

ヒトES細胞株樹立のために使用する配偶子の採取・体外受精胚の作製及びこれらの保存・運搬については以下の①～⑧に従うこと。ヒトES細胞株の樹立及び分配は、平成21年8月21日付文部科学省告示第156号「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針」に準じて行うものとする。ヒトES細胞はヒト体外受精胚を用いて樹立(第一次樹立)されたものであること。なお、ヒトクローン胚を作成し、作成したクローン胚を用いて樹立(第二次樹立)されたES細胞については使用しないこと。また、「体内受精胚」も使用しないこと。

#### ①採取者及び採取医療機関等の適格性

ヒト体外受精胚を作製して使用する場合には雄性及び雌性配偶子の採取者及び採取医療機関等に求めるべき技術的要件について、明らかにすること。

#### ②受精胚の作製方法の妥当性

体外受精胚の作製方法を示し、これらが科学的及び倫理的に適切に選択され、かつ適切な手続きが行われたものであることを明らかにすること。配偶子の採取方法、及び体外受精の方法については、用いられる器具及び薬剤、微生物汚染防止、取り違いやクロスコンタミネーション防止のための方策等を具体的に示すこと。

#### ③ドナーに対する説明及び同意

配偶子のドナーに対する説明及び同意の内容を、臨床利用も含めて規定すること。

#### ④ドナーの個人情報の保護

ドナーの個人情報の保護方策について具体的に規定すること。

#### ⑤ドナーの安全性確保のための試験検査

配偶子の採取時にドナーの安全性確保のために採取部位の状態の確認など試験検査を行わなければならない場合には、その内容、検査結果等に問題があった場合の対処法について具体的に規定すること。

#### ⑥保存方法及び取り違い防止策

採取した配偶子、もしくは作製した体外受精胚を一定期間保存する必要がある場合には、保存条件や保存期間及びその設定の妥当性について明らかにすること。また、取り違いを避けるための手段や手順等については、平成21年2月20日付け雇児母発第0220001号通知厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課長通知「不妊治療における安全管理の徹底について」等を参考にし、その内容を具体的に説明すること。

#### ⑦運搬方法

採取した配偶子、もしくは作製した体外受精胚を運搬する必要がある場合には、運搬容器、運搬手順(温度管理等を含む。)を定め、その妥当性について明らかにすること。

#### ⑧記録の作成及び保管方法

①～⑦に関する事項について、実施の記録を文書で作成し、適切に保管する方法について明らかにすること。

ES細胞由来分化細胞を原材料とした場合は、当該細胞について可能な限り、上記に関する情報を収集することで良い。

#### 2 体外受精胚、既存のES細胞及びES細胞由来分化細胞以外の原材料及び製造関連物質

体外受精胚、既存のES細胞及びES細胞由来分化細胞以外の原材料及び製造関連物質を明らかにし、その適格性を示すとともに、必要に応じて規格を設定し、適切な品質管理を行うことが必要である。

なお、生物由来製品又は特定生物由来製品を原材料として使用する場合は、その使用量を必要最小限とし、「生物由来原料基準」(平成15年厚生労働省告示第210号)をはじめとする関連法令及び通知を遵守すること。特に、ウイルス不活化及び除去に関する情報を十分に評価する必要があるほか、選及調査等を確保する方策についても明らかにすること。

##### (1)細胞の培養を行う場合

①培地、添加成分(血清、成長因子及び抗生物質等)及び細胞の処理に用いる試薬等のすべての成分等についてその適格性を明らかにし、必要に応じて規格を設定すること。各成分等の適格性の判定及び規格の設定に当たっては、最終製品の適用経路等を考慮すること。

②培地成分については、以下の点に留意すること。

ア 培地に使用する成分及び水は、可能な範囲で医薬品又は医薬品原料に相当する基準で品質管理されている生物学的純度の高い品質のものをを使用すること。

イ 培地に使用する成分は主成分のみでなく使用するすべての成分について明らかにし、選択理由及び必要に応じて品質管理法等を明確にすること。ただし、培地の構成成分が周知のもので、市販品等が一般的に使用されているDMEM、MCDB、HAM、RPMIのような培地は1つのものと考えてよい。

ウ すべての成分を含有した培地の最終品については、無菌性及び目的とした培養に適していることを判定するための性能試験を実施する必要がある。その他、工程管理上必要と思われる試験項目を規格として設定し、適切な品質管理を行う必要がある。

③異種血清及び異種もしくは同種の血清に由来する成分については、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと。特に繰り返し使用する可能性のある製品では可能な限り使用を避けるよう検討すること。血清等の使用が避けられない場合には、以下の点を考慮し、血清等からの細菌、真菌、ウイルス及び異常プリオン等の混入・伝播を防止するとともに、最終製品から可能な限り除去するよう処理方法等を検討すること。

ア 血清等の由来を明確にすること。

イ 牛海綿状脳症発生地域からの血清を極力避ける等感染症

リスクの低減に努めること。

ウ 由来動物種に特異的なウイルスやマイコプラズマに関する適切な否定試験を行い、ウイルス等に汚染されていないことを確認した上で使用すること。

エ 細胞の活性化、増殖に影響を与えない範囲で細菌、真菌及びウイルス等に対する適切な不活化処理及び除去処理を行う。例えば、潜在的なウイルス混入の危険性を避けるために、必要に応じて加熱処理、フィルター処理、放射線処理又は紫外線処理等を組み合わせて行うこと。

オ 培養細胞でのウイルス感染のモニター、患者レベルでのウイルス性疾患の発症に対するモニター及び異種血清成分に対する抗体産生等の調査のために、使用した血清の一部を保管すること。

④フィーダー細胞を使用する場合には、平成12年7月14日付け医薬審第873号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基材の由来、調製及び特性解析」、平成14年7月9日付け医政研第0709001号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」及び平成16年7月2日付医政研第0702001号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針」を参考にして品質評価を行い、フィーダー細胞からの細菌、真菌、ウイルス、異常プリオン等の混入・伝播を防止するとともに、使用時の分裂能不活化方法及び細胞密度等の条件について明らかにすること。ただし、例えば既に臨床使用されているヒト細胞・組織製品の製造に使用され、その特性や微生物学的安全性等について評価が定まっているフィーダー細胞と同一の細胞を利用する場合には、その妥当性を示すことによってウイルス否定試験等、試験の一部を省略することができるかも知れない。

⑤抗生物質の使用は極力避けるべきである。ただし製造初期の工程において抗生物質の使用が不可欠と考えられる場合には、その後の工程で可能な限り漸減を図るほか、その科学的理由、最終製品での推定残存量、患者に及ぼす影響などの面から妥当性を説明すること。なお、抗生物質を使用する場合でも十分に除去されることが立証される場合には、その使用を妨げるものではない。一方、原則として、用いる抗生物質に過敏症の既往歴のある患者の場合には、本治療を適応すべきではない。やむを得ず適用する際には十分な注意を払うと同時に、患者からインフォームド・コンセントを得る必要がある。

⑥成長因子を用いる場合には、細胞培養特性の再現性を保証するために、例えば純度及び力価に関する規格を設定する等適切な品質管理法を示すこと。

⑦最終製品に含有する可能性のある培地成分や操作のために

用いられたその他の成分等については、生体に悪影響を及ぼさないものを選択すること。

⑧フィーダー細胞として異種動物由来の細胞を用いる場合には、異種動物由来の感染症のリスクの観点から安全性を確保すること。

## (2) 非細胞成分と組み合わせる場合

### ①細胞以外の原材料の品質及び安全性について

細胞とともに最終製品の一部を構成する非細胞の原材料(マトリックス、医療材料、スキャフォールド、支持膜、ファイバー及びビーズ等)がある場合には、その品質及び安全性に関する知見について明らかにすること。

当該原材料の種類と特性、最終製品における形態・機能及び想定される臨床適応の観点から見た品質、安全性及び有効性評価との関連を勘案して、適切な情報を提供すること。生体吸収性材料を用いる場合には、分解生成物に関して必要な試験を実施すること。

なお、必要な試験等については、平成15年2月13日付け医薬審第0213001号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的試験の基本的考え方について」等を参照し、試験結果及び当該原材料を使用することの妥当性を示すこと。文献からの知見、情報を合理的に活用すること。

### ②目的とする細胞との相互作用について

最終製品中または中間製品中の細胞との相互作用に関し、以下の事項について、確認方法及び確認結果を示すこと。

ア 非細胞成分が、想定される臨床適応に必要な最終製品中または中間製品中の細胞の機能、生育能力、活性及び安定性に悪影響を与えないこと。

イ 非細胞成分との相互作用によって起こり得る、最終製品中または中間製品中の細胞の変異、形質転換及び脱分化等を考慮し、その影響を可能な範囲で評価すること。

ウ 想定される臨床適応において期待される非細胞成分の性質が、最終製品中または中間製品中の細胞との相互作用によって損なわれないこと。

③細胞と適用部位を隔離する目的で非細胞成分を使用する場合 非細胞成分を細胞と適用部位を隔離する目的で使用する場合、下記の項目を参考に効果、安全性を確認すること。

ア 免疫隔離が目的の場合、その程度

イ 最終製品中の細胞由来の目的生理活性物質の膜透過キネティクスと薬理効果

ウ 栄養成分及び排泄物の拡散

エ 非細胞成分が適用部位周辺に及ぼす影響

オ 目的細胞由来の目的生理活性物質の薬理効果に期待し、かつ目的細胞や未分化細胞と適用部位との隔離を目的する場合、非細胞成分の崩壊等により細胞等が漏出しにくいこと。

### (3) 細胞に遺伝子工学的改変を加える場合

細胞に遺伝子を導入する場合は、次に掲げる事項に関する詳細を示すこと。

- ①目的遺伝子の構造、由来、入手方法、クローニング方法並びにセル・バンクの調製方法、管理方法及び更新方法等に関する情報
- ②導入遺伝子の性質
- ③目的遺伝子産物の構造、生物活性及び性質
- ④遺伝子導入構成体を作製するために必要なすべての原材料、性質及び手順(遺伝子導入法並びに遺伝子導入用ベクターの由来、性質及び入手方法等)
- ⑤遺伝子導入構成体の構造や特性
- ⑥ベクターや遺伝子導入構成体を作製するための細胞やウイルスのバンク化及びバンクの管理方法

遺伝子導入細胞の製造方法については、平成7年11月15日付け薬発第1062号厚生省薬務局長通知「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」(以下、「遺伝子治療用医薬品指針」という。)の別添「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」第2章等を参照すること。また、同通知の別記に準じて設定の妥当性等を明らかにすること。

なお、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)に基づき、「ヒトの細胞等」若しくは「分化する能力を有する、又は分化した細胞等であって、自然条件において個体に成育しないもの」以外の細胞、「ウイルス」及び「ウイロイド」に対して遺伝子工学的改変を加える場合には、別途手続きが必要となるので留意すること。

上記の記述にかかわらず、細胞に導入される遺伝子が、化学的にも、機能的にも最終製品の一部を構成せず、製造工程中の試薬として使用される場合は、使用の目的に合う品質及び安全性が確保されていることを明らかにすることでよい(注：要検討)。

### 3 ヒトES細胞株及びヒトES細胞由来分化細胞株

#### (1) ヒトES細胞株の樹立

ヒトES細胞株の樹立及び分配は、平成21年8月21日付文部科学省告示第156号「ヒトES細胞の樹立及び分配に関する指針」に準じて行うものとする。また、ヒトES細胞の使用は、平成21年8月21日付文部科学省告示第157号「ヒトES細胞の使用に関する指針」に準じて行うものとする。

ヒトES細胞株の樹立に当たっては、体外受精胚の雄性及び雌性ドナーの遺伝的背景を可能な範囲で理解したうえで樹立すること。体外受精胚からES細胞株樹立までの方法(ヒト胚盤胞を得るための方法、胚盤胞からの内部細胞塊の分離・培養、未分化細胞の分離及び株化の方法、ヒトES細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間等)を明確に

し、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。

ヒトES細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種細胞特性解析指標(細胞純度、形態学的評価、HLAタイピング、表現型特異的マーカー、核型、DNAフィンガープリンティング、細胞増殖特性、多分化能など)のうちから重要細胞特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示すこと。[注：細胞特性解析に際して、特異的マーカーに加えて、網羅的解析、例えば1)CGHゲノム、2)エピジェネティクス(DNAメチル化)、3)RNA、4)糖鎖に関してアレイやチップ等を用いた解析が有用な場合もあるが、検体の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すれば良い。]

連結不可能匿名化等の理由でドナーの感染症に関する情報が得られない場合には、樹立したヒトES細胞株に関して特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)、バルボウイルスB19感染症について、検査により否定すること。また、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染及びウエストナイルウイルス感染については必要に応じて検査により否定すること。ドナーの遺伝的特徴が得られない場合は、ES細胞株自体の遺伝情報から遺伝的疾患関連因子の有無に関する解析が必要となることがある。なお、これらの試験等は医薬品製造基材という面からは分化細胞株の段階で実施しても良いが、ヒトES細胞株の樹立という趣旨からは、ES細胞株で実施されることが望ましい。

#### (2) ヒトES細胞使用機関によるヒトES細胞由来分化細胞株の樹立

ヒトES細胞使用機関がヒトES細胞から分化段階の進んだ細胞株(分化細胞株：バンク)を樹立することが、安全な最終目的製品を安定的に製造する上で重要でむしろ科学的に合理的な場合がある。そのような方策を選択した場合は、そのヒトES細胞使用機関における使用目的及びヒトES細胞加工医薬品等の製造における利点と妥当性を説明しておくこと。別の表現型を示す細胞株を段階的に樹立する際は、それぞれの細胞株樹立までの方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養及び株化の方法、細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、ヒトES細胞加工医薬品等の製造における妥当性を明らかにすること。

分化細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種特性指標(細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など)のうちから重要細胞特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示すこと。[注：細胞特性解析に際して、特異的マーカーに加えて、網羅的解析、例えば1)CGHゲノム、2)

エピジェネティックス(DNAメチル化)、3) RNA、4) 糖鎖に関してアレイやチップ等を用いた解析が有用な場合もあるが、検体の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すれば良い。]

なお、輸入されたES細胞株や古くに樹立されたES細胞株等から樹立された分化細胞株においても満たすべき要件は同様である。しかし、その樹立・維持の過程が不明で「生物由来原料基準」の規定などを満たさない原材料が使用された履歴もしくは疑いのある場合が想定される。そのような細胞株の使用の妥当性については、製品ごとに個別の審査・評価となるので医薬品医療機器総合機構と相談すること。[注：使用しようとするヒトES細胞由来分化細胞株に関して感染症関連の情報が十分得られない場合は、特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病(HTLV)、パルボウイルスB19感染症について、検査により否定すること。また、サイトメガロウイルス感染、EBウイルス感染及びウエストナイルウイルス感染については必要に応じて検査により否定すること。ドナーの遺伝的特徴が得られない場合は、ES細胞由来分化細胞株自体の遺伝情報から遺伝的疾患関連因子の有無に関する解析が必要となることがある。]

### (3) ヒトES細胞株・ヒトES細胞由来分化細胞株のバンク化

ヒトES細胞株またはヒトES細胞由来分化細胞株をバンク化するには、その理由、セル・バンクの作製方法及びセル・バンクの特性解析(細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など)、保存・維持・管理方法・更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順等について詳細を明らかにし、妥当性を示すこと。平成12年7月14日付医薬審第873号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」等を参考とすること。ただし、より上流の過程で評価されていることに起因する正当な理由により検討事項の一部を省略することは差し支えない。

### (4) ヒトES細胞株・ヒトES細胞由来分化細胞株の取り違え及びクロスコンタミネーション防止対策

ヒトES細胞株・ヒトES細胞由来分化細胞株の樹立及びバンク化における、取り違え及びクロスコンタミネーションの防止対策を明らかにすること。

### (5) ヒトES細胞株・ヒトES細胞由来分化細胞株の運搬方法

樹立された株化ヒトES細胞・ヒトES細胞由来株化分化細胞を運搬する必要がある場合には、運搬容器、運搬手段(温度管理等を含む。)を定め、その妥当性を明らかにすること。

### (6) 記録の作成及び保管方法

(1)～(5)に関する事項について、実施の記録を文書で作成し、適切に保管する方法について明らかにすること。

## 第2 製造工程

ヒトES細胞加工医薬品等の製造に当たっては、製造方法を明確にし、可能な範囲でその妥当性を以下の項目で検証し、品質の一定性を保持すること。

### 1 ロット構成の有無とロットの規定

最終製品及び中間製品がロットを構成するか否かを明らかにすること。ロットを構成する場合には、ロットの内容について規定しておくこと。

### 2 製造方法

配偶子の採取から体外受精胚の作製、ヒトES細胞株の樹立及び分化状態の進んだ細胞を経て最終製品に至る製造の方法の概要を示すとともに、具体的な処理内容及び必要な工程管理、品質管理の内容を明らかにすること。

#### (1) 受入検査

ヒトES細胞由来の分化細胞株について、受入のための試験検査の項目(例えば、目視検査、顕微鏡検査、生存率等)と各項目の判定基準を設定すること。

#### (2) ヒトES細胞由来の中間細胞株の樹立

ヒトES細胞加工医薬品等の製造者が、受け入れた分化細胞株から中間製品としての細胞株(中間細胞株)を樹立する場合は、その利点と妥当性を明らかにしておくこと。別の表現型を示す細胞株を段階的に樹立する際は、それぞれの細胞株樹立までの方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養及び株化の方法、細胞株樹立までの各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、その妥当性を明らかにすること。

中間細胞株の品質の均質性及び安定性を保持するため、各種細胞特性解析指標(細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など)のうちから重要細胞特性指標を同定してその基準を設定するとともに、設定された基準による品質を維持したまま増殖が可能な継代数又は分裂回数を示すこと。[注：細胞特性解析に際して、特異的マーカーに加えて、網羅的解析、例えば1) CGHゲノム、2) エピジェネティックス(DNAメチル化)、3) RNA、4) 糖鎖に関してアレイやチップ等を用いた解析が有用な場合もあるが、細胞の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すれば良い。]

#### (3) 最終製品の構成要素となる細胞の作製



ヒトES細胞由来分化細胞株から直接、あるいはヒトES細胞由来中間細胞株を経て、最終製品の構成要素となる細胞を作製する方法(分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養の方法、培養の各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等)を明確にし、その妥当性を明らかにすること。

#### (4) 細胞のバンク化

ヒトES細胞加工医薬品等の製造のいずれかの過程で、細胞をバンク化する場合には、その理由、セル・バンクの作製方法及びセル・バンクの特性解析(細胞純度、形態学的評価、表現型特異的マーカー、核型、細胞増殖特性、分化能など)、保存・維持・管理方法・更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順等について詳細を明らかにし、妥当性を示すこと。平成12年7月14日付け医薬審第873号厚生省医薬安全局審査管理課長通知「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」等を参考とすること。ただし、より上流の過程で評価されていることに起因する正当な理由により検討事項の一部を省略することは差し支えない。

#### (5) 製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーション防止対策

ヒトES細胞由来分化細胞株からのヒトES細胞加工医薬品等の製造にあたっては、製造工程中の取り違え及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。

### 3 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析

最終製品の構成要素となる細胞については、例えば、未分化細胞の混入や目的外の細胞の混入を規定するための細胞純度をはじめとして、細胞生存率、形態学的特徴、細胞増殖特性、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質、核型、分化能その他適切な遺伝型又は表現型の指標を解析するとともに、必要に応じて機能解析を行うこと。また、培養期間の妥当性及び細胞の安定性を評価するために、予定の培養期間を超えて培養した細胞において目的外の変化がないことを適切な細胞特性指標を用いて示すこと。これらの検討に際しては、あらかじめ試験的検体を用いた検討によって実施・検証しておくことでも良いが、これらの検討結果から患者に製品を適用する際に選択すべき重要細胞特性指標を明らかにしておくこと〔注：特異的マーカーに加えて、網羅的解析、例えば1)CGHゲノム、2)エピジェネティクス(DNAメチル化)、3)RNA、4)糖鎖に関してアレイやチップ等を用いた解析が有用な場合もあるが、検体の量的制限や技術的限界もあり、可能な範囲で考慮すればよい〕。適用後に体内での増殖等を期待する場合には、設定された基準による継代数又は分裂回数が期待された機能を発揮することを明らかにすること。

#### 4 最終製品の形態、包装

最終製品の形態、包装は、製品の品質を確保できるものでなければならない。

#### 5 製造方法の恒常性

ヒトES細胞加工医薬品等の製造に当たっては、製造工程を通じて、個別に加工した製品の細胞数、細胞生存率並びに製品の使用目的及び適用方法等からみた特徴(表現型の適切な指標、遺伝型の適切な指標、機能特性及び目的とする細胞の含有率等)が製品(ロット)間で本質的に損なわれないことを、試験的検体を用いてあらかじめ評価しておくこと。中間製品で評価することが、原材料としての細胞・組織の適格性や中間製品までの製造過程の妥当性をよく反映し、また、最終製品に向けての適正な道標となるなど、合理的な場合もあるので、必要に応じて選択肢とすること。

製造工程中の凍結保存期間や加工に伴う細胞培養の期間が長期に及ぶ場合には一定期間ごとに無菌試験を行うなど、無菌性が確保されることを確認すること。

#### 6 製造方法の変更

開発途中に製造方法を変更した場合、変更前の製造方法による製品を用いて得た試験成績を確認申請又は承認申請に使用するときは、製造方法変更前後の製品の同等性/同質性を示すこと。

### 第3 最終製品の品質管理

#### 1 総論

ヒトES細胞加工医薬品等の品質管理全体の方策としては、最終製品の規格及び試験方法の設定、個別患者への適用ごとの原材料の品質管理、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理のほか、中間製品の品質管理を適正に行うこと等が挙げられる。

ヒトES細胞加工医薬品等においては目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定するための方策が最も重要な要件の一つである。可能な限り中間製品の段階で目的細胞以外の未分化細胞の混入を否定することが望ましい。

最終製品の規格及び試験方法については、対象とする細胞・組織の種類及び性質、製造方法、各製品の臨床使用目的や使用方法、安定性、利用可能な試験法等によって異なると考えられるため、取り扱う細胞・組織によってこれらの違いを十分に考慮して設定すること。また、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持管理法、中間製品の品質管理等との相互補完関係を考慮に入れて、全体として品質管理の目的が達成されたとの観点から、合理的に規格及び試験方法を設定し、その根拠を示すこと。なお、確認申請は、治験を実施する製品の品質として問題がないとみなせることを確認することを目的としている。したがって、無菌性やマイコプラズマの否

定など必須なものを除き、治験後に臨床試験成績と品質の関係を論ずるために必要な品質特性については、やむを得ない場合は少数の試験的検体の実測値をもとにその変動をしかるべき範囲内に設定する暫定的な規格及び試験方法を設定することで差し支えない。ただし、規格及び試験方法を含み品質管理法は治験の進行とともに充実・整備を図ること。

## 2 最終製品の品質管理法

最終製品について、以下に示す一般的な品質管理項目及び試験を参考として、必要で適切な規格及び試験方法を設定し、その根拠を明らかにすること。

ロットを構成しない製品を製造する場合は個別製品ごとに、ロットを構成する製品を製造する場合には、通常、各個別製品ではなく各ロットが品質管理の対象となるので、これを踏まえてそれぞれ適切な規格、試験方法を設定すること。

### (1) 細胞数並びに生存率

得られた細胞の数と生存率は、最終製品又は必要に応じて適切な製造工程の製品で測定すること。なお、確認申請時には、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

### (2) 確認試験

目的とする細胞・組織の形態学的特徴、生化学的指標、免疫学的指標、特徴的産生物質その他適切な遺伝型あるいは表現型のうち、重要細胞特性指標を選択して、目的とする細胞であることを確認すること。

### (3) 細胞の純度試験

目的細胞以外の未分化細胞、異常増殖細胞、形質転換細胞の有無や混入細胞の有無等の細胞の純度について、目的とする細胞・組織の由来、培養条件等の製造工程、中間製品の品質管理等を勘案し、必要に応じて試験項目、試験方法及び判定基準を示すこと。なお、確認申請時には、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

### (4) 細胞由来の目的外生理活性物質に関する試験

細胞由来の各種目的外生理活性物質のうち、製品中での存在量如何で患者に安全性上の重大な影響を及ぼす可能性が明らかに想定される場合には、適切な許容量限度試験を設定すること。なお、確認申請時には、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

### (5) 製造工程由来不純物試験

原材料に存在するか又は製造過程で非細胞成分、培地成分(フィーダー細胞を含む)、資材、試薬等に由来し、製品中に

混入物、残留物、又は新たな生成物、分解物等として存在する可能性があるもので、かつ、品質及び安全性の面からみて望ましくない物質等(例えば、ウシ胎児血清由来のアルブミン、抗生物質等)については、当該物質の除去に関するプロセス評価や当該物質に対する工程内管理試験の結果を考慮してその存在を否定するか、又は適切な試験を設定して存在許容量を規定すること。試験対象物質の選定及び規格値の設定に当たっては、設定の妥当性について明らかにすること。

なお、確認申請時には、少数の試験的検体での実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

### (6) 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験

最終製品の無菌性については、あらかじめモデル検体を用いて全製造工程を通じて無菌性を確保できることを十分に評価しておく必要がある。最終製品について、患者に適用する前に無菌性(一般細菌及び真菌否定)を試験により示すこと。また、適切なマイコプラズマ否定試験を実施すること。検証された核酸増幅法を用いることでもよい。最終製品の無菌試験等の結果が、患者への投与後にしか得られない場合には、投与後に無菌性等が否定された場合の対処方法をあらかじめ設定しておくこと。また、この場合、中間製品で無菌性を試験により示し、最終製品に至る工程の無菌性を厳密に管理する必要がある。また、同一施設・同一工程で以前に他の患者への適用例がある場合には、全例において試験により無菌性が確認されていること。ロットを構成する製品で密封性が保証されている場合には、代表例による試験でよい。適用ごとに試験を実施する必要がある場合で、無菌試験等の結果が、患者への投与後にしか得られない場合には、適用の可否は直近のデータを参考にすることになるが、この場合でも最終製品の無菌試験等は必ず行うこと。

抗生物質は細胞培養系で極力使用しないことが望まれるが、使用した場合には、無菌試験に影響を及ぼさないよう処置すること。

### (7) エンドトキシン試験

試料中の夾雑物の影響を考慮して試験を実施すること。規格値は必ずしも実測値によらず、日本薬局方等で示されている最終製品の1回投与量を基にした安全域を考慮して設定すればよい。また、工程内管理試験として設定することも考えられるが、その場合には、バリデーションの結果を含めて基準等を設定し、その妥当性を説明すること。

### (8) ウイルス等の試験

製造工程中で生物由来成分を使用する場合には、最終製品で当該成分由来のウイルスについての否定試験の実施を考慮すべき場合もあるかも知れない。しかし可能な限り、もとの成分段階での試験やプロセス評価で迷入が否定されているこ

とが望ましい。

#### (9) 効能試験

細胞種、臨床使用目的又は特性等に応じた適切な効能試験の実施を考慮すべき場合もある。なお、確認申請においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

#### (10) 力価試験

細胞・組織から分泌される特定の生理活性物質の分泌が当該ヒトES細胞加工医薬品等の効能又は効果の本質である場合には、その目的としている必要な効果を発揮することを示すために、当該生理活性物質に関する検査項目及び規格を設定すること。遺伝子を導入した場合の発現産物又は細胞から分泌される目的の生成物等について、力価、産生量等の規格を設定すること。なお、確認申請時においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

#### (11) 力学的適合性試験

一定の力学的強度を必要とする製品については、適用部位を考慮した力学的適合性及び耐久性を確認するための規格を設定すること。なお、確認申請時においては、少数の試験的検体による実測値を踏まえた暫定的な規格を設定することでも良い。

### 第3章 ヒトES細胞加工医薬品等の安定性

製品化したヒトES細胞加工医薬品等又は重要なそれらの中間製品について、保存・流通期間及び保存形態を十分考慮して、細胞の生存率及び力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定し、その妥当性を明らかにすること。特に凍結保管及び解凍を行う場合には、凍結及び解凍操作による製品の安定性や規格への影響がないかを確認すること。また、必要に応じて標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を可能な範囲で確認すること。ただし、製品化後直ちに使用するような場合はこの限りではない。

また、製品化したヒトES細胞加工医薬品等を運搬する場合には、運搬容器及び運搬手順(温度管理等を含む)等を定め、その妥当性について明らかにすること。

### 第4章 ヒトES細胞加工医薬品等の 非臨床安全性試験

製品の特性及び適用法から評価が必要と考えられる安全性関連事項について、技術的に可能であれば、科学的合理性のある範囲で、適切な動物を用いた試験又は*in vitro*での試験

を実施すること。なお、非細胞成分及び製造工程由来の不純物等については、可能な限り、動物を用いた試験ではなく理化学的分析法により評価すること。また、最終製品における未分化細胞の存在が異所性組織形成や腫瘍形成・がん化の可能性など安全性上の重要な関心事であるが、可能な限り、セル・バンクや中間製品段階等での徹底的な解析により、混在の可能性を否定するか、あるいは、目的細胞から未分化細胞の効果的分離・除去法や不活化法を開発し、活用することにより、混在の可能性を最小限にする努力が求められる。さらに、投与経路等の選択も安全性上の懸念を最小限にするための有用な方策であるかも知れない。

ヒト由来の製品を実験動物等で試験して必ずしも意義ある結果が得られるとは限らない。このため、動物由来の製品モデルを作製し適切な実験動物に適用する試験系により試験を行うことで、より有用な知見が得られると考えられる場合には、むしろ、このような試験系を用いることに科学的合理性がある場合があるかも知れない。その際は、対象製品及び対象疾患ごとに適切な中・大動物を用いた試験の実施を積極的に考慮する(注:例えば神経疾患ならばサル等、循環器疾患ならばブタ・イヌ等が適している場合がある)。ただし、ヒトiPS(様)細胞加工医薬品等を構成する細胞と同一の特徴を有する細胞集団が同一の手法にてヒト以外の動物種からも得られるとは限らず、また同様の培養条件等で同等/同質な製品が製造できるとも限らないことから、このような試験の採用、実施及び評価にあたっては、慎重な事前検討や対応が必要である。ヒト以外の動物種から得たES細胞細胞加工製品を用いて動物実験を行った場合、その外挿可能性を説明すること。場合によっては細胞を用いる試験系も考慮し、このようなアプローチにより試験を行なった際には、その試験系の妥当性について明らかにすること。

以下に、必要に応じて非臨床的に安全性を確認する際の参考にすべき事項及び留意点の例を示す。これらは例示であって、合理性のない試験の実施を求める趣旨ではなく、製品の特性及び臨床適用法等を考慮して、必要かつ適切な試験を実施し、その結果について総合的な観点から評価、考察すること。

- 1 培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことや目的細胞以外の細胞が異常増殖していないことを明らかにすること。
- 2 必要に応じて細胞・組織が産生する各種サイトカイン、成長因子等の生理活性物質の定量を行い、生体内へ適用したときの影響に関して考察を行うこと。
- 3 製品の適用が患者の正常な細胞又は組織に影響を与える可能性、及びその安全性について検討、考察すること。
- 4 患者への適用により、製品中の細胞や混入する未分化細胞が異所性組織を形成する可能性、及びその安全性について検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与経路、

対象疾患、及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。

5 製品及び導入遺伝子の発現産物等による望ましくない免疫反応が生じる可能性、及びその安全性について検討、考察すること。

6 最終製品の細胞または中間製品の細胞について、適切な動物モデル等を利用し、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性に関して検討、考察すること。その際、製品の種類や特性、投与量・投与経路、対象疾患、及び試験系の妥当性等を総合的に勘案すること。また、腫瘍形成またはがん化の可能性がある場合には、期待される有効性との関係等を勘案して、使用することの妥当性及び合理性について明らかにすること。

(注：造腫瘍性試験において最も重要なのは、最終製品が患者に適用された場合の製品の造腫瘍性を的確に評価することである。しかし、十分な細胞数が得られない等の理由により最終製品を構成する細胞を用いることができず、中間製品の細胞を用いて最終製品の造腫瘍性を評価しなければならない場合も想定される。また、動物モデルを使用した造腫瘍性試験においては、細胞の分散や足場への接着、細胞密度、投与部位等の条件が最終製品と必ずしも一致するものではない。さらに、動物の種・系統・免疫状態による感度差もある。これらの事情を総合的に勘案して、最終製品の造腫瘍性を評価する必要がある。また、最終製品の造腫瘍性に起因する患者へのリスクについては、対象疾患を治療することによる患者へのベネフィット等とのバランスを踏まえて合理的に評価すること。)

7 製造工程で外来遺伝子の導入が行われ、最終製品中で機能している場合や残存している場合には、遺伝子治療用医薬品指針に定めるところに準じて試験を行うこと。特に、ウイルスベクターを使用した場合には増殖性ウイルスがどの程度存在するかを検査するとともに、検査方法が適切であることについても明らかにすること。

また、導入遺伝子及びその産物の性状について調査し、安全性について明らかにすること。細胞については、増殖性の変化、良性腫瘍を含む腫瘍形成及びがん化の可能性について考察し、明らかにすること。

8 動物由来のモデル製品を含めて製品の入手が容易であり、かつ臨床上の適用に関連する有用な安全性情報が得られる可能性がある場合には、合理的に設計された一般毒性試験の実施を考慮すること。

なお、一般毒性試験の実施に当たっては、平成元年9月11日付け薬審1第24号厚生省薬務局新医薬品課長・審査課長連名通知「医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」の別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」等を参照すること。

## 第5章 ヒトES細胞加工医薬品等の効力又は性能を裏付ける試験

1 技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物又は細胞等を用い、適切に設計された試験により、ヒトES細胞加工医薬品等の機能発現、作用持続性及び医薬品・医療機器として期待される臨床効果の実現可能性(Proof-of-Concept)を示すこと。

2 遺伝子導入細胞にあっては、導入遺伝子からの目的産物の発現効率及び発現の持続性、導入遺伝子の発現産物の生物活性並びに医薬品等として期待される臨床効果の実現可能性(Proof-of-Concept)を示すこと。

3 適当な動物由来細胞・組織製品モデル又は疾患モデル動物がある場合には、それを用いて治療効果を検討すること。

4 確認申請段階では、当該製品の効力又は性能による治療が他の治療法と比較したときはるかに優れて期待できることが国内外の文献又は知見等により合理的に明らかにされている場合には、必ずしも詳細な実験的検討は必要とされない。

## 第6章 ヒトES細胞加工医薬品等の体内動態

1 製品を構成する細胞・組織及び導入遺伝子の発現産物について、技術的に可能で、かつ、科学的合理性がある範囲で、実験動物での吸収及び分布等の体内動態に関する試験等により、患者等に適用された製品中の細胞・組織の生存期間、効果持続期間を推測し、目的とする効果が十分得られることを明らかにすること〔注：体内動態に関する試験等には、例えば組織学的検討、磁気共鳴画像診断法(MRI)、陽電子放射断層撮影法(PET)、単一光子放射断層撮影法(SPECT)、光イメージングなどがある。〕

2 ヒトES細胞加工医薬品等の用法(投与方法)について、動物実験を通してその合理性を明らかにすること。特に、全身投与にあっては投与後の細胞の全身分布を動物実験などから外挿し、有用性の観点から議論すること。〔注：投与経路ごとにどこに生着するかは不明であるが、全身投与よりも局所投与が望ましいと想定される。しかし、全身投与であってもその有用性において被投与患者に有益であると合理的に説明が可能である場合には用法として設定可能である。例えば、あるES細胞加工医薬品等を肝疾患治療剤として肝臓への生着を期待する場合、肝臓へ効率よく到達させかつその他の臓器への分布を最低限に抑えることが合理的な投与方法であると想定されるが、経末梢静脈投与により当該細胞が肝臓に集積し、他臓器に生着しないことが証明できれば良い。しかし、異所性生着しても、被投与患者にとって不利益(生体機能への悪影響)が生じない場合は用法として肯定できるかも知れない。異所性分化による不利益とは、例えば当該細胞が心臓に異所性生着して骨形成する場合が想定され、それが不整脈

を惹起したような場合である。]

3 当該細胞・組織が特定の部位(組織等)に直接適用又は到達して作用する場合には、その局在性を明らかにし、局在性が製品の有効性・安全性に及ぼす影響を考察すること。

## 第7章 臨床試験

ヒトES細胞加工医薬品等の治験を開始する(First-in-Man)に当たって支障となる品質及び安全性上の問題が存在するか否かの確認申請の段階においては、臨床上の有用性を勘案して評価されるものであり、ヒトES細胞加工医薬品等について予定されている国内の治験計画について以下の項目を踏まえて評価すること。その際、明らかに想定される製品のリスクを現在の学問・技術を駆使して排除し、その科学的妥当性を明らかにした上で、なお残る未知のリスクと、重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患、身体の機能や形態を一定程度損なうことによりQOLを著しく損なう疾患などに罹患し、従来の治療法では限界があり、克服できな

い患者が新たな治療機会を失うことにより被るかも知れないリスクとのリスクの大小を勘案し、かつ、これらすべての情報を開示した上で患者の自己決定権に委ねるという視点を導入することが望まれる。

1 対象疾患

2 対象とする被験者及び被験者から除外すべき患者の考え方

3 ヒトES細胞加工医薬品等及び併用薬の適用を含め、被験者に対して行われる治療内容(注:投与・移植した細胞の機能を維持・向上・発揮させるために併用する薬剤が想定される場合、当該薬剤の作用を*in vitro*あるいは*in vivo*で検証すること)

4 既存の治療法との比較を踏まえた臨床試験実施の妥当性

5 現在得られている情報から想定される製品及び患者のリスク及びベネフィットを含め、被験者への説明事項の案

なお、臨床試験は、適切な試験デザイン及びエンドポイントを設定して実施する必要がある、目的とする細胞・組織の由来、対象疾患及び適用方法を踏まえて適切に計画すること。



# Molecular Pathway and Cell State Responsible for Dissociation-Induced Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells

Masatoshi Ohgushi,<sup>1,2</sup> Michiru Matsumura,<sup>1,2</sup> Mototsugu Eiraku,<sup>1</sup> Kazuhiro Murakami,<sup>3</sup> Toshihiro Aramaki,<sup>1</sup> Ayaka Nishiyama,<sup>1</sup> Keiko Muguruma,<sup>1</sup> Tokushige Nakano,<sup>1</sup> Hidetaka Suga,<sup>1</sup> Morio Ueno,<sup>1</sup> Toshimasa Ishizaki,<sup>4</sup> Hirofumi Suemori,<sup>5</sup> Shuh Narumiya,<sup>4</sup> Hitoshi Niwa,<sup>3</sup> and Yoshiki Sasai<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Organogenesis and Neurogenesis Group

<sup>2</sup>Division of Human Stem Cell Technology

<sup>3</sup>Laboratory for Pluripotent Cell Studies

RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe 650-0047, Japan

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine

<sup>5</sup>Institute for Frontier Medical Sciences

Kyoto University, Kyoto 606-8315, Japan

\*Correspondence: yoshikisasai@cdb.riken.jp

DOI 10.1016/j.stem.2010.06.018

## SUMMARY

Human embryonic stem cells (hESCs), unlike mouse ones (mESCs), are vulnerable to apoptosis upon dissociation. Here, we show that the apoptosis, which is of a nonapoptotic type, is caused by ROCK-dependent hyperactivation of actomyosin and efficiently suppressed by the myosin inhibitor Blebbistatin. The actomyosin hyperactivation is triggered by the loss of E-cadherin-dependent intercellular contact and also observed in dissociated mouse epiblast-derived pluripotent cells but not in mESCs. We reveal that *Abr*, a unique Rho-GEF family factor containing a functional Rac-GAP domain, is an indispensable upstream regulator of the apoptosis and ROCK/myosin hyperactivation. Rho activation coupled with Rac inhibition is induced in hESCs upon dissociation, but not in *Abr*-depleted hESCs or mESCs. Furthermore, artificial Rho or ROCK activation with Rac inhibition restores the vulnerability of *Abr*-depleted hESCs to dissociation-induced apoptosis. Thus, the *Abr*-dependent “Rho-high/Rac-low” state plays a decisive role in initiating the dissociation-induced actomyosin hyperactivation and apoptosis in hESCs.

## INTRODUCTION

Although hESCs are pluripotent cells derivatized from the blastocyst embryo like mESCs, there are in fact several substantial differences between them (Thomson et al., 1998; Sato et al., 2003). Among the interspecies differences, a particularly intriguing one is the requirement of hESCs to be cultured as cell clumps because they undergo apoptosis when dissociated (Watanabe et al., 2007 and references therein). Their apoptotic response is remarkably extensive and their fragility upon dissociation has

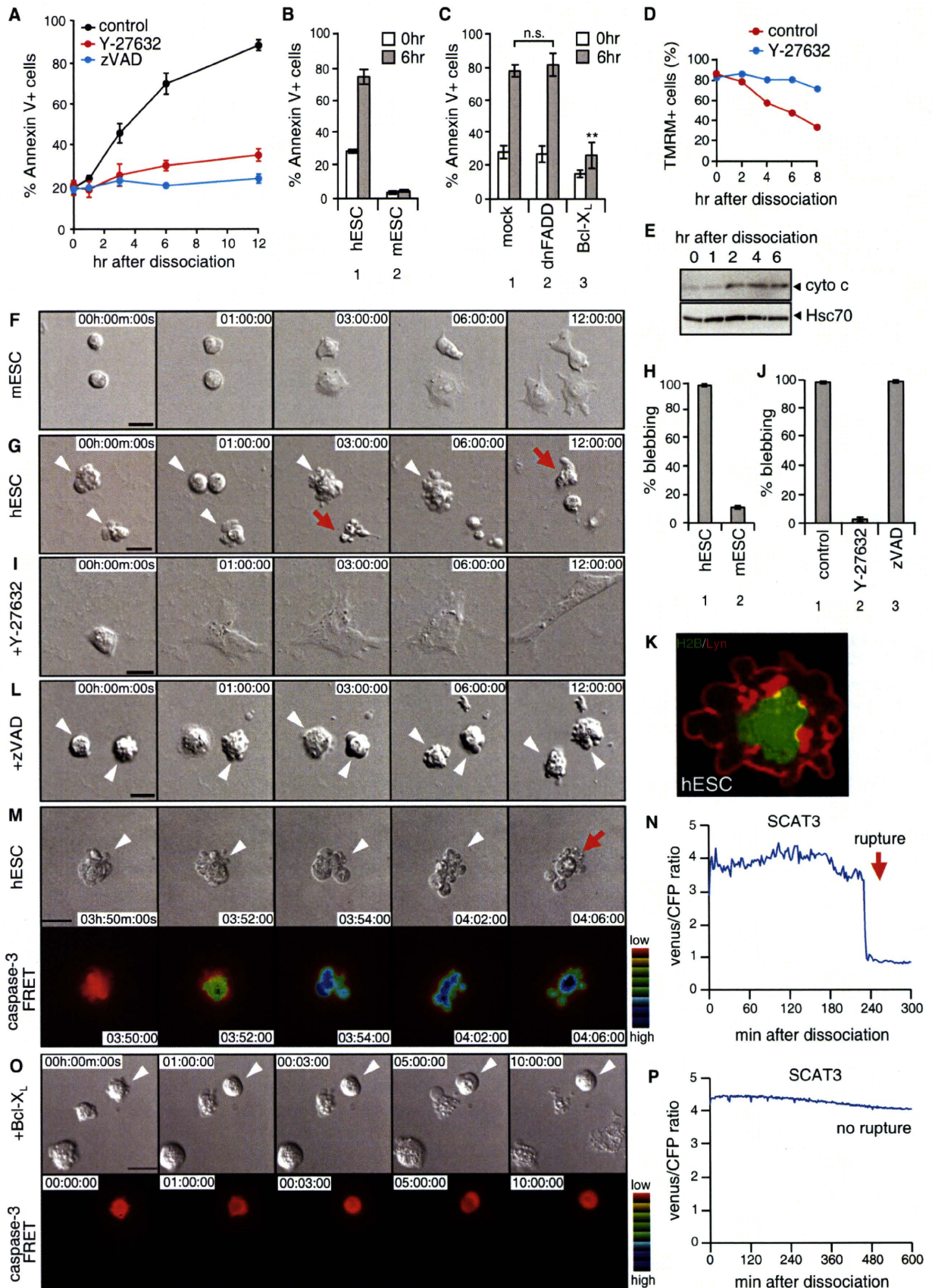
been a large obstacle to the development of techniques for manipulating hESCs. We recently reported that the application of Y-27632, a specific inhibitor for Rho-dependent protein kinase (ROCK), permit the survival of hESCs in clonal culture by efficiently blocking the dissociation-induced cell death (Watanabe et al., 2007; also see an example of greatly improved plating efficiency in Figure S1A available online). The addition of the ROCK inhibitor to dissociated hESCs has already greatly improved a number of practical procedures.

However, several fundamental questions about the ROCK-dependent hESC apoptosis have remained unsolved to date. For instance, it is not known how Y-27632 protects dissociated hESCs from massive cell death, what the upstream signals are that trigger the hESC apoptosis after dissociation, why only hESCs, but not mESCs, are vulnerable to dissociation-induced cell death, or what the biological relevance of the dissociation-induced hESC death is.

ROCK, the target of Y-27632, is one of the major downstream mediators of Rho (Riento and Ridley, 2003; Harb et al., 2008; Krawetz et al., 2009). The GTP-bound form of Rho interacts with ROCK, inducing a conformational change in ROCK that elevates its kinase activity. Rho signaling plays crucial regulatory roles in cellular proliferation, differentiation, cytokinesis, motility, adhesion, and cytoskeletal arrangement (Jaffe and Hall, 2005). At the molecular level, Rho subfamily members, such as Rho and Rac (Burridge and Wennerberg, 2004), function as molecular switches that cycle between GDP-bound inactive and GTP-bound active forms. This transition is strictly controlled by the cooperation of positive and negative regulators. The positive regulator molecules, termed GEFs (guanine nucleotide exchange factors), can activate specific Rho subfamily molecules. The negative regulators, called GAPs (GTPase activating proteins), can reverse this reaction by facilitating the hydrolysis of the bound GTP.

Rho/ROCK activation induces various outcomes depending on the cellular context (Riento and Ridley, 2003). Although a number of substrates for ROCK have been already identified as potential downstream effectors (Riento and Ridley, 2003;







Jaffe and Hall, 2005), the responsible effector for a variety of cases is still uncertain. In particular, the downstream effectors in the survival-or-death regulation of hESCs have been unknown.

In this study, we first demonstrate that the ROCK-dependent hyperactivation of myosin is the direct cause of dissociation-induced apoptosis in hESCs. Disruption of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion is sufficient to trigger an immediate activation of the Rho/ROCK/MLC2 signaling cascade. This dissociation-induced myosin hyperactivation is specific to the epiblast-equivalent cell state rather than to their species of origin. We also show the involvement of a unique Rho-GEF family factor, Abr, as an essential role in this regulation and the biased activity of Rho versus Rac as a critical factor for this phenomenon.

## RESULTS

### Dissociation of hESCs Causes a ROCK-Dependent Early Apoptotic Response via the Mitochondrial Pathway

We first sought to clarify how early after dissociation the apoptotic reaction begins and which apoptotic pathway is involved there. FACS analysis showed an obvious increase in the Annexin V<sup>+</sup> population of hESCs (cells undergoing apoptosis or dead ones) even a few hours after dissociation (Figure 1A; control, black; also see Figures S1B and S1C). At the 6 hr time point, the majority (about three quarters) of the dissociated hESC population was already positive for this early apoptosis marker (Figure 1B, lane 1). Such an apoptotic response was not observed in dissociated mESCs (lane 2). The rapid induction of the apoptosis marker in hESCs was significantly inhibited by the addition of the ROCK inhibitor Y-27632 or the pan-Caspase inhibitor zVAD (Figure 1A; red and blue). Strong suppression of apoptosis was also seen when both ROCK-I and -II were knocked down by RNAi (lane 4 in Figure S1Dc; Figures S1Da and S1Db for RNAi controls).

The overexpression of dominant-negative FADD (dnFADD), which efficiently blocks the FAS-FADD pathway, a typical non-mitochondrial cascade, did not have a substantial effect on the apoptosis marker (Figure 1C, lane 2; see Figure S1E for controls).

In contrast, the overexpression of Bcl-X<sub>L</sub>, which antagonizes the upstream trigger of the mitochondrial pathway (Youle and Strasser, 2008), markedly decreased the Annexin V<sup>+</sup> population (lane 3). Furthermore, the mitochondrial potential (indicated by the TMRM dye) decreased after cell dissociation (Figure 1D, red) and this reduction was inhibited by Y-27632 (Figure 1D, blue). In addition, the cytoplasmic release of cytochrome C, a major messenger of the mitochondrial pathway (Youle and Strasser, 2008), was observed with a similar time course as the decrease in TMRM<sup>+</sup> staining (Figure 1E). These findings showed that the mitochondrial pathway plays a major role in the early apoptotic response downstream of ROCK activity.

### The ROCK-Dependent Apoptosis of Dissociated hESCs Is Associated with an Atypical, Extensive Early-Onset Blebbing

We next performed live-cell imaging during the early phase of dissociation culture (Figures 1F–1L). Unlike dissociated mESCs, which spread normally on the plate bottom and were not particularly mobile (Figure 1F and Movie S1, part A), the dissociated hESC exhibited a high motility and formed a number of blebs on their cell surface (Figures 1G and 1H; also see Figure S1G). The blebbing began immediately upon the start of the dissociation culture and continued until the cells burst and formed apoptotic bodies (Movie S1, part B). This blebbing in the dissociated hESCs was strongly suppressed by Y-27632 (Figures 1I and 1J and Movie S1, part C). The suppression of blebbing appeared to require the continuous (or concurrent) presence of Y-27632 at least during the first 6–12 hr. The cells that had once calmly spread on the plate bottom in the presence of Y-27632 started blebbing when the Y-27632 was removed afterwards (Figure S1H). Conversely, cells that had started blebbing (but were not yet dead) in the absence of Y-27632 stopped blebbing upon the later addition of Y-27632 (Figure S1I). Similar early-onset blebbing was also observed in dissociated human iPS cells (see Experimental Procedures).

Blebbing is an indication of unregulated hyperactivation of the actomyosin system (Charras and Paluch, 2008), which leads to

### Figure 1. Unusual Early-Onset Blebbing during ROCK-Dependent Apoptosis of Dissociated hESCs

(A) Time course FACS analysis of apoptosis in dissociated hESCs (black line, no inhibitor; red line, 10  $\mu$ M Y-27632; blue line, 20  $\mu$ M zVAD).

(B) Apoptosis induction of hESCs and mESCs 6 hr after dissociation.

(C) hESCs were transfected with expression plasmids for an inhibitor with H2B-Venus expression plasmid. Dunnett's test ( $n = 3$ ) versus lane 1. n.s., not significant; \*\* $p < 0.01$ .

(D) FACS measurement of mitochondrial potentials by the uptake of mitochondrial dye TMRM.

(E) Cytosolic release of cytochrome c from mitochondria in dissociated hESC. Bottom, loading control.

(F and G) Live imaging of dissociated mESCs and hESCs on Matrigel (F, mESCs; G, hESCs).

(H) Percentages of blebbing cells in dissociated hESCs and mESCs 15–30 min after dissociation.

(I) Live imaging of dissociated hESCs in the presence of 10  $\mu$ M Y-27632.

(J) Effects of inhibitors on blebbing occurrence.

(K) A Snapshot of confocal live imaging for dynamics of blebbing movement in dissociated hESCs. Plasma membrane (red, Lyn-mCherry) and nuclei (green, H2B-Venus).

(L) Snapshots of live imaging of dissociated hESC in the presence of 20  $\mu$ M zVAD. Images were obtained every 5 min for 12 hr after cell seeding. Scale bars represent 20  $\mu$ m in (F), (G), (I), and (L).

(M) Snapshots of dissociated hESCs expressing the FRET probe SCAT3. Upper panels show bright field; the bottom panel show Venus/CFP ratio image. Pseudo-colors are used to represent the Venus/CFP ratio with blue and red indicated high and low activities, respectively.

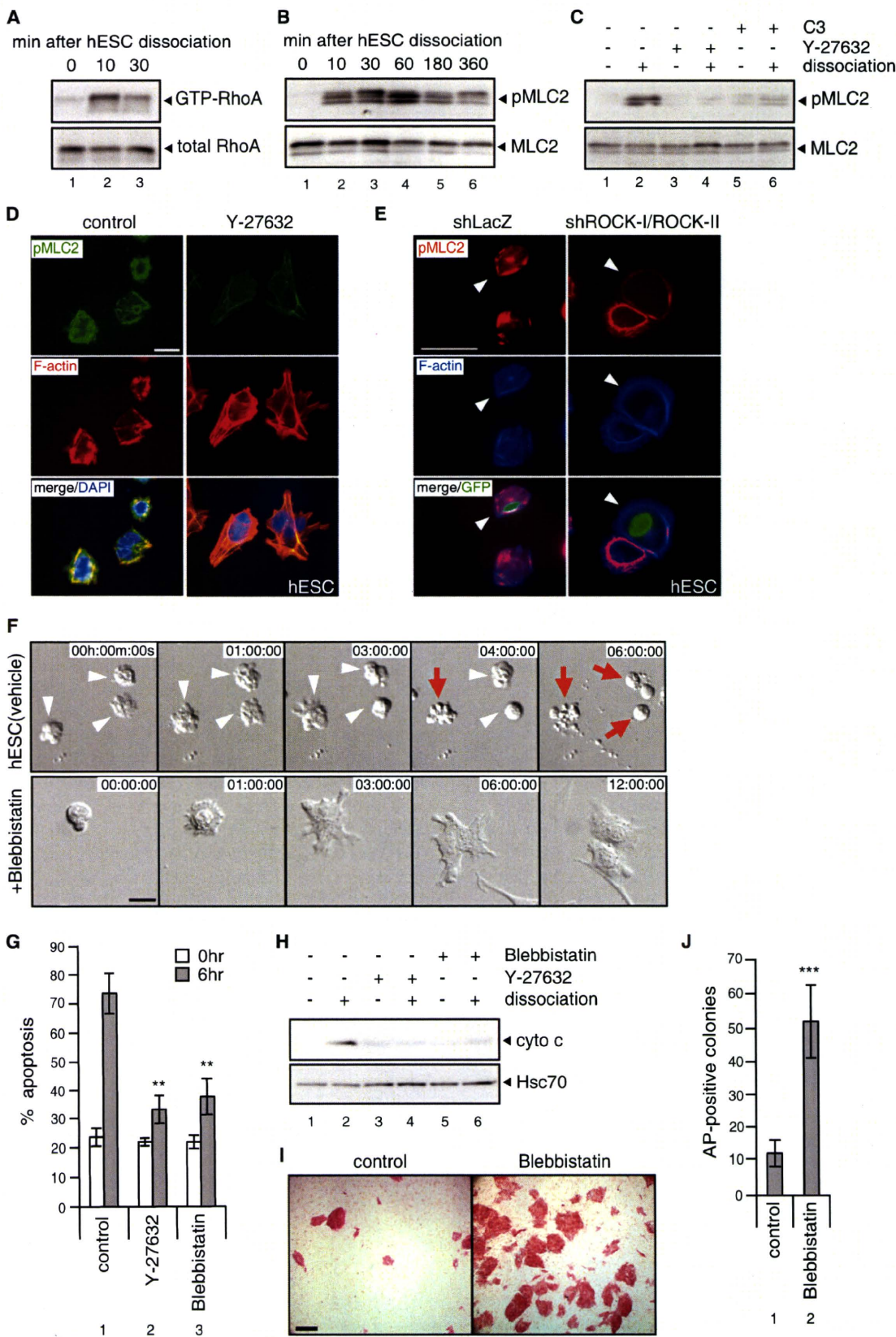
(N) Time course for Caspase-3 activation.

(O and P) Analysis of dissociated hESCs expressing the SCAT3 probe together with Bcl-X<sub>L</sub>. Images were obtained every 2 min for 10 hr after cell seeding. Time course of the mean Venus/CFP ratios over the whole cell was shown. Scale bars represent 10  $\mu$ m in (M) and (O).

(G and L–O) White arrowheads indicate blebbing cells; the red arrow indicates membrane rupture.

The bars in the graphs represent standard deviations. See also Figures S1 and S2 and Movie S1.







the excessive contraction of the cortical actin network and dramatically increases the intracellular pressure. This repeatedly causes multiple local detachments of the plasma membrane (evagination) from the cytoskeleton (Charras et al., 2005; Charras et al., 2006). Some transient blebbing is generally observed in dying cells, but occurs only for a short period during the terminal phase of apoptosis when cells are close to cell bursting (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). In contrast, the blebbing of dissociated hESCs started soon after dissociation, long before the cell burst, and continued for a substantial length of time until the cells burst from a few hours to a day (Figure 1G). By careful observation with multicolor fluorescence live imaging, the plasma membrane movement of the dissociated hESC (shown by Lyn-mCherry) per se was indistinguishable from that of conventional blebbing: a rapid outward protrusion of sac-like blebs (within a few seconds; Figure 1K) and their subsequent slow retraction (a few minute later) (Figures S2A–S2C and Movie S1, parts D–F).

The conventional blebbing at the terminal phase of apoptosis is typically caused by the Caspase-3-induced cleavage of ROCK-I, which then becomes constitutively active (Coleman et al., 2001; Sebbagh et al., 2001). In dissociated hESCs, however, the caspase inhibitor zVAD did not substantially inhibit the blebbing (Figures 1J and 1L), although it suppressed the appearance of the apoptosis marker Annexin V (Figure 1A). In addition, we did not detect the cleaved form of ROCK-I in a western blot (data not shown). These findings indicated that the blebbing of hESCs is also atypical in its molecular regulation and does not occur downstream of caspases.

We next carried out a time-course study, in which the Caspase activity was measured in real-time FRET assay (Figures 1M–1P and Figures S2D–S2G). The level of Caspase-3 activity remained low until ~10 min before cell rupture, when an abrupt all-or-none-type activation was observed (Figures 1M and 1N; Movie S2, part A; the SCAT3 FRET probe gives a high Venus/CFP fluorescence ratio when the Caspase-3 activity is low; Takemoto et al., 2003). A similar observation was made in the temporal profile of Caspase-9 activation (the SCAT9 probe; Takemoto et al., 2003), which occurs upstream of Caspase-3 in the mitochondrial pathway, except that the Caspase-9 activation started earlier (~30 min before cell rupture) and became elevated more gradually than the Caspase-3 activation (Figures S2D and S2E). Thus, the robust terminal activation of both Caspases occurred much later than the onset of blebbing.

Both the blebbing and the Caspase-3 activation were inhibited by Y-27632 treatment (not shown) and by ROCK-I/II-knockdown (Figures S2F and S2G; Movie S2, part B). Consistent with the zVAD data, the blebbing was not substantially inhibited when the Caspase-3 activation was suppressed by overexpressing Bcl-X<sub>L</sub>, which prevents cells from undergoing apoptosis (Figures 1O and 1P; Movie S2, part C).

These observations at the single-cell level demonstrated that the blebbing seen in dissociated hESCs is not the consequence of a strong precocious activation of Caspases but instead is directly associated with ROCK activity.

### Rho/ROCK-Mediated Hyperactivation of Myosin Is a Primary Cause of Rapid Apoptosis of Dissociated hESCs

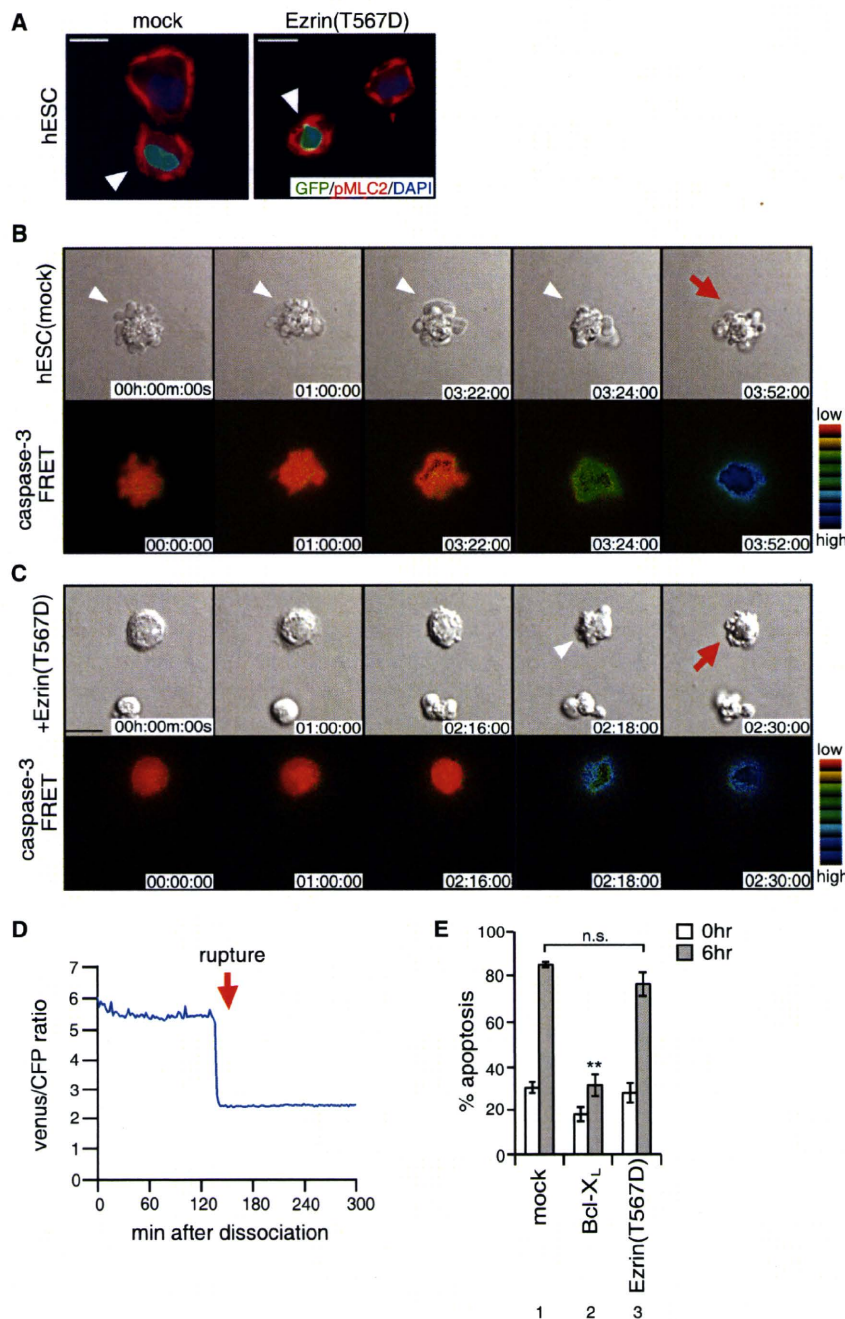
We next analyzed how the ROCK activity was regulated after dissociation. In pull-down assays, an elevated level of active Rho (GTP-bound) was observed upon dissociation (Figure 2A). Similarly, substantial augmentation of ROCK activity was observed upon dissociation in the *in vitro* kinase assay with ROCK proteins immunoprecipitated from hESC lysates (Figure S3A; MYPT1 was used as a substrate). Western blot analysis showed that the phosphorylation level of the nonmuscle myosin light chain 2 (MLC2), a known ROCK substrate (Riento and Ridley, 2003), was significantly and continuously elevated after dissociation (Figure 2B). This elevation of phosphorylated MLC2 (pMLC2) in dissociated hESCs was inhibited by both Y-27632 and the Rho inhibitor C3 (Figure 2C, lanes 4 and 6), consistent with previous reports on the Rho-ROCK-myosin axis functioning in a variety of cells including pluripotent cells (Harb et al., 2008). In addition, three other ROCK inhibitors (HA1077, H-1152P, and GSK269962A) attenuated MLC2 phosphorylation at the concentrations effective for apoptosis inhibition (Figure S3B). Consistent with these Western blot results, a strong immunostaining signal for phosphorylated MLC2 was observed in dissociated hESCs and was diminished by Y-27632 (Figure 2D, top) and by RNAi knockdown of ROCK-I/II (Figure 2E). These observations indicate that the dissociation of hESC induces a quick and substantial increase in pMLC2 in a Rho/ROCK-dependent manner.

The phosphorylation of MLC2 is known to activate myosin and to create intracellular contractive forces via the actomyosin network (Charras and Paluch, 2008). Treatment with the myosin inhibitor Blebbistatin rescued dissociated hESCs from not only

### Figure 2. ROCK-Dependent Actomyosin Hyperactivation Is a Primary Cause for Dissociation-Induced Apoptosis in hESCs

(A) Detection of active Rho in pull-down assay from the lysates of dissociated hESCs.  
(B and C) MLC2 phosphorylation in dissociated hESCs. Time course analysis (B) and effects of inhibitors (C, 10  $\mu$ M Y-27632 and 2  $\mu$ g/ml C3).  
(D) Immunohistochemistry for p-MLC (green) in dissociated hESCs without (left) or with (right) 10  $\mu$ M Y-27632. Cells were counter-stained with F-actin (red) and DAPI (blue).  
(E) Immunohistochemistry for p-MLC (red) in ROCK-depleted hESCs (left panels, control shRNA; right panels, shRNAs for ROCK-I/II). Cells were counter-stained with F-actin (blue). Arrowheads indicate shRNA-expressing cells (positive for the tracer GFP, green).  
(F) Live imaging of dissociated hESCs on Matrigel without (upper) or with (bottom) 10  $\mu$ M Blebbistatin. Images were obtained every 5 min for 12 hr after cell seeding. The scale bar represents 20  $\mu$ m in (D)–(F).  
(G and H) Effects of Blebbistatin on apoptosis in dissociated hESCs. Apoptosis assay (G) and cytosolic cytochrome c release (H) were shown. Dunnnett's test ( $n = 3$ ) versus lane 1. \*\* $p < 0.01$ .  
(I and J) Effects of Blebbistatin on colony formation of dissociated hESCs. Formed hESC colonies were visualized by AP staining (I, scale bar represents 500  $\mu$ m) and counted (J). Student's *t* test ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.001$ .  
The bars in the graphs represent standard deviations. See also Figure S3.





**Figure 3. Actomyosin Hyperactivation, Rather than Blebbing Movement per se, Primarily Causes Apoptosis of Dissociated hESCs**

(A) No obvious effect of overexpression of a constitutively-active form of Ezrin, Ezrin(T567D), on MLC2 phosphorylation in dissociated hESCs. Arrowheads indicate GFP-positive transfected cells. The scale bar represents 10  $\mu$ m.

(B–E) Effects of the overexpressing Ezrin(T567D) on blebbing and apoptosis in dissociated hESCs. (B) Mock-transfected cell.

(C) FRET imaging of dissociated hESCs expressing SCAT3 and Ezrin(T567D). The scale bar represents 10  $\mu$ m.

(D) Time course of the mean Venus/CFP ratios.

(E) Apoptosis assay with Annexin V staining before or 6 hr after dissociation. Dunnett's test ( $n = 3$ ) versus lane 1. n.s., not significant; \*\* $p < 0.01$ .

The bars in the graphs represent standard deviations. See also Movie S2.

stream of ROCK plays an essential role in the dissociation-induced cell death of hESCs.

Consistent with this idea, similar suppression of both blebbing and apoptosis was observed in dissociated hESCs in which the myosin function was inhibited by overexpressing a dominant-negative MLC2 (MLC2-AA: nonphosphorylatable form; Figures S3G–S3I) or by shRNAs for nonmuscle myosin heavy chain IIA/IIC (or *myh9/14*; Figures S3J–S3L). In contrast to Blebbistatin treatment, the MLCK inhibitor ML-7 did not show substantial suppressing effects on dissociation-induced apoptosis even at high concentrations (e.g., 20  $\mu$ M; Figure S3M), suggesting that MLCK is not an essential downstream mediator of ROCK in this particular context (multiple ROCK targets are discussed in Riento and Ridley, 2003).

To examine the role of blebbing in apoptosis, we next overexpressed a constitutively active Ezrin (EzrinT567D), which physically strengthens the link between the plasma membrane and the actomyosin cortex and thereby specifically reduces blebbing (Charras et al., 2006). The overexpression of EzrinT567D did not affect the high level of pMLC2 accumulation in the dissociated hESC (Figure 3A; the overexpressing cells are indicated by coexpressing GFP). However, EzrinT567D strongly inhibited the blebbing, which then occurred only during the terminal stage of apoptosis when Caspase-3 was strongly activated (Figures 3B–3D, Movie S2, part D). In contrast to the efficient suppression of blebbing, EzrinT567D did not substantially inhibit the dissociation-induced apoptosis (Figure 3E, lane 3; lane 2 positive control with Bcl-X<sub>L</sub>). These findings of uncoupling between apoptosis and blebbing indicated that the

the blebbing (Figure 2F) but also the apoptosis (Figure 2G), and decreased the dissociation-induced release of cytochrome C (Figure 2H, lanes 2 and 6). As a result, the Blebbistatin treatment significantly increased the colony formation efficiency in the hESC dissociation culture (Figures 2I and 2J). In addition, treatment with cytochalasin D (an inhibitor of actin polymerization) also attenuated both blebbing and apoptosis in dissociated hESCs (Figures S3C–S3F; MLC2 phosphorylation was unaffected, Figure S3F), suggesting that the actin-myosin interaction is indispensable for the early-onset cell death. These inhibitor studies suggested that the actomyosin hyperactivation down-

stream of ROCK plays an essential role in the dissociation-induced cell death of hESCs. Consistent with this idea, similar suppression of both blebbing and apoptosis was observed in dissociated hESCs in which the myosin function was inhibited by overexpressing a dominant-negative MLC2 (MLC2-AA: nonphosphorylatable form; Figures S3G–S3I) or by shRNAs for nonmuscle myosin heavy chain IIA/IIC (or *myh9/14*; Figures S3J–S3L). In contrast to Blebbistatin treatment, the MLCK inhibitor ML-7 did not show substantial suppressing effects on dissociation-induced apoptosis even at high concentrations (e.g., 20  $\mu$ M; Figure S3M), suggesting that MLCK is not an essential downstream mediator of ROCK in this particular context (multiple ROCK targets are discussed in Riento and Ridley, 2003).



early-onset blebbing is not a direct cause of cell death but rather a parallel phenomenon induced by myosin hyperactivation.

#### **ROCK/Myosin Hyperactivation as well as Rho Activation Is Induced by the Loss of $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent Intercellular Adhesion between hESCs**

Unlike ICM-like mESCs, hESCs exhibit an epithelial character with a clear apico-basal polarity (Krtolica et al., 2007; e.g., apical junctions and a basement membrane) as does the epiblast. A typical form of dissociation-induced apoptosis of epithelial cells is anoikis, which is caused specifically by the loss of cellular adhesion (anchorage) to a substrate or the basement membrane (Frisch and Screaton, 2001). We and others previously guessed that the dissociation-induced hESC apoptosis was probably also anoikis (Watanabe et al., 2007; Krawetz et al., 2009). However, we noticed in our live-imaging analysis that, although the dissociated hESCs successfully attached to the substrate matrix, the cells still underwent massive blebbing and apoptosis, arguing the hypothesis that this cell death is anoikis. The nonanoikis nature was further supported by our immunostaining data of dissociated hESC that clearly showed the formation of paxillin<sup>+</sup> focal adhesions onto the culture substrate, demonstrating the presence of the cell-substrate anchorage (Figure S4A; also see the accumulation of phospho-tyrosine and phospho-FAK, indicative of local integrin-related signaling).

Therefore, we next examined the role of cell-cell adhesion in the control of the hESC apoptosis. In this case, we first cultured the hESC in colonies so that the cells formed tight intercellular adhesion via the cadherin/catenin system involving E-cadherin (Figures 4A–4C). We then added the  $\text{Ca}^{2+}$  chelator EGTA, which disrupts the cadherin-mediated cell attachment, and caused hESC to detach from one another but not from the plate bottom (Figures 4D–4F). Importantly, this dissociation without substrate detachment was sufficient to increase the level of pMLC2 (Figure 4G, lane 2) in a ROCK-dependent manner (lane 3). Live imaging showed that the EGTA-induced mild dissociation was sufficient to induce blebbing in a major population of hESCs, particularly at the periphery of the colonies, where the cellular dissociation by EGTA was most evident (Figure 4H and Movie S3, part A; under this mild dissociation condition, the blebbing typically started 20–40 min after dissociation). Y-27632 treatment reduced both the blebbing (Figure 4I and Movie S3, part B) and also the apoptosis induced by EGTA (Figure 4J, lane 2).

The  $\text{Ca}^{2+}$  depletion-induced blebbing was suppressed when cell adhesion was restored by adding  $\text{Ca}^{2+}$  back to the medium (Figure 4K). In contrast, cells pretreated with the E-cadherin-blocking antibody remained separated even after  $\text{Ca}^{2+}$  was added back. These cells continued to show blebbing even in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Figure 4L) and exhibited a higher rate of apoptosis (Figure S4B, lane 3). These findings indicated that the continuous loss of E-cadherin-dependent intercellular adhesion (not of  $\text{Ca}^{2+}$ ) is responsible for the blebbing and the cell death. Consistent with this idea, RNAi knockdown of E-cadherin sufficiently induced blebbing and apoptosis even in hESCs present in colonies (Figures S4C–S4F and Movie S3, part C). Taken together, these findings show that, although some minor contribution of anoikis is not totally excluded, the loss of E-cadherin-dependent intercellular adhesion plays a major decisive role in the apoptosis in dissociated hESCs.

We next performed a FRET analysis (using Rho-Raichu; Yoshizaki et al., 2003) to analyze the early response of Rho to the cellular dissociation by EGTA treatment. Consistent with the western blot study of the dissociation culture (Figure 2A, lane 1), the level of Rho activation was low before EGTA treatment (Figure 4M; blue) but substantially increased soon after the addition of the chelator to the medium (red in the cell periphery; this FRET probe has a membrane-anchor motif). This activation clearly preceded the onset of blebbing (Movie S4), indicating that Rho activation was not induced by blebbing. These observations showed that Rho activation is an early event occurring prior to the myosin hyperactivation in hESC.

#### **The ROCK/Myosin Hyperactivation Occurs in an Epiblast State-Specific Manner**

One fundamental question about the dissociation-induced hESC apoptosis is why it occurs only in hESCs and not in mESCs. Recently, it was reported that mouse epiblast-derived pluripotent stem cells (mEpiSCs) behave more like hESCs than ICM-derived mESCs do (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). We therefore examined the effect of the EGTA treatment on mEpiSC. Interestingly, in contrast to mESCs (Figure 1F), mEpiSCs started blebbing soon after dissociation (Figure 4N, Figure S5A and Movie S5, part A), and the blebbing was suppressed by Y-27632 (Figure S5B and Movie S5, part B). In addition, the dissociation of mEpiSC causes a higher rate of Y-27632-sensitive apoptosis than did that of mESCs (Figure S5C, lane 3). These observations suggested that the difference in the vulnerability of pluripotent cells is more dependent on the cell state (epiblast-like versus ICM-like), rather than on the species of origin (human versus mouse).

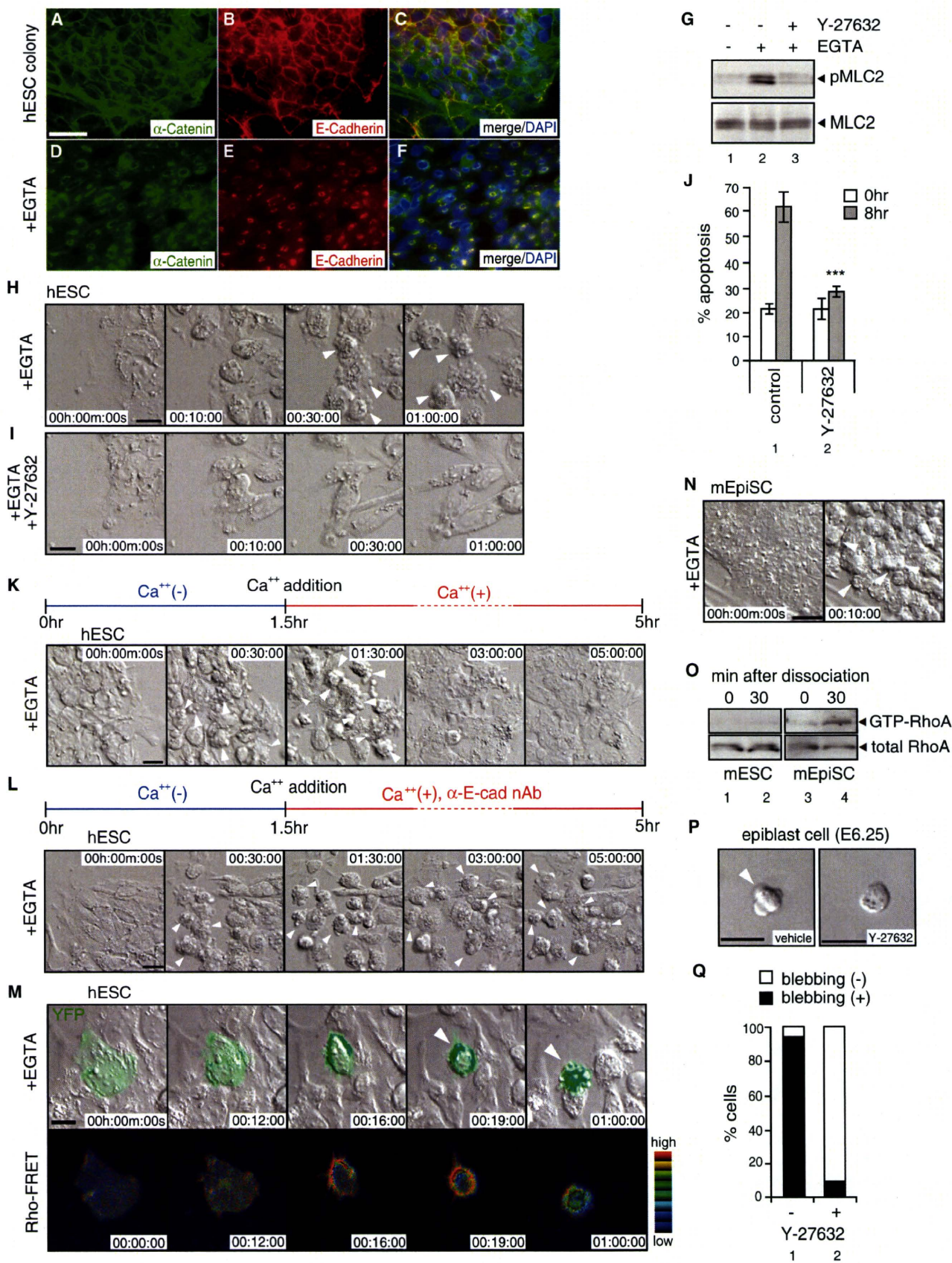
We next compared the activation state of Rho in different pluripotent cells. The dissociation of mEpiSCs, but not of mESCs, increased the level of active Rho (Figure 4O, lane 4). In addition, FRET analysis showed a rapid activation of Rho in mEpiSCs after their cellular disaggregation by EGTA (data not shown). Thus, the mEpiSCs also resembled hESCs in the control of the Rho/ROCK pathway after dissociation, suggesting that the epiblast-like nature of hESCs is relevant to the dissociation-induced Rho/ROCK activation.

In accordance with this idea, the dissociation culture of mouse epiblast cells (primary culture from E6.25 embryos) showed extensive blebbing that was sensitive to Y-27632 (Figures 4P and 4Q; Figure S5D and Movie S5, part C), indicating that a strong tendency for ROCK-myosin hyperactivation is common to epiblast-related cells, both primary culture cells and stem cell lines. Similar dissociation-induced blebbing is also seen in the epiblast-like cells (E-cadherin<sup>+</sup>, Fgf5<sup>+</sup>, Crypto<sup>+</sup>, and Klf4<sup>−</sup>) generated from mESCs cultured for 2 days under differentiating conditions of SFEBq culture (Eiraku et al., 2008) (unpublished data). Interestingly, the similar Y-27632-sensitive blebbing was seen in dissociated ectodermal cells of *Xenopus* gastrulae (Movie S6), suggesting that the dissociation-induced ROCK/Myosin hyperactivation is a common phenomenon in vertebrate early ectodermal cells.

#### **Dissociation-Induced ROCK/Myosin Hyperactivation in hESCs Is Dependent on the Rho-GEF Family Factor Abr**

Previous studies have shown that distinct Rho-GEF family proteins (which have several dozen members) function as the







upstream activator of Rho in various cellular events (Bos et al., 2007; Rossman et al., 2005). RT-PCR analysis revealed that at least 26 Rho-GEF family genes (with a DH domain encoding, Rossman et al., 2005) were expressed in hESC (data not shown). We performed an shRNA-mediated knockdown screen focusing on genes with nonredundant structures and found that the knockdown of one Rho-GEF member (Figures 5A and 5B, efficient knockdown was also confirmed by quantitative PCR, data not shown) strongly rescued hESCs from the dissociation-induced apoptosis (Figure 5C, lanes 3–5; confirmed with three independent shRNAs) as efficiently as the knockdown of ROCK-I/II (positive control; lane 2), and promoted colony formation from dissociated hESCs (Figures 5D and 5E).

This Rho-GEF family molecule was Abr, which is structurally related to Bcr. In contrast to the well-known Bcr, whose fusion to Abl causes chronic myelogenous leukemia, relatively little is known about the role and function of Abr. Importantly, in addition to suppressing apoptosis, the knockdown of Abr markedly inhibited both the blebbing (Figure 5F) and the pMLC accumulation (Figure 5G; *Abr*-shRNA-expressing cells were marked by GFP) after dissociation. These effects of *Abr*-shRNA were reversed by the coexpression of an shRNA-resistant codon-swapped *Abr* (Figure 5H, lanes 2 and 4; lane 3 is a negative control using shRNA-sensitive wild-type *Abr*, which did not generate the gene product), supporting the specificity of the knockdown phenotype. These findings demonstrated that Abr-dependent ROCK/myosin activation plays a key role in triggering the downstream myosin hyperactivation and apoptosis of hESCs.

#### Combinatory Rac Inhibition with Rho/ROCK Activation Plays a Crucial Role in Myosin Hyperactivation upon Dissociation of hESCs

Given that two small G proteins, Rho and Rac, interact in the regulation of various cellular events (positively and negatively; Jaffe and Hall, 2005), we next examined the control of Rac in hESCs. In a pull-down assay, the cell dissociation decreased the level of active Rac (Figure 6A), in contrast to increased Rho activity (Figure 2A). Consistent with this finding, in live FRET analysis (Rac-Raichu; Itoh et al., 2002), whereas a substantial Rac

activity was observed in hESCs before and immediately after the EGTA treatment, the Rac activity subsequently decreased down to a basal level (Figure 6B). Similar Rac suppression upon dissociation was also observed in mEpiSCs (data not shown). Thus, the regulation of Rac activity makes a clear difference from that of Rho activity, which is low before dissociation and increases upon dissociation (Figures 2A and 4M).

These findings raised the possibility that Rho and Rac act in opposite directions in the dissociation-induced ROCK/myosin hyperactivation in hESCs. To test this idea, we introduced a constitutively active Rac (caRac, Rac1V12), which makes Rac activity persistently high, into hESC (Figures 6C–6F). It suppressed the blebbing movement (Figure 6C, top) and inhibited the activation of Caspase-3 and the apoptosis (Figures 6C–6E; Movie S7). It also lowered the accumulation of pMLC in dissociated hESCs (Figure 6F). Thus, the persistent activation of Rac signaling has a clear inhibitory effect on the dissociation-induced ROCK-myosin hyperactivation.

Interestingly, we found that this dissociation-induced Rho-high/Rac-low state was greatly altered in cells of a dissociation-resistant hESC subclone reported previously (subline 1; Hasegawa et al., 2006). Although these cells expressed hESC-specific markers and formed teratoma (Figure S6A), they did not undergo blebbing or apoptosis in dissociation culture (Figures S6B–S6D). Consistent with these findings, no substantial elevation of pMLC2 upon dissociation was observed (Figure S6E, lanes 5 and 6). In pull-down assays, no substantial elevation of Rho activity was observed upon dissociation, whereas Rac activity was increased (Figure S6F, lane 4). These findings provide additional circumstantial evidence for the strong correlation between the Rho/Rac control and the dissociation-induced myosin hyperactivation.

The involvement of the reciprocal Rho/Rac control was particularly intriguing because one special structural feature of Abr is to contain a GAP (inhibitor) domain for Rho-class GTPases in addition to the typical GEF (activator; DH) domain (Figure 5A, top; Heisterkamp et al., 1993; Chuang et al., 1995). Previous studies have shown that the GAP domain of Abr preferentially binds to Rac (and Cdc42), but not to Rho, and has an inhibitory GAP activity for Rac, whereas the amino-terminal portion

#### Figure 4. Disrupted E-Cadherin-Mediated Intercellular Contact Plays a Causal Role in the Dissociation-Induced Apoptosis of hESCs

(A–F) Immunostaining of adherens junction proteins in an intact hESC colony (A–C) and their collapse in hESC dissociated by EGTA (3 mM) treatment. Adherens junction proteins were stained with  $\alpha$ -Catenin (A and D, green) and E-cadherin (B and E, red) antibodies. The scale bar represents 50  $\mu$ m.

(G) MLC2 phosphorylation in EGTA-treated hESC clumps in the absence or presence of 10  $\mu$ M Y-27632.

(H and I) Snapshots of live imaging of EGTA-dissociated hESCs on Matrigel in the absence (H) or presence (I) of 10  $\mu$ M Y-27632. Images were obtained every 1 min for 2 hr after EGTA addition.

(J) Apoptosis assay before or 8 hr after EGTA addition. \*\*\* $p < 0.001$  in t test ( $n = 3$ ).

(K–L)  $Ca^{2+}$  switching experiments.  $Ca^{2+}$  was added back 1.5 hr after the initial EGTA treatment. Snapshots of live imaging of EGTA-dissociated hESCs on the Matrigel substrate in the absence (K) or presence (L) of E-cadherin neutralizing antibody are shown. Images were obtained every 2 min for 5 hr after EGTA addition. Scale bars represent 20  $\mu$ m.

(M) Snapshots of EGTA-treated hESC expressing the Rho-Raichu FRET probes (identified as YFP-positive cells). EGTA was added at 10 min after the starting point of recording. Images were obtained every 30 s for 1 hr. In this case, red and blue indicated high and low Rho activities, respectively. The scale bar represents 20  $\mu$ m.

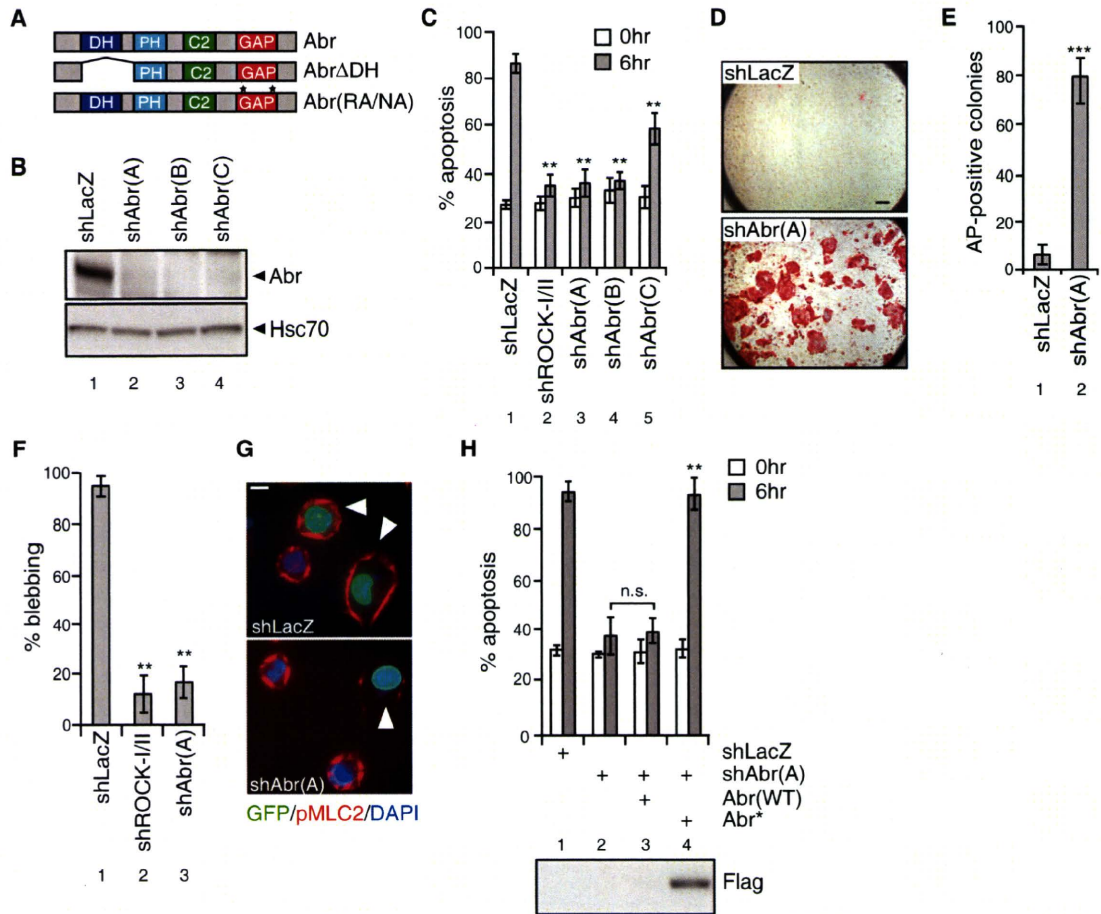
(N) Live imaging of EGTA-treated mEpiSC colonies on MEF feeder cells.

(O) Measurement of Rho activation by a pull-down assay in the lysates of dissociated mESC (lanes 1 and 2) and mEpiSC (lanes 3 and 4).

(H, K, L, N, and O) White arrowheads indicate blebbing cells.

(P and Q) Snapshots of dissociated epiblast cells in the absence (left) or presence (right) of 10  $\mu$ M Y-27632 (P). The scale bar represents 10  $\mu$ m. Percentages of blebbing cells in dissociated epiblast cells upon dissociation (Q). For each condition, four epiblasts were subjected to dissociation and blebbing cells were counted. The contingency table analysis (Fisher's exact test) showed a high statistical significance ( $p < 0.001$ , two-sided). Arrowheads indicate blebbing cells. The bars in the graphs represent standard deviations. See also Figures S4 and S5 and Movies S3–S6.





**Figure 5. Rho-GEF Abr Mediates Rho Activation Induced by Loss of Intercellular Adhesion**

(A) Abr domain structure and Abr mutants.

(B) Efficiency of three independent shRNAs-mediated Abr-knockdown was measured by western blotting.

(C–F) Effects of Abr-knockdown on hESC apoptosis and blebbing. Apoptosis assay (C), colony formation (D and E) and blebbing occurrence (F) were assayed in Abr-depleted hESC. (C) and (F) show a Dunnett's test ( $n = 3$ ) versus lane 1;  $**p < 0.01$ . (E) shows a Student's  $t$  test ( $n = 3$ );  $***p < 0.001$ .

(G) Attenuated MLC2 phosphorylation in Abr-shRNA-expressing hESCs. Arrowheads mark GFP-positive shRNAs-expressing cells. The scale bar represents 10  $\mu\text{m}$ .

(H) Dissociation-induced apoptosis was restored in Abr-knockdown hESC by transfection with RNAi-resistant Abr mutants (Abr<sup>\*</sup>). Expression was confirmed by western blotting against the amino-terminal Flag tag (bottom). Dunnett's test ( $n = 3$ ) versus lane 2 (among Abr-depleted cells) is shown. n.s., not significant;  $**p < 0.01$ . The bars in the graphs represent standard deviations.

possesses a Rho-GEF activity (Chuang et al., 1995). A mutant Abr in which two essential residues in the GAP domain were mutated (Cho et al., 2007; Figure 5A, bottom) failed to rescue the dissociation-induced phenotypes of the Abr-shRNA hESC (Figure 6H, lane 5, bottom panel for control). Likewise, an Abr mutant lacking a Rho-GEF domain (DH; Figure 5A, middle row) was unable to replace the wild-type Abr (Figure 6H, lane 4). These findings indicated that both the Rho-GEF and Rac-GAP domains are essential for Abr to induce the ROCK-dependent downstream events in dissociated hESCs.

Consistent with this idea, neither Rho activation nor Rac inhibition was observed in Abr-depleted hESCs upon dissociation (Figure 6I). Furthermore, the vulnerability to dissociation-induced apoptosis was almost fully restored in Abr-depleted hESCs when both caRho and dnRac (or caROCK and dnRac) were introduced, although the overexpression of each of them

alone caused a substantial but only partial recovery (Figures 7A–7D).

Taken together, these findings indicate that a biased Rho/Rac regulation (high Rho and low Rac activity) plays a crucial role for the induction of the ROCK/myosin hyperactivation in dissociated mammalian pluripotent cells.

Figure 7E illustrates the summary of the apoptosis-inducing pathway elucidated in the present study. In nondissociated hESCs, the Rho/ROCK/pMLC system is kept low by an inhibitory mechanism dependent on the E-cadherin-mediated intercellular adhesion. Upon cell dissociation, this system becomes desuppressed (activated) in an Abr-dependent manner. Rac is an antagonistic factor for the dissociation-induced activation of the Rho/ROCK/myosin system. However, in dissociated hESCs, the Rac-GAP function of Abr attenuates the antagonistic Rac function and facilitates a unilateral augmentation of the



“Rho-high/Rac-low” state, leading to myosin hyperactivation, which is the main cause of the hESC-specific apoptosis executed via the conventional mitochondrial pathway. Interestingly, we observed in our preliminary study that Rac inhibition (by dnRac) combined with Rho activation (by caRho) induced Y-27632-sensitive blebbing movements even in dissociated mESC (Figures S5E and S5F), suggesting that the reciprocal control of Rho/Rac can induce ROCK-Myosin hyperactivation at least to some extent in non-epiblast-like cells.

So far, we do not have experimental evidence showing Abr's direct interaction with the E-cadherin-catenin complex. Unlike catenins, Abr did not substantially bind E-cadherin (Figure S7A). In addition, simple activation of E-cadherin alone (by culturing hESCs on E-cadherin-protein-coated dishes) appeared to be insufficient to attenuate blebbing or apoptosis (Figures S7B–S7E). These observations imply that Abr is controlled by a third factor that acts downstream of E-cadherin-dependent intercellular adhesion.

We deduce that the dissociation-induced apoptosis may be antagonized to some extent by the PI3K-Akt pathway (Downward, 2004), which can be activated by various extrinsic signals including Fgf and extracellular matrix/integrin, both are essential for hESC culture. The inhibitors of the PI3K-Akt pathway (e.g., LY-294002) facilitated the apoptosis in dissociated hESCs (Figure S7F). Conversely, the overexpression of a constitutively active Akt (caAkt) at least partially reduced the dissociation-induced apoptosis without interfering with blebbing (Figure S7G), suggesting that PI3K-Akt signaling can negatively modulate the apoptotic signal downstream of the myosin hyperactivation. Western blot analysis showed that dissociation induces a gradual accumulation of phosphorylated (active) Akt in hESCs (Figure S7H). This accumulation of active Akt may help delay the onset of cell death. The contribution of the active Akt to the strong resistance of mESCs is worth analyzing in-depth, given that both Eras (strongly expressed in mouse pluripotent stem cells, but not in hESCs; Takahashi et al., 2003; Kameda and Thomson, 2005) and LIF can activate the PI3K pathway.

## DISCUSSION

### Myosin Hyperactivation Is the Direct Cause of the Early-Onset Apoptosis of hESCs

In this study, we first revealed that an unregulated activation of the actin-myosin system is the cause for the cell death of isolated hESCs. The myosin hyperactivation per se, not the blebbing, directly leads to the apoptosis. In other words, although the blebbing is like a “death dance” preceding the suicide of a solitary hESC, it is an epiphenomenon and not the actual trigger for death. An important question to be addressed in future investigations is how the information of myosin hyperactivation is transduced to the mitochondria. The present study also showed that cytochalasin D treatment prevented dissociated hESCs from undergoing early-onset apoptosis without inhibiting the pMLC2 accumulation, indicating that the hyperactivation of the actomyosin system, rather than elevated activity of myosin per se, is essential for the apoptosis induction.

One model for the induction mechanism is that the actomyosin hyperactivation nonspecifically augments intracellular stress, which is shown to trigger apoptosis via stress-responsive

apoptotic pathways. Two typical apoptosis-inducing factors related to cellular stress responses are MAPKs (e.g., JNK; Chang and Karin, 2001) and p53 (Vousden and Lane, 2007), which are known to act upstream of the Bcl/Bax family. However, we have so far obtained no evidence for the involvement of these two typical apoptosis inducers in the hESC apoptosis (unpublished data). For instance, the dissociation of hESCs did not increase the level of phosphorylated JNK, and the MAPK inhibitors (SP600125 and SB203580) had little effects on the dissociation-induced apoptosis. Similarly, no significant increase in p53 was induced by hESC dissociation, and the overexpression of Mdm2, an inhibitor (ubiquitin ligase) of p53, failed to inhibit the apoptosis.

A second possibility is that the apoptosis is caused by the excessive energy consumption by the actomyosin hyperactivation. With this in mind, we measured the ATP content in dissociated hESCs. We found no substantial decrease of the ATP level in the Annexin V<sup>−</sup> cell population even 5 hr after dissociation (although most cells started blebbing soon after dissociation; Figure 1G), arguing against the idea that the apoptosis of dissociated hESCs is due to an excessive consumption of intracellular energy (data not shown).

A third interpretation is that the augmented physical tension within the actomyosin cytoskeleton itself triggers the activation of the mitochondrial pathway, for instance, by controlling the subcellular localization of apoptosis-inducing proteins in a tension-dependent fashion. This is certainly an attractive hypothesis to be tested systematically in future investigation.

The present study focused on the molecular mechanism of the early culture period (<2 days) of hESC apoptosis. During this time, in addition to Y-27632, the Caspase inhibitor zVAD also effectively suppressed the early-onset apoptotic reaction (Figure 1A). Interestingly, however, although Y-27632 and Blebbistatin (Figure S1A and Figure 2I) fully enable the survival of dissociated hESCs for a long time (>2 days), continuous zVAD treatment only partially supports the long-term survival (Watanabe et al., 2007), suggesting the presence of a minor Caspase-independent pathway that also lies downstream of the ROCK-myosin hyperactivation for efficient long-term survival.

### Upstream Regulation of the Dissociation-Induced ROCK/Myosin Hyperactivation in hESCs

In the context of dissociation-induced ROCK/myosin hyperactivation, the two small GTPases Rho and Rac seem mutually antagonistic in function. For instance, the overexpression of caRac effectively inhibited the blebbing of hESCs. The data in the present study suggest at least two aspects of Rac's antagonistic functions in dissociated hESCs. First, overexpression of caRac attenuated the elevation of Rho activity in dissociated hESC (Figure S6G, top row), consistent with previous reports on mutual inhibition of Rho and Rac (BurrIDGE and Wennerberg, 2004). Second, Rac may also play an inhibitory role at more downstream levels. When coexpressed with caRho or caROCK, dnRac further increased apoptosis in dissociation culture of Abr-depleted hESCs (Figures 7A–7D). These findings suggest that Rac inhibition plays an effective role even under the condition of forced Rho-ROCK activation.

The effect of the reciprocal Rho/Rac activity is in accordance with a dual regulatory role of Abr as a Rho-GEF and Rac-GAP,