, which complicates any subsequent analysis. As shown in transplantation experiments, ES cells produce teratomas in recipient mice and insufficient removal of undifferentiated ES cells may lead to tumorigenesis, one of the major obstacles for the application of the differentiated cells in regenerative medicine. To solve these problems, it is necessary to introduce some steps to concentrate the intermediate precursor/progenitor cells

using cell surface markers and to simplify the differentiation procedure using serum-free media or avoiding coculture with other cells if possible. For the last decade, researchers have been developing methods to differentiate ES cells into their preferred tissues, including mesoderm (summarized in Table 1). From the point of view of clinical demand for therapeutic transplantations, hematopoietic cells are the most notable descendants of mesodermal cells. Understanding the properties of the stem/progenitor cells and fine-tuning their culture conditions are indispensable for the precise induction of the descendant cells of interest. The establishment of secure and safe methods of manipulation of ES cells into terminally differentiated cells will lead to clinical applications, such as regenerative treatment. This review summarizes the recent advances in the manipulation of ES cells into mesodermal tissues.

2 Mesoderm development in vivo

On the basis of the biological mechanisms observed in normal embryogenesis, a variety of ES cell differentiation processes have been developed in vitro. To control the differentiation of ES cells into mesodermal tissues, it is important to precisely refer to the in vivo process of mesodermal tissue development. In mammalian embryogenesis, the ICM gives rise to the primitive endoderm and epiblast, which is the source of the three primary germ layers during gastrulation (Fig. 1). The formation of the germ layers, and their subsequent fates, are determined through a process dependent upon spatial and temporal regulatory control. The primitive streak, one of the first signs of gastrulation, is a key structural marker to discriminate mesodermal precursor cells [4]. The cells at the anterior region of the primitive streak form the anterior mesendoderm, a bipotential cell population that has the capacity to generate definitive endoderm or axial mesoderm. At the mid- to late-streak stage, the mesoderm emerging from the primitive streak enters between the endoderm and ectoderm to form the paraxial, intermediate, and lateral mesoderm in order of their proximity to the primitive streak. The mesodermal precursor populations give rise to the following: the prechordal plate and notochord (from axial mesoderm); somites, which develop into muscles, bones, and cartilage (from paraxial mesoderm); kidneys, gonads, and their respective duct systems (from intermediate mesoderm); and heart, blood vessels, and blood cells (from lateral mesoderm). In addition, the epiblast forms the extraembryonic mesoderm outside of the embryo, which gives rise to the endothelial and hematopoietic cells of the yolk sac vasculature. However, to reproduce this complicated biological process by simple experimental procedures is clearly difficult. It requires the dissection of the process into elementary steps using various

biological markers and the compiling of each step in the correct order. Section 3 explains how to induce and analyze the differentiation of ES cells into cells corresponding to mesodermal cells or tissues of interest on culture dishes.

3 In vitro differentiation of mesodermal cells

3.1 General consideration

Commonly used protocols for ES cell differentiation are categorized into three types according to the method of culturing: embryoid-body (EB) formation [5], culture on feeder cells [6], and simple monolayer culture on extracellular-matrix-coated dishes (Fig. 2). EB formation is the most popular method whereby three-dimensional cell aggregates are formed and undergo a developmental process corresponding to the events of early embryogenesis, in which the cells lose their pluripotency and differentiate into ectoderm, endoderm, and mesoderm. However, the multiplicity of differentiated cell lineages complicates subsequent analysis, and the heterogeneous size of the cell aggregates tends to cause non-uniform differentiation processes due to differences in extracellular adhesion and intercellular signaling by the cells of interest. It is therefore difficult to control and direct ES cells into mesodermal cells using exogenous signals. To overcome these disadvantages, investigators have developed two-dimensional culture methods. Coculture with feeder cells allows the selective induction of the cell lineage of interest. The induction of the hematopoietic cell lineage from ES cells is achieved by coculturing with stromal cell lines [7]. The modification of the feeder cells enables the elimination of unnecessary cell lineages, such as the use of stromal cell line OP9 to avoid macrophage proliferation, for example [8]. Furthermore, ST2 stromal cells, derived from bone marrow cells, have the potential to support osteoclastogenesis from hematopoietic cells, thus a sequential coculture of mouse ES cells with OP9 cells followed by ST2 cells could efficiently introduce osteoclasts [9]. However, the feeder culture system is technically complicated because the condition of the feeder cells tends to affect the reproducibility of the differentiation. By using a simple monolayer culture, the inducible cell lineage is more selective than the feeder culture, and it is easier to control and observe the differentiation process, and to collect the differentiated cells. Another advantage of monolayer culture is the flexibility and selectivity of culture dish matrix components. Collagen IV is capable of directing ES cell differentiation into mesoderm lineages, including hematopoietic, endothelial, and smooth muscle cells [10]. Although each cell monolayer could be uniformly treated with the same culture conditions, lots of trials are needed to establish the defined culture conditions for the cell types of

Table 1 Summary of mesodermal cell differentiations from ES and iPS cells

Differentiated cell types	Cell types	Selection markers	Culture conditions	Supplement factors	References
Mesodermal cells	Mouse ES	GFP-Gsc, E-cadherin	Embryoid body	Activin A	[13]
	Mouse ES	PDGFR α , VEGFR2	Collagen IV-coated dish		[24]
	Mouse ES	GFP-Brachyury	Embryoid body	Activin A	[89]
	Mouse ES		Coculture with OP9 stromal cells		[90]
Hematopoietic cells	Mouse ES	VEGFR2, VE-cadherin	Collagen IV-coated dish	VEGF, SCF, IL-3, EPO, G-CSF	[10]
	Mouse ES		Embryoid body	BMP4, Activin A, bFGF, VEGF	[29]
	Mouse ES	GFP-Brachyury, VEGFR2	Embryoid body	BMP4, Activin A, Wnt3a	[15, 30]
	Mouse ES		Embryoid body	HoxB4 (retrovirus)	[32]
Erythrocytes	Human iPS	CD43	Coculture with OP9 stromal cells		[75]
	Human ES		Coculture with murine fetal liver-derived stromal cells		[34]
Megakaryocytes	Mouse ES	Coculture with OP9 stromal cells		TPO	[91]
Lymphoid cells	Human ES	Coculture with OP9 stromal cells		VEGF	[35]
	Mouse ES		Coculture with OP9 stromal cells	IL-7	[6]
Dendritic cells	Mouse ES		Coculture with OP9 stromal cells	Dll1 (expressed on OP9 cells)	[92]
	Human ES	CD34	Coculture with OP9 stromal cells	Flt3-L, IL-3, IL-7, SCF	[36]
Macrophage	Mouse iPS		Coculture with OP9 stromal cells	GM-CSF, IL-4, TNFa, anti-CD40	[72]
	Mouse iPS		Coculture with OP9 stromal cells	M-CSF, IL-4, TNFa, anti-CD40	[72]
Vascular endothelial cells	Mouse ES	VEGFR2, VE-cadherin	Coculture with OP9 stromal cells	VEGF, SCF, IL-3, EPO, G-CSF	[10]
	Mouse ES		Collagen IV-coated dish	VEGF, IGF-1, Epo, bFGF, IL-11	[41]
	Mouse ES	VEGFR2	Embryoid body	VEGF	[23]
	Mouse ES	VEGFR2	Collagen IV-coated dish	VEGF	[71]
Cardiac cells	Human iPS	CD31, CD43	Coculture with OP9 stromal cells		[75]
	Mouse ES	VEGFR2, CXCR4	Coculture with OP9 stromal cells	Dkk-1, Frizzled/Fc	[47]
	Mouse ES	VEGFR2, Isl1, Nkx25	Embryoid body		[48]
	Mouse ES	VEGFR2	Embryoid body	Noggin	[49]
Skeletal muscle cells	Mouse iPS	VEGFR2	Collagen IV-coated dish and coculture with OP9 stromal		[69]
	Human iPS		Embryoid body		[73]
	Mouse ES	PDGFR α	Collagen IV-coated dish		[57]
	Mouse ES	PDGFR α , VEGFR2	Embryoid body	Pax3 (Dox inducible)	[58]