

201008030B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系
構築のための基盤研究

平成20年度－平成22年度

総合研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成23（2011）年4月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

ヒト iPS 細胞等応用による新規細胞評価系
構築のための基盤研究

平成20年度－平成22年度

総合研究報告書

主任研究者 水口裕之

平成23（2011）年4月

目 次

I. 総括研究報告	
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盤研究	1
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)	
II. 分担研究報告	
遺伝子導入技術を利用したヒト iPS 細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発	7
水口 裕之 (独立行政法人医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト)	
iPS 細胞等の幹細胞の細胞特性の評価、ならびに細胞試験系における品質管理技術の開発	64
古江 美保 (独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 培養資源研究室)	
iPS 細胞を効率よく作製し、さらに効率よく目的の体細胞に分化させる技術の開発研究	84
高橋 一郎 (独立行政法人医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 難病資源研究室)	
iPS細胞等の幹細胞の再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発	88
梅澤 明弘 (国立成育医療センター 生殖医療研究部)	
レンチウイルスベクターを利用した iPS 細胞の作製とその評価に関する研究	91
形山 和史 (大阪大学大学院薬学研究科)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	109
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合・総括研究報告書

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盤研究

主任研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞（ES 細胞）や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の開発、iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導法の開発、ハイスループットな内胚葉分化誘導効率評価方法の開発、バイオインフォマティクス的手法を用いた iPS 細胞の未分化性評価、およびアデノウイルスベクターを用いた iPS 細胞の作製等を行った。その結果、

- ①ヒト iPS 細胞への高効率遺伝子導入法を開発した。
- ②SOX17、HEX、HN4 α の 3 種の遺伝子を順次導入することにより、高い薬物代謝酵素活性を有する成熟肝細胞を分化誘導することができた。
- ③本研究で確立した内胚葉分化プロトコルを用いて、肝細胞への分化効率を予測することが可能となった。
- ④再現性のある iPS 細胞未分化培養法および評価法を確立した。
- ⑤レトロ、レンチ、アデノウイルスベクターの 3 種のベクターを用いてヒト iPS 細胞の作製を試みた結果、レンチウイルスベクターを利用した場合の作製効率が最も高かった。また、アデノウイルスベクターが iPS 細胞の作製を阻害していること、その阻害効果は外来遺伝子導入効率とは相関しないことが明らかとなった。

分担研究者

古江美保 （独）医薬基盤研究所 形山和史 大阪大学大学院薬学研究科
高橋一朗 （独）医薬基盤研究所
梅澤明弘 国立成育医療センター研究所

A. 研究目的

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞 (ES 細胞) や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。

本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、

- ① 遺伝子導入法の最適化等による iPS 細胞の作製
- ② 再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発
- ③ 遺伝子導入技術の応用による高効率分化誘導技術の開発及び生体機能類似細胞評価手法の開発

などに関して研究を実施し、ヒト由来の iPS 細胞等各種幹細胞及び分化誘導細胞コレクションの構築、創薬研究として実用性・汎用性の高い新規細胞評価系開発の基盤構築を行う。本年度は特に 体細胞と iPS 細胞への遺伝子導入法の最適化、iPS 細胞の未分化性安定評価法の開発、および多分化能安定性評価法の開発を行う。

このようなヒト特異的毒性の予測精度向上およびヒトへの外挿性向上実現のための基盤構築を行うことにより、安全性の向上、創薬初期段階での簡便な有効性・安全性評価が可能となり、創薬後期段階での開発中止の低減、新薬開発コストの低減、新薬開発期間の短縮などが期待される。

B. 研究方法

本研究は、主任研究者水口、分担研究者 4 名 (古江、高橋、梅澤、形山) の計 5 名が遂行した。本研究においては、主にヒト iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の開発、ヒト iPS 細胞から肝細胞への成熟化、肝細胞分化効率の予測法開発、iPS 細胞の未分化培養法および評価法開発、iPS 細胞作製法の改良、に分けて遂行された。

(倫理面への配慮)

「ヒト ES 細胞の品質管理に関する研究」文部科学大臣確認済み (医薬基盤研究所)

「ヒト ES 細胞樹立・使用研究」文部科学大臣確認済み (国立成育医療センター)

C. 研究結果

1. 遺伝子導入技術を利用したヒト iPS 細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発

アデノウイルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞へ効率良く遺伝子導入することが可能となった。また、本技術を利用してヒト iPS 細胞から分化誘導した中内胚葉に SOX17 遺伝子を導入し、そこから得られた内胚葉に HEX 遺伝子を導入し、さらにそこから得られた肝幹前駆細胞に HN4 α 遺伝子を導入することにより、高い薬物代謝酵素活性を有する成熟した肝細胞を効率良く分化誘導することに成功した。

2. iPS 細胞等の幹細胞の細胞特性の評価、ならびに細胞試験系における品質管理技術の開発

培養技術の標準化として我々が確立したヒト幹細胞の培養や遺伝子発現解析に基づき、ヒト iPS 細胞を無フィーダー無血清培地によって長期安定的な培養方法をほぼ確立できた。また、Pluripotency PCR アレイを用いて未分化状態でのヒト iPS 細胞の特

性解析を行った結果、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。また、ヒト iPS 細胞培養における hESF9 培地の有用性を示した。さらに、ヒト iPS 細胞から内胚葉への簡便かつ効率良い分化誘導プロトコルを確立した。

3. iPS 細胞を効率よく作製し、さらに効率よく目的の体細胞に分化させる技術の開発研究

リプログラミング遺伝子として既存の iPS 細胞で発現が昂進している NANOG 遺伝子を加えて体細胞をリプログラミングすることができた。分離した細胞はすべてアルカリフォスファターゼ陽性であった。さらにその中の 8 株について発現解析をおこなったところ、初期化遺伝子の POU5F1,SOX2 遺伝子の発現が体細胞に比べ 400 倍以上上昇していた。

4. iPS 細胞等の幹細胞の再現性のある安定した細胞培養系の確立のための品質管理・品質評価法の開発

ヒト羊膜由来組織から iPS 細胞を樹立し、これまで確立した未分化性評価に関する検証を行った。また、バイオインフォマティクス的手法を用いた包括的な解析を行い、再現性のある品質評価手法を確立した。

5. レンチウイルスベクターを利用した iPS 細胞の作製とその評価に関する研究

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターの 3 種のベクターを用いてヒト iPS 細胞の作製を試みた結果、レンチウイルスベクターを利用した場合の作製効率が最も高かった。また、効率良く、安全性に優れたアデノウ

イルスベクターを用いて、ヒト iPS 細胞を作製するための基礎的知見を得た。アデノウイルスベクターが iPS 細胞の作製を阻害していること、その阻害効果は外来遺伝子導入効率とは相関しないことを明らかにした。

D. 考察

創薬に応用可能なヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から成熟肝細胞を作製する技術を開発し、HNF4 α 遺伝子が肝分化を促進するメカニズムを明らかにした。しかしながら、ある種のチトクローム P450 (CYP) 酵素活性は初代培養肝細胞と比較して同等であるのに対して、初代培養肝細胞と比較し今なお低い CYP 群も存在するため、今後はそれらの CYP に関してもより高い活性を有した肝細胞を作製することが必要となる。肝細胞関連遺伝子の発現は初代培養肝細胞とほぼ同等の細胞が得られたので、今後は CYP 活性が高い細胞を作製するために技術を開発する予定である。また、肝幹前駆細胞から肝細胞への分化誘導に関して、培養条件(3 次元培養等)の検討や更なる機能遺伝子の導入を組み合わせることで、初代培養肝細胞とほぼ同等の機能を有した細胞の分化誘導法を確立できるものと期待される。

多くのヒト iPS 細胞が樹立され、さらに分化誘導技術が進む中、分化効率のより良い細胞株を未分化状態から予測することも今後の重要な課題となると考えられる。今回、我々は未分化状態における遺伝子プロファイリングを検討したが、一般的に使用されている未分化マーカー遺伝子発現を解析しても、顕著な所見が得られないことが明らかとなった。むしろ、癌関連遺伝子などの発現の解析を行うことにより細胞株の評価を行えることが示唆された。品質評価を行うに当たり、従来解析されてきた遺

伝子群では十分ではないとすれば、より多くの遺伝子発現について解析が可能なDNA アレイを用いた解析などの使用が考えられるが、PCR 法を用いて発現を再確認する必要があり、また、高価となる。癌関連遺伝子やシグナル関連遺伝子などのPCR アレイを用いて、解析していくことにより、評価に用いることが可能な遺伝子群が明らかとなることが予測される。今後、評価に用いる遺伝子群の同定を行う予定である。また、今回報告した内胚葉細胞への分化プロトコールは、これまで報告されている内胚葉細胞への分化誘導方法にくらべ、安価で簡便な方法である。さらに、内胚葉細胞への分化効率が、本研究事業の成果であるアデノウイルスベクターによる高効率な成熟肝細胞への分化 (Inamura et al. 2010) と相関性があることが示唆された。この結果から、分化誘導せず、早期の分化段階での選択が可能になり、評価のコストおよび時間短縮が期待される。

ヒト iPS 細胞の未分化マーカーによる評価系について経時的安定性について検証し品質管理技術をほぼ確立できた。また、最もシビアな問題として考えられているゲノム変異について、染色体レベルおよびゲノムレベルでの検証法を確立した。本年度は特にエピゲノムまで解析範囲を広げた手法を確立することができた。この評価系を用いるで染色体異常を認める iPS 細胞の細胞形質を詳細に解析し、正常な iPS 細胞と比較検証する基盤ができ、毒性安全性評価および創薬開発に必要な良質な iPS 細胞とは何かということの規定することが可能となる。未分化性評価とゲノム安定性評価による結果は現在の培養システムがヒト iPS 細胞を長期にわたって安定的に培養できていることを示している。今後、フィーダフリー、血清フリー培養条件で長期安定的に未分化性を維持できる細胞培養条件が課題と

なる。その評価を行う対象となる培養システムが確立できたことは、フィーダフリー、血清フリー培養下で長期にわたって安定した培養環境を構築し、品質管理・評価法の確立へとつながると考えられた。

レンチウイルスベクターを用いた場合には、山中 4 因子を同時に発現するレンチウイルスベクターと Oct3/4 を単独で発現するレンチウイルスベクターを HDF 細胞へ共導入した時にのみヒト iPS 細胞のコロニーが多く出現し、効率よくヒト iPS 細胞を誘導するためには Oct3/4 の発現量が他の因子よりも多く必要であることを明らかにした。現在のところ、同様の方法でヒト iPS 細胞を再現性良く作製することに成功している。一方、Ad ベクターを用いた場合には、ファイバー改変型 Ad ベクターを用いることでヒト繊維芽細胞への高効率遺伝子導入を達成したが、ヒト iPS 細胞の作製には成功していなかった。そこで本研究では、Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を検討した。また、Ad ベクターによる iPS 細胞作製阻害メカニズムを考察するために、タイプの異なるファイバー置換型 Ad ベクターや HDAd ベクターを用いて検討した。汎用されている E1 欠損型 Ad ベクターは、Ad ゲノム (約 36kbp) の複製の開始に必須な E1 領域を欠損しているため、E1 遺伝子を持たない通常の細胞では増殖しない。しかしながら、E1 領域以外の Ad ゲノムが残っているため、弱いながらもウイルス由来遺伝子の転写・翻訳が起こること (VA-RNA、pIX、Hexon、E2、E4 等) が知られている。それに対して、ウイルスゲノムの複製とパッケージングに必要な領域 (左端約 0.4kb、右端約 0.2kb) 以外のすべてのウイルス遺伝子を欠損させた HDAd ベクターでは、ウイルス由来 RNA やタンパクは産生されない。そのため、従来型 Ad ベクターあるいは HDAd ベクターを細胞へ加えた場合の iPS

細胞作製効率が異なれば、Ad ゲノムが iPS 細胞作製へ何らかの影響を与えていることが予想される。

本研究では、Ad ベクターを高タイターで細胞へ加えた場合には、いずれの Ad ベクターを加えた場合にもヒト ES 細胞様のコロニーが出現しなくなった。そのため、Ad ベクターは iPS 細胞作製を阻害している可能性が考えられた。また、細胞へ加える Ad ベクターの量を減らした場合においてもヒト ES 細胞様コロニーの出現効率は減少し、その減少率は Ad ベクターの種類により異なっていた。これらの結果は Ad ベクターを加えるタイミングを変更しても同様であった。HDAd ベクターを加えた場合には、従来型 Ad ベクターに比べて阻害効果が減弱し、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が認められた。本結果から、Ad 由来ゲノム配列の存在が iPS 細胞作製阻害へ何らかの影響を与えている可能性も考えられた。ただし、原因は不明であるが HDF 細胞では HDAd ベクターの遺伝子導入効率が極めて低い為、Ad ゲノムが iPS 細胞作製阻害へ与える影響については検討の余地があると考えられる。一方、従来型 Ad ベクターの量を減らした場合には、細胞への外来遺伝子の導入効率が低いにも関わらず、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が強く阻害された。また、ファイバーを 35 型へ置換した Ad ベクター (AdF35-CMV-GFP) を加えた場合には、ヒト ES 細胞様コロニーの出現が認められた。従来型 Ad ベクターは細胞表面上の CAR を受容体として利用するのに対して、35 型ファイバーは CD46 を受容体として利用する。このような違いが iPS 細胞作製阻害効果の違いに反映される可能性も考えられた。なお、外来遺伝子の導入効率と iPS 細胞作製阻害効果の相関は、本研究では確認できなかった。

Ad ベクターを用いた iPS 細胞作製に関する

論文は 2 報存在するが、それらの iPS 細胞作製効率は非常に低く、また特定の細胞からのみ樹立されている (マウス成体肝細胞より 0.0005% の効率で 3 株 ; ヒト胎児肺由来繊維芽細胞 (IMR-90) より 0.0002% の効率で 3 株)。これまでに、染色体への挿入がない一過的な遺伝子発現によるヒト iPS 細胞樹立の報告は存在するが、一過的な方法での iPS 細胞樹立効率は非常に低いことが知られており、改善の余地があると考えられる。本研究では、Ad ベクターが iPS 細胞の作製を阻害することを明らかとした。今後は、Ad ベクターによる iPS 細胞阻害メカニズムを明らかにし、それらを回避可能な Ad ベクターを開発することで、安全なヒト iPS 細胞を効率良く作製する新規基盤技術の開発が期待できる。

E. 結論

①ヒト ES 細胞や種々のヒト iPS 細胞に対して Ad ベクター用いた高効率遺伝子導入法を用いて、中内胚葉、内胚葉、肝幹前駆細胞に対して、SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子をそれぞれ導入することによって成熟肝細胞への分化を促進できることが明らかとなった。

②我々が開発したハイスループットな内胚葉分化誘導効率評価方法は、ヒト肝細胞への分化効率を予測することが可能であることが示唆され、安定で簡便、安価な方法であり、細胞機能評価方法としての利用が期待される。

③ヒト iPS 細胞による新規細胞評価系構築にとって重要なことは、元々の iPS 細胞が安定的に培養できるかどうかである。ヒト iPS 細胞の継代による経時的評価をし、iPS 細胞の細胞特性が維持できているかを検証した。また、ゲノムレベル、エピゲノムレベルでの安定性に関しての解析を加え品質評価技術の基盤整備が整った。

④レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターの3種のベクターを用いてヒト iPS 細胞の作製を試みた結果、レンチウイルスベクターを利用した場合の作製効率が最も高かった。数種類のファイバー置換型 Ad ベクターおよび HDAd ベクターを利用し、Ad ベクターが iPS 細胞作製を阻害している可能性を見出した。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合・分担研究報告書

遺伝子導入技術を利用したヒト iPS 細胞コレクションの作製と高効率分化誘導技術の開発

分担研究者 水口 裕之

独立行政法人 医薬基盤研究所

創薬基盤研究部 幹細胞制御プロジェクト チーフプロジェクトリーダー

本研究の目的は、iPS 細胞に対する高効率遺伝子導入法を開発し、それを利用して薬物の毒性評価系などへの応用可能なヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞由来の肝細胞を効率良く分化誘導させる技術を開発することである。多種多様なヒト iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の開発および遺伝子導入による内胚葉系細胞や成熟肝細胞への分化誘導法の開発を行った。その結果、

①ヒト iPS 細胞においては、マウス iPS 細胞と異なり、アデノウイルス (Ad) ベクターを単独で作用させても遺伝子導入効率は十分には向上しないことが明らかとなり、ROCK 阻害剤併用が有効であることが判明した。

②SOX17 遺伝子および HEX 遺伝子を中内胚葉系細胞および内胚葉系細胞に対してそれぞれ導入することにより、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞の前駆体である肝幹前駆細胞を効率良く誘導できることが明らかとなった。

③肝細胞への分化に必須の遺伝子である HNF4 α 遺伝子を導入し、肝細胞の成熟化を試みた。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から分化誘導した肝幹前駆細胞に HNF4 α 発現 Ad ベクターを作用させた結果、HNF4 α 遺伝子を導入することにより、薬物代謝の第一相反応に関わる CYP450 遺伝子群の発現量および活性の増加が確認された。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞の 80% 以上はアジアロ糖タンパク受容体 1 (ASGR1) などの肝細胞特異的表面抗原を発現することも明らかになった。さらに、分化誘導した肝細胞はトログリタゾンなどに対して初代培養肝細胞と同様に細胞毒性を示した。

以上のことから、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から成熟肝細胞への分化効率が向上しただけでなく、薬物の毒性評価に使用可能な成熟した肝細胞を作製できることが明らかとなった。

研究協力者

川端健二 (独)医薬基盤研究所 田代克久 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

高山和雄 (独)医薬基盤研究所

櫻井文教 大阪大学大学院薬学研究科

大阪大学大学院薬学研究科

稲村 充 (独)医薬基盤研究所
大阪大学大学院薬学研究科

A. 研究目的

細胞を用いた *in vitro* アッセイは、様々な安全性・有効性評価のための創薬研究に用いられるが、細胞において測定可能な評価項目は限られていること等、その結果の解釈には限界があった。また、創薬研究にこれまで用いられてきた様々な培養細胞の他、より生体組織に近い性質・機能を有した胚性幹細胞(ES細胞)や各種幹細胞の利用について研究がなされているが、分化制御等が不十分であり、再現性・安定供給に問題が認められた。

そこで本研究では、創薬研究の加速化および非臨床データのヒトへの外挿性向上等のため、ヒト由来各種幹細胞を用いた *in vitro* 安全性・有効性評価系開発のための基盤研究を行う。具体的には、ヒト ES 細胞や多種多様なヒト 人工多能性幹細胞(iPS細胞)への高効率遺伝子導入による成熟肝細胞への分化誘導法の開発を行った。

B. 研究方法

B-1. Ad ベクターの作製

Ad ベクターの作製は *improved in vitro* ライゲーション法により行った。シャトルプラスミドは pHMEF5 を使用した。そのマルチクロニング部位に β -ガラクトシダーゼ(LacZ)遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMEF5-LacZ を作製した。さらに、EFプロモーター制御下でヒト SRY-box containing gene 17 (SOX17)、hematopoietically expressed homeobox transcription factor (HEX)、または hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)を発現するシャトルプラスミド pHMEF5-SOX17、pHMEF5-HEX、

pHMEF5-HNF4 α を作製した。また、peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 (PPAR γ 2、以後 PPAR γ と表記)、またはマウス runt-related transcription factor 2 (Runx2)を発現するシャトルプラスミド pHMCA5-PPAR γ 、pHMCA5-Runx2 を作製した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを *I-Ceu I* と *PI-Sce I* で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミドに挿入することにより、pAd-K7-EF-LacZ、pAd-K7-EF-SOX17、pAd-K7-EF-HEX、pAd-K7-EF-HNF4 α 、pAd-CMV-LacZ、pAd-CA-LacZ、pAd-EF-LacZ、pAd-CA-mCherry、pAd-EF-mCherry、pAd-CA-PPAR γ 、pAd-CA-Runx2 を作製した。作製した Ad ベクタープラスミドを *Pac I* で消化し、SuperFect (Qiagen 社)を用いて 293 細胞にトランスフェクションすることにより、各遺伝子発現 Ad ベクターを作製した。定法により Ad ベクターの増殖・精製を行った。各 Ad ベクターの物理学的 (particle)タイターは Maizel らの方法により測定した。

B-2. マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞の培養

E14 マウス ES 細胞はマウス ES 細胞用 leukemia inhibitory factor (LIF)含有培地 (Specialty Media Inc 社)にてマイトマイシン C 処理をした mouse embryonic fibroblast (MEF ; Specialty Media Inc 社)上、またはゼラチンコートしたディッシュで培養した。Nanog プロモーター制御下に GFP/ IRES/ピューロマイシン耐性遺伝子の発現カセットが導入されているマウス iPS 細胞株 20D17 (理化学研究所バイオリソースセンターを介して京都大学山中伸弥教授から供与)は上記のマウス ES 細胞の培養法に準じて行った。なお、1.5 μ g/mL の

ピューロマイシン(SIGMA 社)を培地に加え、ゼラチンコートディッシュで培養することにより GFP を発現する未分化 iPS 細胞を濃縮した。

B-3. 胚様体形成

マウス ES 細胞またはマウス iPS 細胞からの胚様体形成は以下のように行った。MEF 上で培養しているマウス ES 細胞、マウス iPS 細胞を 0.25%トリプシン/1 mM EDTA (Invitrogen 社)で単細胞にし、通常の培養ディッシュに移して 37°C で 45 分間静置した後、上清(ES 細胞、iPS 細胞が含まれている)を回収し MEF と分離した。次に回収した ES 細胞、iPS 細胞を分化培地(15% fetal calf serum for ES cell (Specialty Media Inc 社)、1 x non-essential amino acid (Specialty Media Inc 社)、1 x nucleoside (Specialty Media Inc 社)、100 μ M β -mercaptoethanol (Nacalai Tesque 社)、1 x penicillin/streptomycin (Invitrogen 社)、2 mM L-glutamine (Invitrogen 社)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Wako 社))で 1 x 10⁵ cells/mL となるように懸濁した後、30 μ L (約 3 x 10³ cells/drop)ずつ 10 cm ペトリディッシュの蓋の裏に付着させ、PBS 20 mL を予め加えておいたペトリディッシュ(底)に蓋を被せた。その状態のまま 37°C で 2 日または 5 日静置して ES 細胞由来 EB (ES-EB)、iPS 細胞由来 EB (iPS-EB)を作製した。

B-4. LacZ 発現解析

マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞を予め MEF を播種しておいた 24 well プレートに 5 x 10⁴ cells/well となるように播種し、翌日に各 LacZ 発現 Ad ベクター(Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-RSV-LacZ、Ad-null)を

3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で作用させた。翌日に下記の方法で X-gal 染色を行った。マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.5%グルタルアルデヒド溶液を加えて室温で 5 分間静置した。再度 PBS で洗浄し、X-gal 染色溶液(1.3 mM MgCl₂、15 mM NaCl、44 mM Hepes (pH8.0)、3 mM K₃Fe(CN)₆、3 mM K₄Fe(CN)₆、0.05% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside))を加えて LacZ 発現細胞を染色した。また、5 日間浮遊培養することにより作製した ES-EB、iPS-EB に対しても各 LacZ 発現 Ad ベクターを 3,000 VP/cell の濃度で作用させ、2 日後に X-gal 染色と β -gal chemiluminescent assay を行った。 β -ガラクトシダーゼの酵素活性の測定の際には、PBS で洗浄したあとの ES-EB および iPS-EB を、1/5 濃度に希釈し 24 well プレートへ入れておいた 100 μ L の細胞溶解剤(LC-8 ; TOYO INK Co. LTD.社)中に移し、室温で 5 分静置した。回収した EB を凍結融解後に 15,000 x g、4°C 条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。サンプル中の β -ガラクトシダーゼ活性は Luminescent β -gal Detection Kit II (Clontech)を用いて測定した。また、Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad)を用いてサンプル中の総タンパク質濃度を定量し、 β -ガラクトシダーゼ活性をタンパク質量で補正した。

B-5. mCherry 発現解析

ES 細胞あるいは iPS 細胞を 5 x 10⁴ cells/well でゼラチンコートした 24 well プレートに播種し、翌日に各 Ad ベクター(Ad-CA-mCherry、Ad-EF-mCherry、Ad-null)を 1,000、3,000、10,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。24 時間後、それぞれの細胞をトリプシン-EDTA で回収し、mCherry および GFP の発現をフロ

ーサイトメーター(LSR II ; BD Bioscience 社)により解析した。なお、蛍光顕微鏡を用いて mCherry および GFP の発現を観察する際は以下の手順で行った。マウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞をゼラチンコートした 2 well チャンバースライド(Nunc 社)に 5×10^4 cells/well で播種し、翌日に Ad-CA-mCherry、Ad-EF-mCherry を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。24 時間後、それぞれの細胞を 4% パラホルムアルデヒド(PFA)/PBS を用いて固定し、0.2% Triton X-100/PBS により細胞透過処理を行った。その後、ProlongGold with DAPI (Invitrogen 社)により核染色を行い、蛍光顕微鏡(IX81, Olympus 社)で観察した。

B-6. CAR 発現解析

ゼラチンコートしたディッシュ上で培養したマウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞に 1 mM EDTA/PBS を加え、37°C で 15 分反応させてそれぞれの細胞を回収し、1% FBS/PBS に懸濁した。回収した細胞に rat anti-mouse CAR monoclonal antibody (KAN Research Institute, Inc.社 今井俊夫博士より供与)を反応させた後、phycoerythrin (PE)標識 donkey anti-rat antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories 社)を反応させた。CAR 発現細胞の割合は LSR II フローサイトメーターを用いて解析した。

B-7. アルカリフォスファターゼ染色

MEF を播種しておいた 12 well プレートにマウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞を 1×10^4 cells/well で播種し、翌日に Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。3 日後、Alkaline phosphatase detection kit (Chemicon 社)を用いてアルカリフォスファターゼ(ALP)発現細胞を染色した。

B-8. Oct-3/4 染色

MEF を播種しておいた 2 well チャンバースライドにマウス ES 細胞あるいはマウス iPS 細胞を 1×10^4 cells/well で播種し、翌日に Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させた。3 日後、4% PFA/PBS を加え室温で 10 分間固定し、2% BSA/PBS によりブロッキングを行った。0.2% Triton X-100/PBS により細胞透過処理を行った後、mouse anti-Oct-3/4 antibody (Santa Cruz biotechnology、ブロッキング液で 1/100 倍希釈)を 4°C、overnight で反応させた。次に HRP 標識 anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology 社)を室温で 1 時間反応させた。その後 diaminobenzidine (Vector Laboratories 社)を用いて Oct-3/4 発現細胞を可視化した。

B-9. RT-PCR

各細胞集団から ISOGEN (Nippon gene 社)を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Oligo (dT) プライマー (Qiagen 社)と SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen 社)を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA)を合成した。KOD Plus DNA Polymerase (Toyobo 社)を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR)を行い各遺伝子の cDNA を増幅した。PCR に用いたプライマーは Table 1 に示した。

B-10. 脂肪細胞への分化誘導

マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞から脂肪細胞への分化誘導は以下の方法で行った。マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞をハンギングドロップで 2 日間培養して EB を形成させた後、100 nM の

all-trans-retinoic acid (RA ; Wako 社)を含む分化培地(B-3 参照)中で 3 日間浮遊培養した。その後 RA を除いた分化培地でさらに 2 日間浮遊培養した。これまでに、我々の研究室では Day 0、2、5 の EB に対して Ad ベクターを用いて遺伝子導入することで、EB の内部においても外来遺伝子を発現させることに成功している(Tashiro K et al. *J. Gene Med.*, 2008, 10, 498-507)。そこで、Ad ベクターを用いて脂肪細胞分化のマスター遺伝子である PPAR γ 遺伝子を上記誘導法の 0、2、5 日目に導入し(triple transduction)、7 日目にゼラチンコートしたディッシュに播種した。その後、脂肪細胞分化用の液性因子 (0.1 M 3-isobutyl-L-methylxanthine (Sigma 社)、100 nM insulin (Sigma 社)、100 nM dexamethasone (Wako) 、 2 nM triiodothyronine (Sigma))を含む分化培地または液性因子を含まない分化培地で 15 日間培養した。培地交換は 2-3 日おきに行った。

B-11. GPDH 活性の測定、オイルレッド O 染色

脂肪細胞分化誘導因子を含むまたは含まない培地で細胞を培養した後、脂質合成酵素である glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)の活性を GPDH Assay Kit (Primary Cell 社)を用いて測定した。また、細胞抽出液中のタンパク質濃度を測定し、GPDH の活性をタンパク質濃度で補正した。また、オイルレッド O 染色 (Lipid Assay Kit; (Primary Cell 社))を用いて細胞内の脂肪滴を染色した。

B-12. 骨芽細胞への分化誘導

マウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞をハンギングドロップで 2 日間培養して EB を形成させた後、100 nM の RA を含む分

化培地で 3 日間浮遊培養し、その後 RA を除いた分化培地でさらに 2 日間浮遊培養した。なお、骨芽細胞への分化誘導においては 0、2、5 日目に Ad ベクターを用いて骨芽細胞分化に必須の Runx2 遺伝子を導入した(triple transduction)。7 日目にゼラチンコートディッシュに播種した ES-EB および iPS-EB は骨芽細胞分化用の液性因子 (50 μ g/mL ascorbic acid 2-phosphate (Sigma 社)、5 mM β -glycerophosphate (Sigma 社)、10 nM dexamethasone (Wako 社))を分化培地に加え、2-3 日おきに培地交換をしながら培養した。15 日間培養した後、骨芽細胞への分化効率を評価した。

B-13. ALP 活性の測定

骨芽細胞への分化誘導を行った細胞を 1/100 量のプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 100 μ L の ALP 用 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM MgCl $_2$ 、0.1% Triton X-100)に懸濁し、氷上で 30 分静置した。細胞懸濁液を凍結融解後、15,000 x g、4°C 条件下で 10 分間遠心し、上清を回収した。サンプル中の ALP 活性は LabAssay ALP Kit (Wako 社)を用いて測定した。またサンプル中のタンパク質濃度を測定し、ALP 活性をタンパク質濃度で補正した。

B-14. von Kossa 染色、カルシウム定量

von Kossa 染色は以下の方法で行った。分化誘導を行った細胞を 4% PFA/PBS により室温条件下で 5 分間固定し、次に 5% AgNO $_3$ を加えて UV ランプ下で 1 時間静置することにより染色した。カルシウム定量の際は、細胞を PBS で洗浄し、0.5 M acetic acid を加えて室温で一晩浸とうした後、15,000 x g で遠心して上清を回収した。上清サンプル中のカルシウムは Calcium C-test Wako Kit (Wako 社)を用いて定量し、遠心後のペレットから DNeasy Tissue and

Blood Kit (Qiagen 社)を用いてゲノム DNA を抽出することにより、カルシウム沈着量をゲノム DNA で補正した。

B-15. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 および 253G1(京都大学、山中伸弥教授から供与)は 4 ng/mL の basic fibroblast growth factor(bFGF)を含む霊長類 ES 細胞用培地 (ReproCell) にて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞(MEF, Chemicon)上で培養した。ヒト iPS 細胞の 201B7 株は Myc を含む 4 因子(Oct-3/4, Sox2, Klf-4, c-Myc)を、253G1 株は Myc を含まない 3 因子(Oct-3/4, Sox2, Klf-4)を、それぞれヒト皮膚繊維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts, HDF) へ遺伝子導入することにより樹立された。5-7 日ごとにコラゲナーゼとスクレイパーまたは、霊長類 ES 細胞用細胞剥離液(CTK)を用いてヒト iPS 細胞コロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。ヒト iPS 細胞を単細胞で継代する時は、継代の前に 10 μ M の ROCK 阻害剤 (Y-27632, Wako)を含む培地中で 1 時間培養し、CTK を用いてヒト iPS 細胞コロニーを回収した後ピペッティングによりヒト iPS 細胞を単細胞にした。その後 MEF に播種し、10 μ M の ROCK 阻害剤を含む培地にて 12 時間培養した。その後は ROCK 阻害剤を含まない培地で培地交換を行った。

B-16. 免疫染色

2 well チャンバースライドに播種したヒト iPS 細胞を PBS にて 2 回洗浄し、4% PFA/PBS を加えて室温で 15 分固定した後、2% BSA/PBS でブロッキングを行った。Oct-3/4、Nanog を検出する時はブロッキングの後に 0.2% Triton X-100/PBS にて細胞透過処理を行った。一次抗体として mouse anti-Oct-3/4 antibody (Santa Cruz

Biotechnology)、mouse anti-human CAR monoclonal antibody (Upstate Biotechnology) を 4°C で一晩反応させ、続いて fluorescein isothiocyanate (FITC) または Alexa Fluor594 で標識した 2 次抗体 (それぞれ BD Bioscience, Molecular Probe)を室温で 1 時間反応させた。その後、ProlongGold with DAPI を用いて核染色および封入を行い、蛍光顕微鏡(BIOREVO、キーエンス)にて観察した。なお、Ad ベクターにて遺伝子導入したヒト iPS 細胞の免疫染色は、ヒト iPS 細胞へ Ad-EF-mCherry を 3,000 VP/cell の濃度で 1.5 時間作用させて 48 時間後に上述の手順で行った。

B-17. ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞の培養

ヒト ES 細胞株 KhES-1 (京都大学再生医科学研究所から分与) やヒト iPS 細胞株 201B7、201B2 および 253G1 (京都大学、山中伸弥教授から供与) は 5 ng/mL の basic fibroblast growth factor (bFGF, Sigma 社)を含む霊長類 ES 細胞用培地 (ReproCell 社) にて、マイトマイシン C 処理済みのマウス胚性繊維芽細胞 (MEF, Chemicon 社) 上で培養した。ヒト iPS 細胞の 201B7 株や 201B2 株は MYC を含む 4 因子 (OCT-3/4, SOX2, KLF-4, C-MYC) を、253G1 株は MYC を含まない 3 因子 (OCT-3/4, SOX2, KLF-4) を、それぞれヒト皮膚繊維芽細胞 (Human Dermal Fibroblasts, HDF) へ遺伝子導入することにより樹立された。ヒト iPS 細胞株 Tic および Dotcom は 10 ng/mL の bFGF および 0.1 mM 2-mercaptoethanol、0.1 mM nonessential amino acids、2 mM L-glutamine, 20% GIBCO™ knock-out™ serum replacement (KSR, Invitrogen 社) を含む knock-out DMEM/F12 (Invitrogen 社) にて、マイト

マイシン C 処理済みの MEF 上で培養した。ヒト iPS 細胞株 Tic および Dotcom は、4 因子 (OCT-3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC) をそれぞれヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC-5) へ遺伝子導入することにより樹立された。5-8 日ごとに 0.1 mg/mL ディスパーゼを用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞のコロニーを回収後、単細胞にしないように懸濁して継代を行った。

B-18. 未分化なヒト ES やヒト iPS 細胞への遺伝子導入

ディスパーゼ (Roseh 社) により回収したヒト ES 細胞 (KhES-1)、ヒト iPS 細胞 (201B7、201B2、253G1) を予め MEF を播種しておいた 12 well プレートへ播種し、24 時間後に各 Ad ベクター (Ad-RSV-LacZ、Ad-CMV-LacZ、AdCA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-EF-mCherry、Ad-null) を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で作用させた。48 時間後、X-gal 染色を行った。ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を単細胞に乖離し、遺伝子導入を行う時は、継代の前に 10 μ M の Rho-associated kinase (ROCK) 阻害剤 (Y-27632, Wako 社) を含む培地中で 1 時間培養し、ディスパーゼを用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞コロニーを回収した後ピペッティングおよびフィルターを通すことによりヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を単細胞にした。その後 MEF に播種し、10 μ M の ROCK 阻害剤を含む培地にて 12 時間培養した。その後 ROCK 阻害剤を含まない培地で培地交換を行い、24 時間後に各 Ad ベクター (Ad-RSV-LacZ、Ad-CMV-LacZ、AdCA-LacZ、Ad-EF-LacZ、Ad-EF-mCherry、Ad-null) を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で作用させた。48 時間後、X-gal 染色を行った。

B-19. ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞株 H9 やヒト iPS 細胞株 201B7、Dotcom、Tic から内胚葉系細胞への分化誘導は以下の方法で行った。ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を分化誘導開始の前日に無血清培地 hESF9 (Furue MK et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105, 13409-13414) で培地交換した。次に、細胞剥離液である Accutase (Invitrogen 社) を用いてヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を回収後、6 因子 (10 μ g/mL human recombinant insulin、5 μ g/mL human apotransferrin、10 μ M 2-mercaptoethanol、10 μ M ethanolamine、10 μ M sodium selenite、0.5 mg/mL fatty acid free bovine albumin) および 100 ng/mL Activin A (R&D systems 社) を含む hESF-DIF (Cell Science & Technology Institute 社) 培地に懸濁後、マトリゲル (BD 社) コートした細胞培養用 12 プレートの各ウェルに 6.0×10^4 cells/cm² の細胞密度で播種した。6 日後にフローサイトメトリーを用いて内胚葉系細胞への分化効率を測定した。

Ad ベクター用いた遺伝子導入によりヒト ES・iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導を行う場合は、培養 3 日目の内胚葉系細胞に、各 Ad ベクター (Ad-K7-EF-LacZ、Ad-K7-EF-SOX17) を 3,000 vector particles (VP)/cell の濃度で作用させた。培地は上記のものと同じものを使用した。

B-20. 肝幹前駆細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞株 H9 やヒト iPS 細胞株 201B7、Tic、Dotcom から肝幹前駆細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-3 の方法で 5 日間培養することで分化誘導されたヒト ES・iPS 細胞由来の内胚葉系細胞を、0.0125% trypsin-0.01325 mM EDTA で回

収し、B-3 に記載された 6 因子および 100 ng/mL Activin A を含む hESF-DIF 培地 (Cell Science & Technology Institute 社) に懸濁後、マトリゲルコートした細胞培養用 12 プレートの各ウェルに 1.2×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種した。24 時間後に各 Ad ベクター (Ad-K7-EF-LacZ、Ad-K7-EF-HEX) を 3,000 vector particles(VP)/cell の濃度で作用させた後、B-3 に記載された 6 因子および 20 ng/mL FGF4 (R&D systems 社) と 20 ng/mL BMP4 (R&D systems 社) を含んだ hESF-DIF 培地で培地交換を行った。また、3 日後にフローサイトメトリーにより肝幹前駆細胞への分化効率を測定した。

B-21. 肝細胞への分化誘導

ヒト ES 細胞株 H9 やヒト iPS 細胞株 201B7、Tic、Dotcom から肝細胞への分化誘導は以下の方法で行った。B-4 の方法で 3 日間培養することで分化誘導されたヒト ES・iPS 細胞由来の肝幹前駆細胞に各 Ad ベクター (Ad-K7-EF-LacZ、Ad-K7-EF-HNF4 α) を 3,000 vector particles(VP)/cell の濃度で作用させた後、conditioned CL15 medium (8.3% tryptose phosphate broth [BD 社]、8.3% fetal bovine serum [Vita 社]、10 μ M hydrocortisone 21-hemisuccinate [Sigma 社]、1 μ M insulin、25 mM NaHCO₃ [Wako 社]、20 ng/mL HGF [R&D Systems 社]、20 ng/mL Oncostatin M [R&D Systems 社]、10⁻⁶ M dexamethasone [Sigma 社] を添加した L15 medium [Invitrogen 社]) を用いて培養した。11 日後に肝細胞への分化効率の測定および機能性の評価を行った。

B-22. LacZ 発現解析

遺伝子導入効率を測定するため、下記の

方法で X-gal 染色を行った。各細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.5% グルタルアルデヒド溶液を加えて室温で 5 分間静置した。PBS で洗浄し、X-gal 染色溶液 (1.3 mM MgCl₂、15 mM NaCl、44 mM HEPES (pH8.0)、3 mM K₃Fe(CN)₆、3 mM K₄Fe(CN)₆、0.05% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) を加えて LacZ 発現細胞を染色した。

B-23. 定量的リアルタイム PCR

各細胞集団から ISOGEN (Nippon gene 社) を用いて Total RNA を抽出した。ヒト初代培養肝細胞 (CellzDirect 社) はコラーゲンコートした細胞培養用 12 プレートの各ウェルに 1.2×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種した後、48 時間培養したものを使用した。各 Total RNA を RNase-free DNase I で処理した後、Superscript VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen 社) を用いて逆転写反応を行い、complementary DNA (cDNA) を合成した。定量的リアルタイム PCR による解析は Taqman gene expression assays (Applied Biosystems 社) を使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems 社) により定量した。

B-24. 免疫抗体染色

12 well プレートに播種した各細胞を PBS にて 2 回洗浄し、メタノール (Wako 社) もしくは 4% paraformaldehyde (Wako 社) を用いて室温で 10 分処理後、2% BSA (Sigma 社)、0.2% Triton X-100 (Sigma 社) を添加した PBS で 45 分間ブロッキングを行った。各 1 次抗体を 4°C で一晩反応させ、続いて Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 594 で標識した 2 次抗体 (Molecular Probe 社) を室温で 1 時間反応させた。その後、DAPI (Invitrogen) を用いて核染色行っ

た後 2% paraformaldehyde にて固定し、蛍光顕微鏡(BIOREVO、キーエンス社)にて観察した。

B-25. 薬剤代謝酵素 P450 3A4 の活性測定

分化誘導されたヒト iPS 細胞由来の肝細胞またはヒト肝癌細胞株 HepG2 に 25 μ M rifampicin (Sigma 社) または DMSO を添加し、72 時間後に P450-Glo™ CYP3A4 Assay Kit (Promega 社) を用いて CYP3A4 の活性を測定した。活性はルミノメーター (Lumat LB 9507、Berthold 社) を用いて定量した。

B-26. フローサイトメトリー

分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞に 1mM EDTA/PBS を加え、37°C で 15 分反応させて細胞を回収し、PBS にて 2 回洗浄した後、メタノール(Wako 社)を用いて 4°C で 20 分処理した。得られた細胞に各 1 次抗体を 4°C で 1 時間反応させ、続いて Alexa Fluor 488 で標識した 2 次抗体 (Molecular Probe 社) を 4°C で 1 時間反応させた。抗原陽性細胞の割合は LSRFortessa (BD 社) フローサイトメーターを用いて解析した。

B-27. 細胞周期の解析

分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞に 1mM EDTA/PBS を加え、37°C で 15 分反応させて細胞を回収し、5% FBS/PBS にて 2 回洗浄した。得られた細胞を 10 μ g/ml Hoechst33342 (Sigma 社)、40 μ g/ml Verapamil (Sigma)、10 mM HEPES、2% FBS/DMEM (Invitrogen) に懸濁し、37°C で 40 分反応させた。さらに、5% FBS/PBS にて 2 回洗浄した後、細胞を 0.5 μ g/ml Pyronin Y (Sigma 社)、10 mM HEPES、2% FBS/DMEM に懸濁し、37°C で 20 分

反応させた。分裂中の細胞の割合は LSRFortessa (BD 社) フローサイトメーターを用いて解析した。

B-28. Indocyanine Green (ICG) の取り込み能と排泄能の評価

分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞を 1 mg/ml ICG/conditioned L15 medium を用いて 37°C で 1 時間培養した後、ICG を取り込んだ細胞を観察した。ICG を含まない conditioned L15 medium に培地交換したのち、37°C で 6 時間培養することにより、ICG を取り込んだ細胞から ICG を排泄させた。

B-29. グリコーゲン貯蔵能の評価

分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞を PBS にて 2 回洗浄し、4% paraformaldehyde (Wako 社) を用いて室温で 10 分処理した後、Periodic Acid-Schiff 染色キット (Sigma 社) を用いて、グリコーゲンを貯蔵している細胞を染色した。

B-30. Low density lipoprotein (LDL) の取り込み能の評価

分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞を 20 μ g/ml/conditioned L15 medium を用いて 37°C で 1 時間培養した後、2% paraformaldehyde にて固定した。DAPI (Invitrogen) を用いて核染色を行った後、蛍光顕微鏡(BIOREVO、キーエンス社)にて観察した。

B-31. 薬物毒性評価

ヒト ES 細胞、分化誘導されたヒト ES 細胞由来の肝細胞、およびヒト初代培養肝細胞を Troglitazone (Wako 社)、Acetaminophen (Wako 社)、Cyclophosphamide (Wako 社)、Carbamazepine (Wako 社) をそれぞれ含む

培地を用いて 37°C で 48 時間培養した。0.5 mg/ml Aramar Blue (Invitrogen)を用いて 37°Cで 3 時間培養した後、プレートリーダー (Sunrise 社)を使用して 570 nm および 600 nm の吸光度を測定することによって細胞生存率を評価した。

B-32. 薬剤代謝酵素 P450 3A4 の活性測定

分化誘導されたヒト iPS 細胞由来の肝細胞またはヒト肝癌細胞株 HepG2 に 25 μ M rifampicin (Sigma 社)または DMSO を添加し、72 時間後に P450-Glo™ CYP3A4 Assay Kit (Promega 社)を用いて CYP3A4 の活性を測定した。活性はルミノメーター (Lumat LB 9507、Berthold 社)を用いて定量した。

C. 研究結果

これまでの研究から、マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞と同じ遺伝子発現パターンを有していることが示されている。そこで、本研究で使用しているマウス iPS 細胞もその特徴を保持しているかどうかを RT-PCR 法により解析したところ、マウス iPS 細胞は、未分化マーカーである Oct-3/4 や Nanog をマウス ES 細胞と同様に強く発現していることが確認できた(Fig. 1A)。なお、本研究で使用しているマウス iPS 細胞株 20D17 は Nanog プロモーターの下流に GFP/IRES/ピューロマイシン耐性遺伝子の発現カセットを挿入した細胞であるため、未分化マウス iPS 細胞でのみ GFP の発現がみられる。また、胚様体(embryoid body; EB)形成によりマウス iPS 細胞の未分化マーカーの遺伝子発現量は減少し三胚葉系のマーカー遺伝子(外胚葉 ; FGF5、Nestin、中胚葉 ; brachyury T、flk-1、内胚葉 ; GATA6、AFP)の発現は上昇していることが観察され(Fig. 1A)、マウス iPS 細胞の遺伝子発現パターンはマウス ES 細胞のそれと一致していることが示された。

従来型 Ad ベクターによる遺伝子導入には CAR の発現量が重要であることが知られている。そこで、マウス iPS 細胞の CAR の発現を RT-PCR 法およびフローサイトメトリーにより解析した結果、マウス iPS 細胞およびマウス iPS 細胞由来 EB (iPS-EB) はそれぞれマウス ES 細胞およびマウス ES 細胞由来 EB (ES-EB)と同程度の CAR を発現していることが明らかとなった(Fig. 1A, 1B)。なお、95%以上の GFP 発現未分化 iPS 細胞が CAR を発現していることが確認され、Ad ベクターによる遺伝子導入が可能であることが示唆された。そこで次にマウス iPS 細胞への遺伝子導入に適した Ad ベクターを調べるため、プロモーターの異なる LacZ 発現 Ad ベクター(Ad-RSV-LacZ、

Ad-CMV-LacZ 、 Ad-CA-LacZ 、 Ad-EF-LacZ)を用いて遺伝子導入効率を検討した。また、外来遺伝子を発現しない Ad ベクターである Ad-null をコントロールベクターとして用いた。それぞれの Ad ベクターを 3,000 VP/cell の濃度でマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞へ作用させ、翌日に X-gal 染色を行った。その結果、マウス ES 細胞の結果と同様に、CA および EF-1 α プロモーターはマウス iPS 細胞においても極めて効率良く遺伝子導入できることが示された(Fig. 2)。なお、マウス iPS 細胞においても RSV および CMV プロモーターはほとんど機能しなかった(Fig. 2)。次に、GFP を発現する未分化マウス iPS 細胞への遺伝子導入が可能かどうかを調べるために、赤色蛍光蛋白質である mCherry を発現する Ad ベクター、Ad-CA-mCherry および Ad-EF-mCherry を作製し、マウス iPS 細胞への遺伝子導入を行った。フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡を用いて mCherry 発現を解析した結果、Ad-CA-mCherry または Ad-EF-mCherry をマウス iPS 細胞へ作用させることにより、GFP 発現未分化 iPS 細胞へ効率良く遺伝子導入できることが示された(Fig. 3A, 3B, and data not shown)。さらに、mCherry の発現量は Ad ベクターの作用量依存的に上昇し、Ad-CA-mCherry または Ad-EF-mCherry を 10,000 VP/cell の濃度で作用させることにより 90%以上の iPS 細胞に対して遺伝子導入可能であることが明らかとなった(Fig. 3C and data not shown)。また、いずれの Ad ベクターの作用量においても GFP 陽性細胞の割合が変わっていないことから、Ad ベクターによる遺伝子導入後の iPS 細胞は未分化を維持していることが示された(Fig. 3D)。なお、マウス iPS 細胞が Ad ベクターによる遺伝子導入後に未分化性を維持していることはア