

Fig. 3 The formation of DE cells, hepatoblasts, hepatocytes, and cholangiocytes from human ESCs. (a) Human ESCs (H9) were differentiated into DE cells according to the protocol described in Fig. 6a and subjected to immunostaining with anti-CXCR4 antibodies on day 6 of differentiation. On (b) day 9 or (c) day 12, human ESC-derived cells were subjected to immunostaining with anti-AFP, CK7, and ALB antibodies. The percentage of antigen-positive cells was measured by flow cytometry. The gray, white, or hatched bars represent the percentage of AFP-, CK7-, or ALB-positive cells, respectively. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

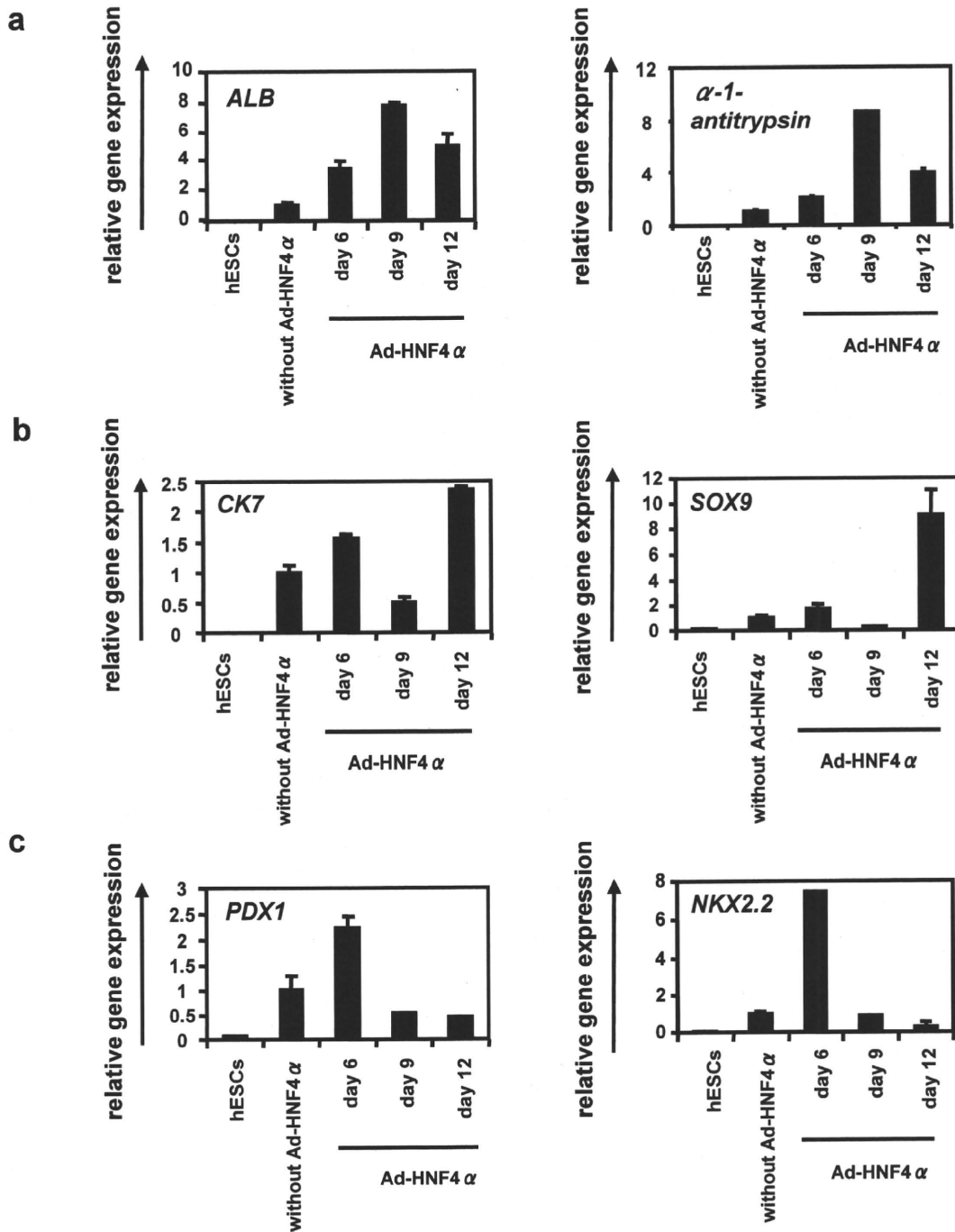


Fig. 4 Transduction of HNF4 α into hepatoblasts promotes hepatic differentiation.

(a-c) The human ESC (H9)-derived cells, which were cultured for 6, 9, or 12 days according to the protocol described in Fig. 6a, were transduced with 3,000 vector particles (VP)/cell of Ad-HNF4 α for 1.5 hr and cultured until day 20. The gene expression levels of (a) hepatocyte markers (*ALB* and *α -1-antitrypsin*), (b) cholangiocyte markers (*CK7* and *SOX9*), and (c) pancreas markers (*PDX1* and *NKX2.2*) were examined by real-time RT-PCR on day 0 (human ESCs [hESCs]) or day 20 of differentiation. The horizontal axis represents the days when the cells were transduced with Ad-HNF4 α . On the y axis, the level of the cells without Ad-HNF4 α transduction on day 20 was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

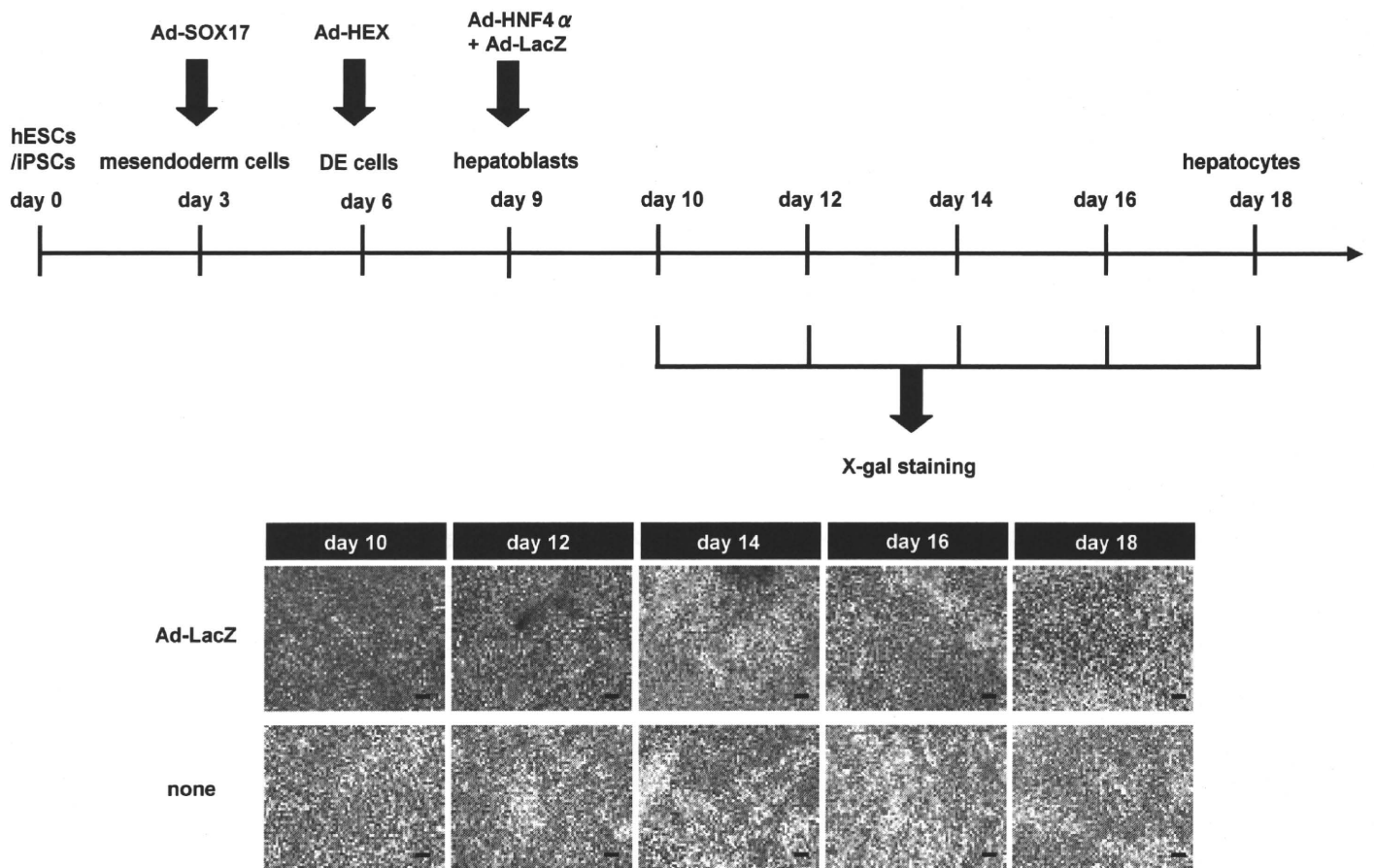


Fig. 5 Time course of LacZ expression in hepatoblasts transduced with Ad-LacZ.

Human ESCs were differentiated into hepatoblasts according to the protocol described in Fig. 6a, and then transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ for 1.5 hr. On days 10, 12, 14, 16, and 18, X-gal staining was performed. The scale bar represents 100 μ m. Similar results were obtained in two independent experiments.

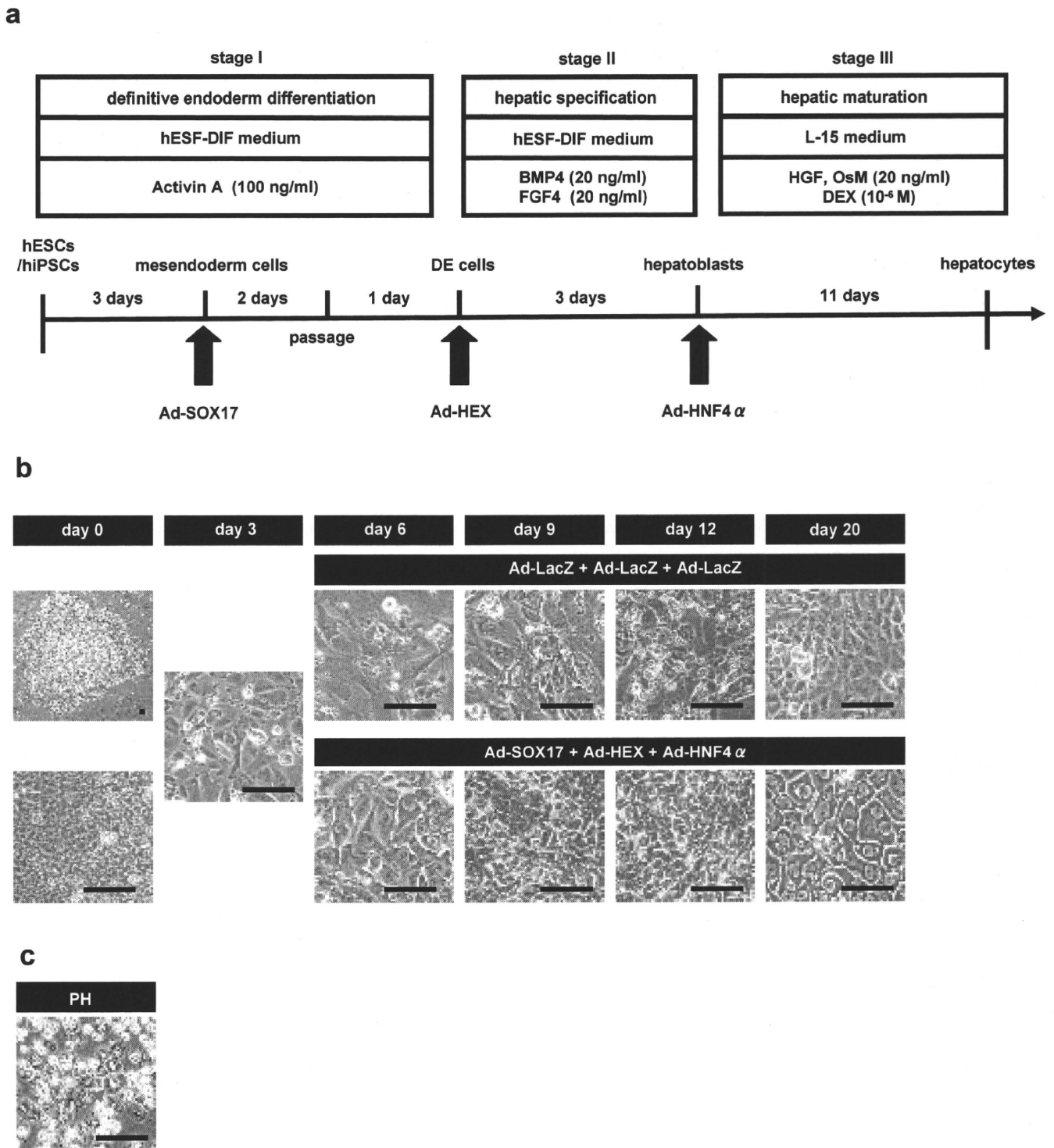


Fig. 6 Hepatic differentiation of human ESCs and iPSCs transduced with 3 factors. (a) The procedure for differentiation of human ESCs and iPSCs into hepatocytes via DE cells and hepatoblasts is presented schematically. (b) Sequential morphological changes (day 0-20) of human ESCs (H9) differentiated into hepatocytes via DE cells and hepatoblasts are shown. Red arrow shows the cells that have double nuclei. (c) The morphology of primary human hepatocytes is shown. Scale bar represents 50 μ m.

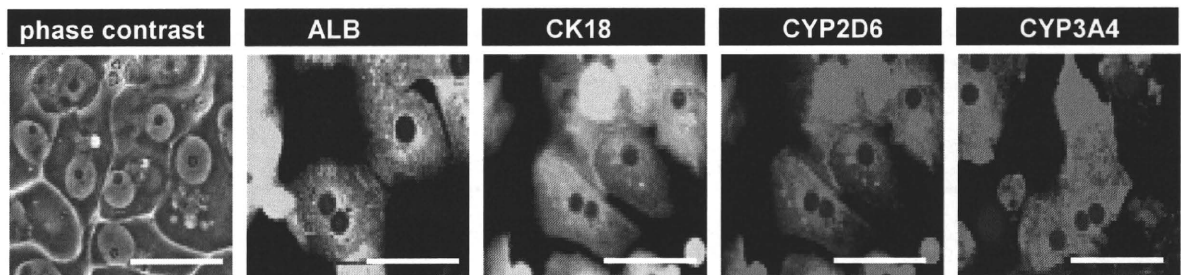


Fig. 7 The morphology of induced hepatocytes that have two nuclei.

Human ESCs were differentiated into hepatocytes according to the protocol described in **Fig. 6a**. The induced hepatocytes (day 20) were subjected to immunostaining with anti-ALB (green), CK18 (green), CYP2D6 (red), or CYP3A4 (red) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 25 μ m. Similar results were obtained in two independent experiments.

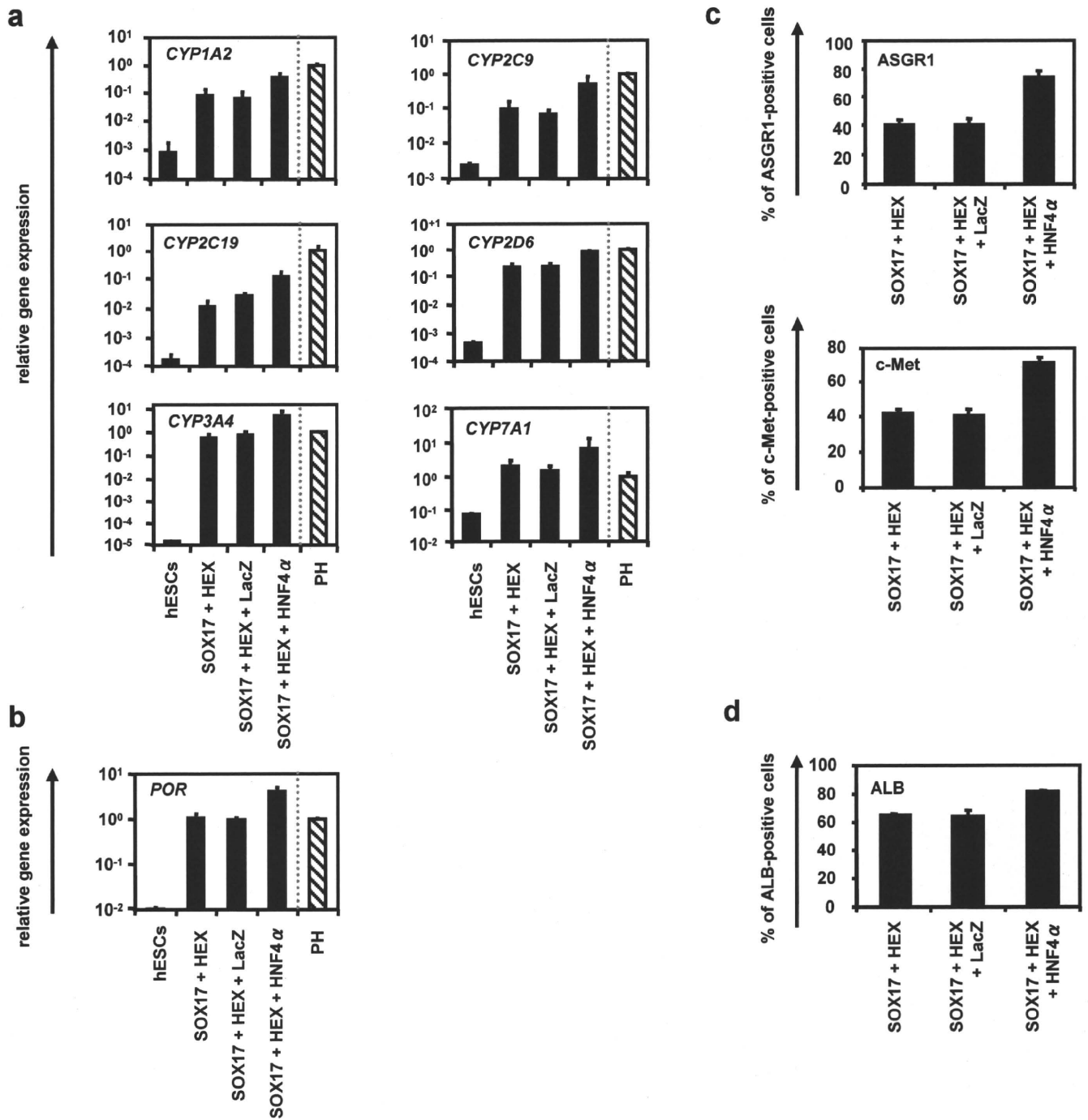


Fig. 8 Transduction of HNF4 α promotes hepatic maturation from human ESCs and iPSCs.

(a, b) The human ESCs were differentiated into hepatocytes according to the protocol described in Fig. 6a. On day 20 of differentiation, the gene expression levels of (a) CYP enzymes (*CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, and *CYP7A1*) and (b) *POR* were examined by real-time RT-PCR in undifferentiated human ESCs (hESCs), induced hepatocytes, and primary human hepatocytes (PH, hatched bar). On the y axis, the expression level of primary human hepatocytes, which were cultured for 48 h after the cells were plated was taken as 1.0. (c and d) The induced hepatocytes (day 20) were subjected to immunostaining with (c) anti-hepatic surface protein (ASGR1 and c-Met) and (d) anti-ALB antibodies, and then the percentage of antigen-positive cells was examined by flow cytometry on day 20 of differentiation. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

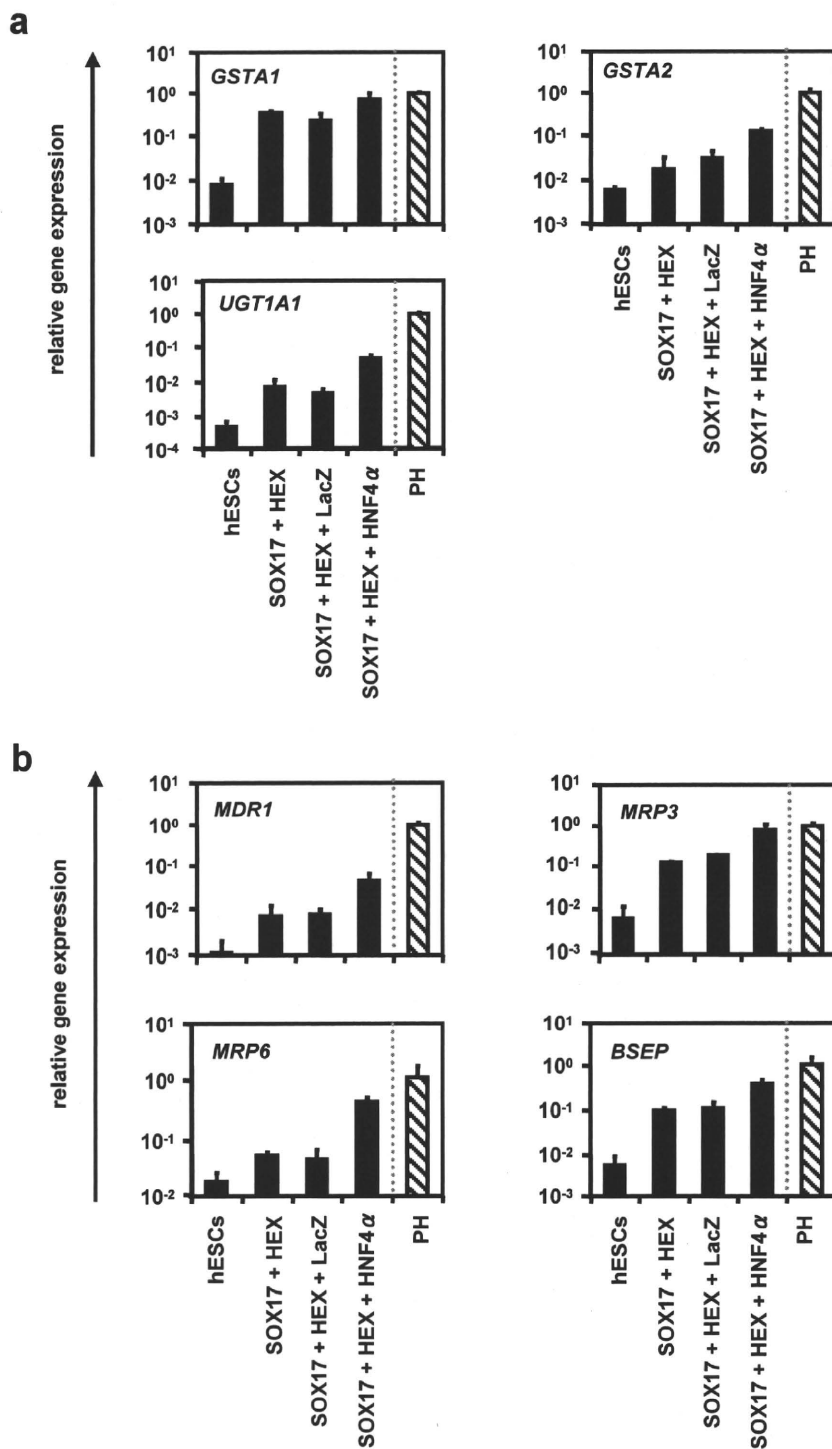


Fig. 9 Upregulation of the expression levels of conjugating enzymes and hepatic transporters by HNF4 α transduction.

(a, b) The human ESCs were differentiated into hepatocytes according to the protocol described in Fig. 6a. On day 20 of differentiation, the gene expression analysis of (a) hepatic conjugating enzymes (*glutathione s-transferase A1* [GSTA1], GSTA2, and *uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1* [UGT1A1]) and (b) hepatic transporters (*multi-drug resistant gene 1* [MDR1], *multi-drug resistance protein 3* [MRP3], MRP6, and *bile salt export pump* [BSEP]) showed higher expression levels in the 3 factors-transduced cells (SOX17 + HEX + HNF4 α) as compared with control cells on day 20. On the y axis, the expression level of primary human hepatocytes (PH, hatched bar), which were cultured for 48 h after the cells were plated was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

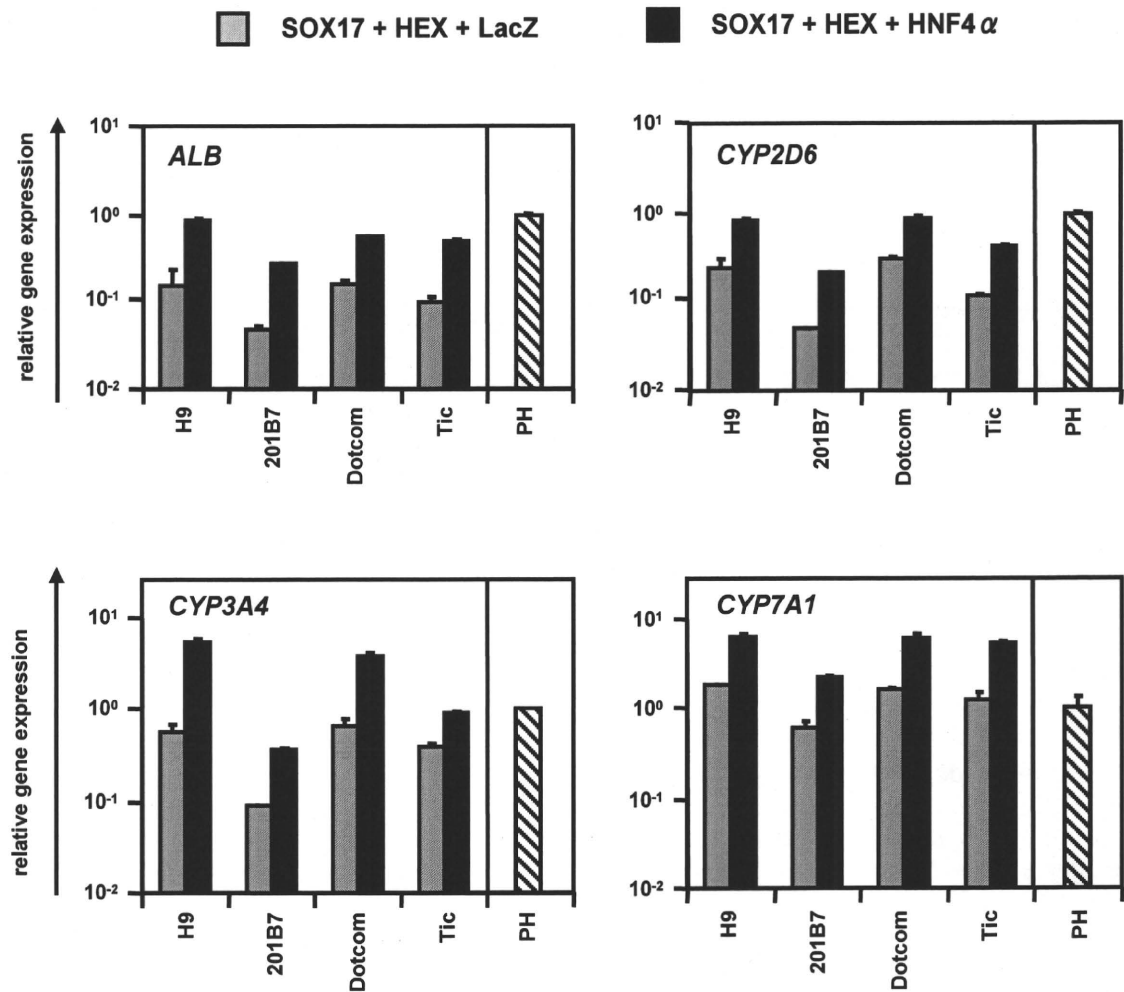


Fig. 10 Generation of hepatocytes from various human ES or iPS cell lines.

Hepatoblasts were transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h and cultured until day 20 of differentiation according to the protocol described in Fig. 6a. The expression levels of the hepatocyte markers (*ALB*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, and *CYP7A1*) were examined by real-time RT-PCR in human ESC (H9)-derived hepatocytes and human iPSC (201B7, Dotcom, or Tic)-derived hepatocytes. The gene expression profiles of cells transduced with 3 factors (black bar) were compared with those of cells transduced with 2 factors plus Ad-LacZ (gray bar). The level of primary human hepatocytes (PH, hatched bar), which were cultured 48 hr after plating the cells were plated, was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n = 3$).

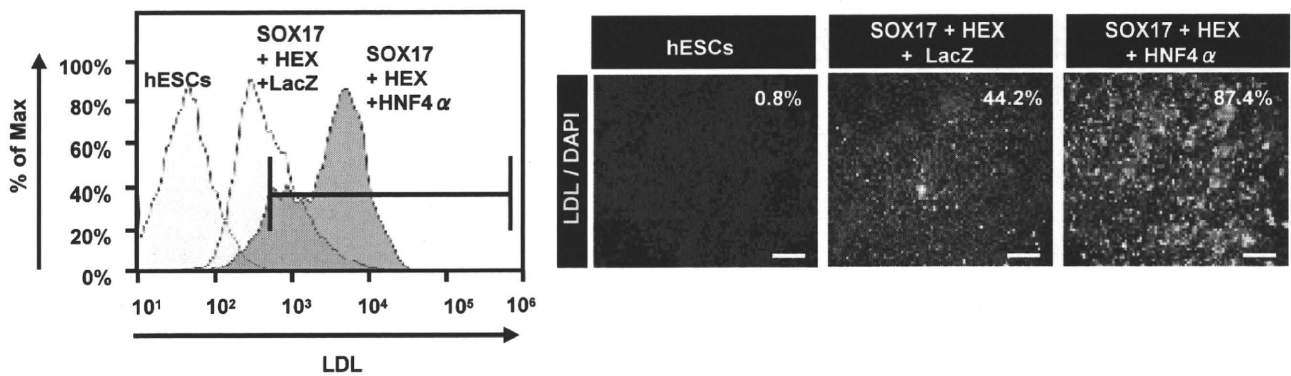


Fig. 11 Human ESC-derived hepatocytes uptake LDL.

The human ESCs were differentiated into hepatoblasts and transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h and cultured until day 20 of differentiation according to the protocol described in **Fig. 6a**. The hepatic functions of the 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (SOX17 + HEX + LacZ) and the 3 factors-transduced cells (SOX17 + HEX + HNF4 α) were compared. Undifferentiated human ESCs (hESCs) and induced hepatocytes (day 20) were cultured with medium containing Alexa-Fluor 488-labeled LDL (green) for 1 h, and immunohistochemistry and flow cytometry analysis were performed. The percentage of LDL-positive cells was measured by flow cytometry. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 100 μ m. All data are represented as means \pm SD ($n = 3$).

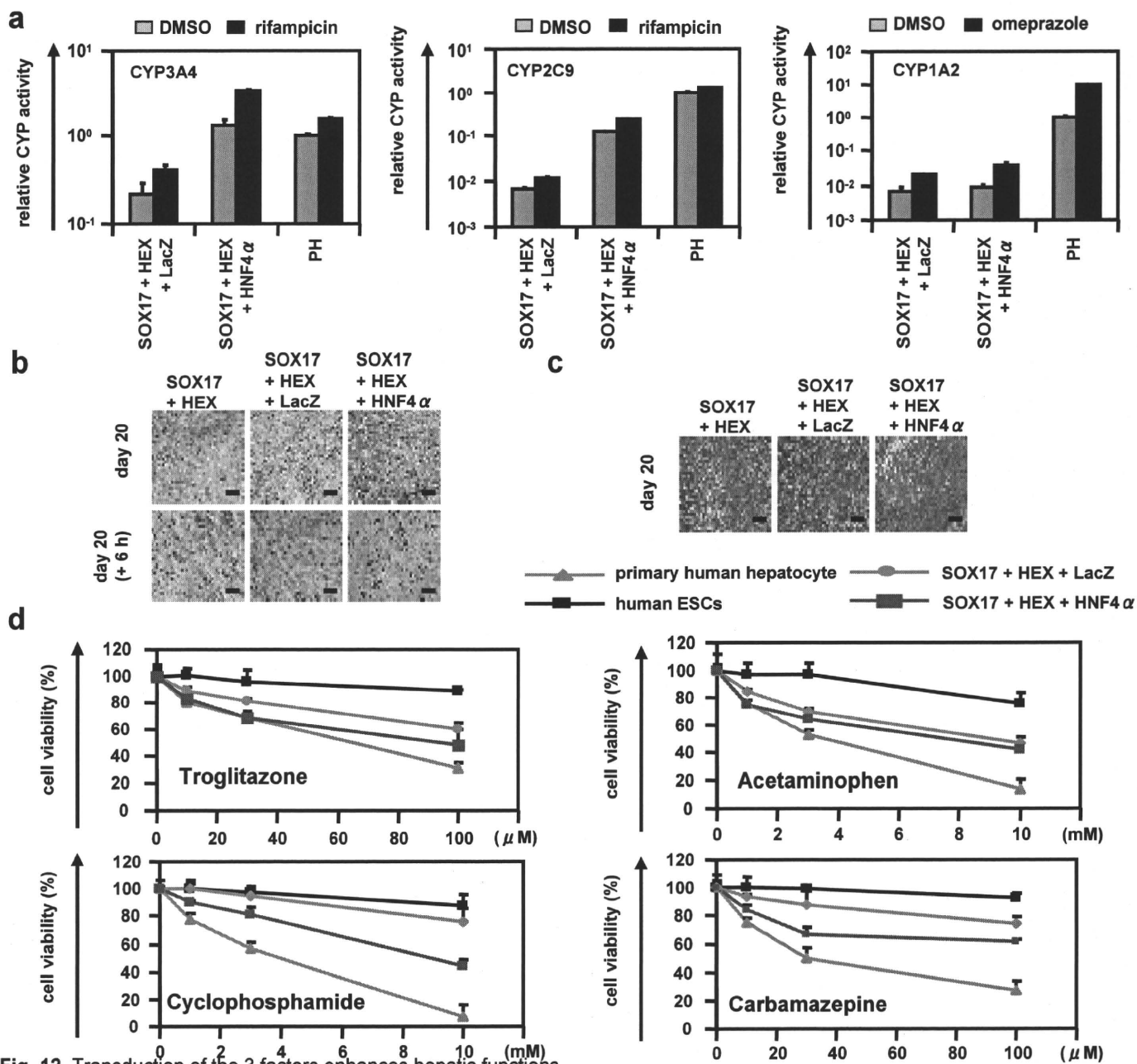


Fig. 12 Transduction of the 3 factors enhances hepatic functions.

The human ESCs were differentiated into hepatoblasts and transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h and cultured until day 20 of differentiation according to the protocol described in Fig. 6a. The hepatic functions of the 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (SOX17 + HEX + LacZ) and the 3 factors-transduced cells (SOX17 + HEX + HNF4 α) were compared. (a) Induction of CYP3A4 (left), CYP2C9 (middle), or CYP1A2 (right) by DMSO (gray bar), rifampicin (black bar), or omeprazole (black bar) in induced hepatocytes (day 20) and primary human hepatocytes (PH), which were cultured for 48 hours after the cells were plated. On the y axis, the activity of primary human hepatocytes that have been cultured with medium containing DMSO was taken as 1.0. (b) The induced hepatocytes (day 20) (upper column) were examined for their ability to take up Indocyanin Green (ICG) and release it 6 h thereafter (lower column). (c) Glycogen storage of induced hepatocytes (day 20) was assessed by Periodic Acid-Schiff (PAS) staining. PAS staining was performed on day 20 of differentiation. Glycogen storage is indicated by pink or dark red-purple cytoplasm. The scale bar represents 100 μ m. (d) The cell viability of undifferentiated human ESCs (black), 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (green), the 3 factors-transduced cells (blue), and primary human hepatocytes (red) was assessed by Alamar Blue assay after 48 h exposure to different concentrations of four test compounds (troglitazone, acetaminophen, cyclophosphamide, and carbamazepine). The cell viability is expressed as a percentage of cells treated with solvent only treat: 0.1% DMSO except for carbamazepine: 0.5% DMSO. All data are represented as means \pm SD ($n=3$).

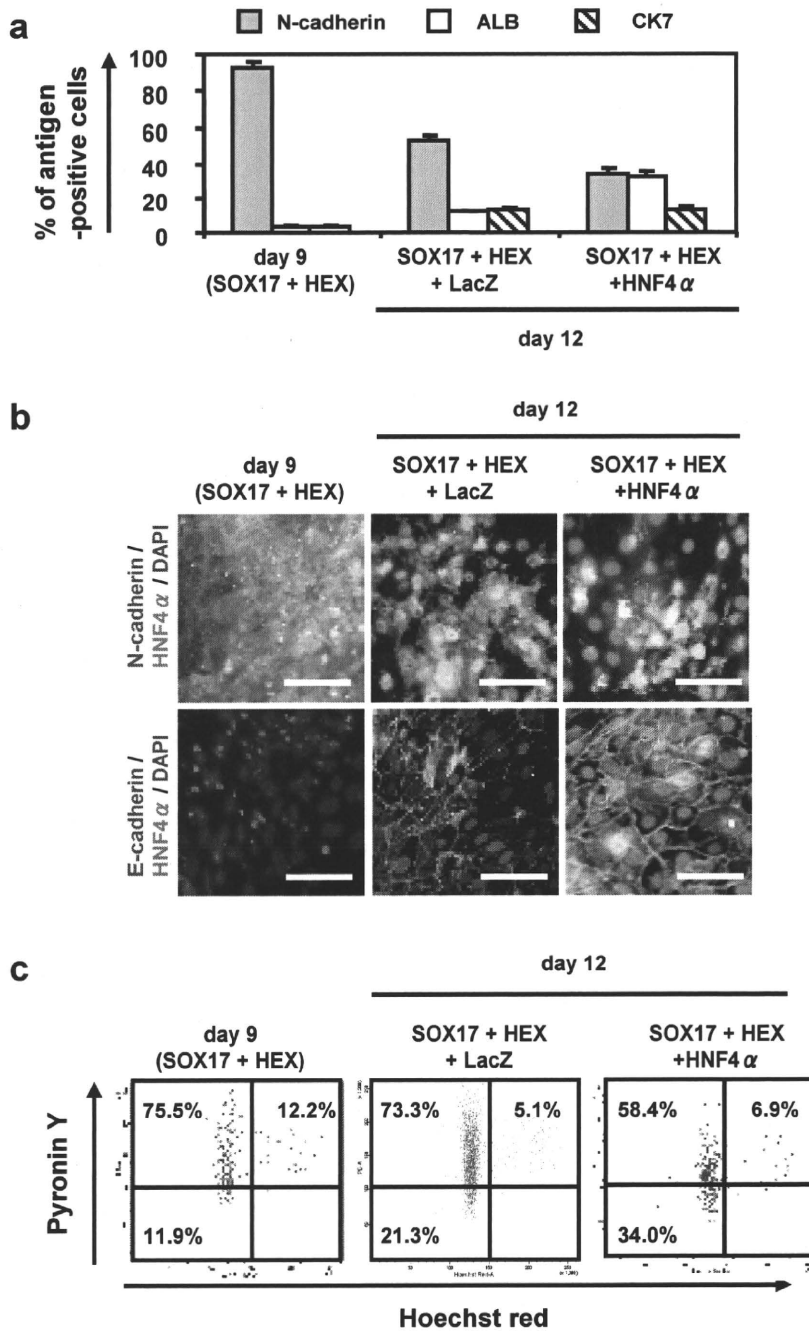


Fig. 13 HNF4 α promotes hepatic differentiation by activating MET.

Human ESCs were differentiated into hepatoblasts according to the protocol described in **Fig. 2a**, and then transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h, and finally cultured until day 12 of differentiation. **(a)** The hepatoblasts, 2 factors plus Ad-LacZ-transduced cells (SOX17 + HEX + LacZ) (day 12), and the 3 factors-transduced cells (SOX17 + HEX + HNF4 α) (day 12) were subjected to immunostaining with anti-N-cadherin, ALB, or CK7 antibodies. The percentage of antigen-positive cells was measured by flow cytometry. **(b)** The cells were subjected to immunostaining with anti-N-cadherin (green), E-cadherin (green), or HNF4 α (red) antibodies on day 9 or day 12 of differentiation. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The scale bar represents 50 μ m. Similar results were obtained in two independent experiments. **(c)** The cell cycle was examined on day 9 or day 12 of differentiation. The cells were stained with Pyronin Y (y axis) and Hoechst 33342 (x axis) and then analyzed by flow cytometry. The growth fraction of cells is the population of actively dividing cells (G1/S/G2/M).

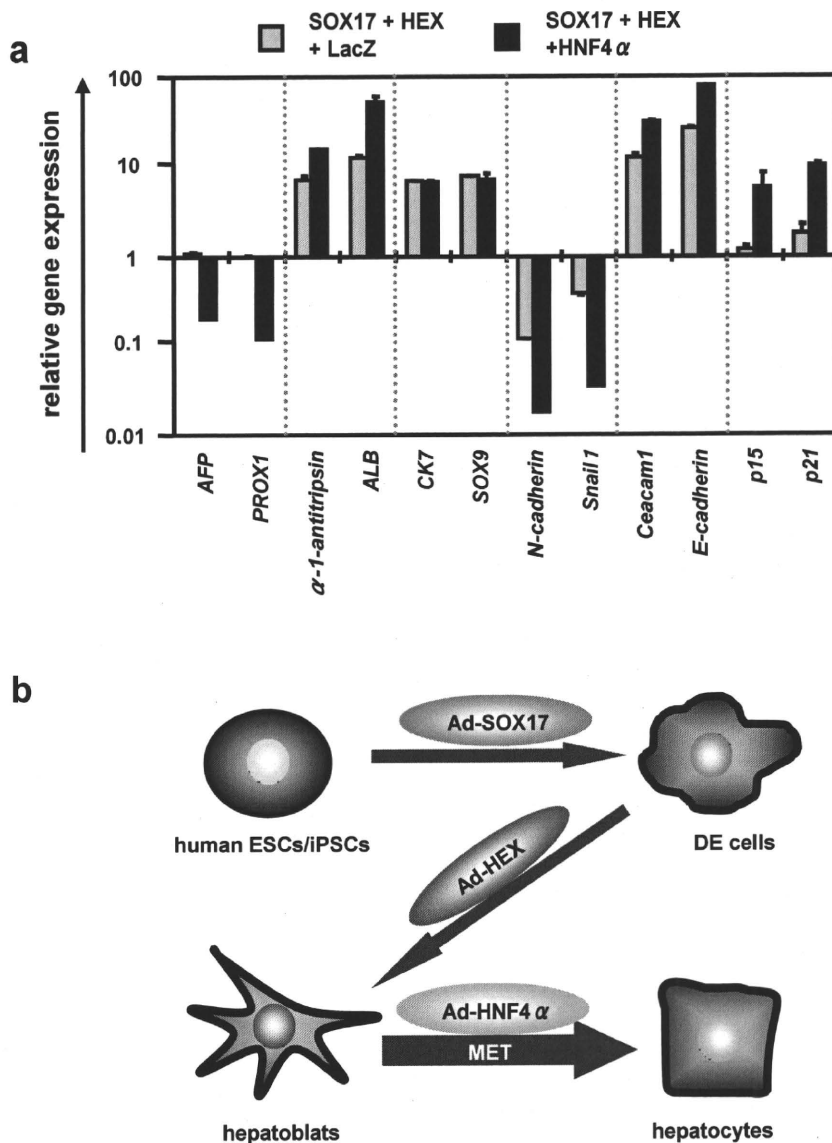


Fig. 14 HNF4 α promotes hepatic differentiation by activating MET.

Human ESCs were differentiated into hepatoblasts according to the protocol described in **Fig. 6a**, and then transduced with 3,000 VP/cell of Ad-LacZ or Ad-HNF4 α for 1.5 h, and finally cultured until day 12 of differentiation. **(a)** The expression levels of *AFP*, *PROX1*, *α -1-antitrypsin*, *ALB*, *CK7*, *SOX9*, *N-cadherin*, *Snail1*, *Ceacam1*, *E-cadherin*, *p15*, and *p21* were examined by real-time RT-PCR on day 9 or day 12 of differentiation. The expression level of hepatoblasts (day 9) was taken as 1.0. All data are represented as means \pm SD ($n=3$). **(b)** The model of efficient hepatic differentiation from human ESCs and iPSCs in this study is summarized. The human ESCs and iPSCs differentiate into hepatocytes via definitive endoderm and hepatoblasts. At each stage, the differentiation is promoted by stage-specific transduction of appropriate functional genes. In the last stage of hepatic differentiation, HNF4 α transduction provokes hepatic maturation by activating MET.

Supporting Table 1. List of Taqman probes and primers used in this study.

Genes	Assay ID or Primers (forward/reverse; 5' to 3')
ALB	GCACAGAATCCTTGGTGAACAG/ATGGAAGGTGAATGTTTTTCAGCA
CYP2D6	CTTTCGCCCCAACGGTCTC/TTTTGGAAGCGTAGGACCTTG
CYP3A4	AAGTCGCCTCGAAGATACACA/AAGGAGAGAACACTGCTCGTG
CYP7A1	GAGAAGGCAAACGGGTGAAC/GCACAACACCTTATGGTATGACA
CK7	AGACGGAGTTGACAGAGCTG/GGATGGCCCGGTTTCATCTC
SOX9	TTTCCAAGACACAAACATGA/AAAGTCCAGTTTCTCGTTGA
PDX1	Hs00426216_m1
NKX2.2	Hs00159616_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GAPDH	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA/GTGGTTCGTTGAGGGCAATG
HNF4 α	CGTCATCGTTGCCAACACAAT/GGGCCACTCACACATCTGTC
CYP1A2	CAATCAGGTGGTGGTGTGTCAG/GCTCCTGGACTGTTTTCTGC
CYP2C9	GGACAGAGACGACAAGCACA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
CYP2C19	ACTTGGAGCTGGGACAGAGA/CATCTGTGTAGGGCATGTGG
GSTA1	ATGCCCATGATACTGGGTA/GTGAGCCCCATCAATCAAGT
GSTA2	TGCAACAATTAAGTGCTTTACCTAAGTG/TAACTAAGTGGGTGAATAGGAGTTGTATT
UGT1A1	TAAGTGCTACCCCAAAACG/GCTTTGCATTGTCCATCTGA
POR	GGTGGCCGAAGAAGTATCTCT/ATTTTGGTGAACTCGGGGACT
MDR1/ABCB1	GCCAAAGCCAAAATATCAGC/TTCCAATGTGTTCCGGCATT
MRP3/ABCC3	GTCCGCAGAAATGGACTTGAT/TCACCACTGGGGATCATT
MRP6/ABCC6	TGTCGCTCTTTGGAAAATCC/AGGAACACTGCGAAGCTCAT
BSEP/ABCB11	TGATCCTGATCAAGGGAAGG/TGGTTCCTGGGAAACAATTC
AFP	TGGGACCCGAACCTTTCCA/GGCCACATCCAGGACTAGTTTC
PROX1	TTGACATTGGAGTGAAAAGGACG/TGCTCAGAACCTTGGGGATT
α -1-antitrypsin	ACTGTCAACTTCGGGGACAC/CATGCCTAAACGCTTCATCA
N-cadherin	GAGGAGTCAGTGAAGGAGTCA/GGCAAGTTGATTGGAGGGATG
Snail	AATCGGAAGCCTAACTACAGCG/TCCCAGATGAGCATTGGCA
Ceacam1	TCACCTTGAATGTCACCTATGGC/GGCTTTGCTACTACTGGACTTAG
E-cadherin	CGAGAGCTACACGTTACGG/GTGTCGAGGGAAAAATAGGCTG
p15	TGGACCTGGTGGCTACGAAT/AGGGCCTAAGTTGTGGGTTCA
p21	CTGCCAAGCTCTACCTTCC/CCCGCAGTATCTTGCCTCC

Supporting Table 2. List of antibodies used in this study.

Antigen	Type	Company
CXCR4	mouse	R&D Systems
Alpha-1-Fetoprotein	rabbit	DAKO
CK7	mouse	Invitrogen
ALB	rabbit	SIGMA
CK18	mouse	Invitrogen
CYP2D6	goat	Santa Cruz Biotechnology
CYP3A4	goat	Santa Cruz Biotechnology
ASGR1	goat	Santa Cruz Biotechnology
c-Met	mouse	Santa Cruz Biotechnology
LDL	mouse	Invitrogen

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

（分担）研究報告書

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系構築のための基礎研究

研究分担者 古江・楠田 美保

独) 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室 研究リーダー

研究要旨：

ヒト iPS 細胞などの応用による毒性評価系を構築するため、目的に応じた良い細胞株を選択すること、その選択基準を決めることが品質評価の上で重要である。そこで、多種類のヒト iPS 細胞の未分化状態における特性を明らかにし、その品質管理、品質評価技術を確立するとともに、ヒト iPS 細胞から内胚葉細胞への安定で高効率な分化誘導技術の開発し、細胞株の選択を行うための品質評価法を開発することが、本分担研究の目的である。

A. 研究目的

多くのヒト iPS 細胞が樹立される一方で、細胞株間の形質が異なることが知られている。そこで、目的に応じた良い細胞株を選択すること、その選択基準を決めることが品質評価の上で重要である。また、ヒト iPS 細胞などの応用による毒性評価系を構築するため、再現性のある安定した細胞培養系の確立が重要である。本事業においては、ヒト iPS 細胞などの応用による毒性評価系を構築するため、ヒト iPS 細胞から肝細胞を誘導することを目標としている。そのためには、安定した細胞形質を維持できる培養法を確立し、品質評価を行って、肝細胞への分化誘導効率の高い株の選択する必要がある。そこで、ヒト iPS 細胞の未分化状態における遺伝子発現の解析プロフィールを解析し、内胚葉細胞へ高効率に分化する細胞株の選択を行うための品質評価法を開発することが、本分担研究の目的である。

具体的には

1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析：未分化状態でのヒト ES/iPS/EC 細胞の遺伝子プロファイリングを行い、iPS 細胞の特性を明らかにする。
2. In vitro における多分化能評価方法の開発：再現性があり、簡便、安価な胚葉体培養方法を検討する。
3. 再現性の高い安定した培養方法の確立：これまでに我々が開発した無血清無フィーダー培養系における培養法の再現性を確認する。
4. ヒト iPS 細胞から内胚葉細胞への分化効率測定法開発：再現性のある高効率な分化誘導方法を確立するとともに、その方法を用いて、ハイスループットに細胞株の分化効率を評価する方法を確立する。

B. 研究方法

1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

未分化状態での iPS 細胞の特性を明らかにするため、ヒト ES/iPS/EC 細胞の遺伝子発現プロファイルを PCR アレイを用いて解析を行った。対象は、厚生労働省研究資源バンク・細胞バンク (JCRB Cell Bank) に登録されたヒト iPS 細胞 JCRB1331/Tic, JCRB1327/Dotocom, JCRB1329/Squeaky, JCRB1338/Toe, JCRB1336/Lollipop、大阪医療センターにて樹立され、研究用に分与された iDMC-01、iDMC-03、ヒト iPS 細胞京都大学ヒト ES 細胞 KhES-1、KhES-3 (京都大学より分与)、ウィスコンシン大学ヒト ES 細胞 H9 (Wicell より分譲)、ヒト ES 細胞 JCRB1168/NCRG3、2102Ep.cl.2A6 (英国シェフィールド大学より分与) を用いた。国際幹細胞イニシャティブによる解析にも用いられた Pluripotency 遺伝子 PCR アレイを用いて解析を行った。また、iPS 細胞の癌化の高い可能性が示唆されていることから、Oncogenes and Tumor suppressor genes についての PCR array による解析も行った。

2. In vitro における多分化能評価方法の開発

一般的な分化傾向の評価は、ヒト ES/iPS 細胞を凝集させ胚様体 (Embryoid body ; EB) を作製し自然発生させ、10 日から 3 カ月程度培養を行って分化マーカーの遺伝子発現を解析している。しかしながら、EB 形成後、細胞接着が起こらない特殊加工した細胞培養プレートを用いて培養する方法

もあるが、このようなプレートはコストがかかるとともに、細胞が浮遊している為、培地交換にも手間がかかる。多種類のヒト iPS 細胞の分化傾向を評価するためには、安定で簡便で安価な評価方法が必要である。昨年度は EB 形成後、細胞接着した状態で培養させ、複数リストアップした外胚葉、中胚葉、内胚葉の遺伝子発現を解析した。しかし、株の中には EB を形成しにくいものもあり、他の EB 形成法も検討する必要があると考え、今年度は特殊加工した細胞培養プレートを用いた培養方法と従来の方法で培養を行った。さらに、これらの遺伝子発現を Stem cell Pluripotency Array (ABI) を用いて比較解析した。

3. 再現性の高い安定した培養方法の確立

これまでに我々が開発した無血清培地 hESF9 培地とファイブロネクチンを用いて、無フィーダー培養系にて、京都大学ヒト ES 細胞 KhES-1 ならびに京都大学ヒト iPS 細胞 201B7 が培養できることが明らかとなった。ヒトケラチノサイトより樹立したヒト iPS 細胞 UTA-1 (東京大学にて樹立、分与) が上記方法で培養できるかどうかを確認した。

4. ヒト iPS 細胞から内胚葉細胞への高効率的分化誘導方法の開発

多くのヒト iPS 細胞が樹立される中、株間において目的細胞への分化効率が異なることが知られている。ヒト iPS 細胞から高効率な成熟肝細胞分化誘導を行うためには、①分化効率のよい細胞株を選択すること、また、②内胚葉細胞への分化誘導を高効率に行うこと、が必要となる。昨年度の成果として、hESF9-differ、ラミニン、ActivinA

による内胚葉細胞への分化誘導条件の開発について成果発表した(Inamura et al. 2010)。そこで、さらなる分化効率の改善を試みた。マルチウェルプレートを用いて、細胞播種濃度、ActivinA 濃度、培養日数、培地交換の有無等の点を改良した。さらに、この分化プロトコールによるヒト iPS 細胞株間での内胚葉細胞分化誘導効率の違いを、イメージアナライザーを用いて解析した。さらに、この内胚葉細胞への分化効率と、水口らの分化プロトコールによって誘導された成熟肝細胞への分化効率に相関性があるのか検討した。

C. 研究結果

1. 未分化状態でのヒト iPS 細胞の特性解析

ES/iPS 細胞におけるヒト幹細胞の未分化マーカーや早期分化マーカーなどの遺伝子群の発現を Pluripotency PCR アレイを用いて、解析した。ヒト ES 細胞と iPS 細胞、ならびにヒト EC 細胞において、未分化マーカー遺伝子、あるいは早期分化マーカー遺伝子の発現において、大きな発現の差は見られなかった (図 1)。一方、MRC5 細胞から樹立された iPS 細胞クローンである、JCRB1331 (Tic) と 染色体異常を示す JCRB1329 (Squeaky) を用いて、Oncogenes and Tumor suppressor genes の発現を比較した。その結果、JCRB1329 において優位に発現する遺伝子が存在することが示唆された (図 2)。JCRB1329 については、樹立者よりテラトーマ形成を確認できないとの報告が得られており、品質との関連性が推測された。

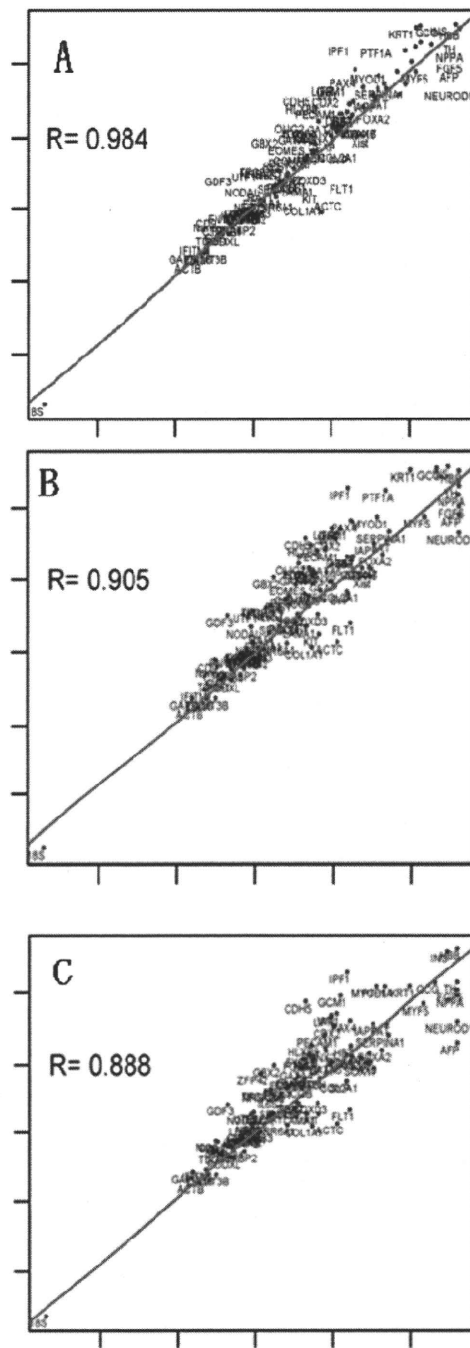


図 1. ヒトES/iPS, EC細胞間における遺伝子発現比較解析

ヒトES/iPS, EC細胞の、未分化状態において、RNAを抽出し、Pluripotency PCR arrayを行い、_カテゴリー間 A) ESとiPS細胞、B) ECとiPS細胞、C) ECとiPS細胞 における各遺伝子の相対発現レベルをScatter Plotで示した。Rは相関係数を示す。

2. *in vitro*における多分化能評価方法の開発
発

JCRB1327 (Dotcom)を用いて、EBを形成し、2種類方法で2週間培養を行った後、RNAを抽出して遺伝子発現解析を行った。両者の方法においても未分化マーカーの発現は減少し、分化マーカーの発現は増加する傾向にあり、完全に発現の増減率が一致する結果ではないが、類似した分化傾向が見られた(図3)。しかし、新規培養法において、未分化マーカー遺伝子群において、いくつかの遺伝子について、発現低下が顕著ではないものが見られた。従来法で用いているプレートは安価でもあることから、従来の方法で十分であることが示唆された。

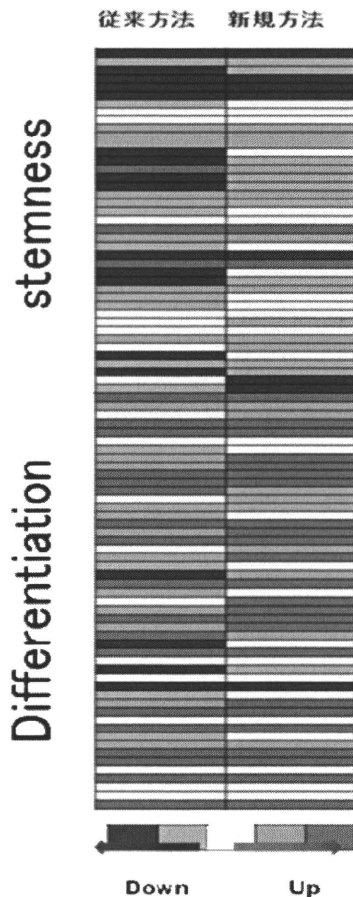


図3. EBを用いた*in vitro*における多分化能評価方法の開発

JCRB1327 (Dotcom)を用いてEBを形成後、2種類の方法で2週間培養し、RNAを抽出後、その遺伝子発現をStemcell Pluripotency Array (ABI)を用いて解析した。Stemnessは未分化マーカーをDifferentiationは分化マーカーを示す。

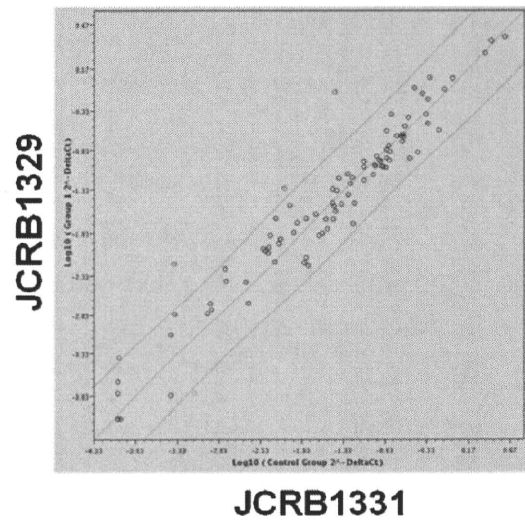


図2. 同一細胞からのクローンであるヒトiPS細胞株におけるOncogenes and Tumor suppressor genes遺伝子発現比較解析

同一細胞からのクローンである、JCRB1331 (Tic)と染色体異常を示すJCRB1329 (Squeaky)の未分化状態において、RNAを抽出し、Oncogenes and Tumor suppressor genes PCR arrayを用いて、この細胞株間における各遺伝子の相対発現レベルをScatter Plotで示した。三斜線外の部分は少なくとも3倍以上の相対変化が見られた遺伝子群であり、緑印はX mediumで相対変化の高い遺伝子群、赤印はY mediumで相対変化の高い遺伝子群を示す。

3. 再現性の高い安定した培養方法の確立

ヒト初代培養ケラチノサイトから、フィーダー細胞ならびに KSR を用いた培地中にて樹立したヒト iPS 細胞 UTA-1 を、ファイブロネクチンと hESF9 培地にアクチビンを添加した条件で、長期培養を試みた (Hayashi et al. 2010)。その結果、細胞倍加時間は変化せず、テラトーム形成による分化能も保持していた(図 4)。

さらに、牛血清に含まれるヒト体内では生産されない N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc)陽性細胞が、無血清培地を用いて培養することにより、低下していた(図 5)。以上のことから、品質管理を行う上で、hESF9 培地は有用であることが明らかとなった。

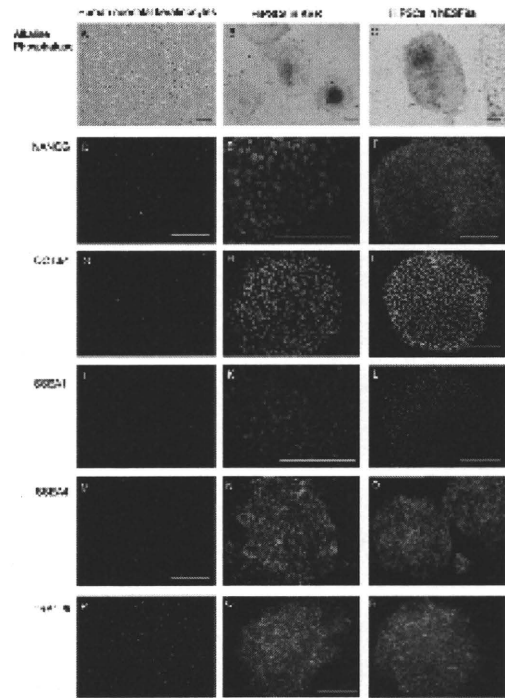


図 4. ヒトケラチノサイトから、マウスフィーダー細胞 (MEF) ならびに KSR を用いた培養条件下で iPS 細胞を樹立した (UTA-1)。この細胞を、ファイブロネクチンと hESF9a 培地を用いて継続的に培養を行った。iPS 細胞は、MEF 上でもフィーダーフリーであっても、未分化マーカーを発現していた。

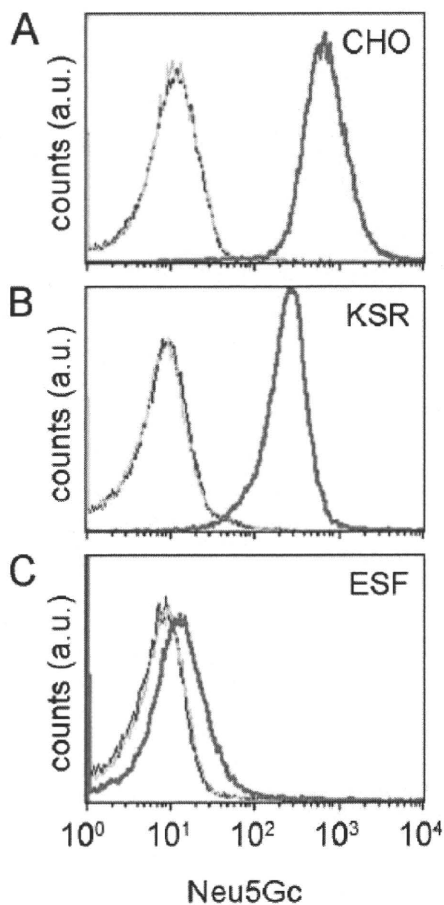


図 5. MEF 上ならびに、無フィーダーで培養を行った UTA-1 細胞における N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc)細胞発現プロファイル解析。

4. ヒト iPS 細胞から内胚葉細胞への高効率的分化誘導方法の開発

多数の報告において、ヒト iPS 細胞から内胚葉細胞を誘導する培養条件に、100ng/ml という高濃度の ActivinA を使用している。我々が開発した hESF9 培地においては、添加因子への感受性が従来培地に比べて高くなることから、内胚葉細胞への分化誘導に適度な濃度決定をするために、マルチウェルプレートを用いて解析を行った。その結果、アクチビン濃度依存的に FoxA2 陽性細胞が増加するものの、50ng/ml の濃度において、Foxa2 陽性率は飽和し、100ng/ml の濃度と同等の Foxa2(内胚葉マーカー)の発現陽性率を誘導できることが明らかとなった(図6)。また、株間の誘導効率の差も検出できた。さらに、従来の方法では、内胚葉細胞を誘導するまで5日間毎日の培地交換を行い、多量の ActivinA を要していた。しかしながら、今回の検討では、細胞播種時に 50ng/ml ActivinA を添加するのみで、培養期間4日間培地交換をしない条件でも、優位に内胚葉細胞誘導ができることが明らかとなった(図5)。そこで、この分化プロトコルを用いて、ヒト iPS 細胞株間での内胚葉細胞分化効率を比較した(図5)。その結果、水口らのアデノウィルスベクターを用いた遺伝子導入により誘導された最終的な成熟肝細胞への分化効率と相関性があることが示唆された。

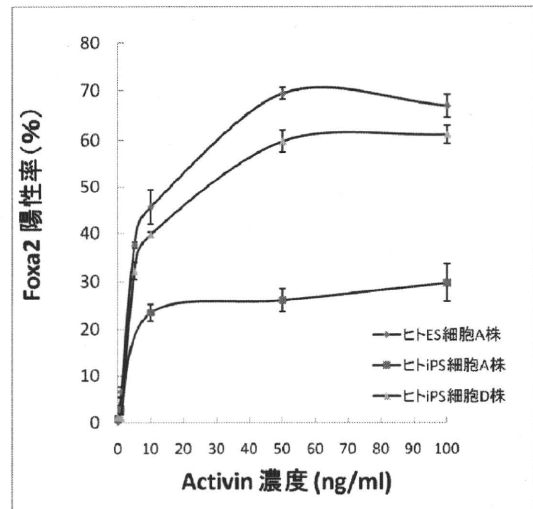


図6. 株による ActivinA 濃度依存的内胚葉分化誘導効率の違い

ヒトES細胞1株とヒトiPS細胞2株を、我々が開発した分化プロトコルを用いて、ActivinAの濃度を振り、4日間培養し、内胚葉細胞マーカーであるFoxa2の発現をイメージアナライザーを用いて比較解析した。縦軸はFoxa2の発現陽性率を示す。

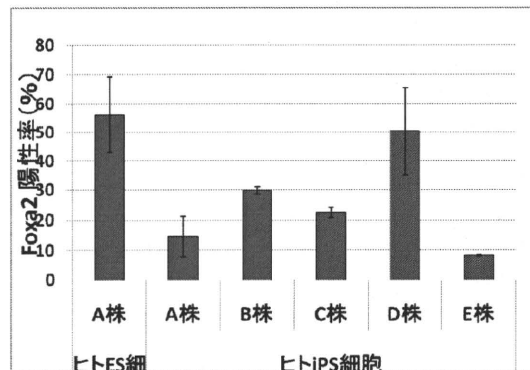


図7. 株による内胚葉分化誘導効率の違い

ヒトES細胞1株とヒトiPS細胞5株を、我々が開発した分化プロトコルを用いて4日間培養し、内胚葉細胞マーカーであるFoxa2の発現をイメージアナライザーを用いて比較解析した。縦軸はFoxa2の発現陽性率を示す。