

ルカリフォスファターゼ活性および Oct-3/4 の発現が維持されていることから実証された(Fig. 4A)。さらに、Ad ベクターによる遺伝子導入後の iPS 細胞の生細胞数を計測したところ、10,000 VP/cell の濃度で作用させた場合はわずかに生細胞数が減少するものの(有意差はなし $p > 0.05$)、3,000 VP/cell で作用させた場合には未処理の iPS 細胞と同程度の生細胞数であり、これらの結果はマウス ES 細胞と一致していた(Fig. 4B)。したがって、Ad ベクターによる遺伝子導入はマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞へほとんど細胞毒性を示さないことが明らかとなった。以上の結果から、マウス iPS 細胞へ効率良く遺伝子導入するには CA または EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクターが適していることが明らかとなり、マウス iPS 細胞は Ad ベクターを用いた遺伝子導入系においてもマウス ES 細胞と同様の特徴を示すことが明らかとなった。

次に、上述の LacZ 発現 Ad ベクターを用いてマウス iPS-EB への遺伝子導入を行った。その結果、これまでに我々が報告しているように(Tashiro K et al. *J. Gene Med.*, 2008, 10, 498-507)、ES-EB においては CA プロモーターを有する Ad ベクターが最も高い遺伝子発現を示した(Fig. 5A, upper)。同様に、iPS-EB においても、調べた 4 種類のプロモーターの中では CA プロモーターが最も高い遺伝子発現活性を有していた(Fig. 5A, lower)。興味深いことに、CMV プロモーターはマウス ES 細胞、ES-EB、未分化 iPS 細胞において活性が低いにも関わらず、iPS-EB においては比較的高い遺伝子発現を示した(Fig. 5)。これらの結果から、マウス ES 細胞およびマウス ES-EB と同様に、マウス iPS 細胞およびマウス iPS-EB においてもプロモーターの選択が効率の良い遺伝子発現には重要であることが示され

た。

これまでに CA または EF-1 α プロモーターを有する従来型 Ad ベクターを用いることにより、マウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入に成功した。そこで次に最適化した Ad ベクターを用いてマウス iPS 細胞へ分化関連遺伝子を導入することにより、液性因子のみを利用する従来の誘導法よりも効率良く目的の細胞へ分化誘導できるかどうか検討した。まず両細胞に脂肪細胞分化のマスター遺伝子である PPAR γ 遺伝子を導入することにより、脂肪細胞への効率的な分化誘導が可能かどうか検討した。CA プロモーター制御下でマウス PPAR γ 遺伝子を発現する Ad ベクター、Ad-CA-PPAR γ をマウス ES 細胞およびマウス iPS 細胞へ作用させた後に EB を作製し、さらに同 Ad ベクターを 2 日目の EB および 5 日目の EB に作用させた(triple transduction)。その後脂肪細胞分化用の液性因子中で 15 日間培養することにより脂肪細胞への分化誘導を行った。脂肪細胞への分化効率をオイルレッド O 染色により評価した結果、iPS 細胞の脂肪細胞への分化効率は ES 細胞の分化効率よりも低いものの、液性因子を作用させて培養することにより細胞内に脂肪滴が観察された(Fig. 6A, a, b, e, f)ことから、iPS 細胞は ES 細胞と同じ誘導法で脂肪細胞へ分化することが明らかとなった。また、液性因子のみを用いた分化誘導法と比較し、液性因子を加えさらに Ad ベクターによる PPAR γ 遺伝子を導入した ES 細胞および iPS 細胞は、極めて効率良く脂肪細胞へ分化することも示された(Fig. 6A, d, h)。さらに、Ad ベクターを用いた PPAR γ 遺伝子導入による脂肪細胞への分化効率の上昇は、GPDH 活性の上昇および脂肪細胞特異的なマーカー遺伝子の発現上昇によっても確認された(Fig. 6B, 6C)。興味深いことに、Ad ベクターによる PPAR γ 遺伝子導入後の脂

肪細胞への分化効率は、iPS 細胞の方が増大していた。すなわち、ES 細胞においては PPAR γ 遺伝子による GPDH 活性の上昇は約 2 倍であったのに対し、iPS 細胞においては GPDH 活性が約 4 倍上昇していた(Fig. 6B)。なお、コントロールとして LacZ 遺伝子を導入した ES 細胞、iPS 細胞においては、脂肪細胞への分化効率が上昇することはなかった。これらの結果から、マウス ES 細胞と同様に、マウス iPS 細胞は脂肪細胞への分化能力を有していること、そして脂肪細胞への分化効率は Ad ベクターを用いた PPAR γ 遺伝子の導入により飛躍的に上昇することが示された。

次に、マウス iPS 細胞からの骨芽細胞への分化誘導を行うとともに、Ad ベクターを用いた iPS 細胞への Runx2 遺伝子導入により骨芽細胞への分化効率が改善されるかどうか併せて検討した。Runx2 遺伝子は骨芽細胞分化に必須の転写として知られている遺伝子である。マウス ES 細胞、マウス iPS 細胞へ CA プロモーターを有する従来型 Ad ベクターにより LacZ 遺伝子または Runx2 遺伝子を導入し、骨芽細胞用の液性因子中で 15 日間培養した。まず、初期骨芽細胞分化のマーカである ALP 活性を測定したところ、期待通り Runx2 導入細胞において高い活性が認められた(Fig. 7A)。そこで次に、iPS 細胞が成熟骨芽細胞へ分化しているかどうかを von Kossa 染色により石灰化を検出した。その結果、iPS 細胞は ES 細胞と同じ誘導法を用いることにより、骨芽細胞への分化することが明らかとなった(Fig. 7B, a, b, e, f)。なお、マウス ES 細胞の結果と同様に、骨芽細胞の石灰化は Runx2 遺伝子の導入によりさらに上昇していることが確認された(Fig. 7B, d, h)。また、カルシウムの沈着を定量したところ、LacZ 遺伝子導入群においては液性因子のみの誘導法と著差は認められなかったものの、

Runx2 遺伝子導入細胞においては約 8 倍のカルシウムが蓄積していた(Fig. 7C)。この結果からも Runx2 遺伝子導入細胞の石灰化が上昇していることが確認された。また、骨芽細胞分化のマーカ遺伝子を RT-PCR 法により解析した結果、Runx2 遺伝子導入細胞は Runx2、osterix、bone sialoprotein、osteocalcin、collagen I 遺伝子の発現上昇が認められた(Fig. 7D)。したがって、Ad ベクターを用いたマウス iPS 細胞への分化関連遺伝子の導入により、脂肪細胞分化だけでなく骨芽脂肪分化においても分化効率を劇的に改善できることが示され、本研究において確立した遺伝子導入法はマウス iPS 細胞を用いた細胞分化研究に有用であることが示された。

Ad ベクターを用いてヒト iPS 細胞への遺伝子導入法を確立するため、プロモーターの異なる LacZ 発現従来型 Ad ベクターを作用させて遺伝子導入効率を検討した。ヒト iPS 細胞は、Myc を含む 4 因子の遺伝子導入により樹立された 201B7 株と、Myc を含まない 3 因子の遺伝子導入により樹立された 253G1 株を用いて検討した。その結果、いずれの従来型 Ad ベクターを使用してもヒト iPS 細胞コロニーの辺縁部においては LacZ 発現が認められるものの、コロニーの中心部ではほとんど発現が認められなかった (Fig. 8)。

ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と同様、単細胞にして継代すると生存率が著しく低下するため、コロニーで継代する必要がある。しかしながらコロニーを形成しているヒト iPS 細胞においては Ad ベクターが細胞内に侵入できていない可能性が考えられたため、ヒト iPS 細胞を単細胞にまで解離して Ad ベクターを作用させることを考えた。ヒト ES・iPS 細胞を単細胞にまで解離して継代すると生存率は著しく低下するが、ROCK 阻害剤がヒト ES 細胞継代時におけ

る細胞死を抑制することが報告され、さらに、ROCK 阻害剤はヒト iPS 細胞継代においても細胞死を抑制できることが示されている。そこで ROCK 阻害剤により単細胞にまで解離したヒト iPS 細胞 (201B7) に Ad-EF-mCherry を作用させ、その 48 時間後の Oct-3/4 の発現と共に解析した。その結果、mCherry の発現は 70-80% のヒト iPS 細胞コロニーにおいて観察され、さらに、それらの細胞は Oct-3/4 を発現していることが明らかとなった (Fig. 9)。したがって、EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクターは Oct-3/4 を発現しているヒト iPS 細胞の未分化な部分へ遺伝子導入されていることが示された。

ヒト iPS 細胞は細胞増殖や分化効率などの性質がクローン間で異なること指摘されている。そこで、異なるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞に対し本遺伝子導入法が応用可能かどうか検討した。これまでに用いたヒト iPS 細胞 201B7 に加え、201B2、253G1 の 3 クローンおよびヒト ES 細胞 KhES-1 について Ad ベクターを用いて遺伝子導入効率を検討した。その結果、いずれの細胞株も Ad ベクターの単独作用ではコロニーの辺縁部でしか LacZ の発現がみとめられなかった (Fig. 10A)。一方、ROCK 阻害剤を用いて細胞を継代し、さらに CA または EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクターを作用させることによりヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞コロニーの中心部においても LacZ の発現が観察された (Fig. 10B)。また、ROCK 阻害剤を作用させた後に EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクター (Ad-EF-mCherry) による遺伝子導入を行ったところ、約 80% のヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞が mCherry を発現しているだけでなく、未分化マーカーである NANOG、OCT-3/4、SSEA-4 も発現していたことから、これら

の細胞は未分化性を維持していることが示された (Fig. 11)。以上の結果から、Ad ベクターを用いてヒト ES 細胞や複数のヒト iPS 細胞へ効率良く遺伝子導入できることが明らかとなった。特に、EF-1 α プロモーターを有する Ad ベクターは今回検討した Ad ベクターの中で最も高い遺伝子発現効率を示していたことから、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞への分化誘導系に有用であることが示された。

現在の *in vitro* 毒性スクリーニング系は、入手に限りがあるヒトの初代培養の肝細胞を使用しているため制約が多い。そのため、あらゆる組織細胞へと分化することができ、無限に増殖させることが可能なヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から、肝細胞を安定的に分化誘導させることができれば、毒性スクリーニング系に適用可能な細胞を安定的に大量に供給できる。しかしながら、未分化なヒト ES 細胞から肝細胞への分化誘導には非常に長い培養期間を要すること、分化効率も極めて低いこと、得られた細胞も薬剤代謝酵素の活性が低い未成熟な肝細胞であることが問題点として挙げられる。分化効率を改善する方法としては遺伝子導入による方法が考えられるが、これまでの研究において、未分化な ES 細胞に対し遺伝子導入を行った場合、他の液性因子を用いた方法と比較して、肝細胞への分化効率の改善はみとめられていない (Hepatology Res. 26:225-231.2003)。そこで本研究では、肝臓の発生に必須な遺伝子を分化能が肝細胞等に運命付けられた内胚葉系細胞に導入することにより、肝分化が促進されるか否かを検討した (培養プロトコルは Fig. 12A 参照)。まず、未分化なヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化促進効果があるとされる液性因子を用いて内胚葉系細胞を分化誘導した。ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞を Activin A と

bFGF 存在下で 5 日間培養を行ったところ、細胞間の密度が低い分化した細胞に特徴的な形態へと変化した (Fig. 12B(a,b,e,f))。細胞免疫抗体染色により各分化マーカーの発現を解析した結果、内胚葉マーカーである FOXA2 の発現は確認できたものの、大部分が未分化マーカーである NANOG を発現する細胞であった (Fig. 13A(a), B, D(a), E)。そこで、トリプシン-EDTA を用いてラミニンコートしたプレートへ継代した結果、FOXA2 陽性の細胞を優先的に継代することができた (Fig. 13A(b), D(b))。定量的リアルタイム PCR 法による解析からも、内胚葉マーカーである FOXA2 や SOX17 の発現増加および未分化マーカーである NANOG の発現低下を確認することができた (Fig. 13C, F)。内胚葉系細胞は、異なる細胞系譜である胚体外組織細胞と FOXA2 や SOX17 などの遺伝子発現パターンの点で類似していることが知られている。しかし、内胚葉系細胞で発現せず、胚体外組織細胞でのみ発現する SOX7 の発現が、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞ではみとめられなかった (Fig. 13C, F)。以上の結果から、本法において、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞を分化誘導することができたと考えられる。次に、内胚葉系細胞に Ad ベクターを用いて遺伝子導入可能かを調べるため、LacZ 発現改良型 Ad ベクターを作用させて遺伝子導入効率を検討した。その結果、ほぼ全ての細胞において LacZ の発現がみとめられたことから、改良型 Ad ベクターを用いて内胚葉系細胞に対して効率良く遺伝子導入可能なことが明らかとなった (Fig. 14)。そこで、肝臓の発生、分化に必須な遺伝子 HEX を内胚葉系細胞に Ad ベクターを用いて遺伝子導入することで、肝分化が促進されるか否かを免疫抗体染色により

解析した。改良型 Ad ベクターを用いて内胚葉系細胞に対して HEX を遺伝子導入し、免疫抗体染色により肝分化マーカーの発現解析を行った。その結果、培養 9 日目 (遺伝子導入 3 日後) に、肝幹細胞マーカーである α -fetoprotein (AFP) の陽性細胞が出現した (Fig. 15A(e))。さらに培養 10 日目 (遺伝子導入 4 日後) には胆管上皮細胞のマーカーである cytokeratin 7 (CK7) 陽性細胞が出現した (Fig. 15A(f))。そして、培養 12 日目 (遺伝子導入 6 日後) には、AFP 陽性あるいはアルブミン陽性のコロニーが生じ、周辺領域に CK7 陽性細胞が検出された (Fig. 16A(c,f,i,j))。また定量的リアルタイム PCR 法により、HEX を遺伝子導入することにより AFP とアルブミンの発現増加も確認することが出来た (Fig. 16B)。肝幹細胞からは実質細胞である肝細胞と非実質細胞である胆管上皮細胞が発生することが知られているため、HEX を内胚葉系細胞に対して遺伝子導入することで肝幹細胞が分化誘導され、その由来細胞である肝細胞と胆管上皮細胞が発生したと考えられる。次に、分化誘導された肝幹細胞が機能性のある肝細胞へと分化可能であるかを検討するため、肝幹細胞が最も効率よく分化誘導された 9 日目の培養細胞 (Fig. 15A(e)) を用いて、既知の液性因子を用いた肝分化プロトコール (Agarwal et al., Stem Cells. 2008, 26, 1117-1127) に従って 9 日間培養を行った。免疫抗体染色による解析の結果、遺伝子 HEX により分化誘導された細胞集団のうち 84% がアルブミン、80% が薬剤代謝酵素 CYP3A4 を発現していた (Fig. 17A)。定量的リアルタイム PCR 法による解析により、アルブミンの発現量も増加したが、胎児期組織における発現量の 1% 程度であり、肝細胞が機能性の高い細胞へと成熟化すると消失する AFP の発現も強く残っていた (Fig. 17B)。

次に、肝細胞の機能性を評価するために、薬剤代謝酵素の発現量を定量的リアルタイム PCR 法により定量した。その結果、CYP3A4 が胎児肝組織と同程度発現していることが明らかとなった (Fig. 18A)。また、この分化誘導された細胞は薬剤代謝能を有していることが確認された (Fig. 18B)。さらに、CYP3A4 の誘導薬剤である rifampicin を分化誘導された肝細胞に投与した結果、CYP3A4 の活性が著しく増加したことから、分化誘導された肝細胞は薬剤応答能も有していることが示された (Fig. 18B)。しかしながら、CYP3A4 に加えて CYP2D6 や CYP7A1 などの発現量は成体肝組織と比較して低いものであった (Fig. 18A)。したがって、内胚葉系細胞に HEX を遺伝子導入することで分化誘導された細胞は胎児期の肝細胞と同程度の機能性を有しているものの、成体肝細胞と比較すると未成熟な細胞であると考えられる。今後、機能性の高い肝細胞への成熟化が課題となる。

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞への分化過程において、これまでの研究では肝細胞の前駆細胞である内胚葉系細胞への分化効率は十分なものではなかった。上記の HEX を用いた肝分化誘導法においても、未分化なヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの内胚葉系細胞への分化効率は充分であるとは言えず、内胚葉系細胞への分化効率を改善することで後期の肝分化過程における効率も増加することが期待できる。近年ヒト ES 細胞に SOX17 遺伝子を安定発現させることで内胚葉系細胞が分化誘導されると報告された。しかしながら、SOX17 を用いたヒト iPS 細胞から内胚葉系細胞への分化誘導に関して、あるいは SOX17 を一過的に発現させることによる内胚葉系細胞への分化誘導に関しては報告がされていない。そこで、ほぼ全ての細胞に一過性

に目的遺伝子を発現可能な Ad ベクターの特徴を最大限に生かし、多種多様なヒト iPS 細胞に Ad ベクターを用いて SOX17 遺伝子を導入することにより、内胚葉系細胞への効率的な分化誘導を検討した (培養プロトコールは Fig.19A 参照)。まず、未分化なヒト iPS 細胞株 201B7 に Ad ベクターを用いて遺伝子導入可能かを調べるため、LacZ 発現改良型 Ad ベクターを作用させて遺伝子導入効率を検討した。その結果、ほぼ全ての細胞において LacZ の発現が認められたことから、改良型 Ad ベクターを用いて未分化なヒト iPS 細胞に対して効率的に遺伝子導入可能なことが明らかとなった (Fig. 20)。次に、上記の方法で未分化なヒト iPS 細胞 201B7 に対し Ad ベクターを用いて SOX17 遺伝子を導入することにより、内胚葉系細胞への分化促進効果がみとめられるかどうかについて検討した。その結果、培養 5 日目において、液性因子のみで培養を行うよりも、SOX17 を遺伝子導入した場合に、分化した細胞に特徴的な平坦で細胞間の密度が低い形態へと変化した (Fig. 19B(b-d))。また、免疫抗体染色により内胚葉マーカー FOXA2 の発現を解析した結果、SOX17 を遺伝子導入した細胞集団においてより多くの FOXA2 陽性細胞を確認することができた (Fig. 21A(f))。さらに他のヒト iPS 細胞株 253G1、Tic、Dotcom に対しても Ad ベクターを用いて SOX17 を遺伝子導入した結果、何れの細胞株においても FOXA2 陽性細胞数の発現増加が認められた (Fig. 21B)。従って、Ad ベクターを用いて SOX17 を一過的に発現させることにより、ヒト iPS 細胞株から効率良く内胚葉系細胞を分化誘導することができた。

ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞の分化において重要な役割を果たしている遺伝子を調べるために、Gene

Expression Omnibus (GEO)に公開されている Si-Tayeb らのマイクロアレイのデータを解析した(GEO accession: GSE14897)。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞への分化において有意に上昇している遺伝子を Significant Analysis of Microarray (SAM)法を用いて 302 遺伝子抽出した(Fig. 22a)。転写因子や細胞増殖・代謝に関連した遺伝子が成熟肝細胞を作製するために重要であると仮定し、これら 302 遺伝子のうち、転写因子でかつ、細胞増殖・代謝に関連した遺伝子を抽出した(Fig. 22b)。その結果、hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)遺伝子が唯一の候補遺伝子として得られた。また、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程において内在性の HNF4 α 遺伝子が発現上昇していることを確認した(Fig. 22c)。

ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞からの肝分化に HNF4 α 遺伝子が重要であると予想されたため、HNF4 α 遺伝子を導入することによって肝分化を促進できるのではないかと考えた。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から誘導された細胞に HNF4 α 遺伝子を効率良く遺伝子導入するために、本研究では HNF4 α 遺伝子を搭載したアデノウイルス(Ad-HNF4 α)ベクターを用いた。まず、HNF4 α 遺伝子を導入する時期を検討した。ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞から肝細胞への分化過程において、培養 6 日目に内胚葉系細胞(Figs. 23、Fig. 24a)、培養 9 日目に肝幹前駆細胞(Figs. 23、Fig. 24b)、培養 12 日目に肝細胞と胆管上皮細胞(Fig. 23、Figs. 24c)の混合集団が得られることを FACS によって確認した。HNF4 α 遺伝子を培養 6、9、12 日目の細胞に遺伝子導入し、培養 20 日目において RT-PCR 法を用いて評価した。培養 9 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入するにより、最も選

択的かつ効率良く肝細胞を分化誘導できることが示唆された(Fig. 25a)。また、培養 9 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって、胆管上皮細胞への分化は抑制され、膵分化には影響を及ぼさないことが示唆された(Figs. 25b、25c)。これに対し、培養 6 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって、肝分化が促進されるだけではなく、膵分化も促進されることが示唆された。また、培養 12 日目の細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって、肝分化が促進されるだけではなく、胆管分化も促進されることが示唆された。以上の結果より培養 9 日目の肝幹前駆細胞に HNF4 α 遺伝子を導入することによって高効率に肝細胞を誘導できることが示唆された。Ad ベクター由来の外來遺伝子の発現の持続期間を調べるために、培養 9 日目の肝幹前駆細胞に Ad-LacZ 遺伝子を導入し、継続的に X-gal 染色を実施した。Ad ベクター由来の LacZ 遺伝子の発現は培養 14 日目まではほぼすべての細胞で持続し、培養 18 日目にはほぼ消失した(Fig. 26)。以上の結果から培養 20 日目における肝細胞関連遺伝子の発現などは Ad 由来の HNF4 α 遺伝子の直接的な制御によるものではなく、内在性の遺伝子の制御によるものであることが確かめられる。

ヒト ES 細胞を Fig. 27a に記載されたプロトコールにしたがって培養した結果、ヒト ES 細胞は肝細胞様の形態(明瞭な輪郭など)を有した細胞へと変化した(Fig. 27b)。得られた肝細胞の一部は 2 核であり、それらは ALB、CK18、CYP2D6、CYP3A4 陽性であることが確認された(Fig. 28)。HNF4 α 遺伝子を培養 9 日目の肝幹前駆細胞に導入することによって誘導された肝細胞の遺伝子発現および表面抗原などの発現を培養 20 日目にさらに詳しく調べた。CYP1A2、CYP2C9、CYP2C9、CYP2C19、

CYP2D6、CYP3A4、CYP7A1の遺伝子発現はいずれもAd-SOX17、Ad-HEX、Ad-HNF4 α 導入細胞(3遺伝子導入細胞)の方がAd-SOX17、Ad-HEX、Ad-LacZ導入細胞(2遺伝子導入細胞)よりも高いことが確認された(Fig. 29a)。また、CYPが正常に機能するために必要だと考えられるCYPレダクターゼ(POR)遺伝子の発現も3遺伝子導入細胞の方が高かった(Fig. 29b)。第2相抱合酵素(Fig. 30a)およびトランスポータ関連遺伝子(Fig. 30b)の発現に関しても3遺伝子導入細胞の方がその遺伝子発現が高いことが確認された。本研究で調べた3遺伝子導入細胞の遺伝子発現は初代培養肝細胞と同程度もしくはそれ以上のものもあったが、初代培養細胞よりも劣るものもあった。次に、これらの結果がヒトES細胞だけでなく、ヒトiPS細胞においても同様の結果が得られるか調べた。3株のヒトiPS細胞を肝分化させたのち、培養20日目にreal-time RT-PCR法を用いて解析した(Fig. 31)。その結果、これら3株のヒトiPS細胞の間に肝分化能の違いを観察した。2株のヒトiPS細胞(DotcomおよびTic)は他のヒトiPS細胞(201B7)よりも肝分化能が高いことが確認された。

分化誘導した肝細胞を再生医療に応用するためには細胞集団が均質である必要であるので、本研究において得られた肝細胞がどの程度均質であるかフローサイトメトリーで確かめた。アジアロ糖タンパク受容体1(ASGR1)陽性細胞、c-Met陽性細胞(Fig. 29c)、ALB陽性細胞(Fig. 29d)の割合を調べたところ、3遺伝子導入細胞では約80%であったのに対し、2遺伝子導入細胞では約50%であった。以上の結果から、3遺伝子(SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子)を順次導入することによって、ほぼ均質な肝細胞が得られることが確認された。

次に本研究においてヒトES細胞および

ヒトiPS細胞から誘導した肝細胞が十分な肝機能を有しているか評価した。培養20日目に培地に含有されているLDLを取り込む細胞の割合を調べたところ、3遺伝子導入細胞では約87%であったのに対して、2遺伝子導入細胞では約44%であった(Fig. 32)。次に誘導された肝細胞におけるCYP誘導能を評価した。細胞内のCYP3A4、CYP2C9、CYP1A2の活性を調べたところ、3遺伝子導入細胞では2遺伝子導入細胞よりもCYP活性が高いことが確認された(Fig. 33a)。CYP誘導能を評価するために、CYP3A4およびCYP2C9を誘導できるリファンピシン、CYP1A2を誘導できるオメプラゾールを細胞に作用させた。ヒトES細胞ではこれらの化合物に対してCYP誘導は確認されなかったが、ヒトES細胞由来肝細胞およびヒト初代培養肝細胞ではCYP誘導能が確認された。ヒトES由来の肝細胞ではCYP種によって、その活性は大きく異なっていたが、CYP3A4に関してはヒト初代培養肝細胞と同程度であった。以上の結果から、高いレベルのCYP活性を有した細胞をヒトES細胞から分化誘導できたことが示された。

肝細胞の化合物を取り込み、抱合し、排泄する能力も非常に重要であることが知られているので、本研究においてはインドシアニングリーン(ICG)の取り込み能を評価した(Fig. 33b)。培養20日目にICGを含有した培地で6時間培養することによって、3遺伝子導入細胞の方が2遺伝子導入細胞よりも多くのICGの取り込みが観察された。肝細胞は細胞質にグリコーゲンを多く貯蔵していることが知られているので、ヒトES細胞由来の肝細胞が細胞質にグリコーゲン貯蔵しているかPAS染色によって評価したところ、3遺伝子導入細胞の方が2遺伝子導入細胞よりも多くのグリコーゲンを貯蔵していることが確認された(Fig. 33c)。以

上の結果より、3 遺伝子を導入することによって多くの肝機能が向上したことが明らかとなった。

多くの薬物は CYP によって代謝産物が活性を獲得し、細胞毒性を生じることが知られている。より安全な創薬のために、この細胞毒性を事前に予想することが必要である。ヒト初代培養肝細胞は同一ロットを大量に入手することが困難であり、ロット差のばらつきが大きいために、ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞由来の肝細胞がこの代用品となることが期待されている。本研究において誘導した肝細胞が薬剤による細胞毒性を予測することに利用できるか調べるために、肝臓において CYP による代謝を受けて毒性を示すことが知られている種々の化合物(トログリタゾン、アセトアミノフェン、シクロフォスファミド、カルバマゼピン)を細胞に作用させたのち、細胞生存率を評価した(Fig. 33d)。いずれの化合物においての 3 遺伝子導入細胞の細胞生存率は 2 遺伝子導入細胞およびヒト ES 細胞よりも低かった。この結果より、3 遺伝子導入細胞は 2 遺伝子導入細胞やヒト ES 細胞より、CYP による薬物代謝能が高く、毒性評価に利用可能であることが示唆された。しかしながら、3 遺伝子導入細胞の細胞生存率はヒト初代培養肝細胞よりも高かったため、今後はよりヒト初代培養肝細胞に近い細胞を作製する技術の開発が必要とされる。

これまでの実験結果により、HNF4 α 遺伝子は肝分化を促進することが明らかとなったが、そのメカニズムは明らかになっていない。過去に HNF4 α 遺伝子は繊維芽細胞(NIH3T3 細胞など)において間葉上皮移行(MET)を促進することが知られているので、本研究におけるヒト ES 細胞から肝細胞への分化においても MET が促進されているか調べた。培養 9 日目の細胞に Ad-LacZ も

しくは Ad-HNF4 α を細胞に感染させ、培養 12 日目にどのような細胞集団が誘導されているかフローサイトメトリーを用いて評価した(Fig. 34a)。HNF4 α 遺伝子を導入することによって、ALB 陽性の肝細胞の割合は増加し、N-cadherin 陽性の肝幹前駆細胞の割合の割合は減少した。CK7 陽性の胆管上皮細胞の割合は変化しなかった。この結果が HNF4 α 遺伝子によって促進された MET によるものかどうか調べるために、上皮細胞マーカーおよび間葉系細胞マーカーの発現を免疫抗体染色によって評価した。HNF4 α 遺伝子を導入することによって、N-cadherin 陽性である間葉系細胞は減少し、E-cadherin 陽性の上皮細胞が増加したことが確認された(Fig. 34b)。以上の結果より、HNF4 α 遺伝子によって、肝幹前駆細胞からの MET が促進されることが示唆された。また、興味深いことに HNF4 α 遺伝子を導入することによって分裂中の細胞の割合が減少した(Fig. 34c)。肝細胞はほぼ分裂しない細胞であることが知られているので、この結果は HNF4 α 遺伝子によって肝成熟化が進行したためだと考えられる。また、各種肝細胞マーカー(AFP、PROX1)および上皮細胞マーカー(Ceacam、E-cadherin)の発現が上昇し、間葉系細胞マーカー(N-cadherin、Snail)および細胞周期阻害因子(p15、p21)の発現が減少した(Fig. 35a)。以上の結果から HNF4 α 遺伝子は肝分化において MET を促進することが明らかとなった(Fig. 35b)。

D. 考察

マウス iPS 細胞を用いた研究により、外来遺伝子を効率良く導入できれば、iPS 細胞の機能細胞への分化を遺伝子導入により自由に制御できる可能性が示された。しかしながら、ヒト iPS 細胞においては Ad ベクター単独では遺伝子導入効率が極めて低

く、ROCK 阻害剤を併用することで初めて遺伝子導入が可能であった。ROCK 阻害剤が分化誘導に悪影響を及ぼすことも考えられるため、今後は薬剤併用を伴わない遺伝子導入ベクターの開発が重要であると考えられる。また、iPS 細胞は分化効率においてクローン間の差が大きいことが指摘されており、種々の iPS クローンをを用いた検討も重要になると思われる。

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞由来の内胚葉系細胞に対して HEX を遺伝子導入することにより従来法と比較し飛躍的に効率良く肝幹細胞を分化誘導可能であった。しかし、その後液性因子を用いて肝幹細胞から成熟肝細胞への分化誘導を試みたものの、薬剤代謝酵素の発現量は胎児肝組織と同程度であり、成体肝組織と比較して依然発現量が低いものであった。そこで、HNF4 α 遺伝子を導入する技術を用いることにより、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ことに成功した。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。

E. 結論

ヒト ES 細胞や種々のヒト iPS 細胞に対

して Ad ベクターを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肝分化を促進できることが明らかとなった。また、これらの結果は、薬物毒性スクリーニングに応用可能な細胞が作製できる技術の基盤となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, 19, 400-407 (2011)
- (2) Tashiro K., Kawabata K., Inamura M., Takayama K., Furukawa N., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Furue-Kusuda M., Mizuguchi H. Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Rerogram.*, 12, 501-507 (2010)
- (3) 川端健二、田代克久、水口裕之、iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、*薬学雑誌*、130、1527-1534 (2010)
- (4) Tashiro K., Inamura M., Kawabata K., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells.*, 27, 1802-1811, (2009)
- (5) Tashiro K., Kondo A., Kawabata K., Sakurai H., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysine-modified adenovirus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379, 127-132, (2009)
- (6) Tashiro K., Kawabata K., Sakurai H,

Kurachi S, Sakurai F, Yamanishi K, Mizuguchi H. Efficient adenovirus vector-mediated PPAR gamma gene transfer into mouse embryoid bodies promotes adipocyte differentiation. *J. Gene Med.*, 10; 498-507 (2008)

2. 学会発表

- (1) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの成熟肝細胞への高効率分化誘導、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日
- (2) 川端健二、水口裕之、遺伝子導入を用いた iPS 細胞の肝細胞への高効率分化誘導法、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日
- (3) 高山和雄、稲村充、川端健二、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 10 回日本再生医療学会総会、東京、2011 年 3 月 1 日-2 日
- (4) 水口裕之、遺伝子導入技術を駆使した幹細胞の分化制御ーヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導技術の開発の開発を中心にー、第 7 回ナノバイオ国際シンポジウム、東京、2011 年 2 月 16 日
- (5) 水口裕之、遺伝子導入技術を駆使したヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導と毒性評価系への応用、第 2 回大阪大学 iPS 細胞臨床研究シンポジウム、大阪、2011 年 1 月 27 日
- (6) 水口裕之、ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築ー遺伝子導入技術を駆使したヒト iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導ー、第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会、大阪、2010 年 10 月 30 日
- (7) 稲村充、川端健二、高山和雄、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之、HEX 遺伝子の導入によるヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの効率良い肝幹細胞への分化誘導、第 16 回肝細胞研究会、秋田、2010 年 6 月 18-19 日
- (8) 高山和雄、稲村充、田代克久、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之、SOX17 遺伝子導入によるヒト ES・iPS 細胞からの内胚葉および胚体外内胚葉への選択的分化誘導、第 16 回肝細胞研究会、秋田、2010 年 6 月 18-19 日
- (9) 水口裕之、川端健二、ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築に向けた基盤整備の現状と肝細胞への分化誘導、第 26 回 DDS 学会、大阪、2010 年 6 月 17-18 日
- (10) 水口裕之：iPS 細胞の創薬研究、特に毒性評価への応用について、スーパー特区シンポジウム、東京、2010 年 3 月 31 日
- (11) 水口裕之：ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築に向けた基盤整備の現状、日本薬学会第 130 年会シンポジウム、岡山、2010 年 3 月 28-30 日
- (12) 川端健二、田代克久、水口裕之：iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化、日本薬学会第 130 年会シンポジウム、岡山、2010 年 3 月 28-30 日
- (13) 高山和雄、稲村充、形山和史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之：SOX17 遺伝子の導入によるヒト iPS 細胞からの効率良い内胚葉系細胞への分化誘導、日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月 28-30 日
- (14) 田代克久、稲村充、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之：アデノウイルスベクターを用いた未分化ヒト ES/iPS 細胞への高効率遺伝子導入、日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月 28-30 日
- (15) 水口裕之：ヒト iPS 細胞を用いた毒性評価系の構築ー遺伝子導入技術の活用と幹細胞の分化制御ー、大日本住友製薬株式会社特別セミナー、大阪、2010 年 3 月 23 日
- (16) 水口裕之：ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築、スーパー特区フォーラム in 大阪、大阪、2010 年 1 月 15 日

- (17) 水口裕之: ヒト iPS 細胞を活用した毒性評価系構築に向けた基盤整備の現状、大阪大学医学部附属病院 iPS 細胞臨床研究センター開設記念シンポジウム iPS 細胞研究の最前線と臨床応用に向けて、大阪、2009年12月16日
- (18) 田代克久、稲村充、古川智久、川端健二、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: Adenovirus vector-mediated efficient transduction into human induced pluripotent stem cells.、第32回分子生物学学会年会、横浜、2009年12月9-12日
- (19) 稲村充、川端健二、櫻井文教、形山和史、林田みどり、松村紘子、古江一楠田美保、水口裕之: 未分化ヒト ES 細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果、第8回次世代を担うファーマ・バイオフィォーラム 2009、名古屋、2009年11月14-15日
- (20) 水口裕之: ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築に向けた基盤整備の現状、日本動物実験代替法学会第22回大会、大阪、2009年11月14日
- (21) 川端健二、田代克久、水口裕之: アデノウイルスベクターを用いた iPS 細胞への遺伝子導入の最適化と分化誘導、第82回日本生化学会大会シンポジウム、神戸、2009年10月21-24日
- (22) 水口裕之: ヒト iPS 細胞を用いた新規 in vitro 毒性評価系の構築に向けた基盤整備の現状、第16回組織工学・再生医学ワークショップ、京都、2009年9月26日
- (23) Katsuhisa Tashiro, Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi: Adipocyte and Osteoblast Differentiation from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells by Efficient Adenoviral Transduction, 7th Annual Meeting of International Society of Stem Cell Research, Barcelona, Spain, 2009年7月
- (24) Mitsuru Inamura, Kenji Kawabata, Fuminori Sakurai, Kazufumi Katayama, Midori Hayashid, Hiroko Matsumura, Furue Miho, Hiroyuki Mizuguchi: Laminin promotes human embryonic stem cell differentiation into mesodendoderm, International Society for Stem Cell Research, Barcelona, Spain, 2009年7月
- (25) 田代克久、稲村充、川端健二、櫻井文教、水口裕之: アデノウイルスベクターによるマウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入法の確立と分化誘導への応用、第25回日本 DDS 学会学術集会、東京、2009年7月3-4日
- (26) 稲村充、川端健二、形山和史、梅澤明弘、阿久津英憲、林田みどり、松村紘子、古江一楠田美保、水口裕之: ヒト ES 細胞や iPS 細胞からの内胚葉系細胞および肝細胞への分化誘導法の開発、第16回肝細胞研究会、山形、2009年6月26-27日
- (27) 稲村充、川端健二、櫻井文教、形山和史、林田みどり、松村紘子、古江一楠田美保、水口裕之: 未分化ヒト ES 細胞から中内胚葉へのラミニンによる分化促進効果、日本組織培養学会第82回大会、栃木、2009年5月18-19日
- (28) 田代克久、稲村充、川端健二、櫻井文教、水口裕之: アデノウイルスベクターによるマウス iPS 細胞への遺伝子導入の最適化と分化誘導、日本薬学会第129年会、京都、2009年3月26日-28日
- (29) 稲村充、川端健二、櫻井文教、山西弘一、水口裕之: 内胚葉関連遺伝子 FOXA2 および SOX17 の転写制御機構の解明、日本薬学会第129年会、京都、2009年3月26日-28日
- (30) 田代克久、川端健二、櫻井文教、水口裕之: アデノウイルスベクターを用いたマウス iPS 細胞への高効率遺伝子導入と細胞分化、第8回日本再生医療学会総会、東京、2009年3月5日-6日
- (31) 田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、櫻井文教、水口裕之: 改良型アデノウイルスベクターを用いた骨芽細胞への高効率分化誘導法の開発、第31回日本分子生物学学会年会、神戸、2008年12月9日-12日
- (32) Katsuhisa Tashiro, Kenji Kawabata, Asami Ino, Haruna Sakurai, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi: Efficient Differentiation into Osteoblastic Lineage from Both Mouse Embryoid Bodies and Bone Marrow Stromal Cells by Adenovirus Vectors. 11th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Boston, USA, May 28 - June 1, 2008
- (33) 田代克久、井野麻美、川端健二、桜井晴奈、櫻井文教、水口裕之: 最適化アデノウイルスベクターを用いた高効率骨芽細胞分化、遺伝子デリバリー研究

会第8回シンポジウム、大阪、2008年
5月8日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 水口裕之、川端健二、古江美保、稲村充
(発明人); 幹細胞から肝細胞への分化誘導方
法 ; 特願 2010-154225(基礎出願 : 特願
2009-247342 (2009/10/28) 、 特願
2010-121282 (2010/05/27)

(2) 水口裕之、川端健二、古江美保、稲村充
(発明人); 幹細胞から肝細胞への分化誘導方
法 ; GP10-1027/PCT

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項なし

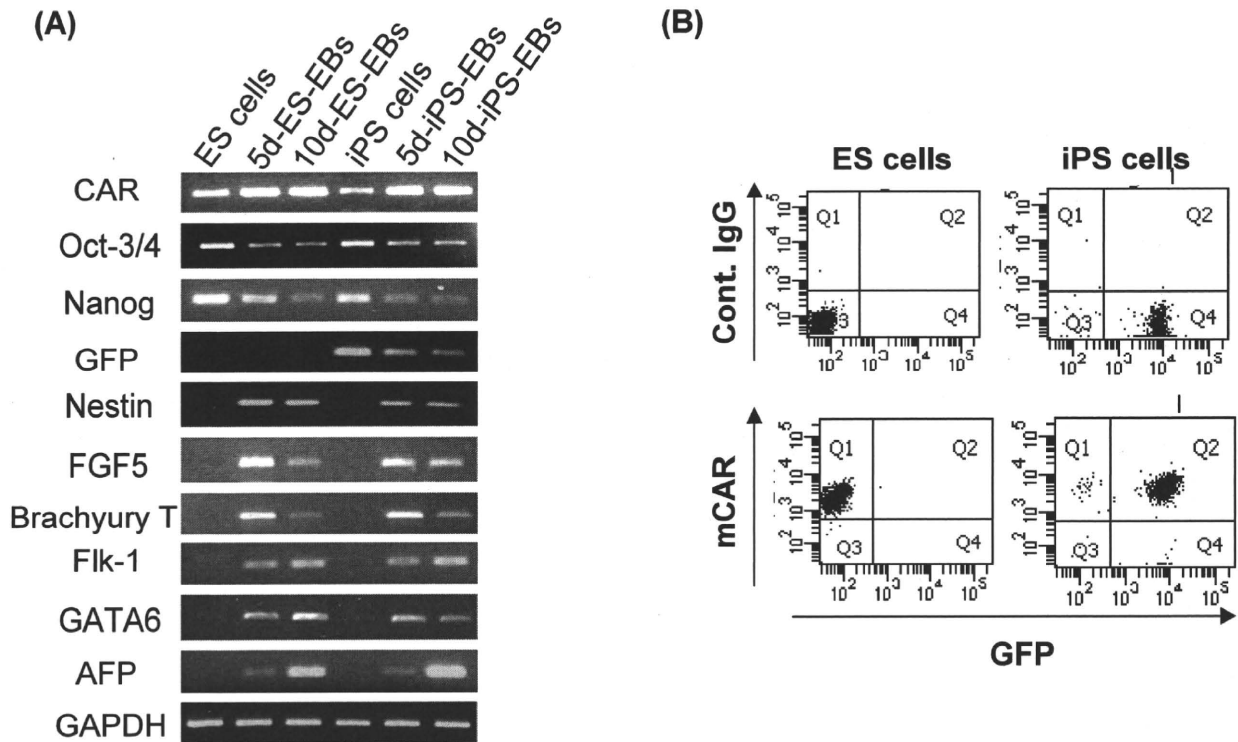


Figure 1 Gene expression patterns of mouse iPS cells were similar to those of mouse ES cells

(A) Total RNA was isolated from mouse ES cells (lane 1), 5d-ES-EBs (lane 2), 10d-ES-EBs (lane 3), iPS cells (lane 4), 5d-iPS-EBs (lane 5), or 10d-iPS-EBs (lane 6), and semi-quantitative RT-PCR was then performed. (B) The expression of levels CAR in mouse ES cells and iPS cells were detected with anti-mouse CAR monoclonal antibody by flow cytometry. As a negative control, the cells were incubated with an irrelevant antibody. Data shown are from one representative experiment of three performed. Abbreviations: ES cells, embryonic stem cells; EB, embryoid body; 5d-ES-EBs, ES cell-derived five-day-cultured EB; 10d-ES-EBs, ES cell-derived ten-day-cultured EB; iPS cells, induced pluripotent stem cells; 5d-iPS-EBs, iPS cell-derived five-day-cultured EB; 10d-iPS-EBs, iPS cell-derived ten-day-cultured EB; CAR, coxsackievirus and adenovirus receptor; GFP, green fluorescent protein; FGF, fibroblast growth factor; GATA, GATA-binding protein; AFP, alpha fetoprotein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Cont., control.

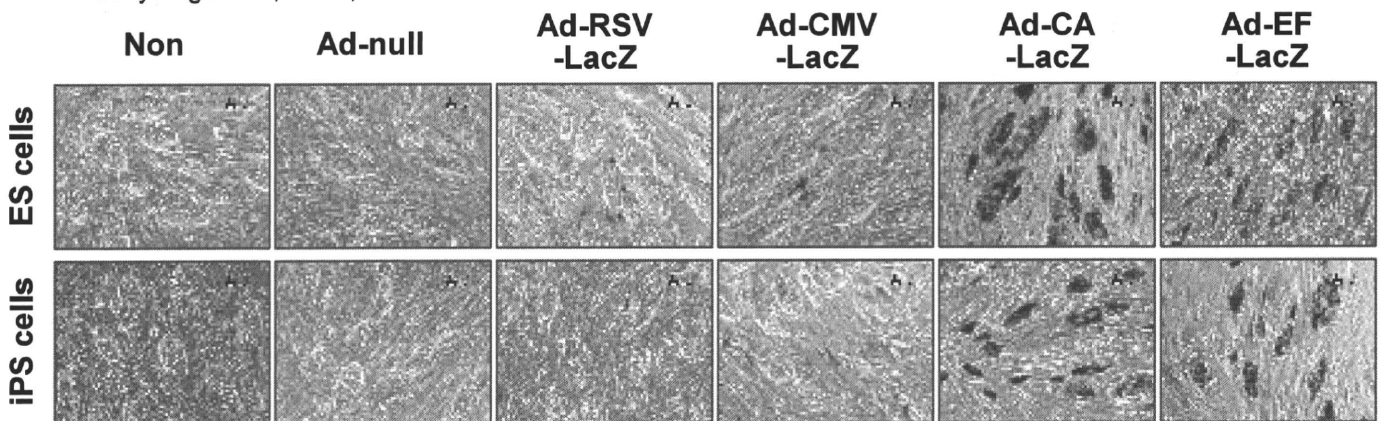


Figure 2 Efficient LacZ expression in mouse iPS cells by using an Ad vector containing the CA and the EF-1 α promoter.

Mouse ES cells or iPS cells were transduced with LacZ-expressing Ad vector at 3,000 VP/cell. On the following day, X-gal staining was carried out. Similar results of X-gal staining were obtained in three independent experiments. Abbreviations: Ad, adenovirus; RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ β -actin promoter; EF, elongation factor-1 α ; LacZ, β -galactosidase.

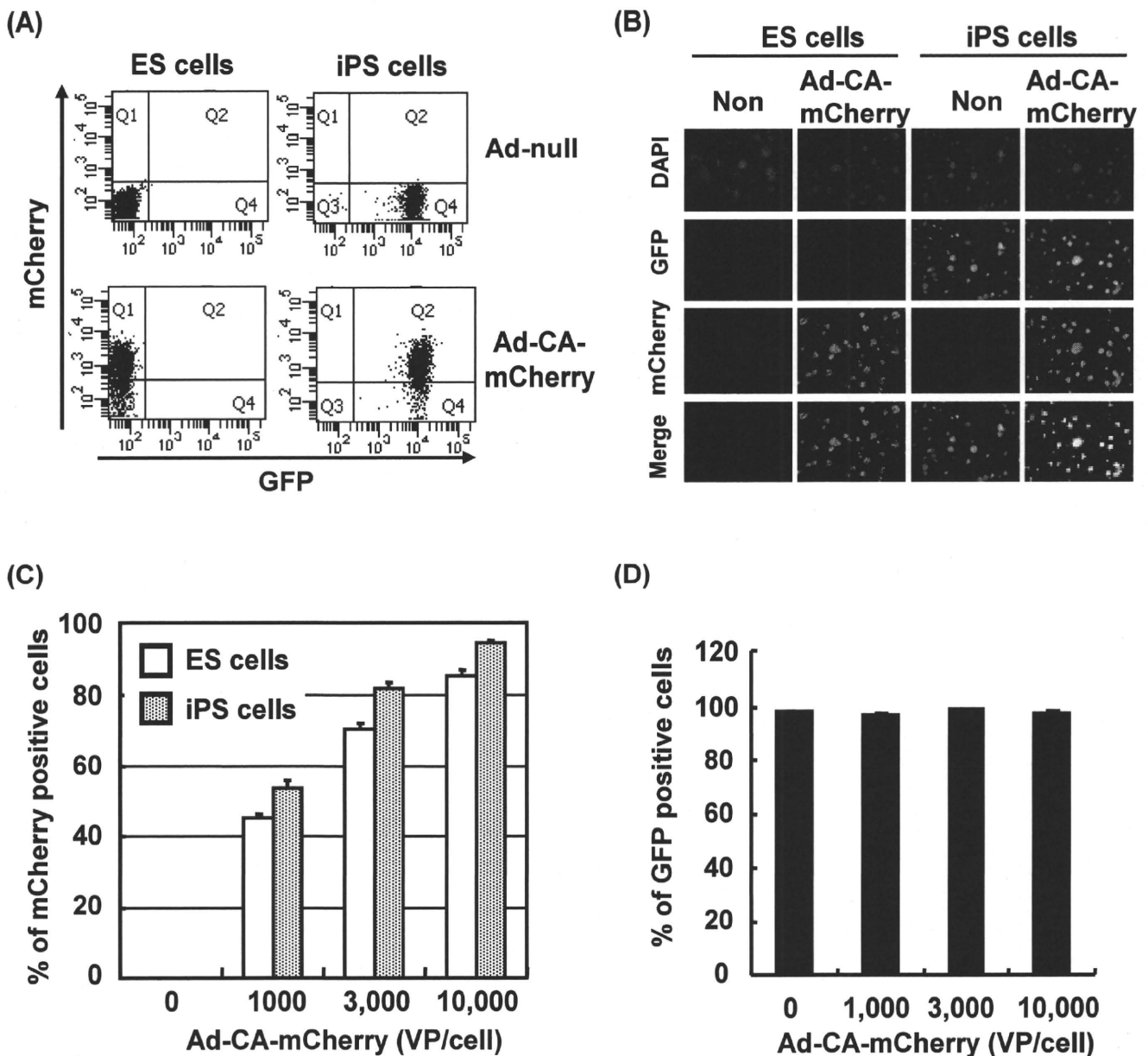
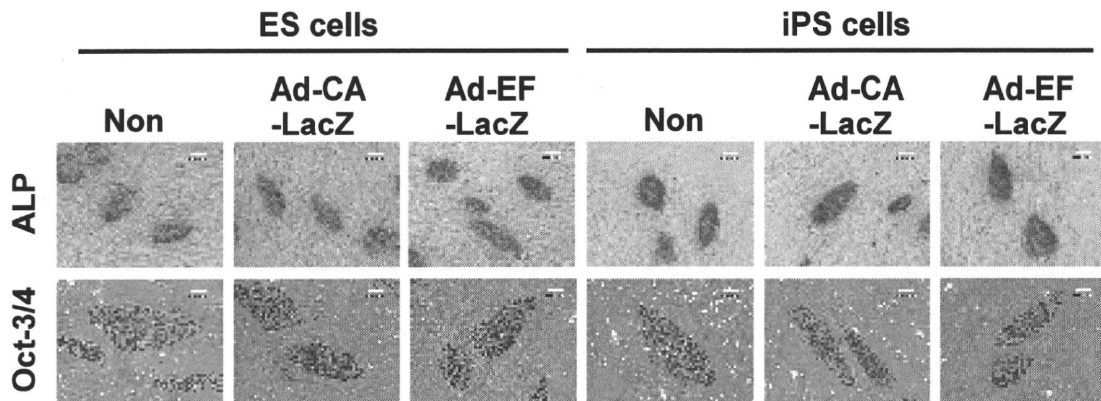


Figure 3 Efficient mCherry expression in GFP-expressing undifferentiated iPS cells by Ad vectors. (A) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with Ad-CA-mCherry at 3,000 VP/cell, and the expression of GFP and mCherry was then analyzed by flow cytometry (A) and fluorescent microscopy (B). (C, D) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with different amounts of Ad-CA-mCherry for 1.5 hr. mCherry expression (C) and GFP expression (D) was determined by flow cytometry. The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). Abbreviations: DAPI, 4',6-diamino-2-phenylindole; GFP, green fluorescent protein.

(A)



(B)

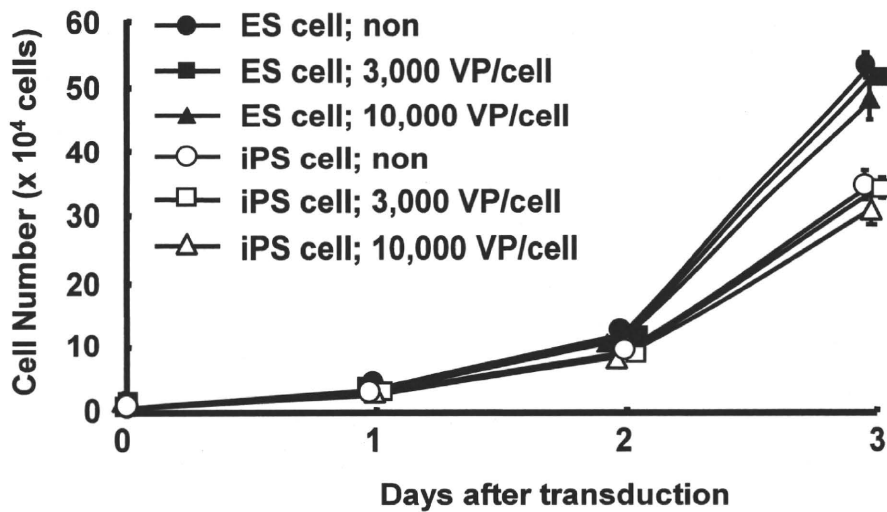


Figure 4 Ad vector-mediated transduction has almost no cytotoxicity against mouse iPS cells. (A) Mouse ES cells and iPS cells were transduced with Ad-CA-LacZ or Ad-EF-LacZ at 3,000 VP/cell. Three days later, ALP activity and Oct-3/4 expression were observed by light microscopy. (B) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with Ad-CA-mCherry at 3,000 or 10,000 VP/cell. After transduction, viable mouse ES cells or iPS cells were counted. The data are expressed as the mean \pm S.D. (n=3). Abbreviation: ALP, alkaline phosphatase.

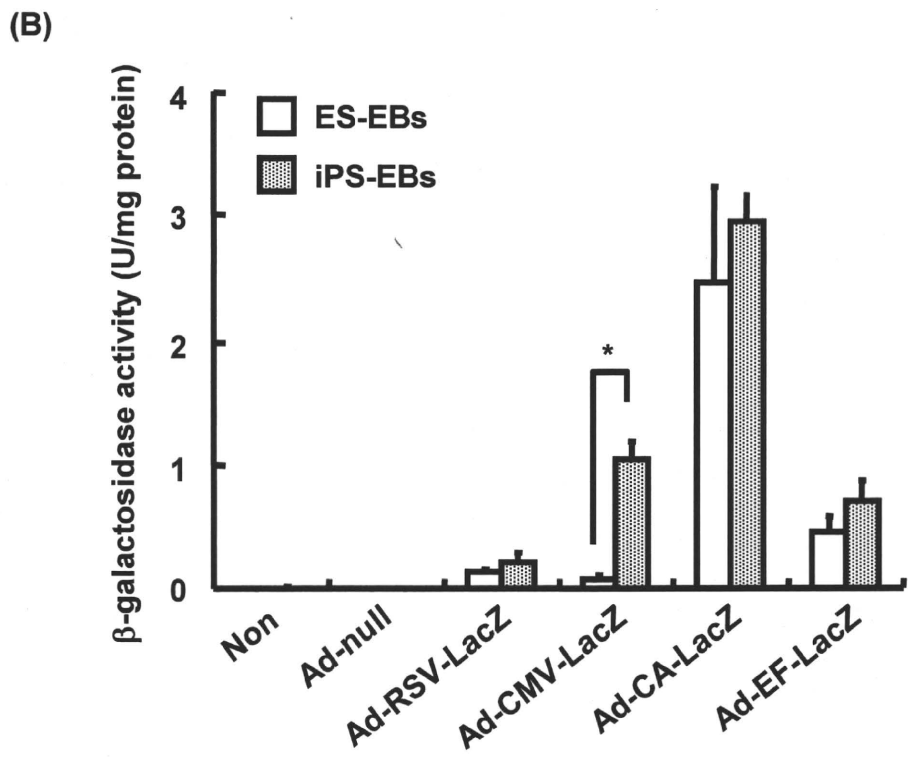
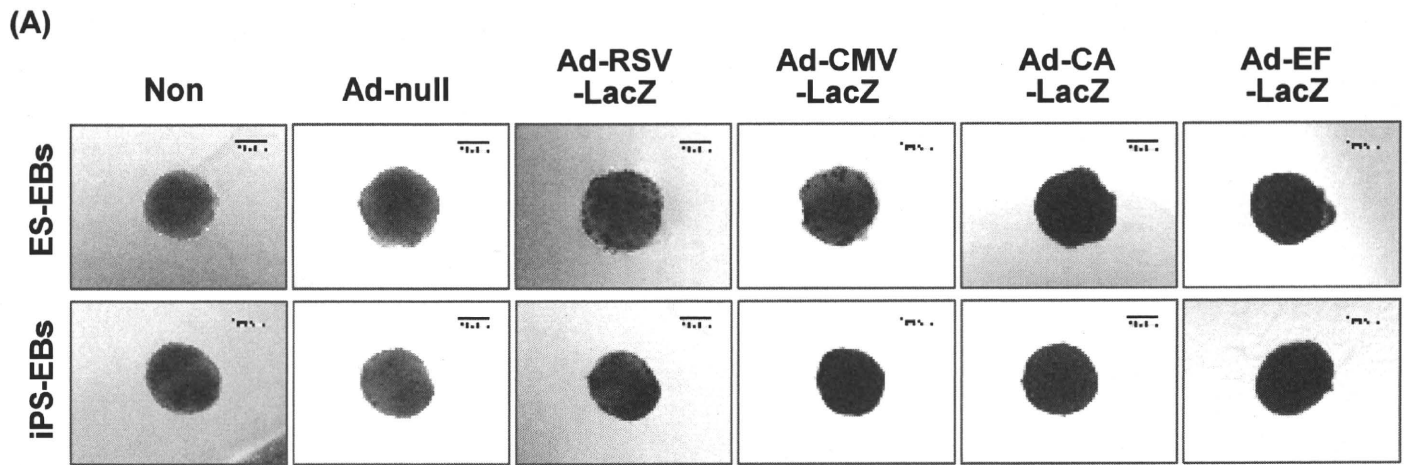


Figure 5 Comparison of promoter activity in iPS-EBs by using Ad vectors. 5d-ES-EBs or 5d-iPS-EBs were transduced with each Ad vector at 3,000 VP/cell. After 48 hr, X-gal staining (A) and β -galactosidase luminescence assay (B) were performed as described in the Materials and Methods. (A) Similar results of X-gal staining were obtained in six independent experiments. (B) The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). * $p < 0.001$

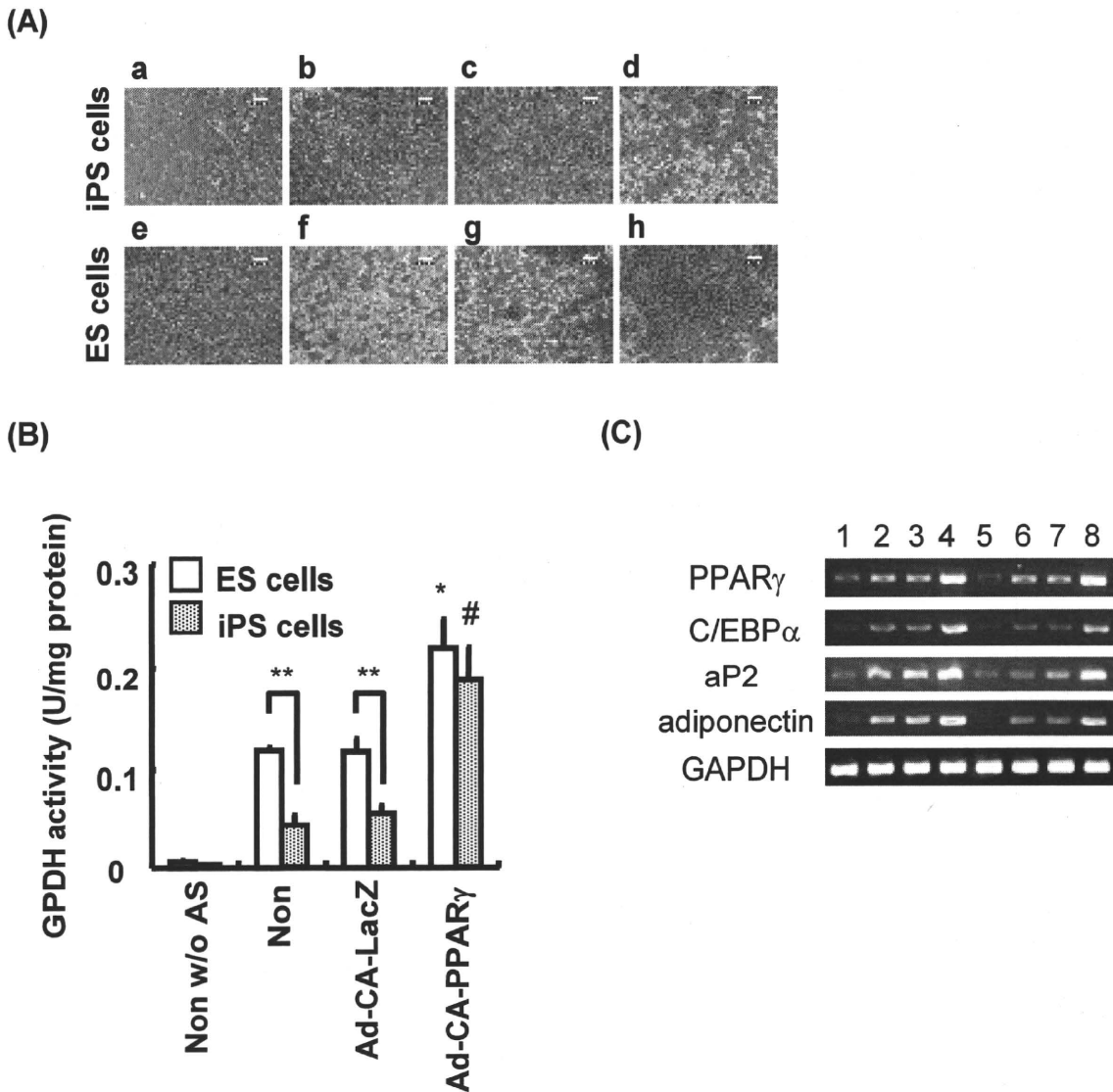


Figure 6 Efficient adipocyte differentiation from mouse ES cells and iPS cells by the transduction of the PPAR γ gene. ES-EBs or iPS-EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of Ad-CA-LacZ or Ad-CA-PPAR γ . After plating onto a gelatin-coated dish on day 7, ES-EBs and iPS-EBs were cultured for 15 days in the presence or absence of adipogenic supplements (AS). After cultivation, (A) lipid accumulation was detected by oil red O staining, and (B) GPDH activity in the cells was measured. (A) a, non-treated iPS-EBs; b, iPS-EBs with AS; c, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; d, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ ; e, non-treated ES-EBs; f, ES-EBs with AS; g, ES-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; h, ES-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ . The scale bar indicates 60 μ m. (B) The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced ES cells. # $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced iPS cells. (C) The expression of PPAR γ , C/EBP α , aP2, adiponectin, and GAPDH was measured by semi-quantitative RT-PCR. Lane 1, non-treated ES-EBs; lane 2, ES-EBs with AS; lane 3, ES-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; lane 4, ES-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ ; lane 5, non-treated iPS-EBs; lane 6, iPS-EBs with AS; lane 7, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; lane 8, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ . Abbreviations: AS, adipogenic supplements; w/o, without; GPDH, glycerol-3-phosphate dehydrogenase; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; C/EBP α , CCAAT/enhancer binding protein alpha.

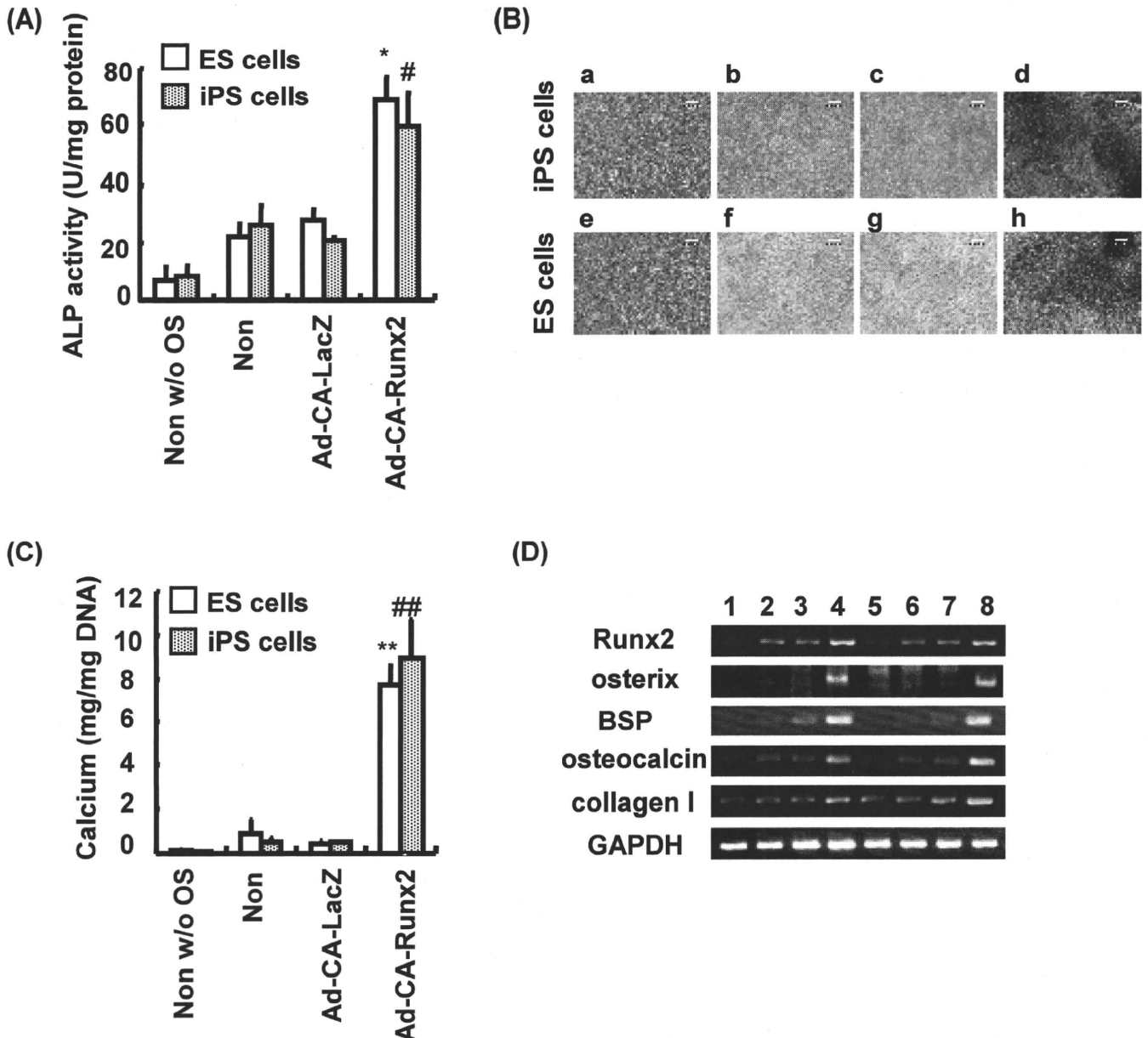


Figure 7 Enhanced osteoblast differentiation from ES cells and iPS cells in Ad-CA-Runx2-transduced cells. ES-EBs or iPS-EBs were transduced in triplicate with 10,000 VP/cell of Ad-CA-LacZ or Ad-CA-Runx2. After culturing for 15 days with or without osteogenic supplements (OS), alkaline phosphatase activity in the cells was determined. The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). * $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced ES cells. # $p < 0.05$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced iPS cells. (B) Matrix mineralization in the cells was detected by von Kossa staining, and (C) deposition of calcium was quantified as described in the Materials and Methods. (B) a, non-treated iPS-EBs; b, iPS-EBs with OS; c, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; d, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2; e, non-treated ES-EBs; f, ES-EBs with OS; g, ES-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; h, ES-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2. The scale bar indicates 60 μ m. (C) The data are expressed as the means \pm S.D. (n=3). ** $p < 0.01$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced cells. ## $p < 0.01$ as compared with non-transduced or Ad-CA-LacZ-transduced iPS cells. (D) Total RNA was isolated, and semi-quantitative RT-PCR was carried out using primers for Runx2, osterix, bone sialoprotein, osteocalcin, collagen type I, and GAPDH. Lane 1, non-treated ES-EBs; lane 2, ES-EBs with OS; lane 3, ES-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; lane 4, ES-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2; lane 5, non-treated iPS-EBs; lane 6, iPS-EBs with OS; lane 7, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; lane 8, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2. Abbreviations: OS, osteogenic supplements; Runx2, runt-related transcription factor 2.

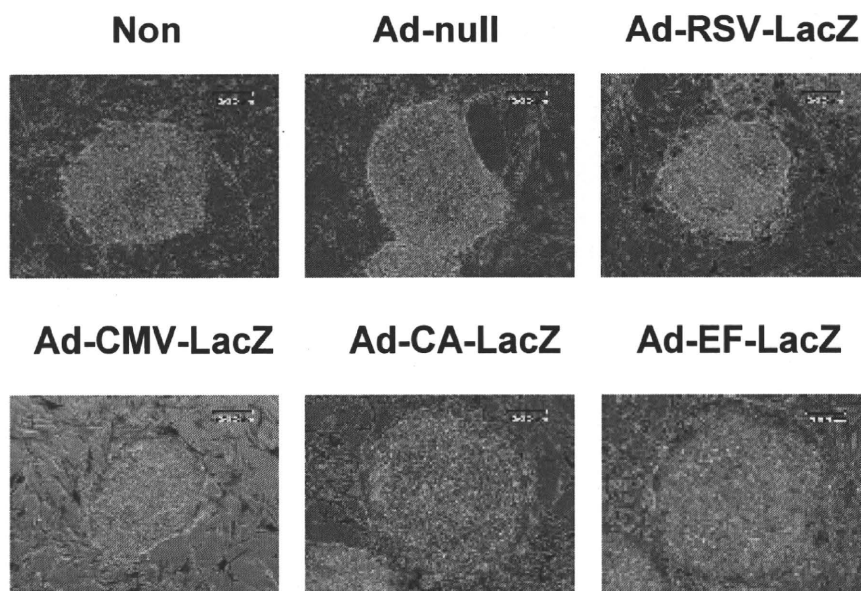


Fig.8 Ad vector-mediated transduction efficiency in human iPS cells as determined using various types of promoters. Human iPS cells (201B7) were transduced with various types of LacZ-expressing Ad vectors at 3,000 VP/cell for 1.5 hr. Two days later, X-gal staining was performed. Similar results of X-gal staining were obtained in two independent experiments. Abbreviations: RSV, rous sarcoma virus; CMV, cytomegalovirus; CA, CMV enhancer/ β -actin promoter; EF, human elongation factor-1 α

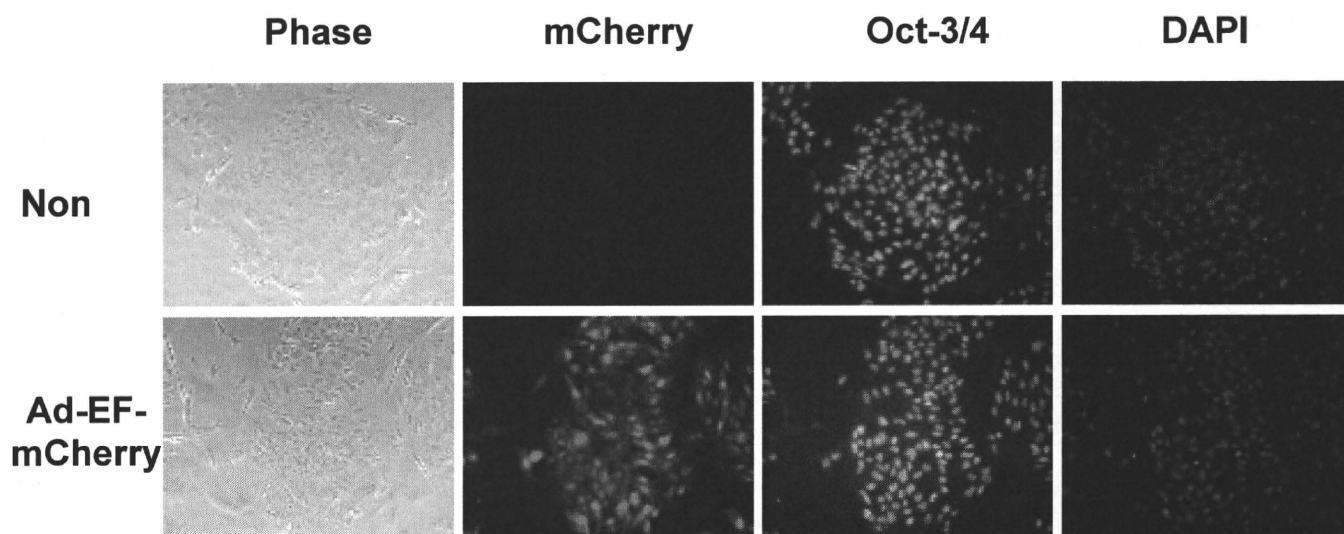


Fig. 9 Adenoviral transgene expression in human iPS cells in the presence of Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632.

Human iPS cells were pre-treated with Y-27632, and were then plated on 2-well chamber slides. On the next day, they were transduced with Ad-EF-mCherry at 3,000 VP/cell for 1.5 hr. Two days later, the expression of oct-3/4 and mCherry was observed by fluorescent microscopy.

Table 1 List of the primers used for RT-PCR

Genes	(5') Sense primers (3')	(5') Antisense primers (3')
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
CAR	TGATCAATTTGTATTCTGGA	TTAACAAGAACGGTCAGCAG
Oct-3/4	GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC	TCTAGCCCAAGCTGATTGGC
Nanog	ATGGTCTGATTGAGAAGGGC	TTCACCTCCAAATCACTGGC
GFP	CACATGAAGCAGCACGACTT	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG
FGF5	GAAGCGGCTCGGAACATAGC	GGACGCATAGGTATTATAGC
Nestin	CCCTCACCCTCTATTTTA	TTCTCCTAAAGGTTTAGATAGT
brachyury T	CAGGAGGATGTTCCCGGTGC	TCCGAGGTTCACTTATATGC
flk-1	TCTGTGGTTCTGCGTGGAGA	GTATCAATTTCCAACCACCC
GATA6	GCCAAACTGAGCCCCTTCGC	GGGGGGCTGTCGGCGGAGGC
AFP	TCGTATTCCAACAGGAGG	AGGCTTTTGCTTCACCAG
PPAR γ	CCCTGGCAAAGCATTGTAT	AATCCTTGGCCCTCTGAGAT
C/EBP α	CGCTGGTGATCAAACAAGAG	GTCCTGGTCAACTCCAGCA
aP2	TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA	ACACATTCCACCACCAGCTT
adiponectin	GTTGCAAGCTCTCCTGTTCC	GCTTCTCCAGGCTCTCCTTT
Runx2	CCTCTGACTTCTGCCTCTGG	CAGCGTCAACACCATCATT
Osterix	CTTAACCCAGCTCCCTACCC	TGTGAATGGGCTTCTTCCTC
Bone sialoprotein	AAAGTGAAGGAAAGCGACGA	GTTCTTCTGCACCTGCTTC
Osteocalcin	GCGCTCTGTCTCTGACCT	TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC
Collagen I	CACCCTCAAGAGCCTGAGTC	GCTACGCTGTTCTTGCAGTG