

## 疾患由来 iPS 細胞の 委託作製と そのバンク化事業について

熊本大学では疾患由来人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の委託作製とそのバンク化を行っています。iPS 細胞からは、いろいろな細胞を作り出すことができ、疾患研究に役立つ細胞と考えられています。iPS 細胞は患者様から提供していただいた皮膚組織（3-5 mm 片）から作製することができます。したがって、作製には患者様のご協力が不可欠です。皆様のご理解とご協力をお願いします。

本事業の目的は以下の2点です。

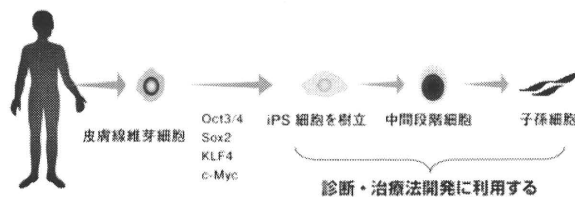
- 1) 疾患由来の iPS 細胞を医師や研究者の代わりに作成し、提供することで治療方法の開発などの研究に役立てて頂く。
- 2) 患者様、医師・研究者の方々の同意が得られたならば iPS 細胞バンクへご協力していただき研究の発展を促す。

この事業は難治性疾患の臨床に従事されている医師あるいは研究者の方々が疾患由来 iPS 細胞を使い研究を行いたい時に、先生方かわりに iPS 細胞を作り、ご依頼があった先生方に提供するという事業です。作製した iPS 細胞について、患者様、医師・研究者の方々の同意が得られましたら、難病研究資源バンクへの提供にご協力していただくことをお願いしております。

### iPS 細胞研究とは？

iPS 細胞は、患者様の少量の皮膚より線維芽細胞の培養を行い、その後、この細胞に4つのタンパク質 (Sox2, KLF4, Oct3/4, c-Myc) の遺伝子を加え発現させることで作ることができます。私たちは作製後の研究に都合が良いように、4つのタンパク質の遺伝子が染色体内に残らない方法にて作製します。

iPS 細胞からは、いろいろな細胞を作り出すことができ、また iPS 細胞自身も試験管内で簡単に増やすことができます。iPS 細胞作製が、すぐに難治性疾患の治療法につながるものではありませんが、iPS 細胞からいろいろな細胞を作り出して研究を行うことで病気の発症機序などを明らかにし、さらに治療法の開発につながる研究へと発展させる可能性があると考えられています。



## 資料3 市民公開シンポジウムのポスター



みんなの明日を  
笑顔にしたい。

平成22年度 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 研究成果発表

難病研究資源バンクに関する市民・研究者公開シンポジウム

# バンク化が拓く、難治性疾患対策の未来

2010 | **10.2** | Sat

13:30-16:30  
熊本県立劇場 大会議室

入場無料

総合司会 / 江良沢実

**13:30** 挨拶「難治性疾患克服研究事業について」厚生労働省健康局疾病対策課

**座長** 山口一成 国立感染症研究所 客員研究員

**13:50** 「難病研究資源バンクの活動を通じて」

**亀岡洋祐** 独立行政法人 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 難病研究資源バンク 主任研究員

**14:10** 「医学分野における研究材料の重要性」

**中村幸夫** 独立行政法人 理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞材料開発室 室長

**14:30** 「iPS細胞の委託作製とバンク化」

**江良沢実** 熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野 教授

**14:50** -----15分間 休憩

**座長** 内野誠 熊本大学大学院 生命科学研究所 神経内科学分野 教授

**西中村隆一** 熊本大学 発生医学研究所 腎臓発生分野 教授

**15:05** 「私の発症している神経難病について」

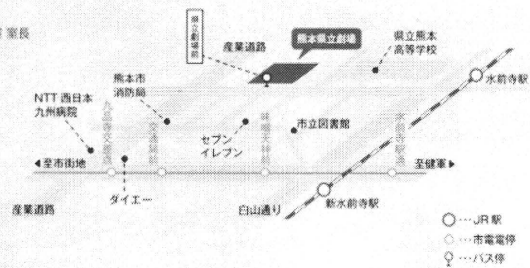
**松野英一** 特定非営利活動法人 熊本県難病支援ネットワーク 理事

**15:20** 「私の分子病戦記」

**安東由喜雄** 熊本大学大学院 生命科学研究所 病態情報解析学分野 教授

**15:50** 「iPS細胞を用いた再生医学・疾患・創薬研究」

**岡野栄之** 慶應義塾大学 医学部生理学 教授



主催 / 熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野

難治性疾患克服研究事業「難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製とバンク化」研究班

お問い合わせ / TEL 096-373-6588(熊本大学 発生医学研究所 幹細胞誘導分野) cellmod@kumamoto-u.ac.jp



## 難治性疾患患者皮膚からの皮膚線維芽細胞樹立

分担研究者 尹 浩信

熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野教授

協力者 神人正寿

熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学分野講師

### 研究要旨

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

#### A. 目的

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

本研究では iPS 細胞を作製するためにその前段階として難治性疾患の皮膚から

生検を行い、皮膚線維芽細胞を樹立する事を目的として研究を行った。

#### B. 背景

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

患者試料から作製された iPS 細胞は、無制限に増幅させ、長期にわたり貯蔵可能であり、多くの研究者に必要時に容易に提供可能である。従って、さまざまな分野の研究者が難治性疾患を研究する機会が増え、治療法の開発を促進する可能性がある。

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

### C. 方法

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

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

対象は Kugelberg-Welander disease 1 例、肢帯型筋ジストロフィー 1 例、先天性筋繊維タイプ不均衡症 1 例、糖原病 I 型（1A）1 例、sporadic ALS 1 例、familial ALS 1 例、全身性強皮症 11 例、副腎過形成症候群 2 例、副腎皮質過形成症候群 1 例、CADASIL 1 例、CADASIL 疑い 2 例、皮膚筋炎 2 例、

封入体筋炎 2 例、筋炎疑い 1 例、原発性骨形成不全症 1 例、異染性白質ジストロフィー 1 例、Perry 病 1 例、家族性アミロイドーシス 2 例、Galoway-Mowat 症候群 1 例、Cockayne 症候群疑い 1 例、脊髄小脳変性症（多系統萎縮症）1 例、新生児ヘモクロマトーシス（生体肝移植）1 例、SMON1 例の合計 42 例であった。

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

### D. 結果

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

## 遺伝子挿入のない iPS 細胞を用いた分化誘導法の開発に関する研究

分担研究者 西中村 隆一 熊本大学発生医学研究所 教授

### 研究要旨

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

### A. 研究目的

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

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

細胞を分化させる際にはフィーダー細胞の混入を除く必要があり、さらに分化誘導法自体がそれぞれの目的細胞によって異なるため試行錯誤が要求される。そこで、正常人由来の iPS細胞をモデルケースとして分化誘導実験を行った。

### B. 研究方法

ゼラチンコートした培養皿にマイトマイシン C 処理したマウス繊維芽細胞をまき ( $5 \times 10^5 / 6\text{cm}$  プレート)、その上で iPS 細胞を培養した。共同研究者の房木ノエミ博士がセンダイウイルスベクターによって樹立した外来因子フリー iPS 細胞を使用した。培養液は ReproCell 社の Primate ES cell culture medium に bFGF を添加して用いた。フィーダーのない条件としては、ReproCell FF 培地に bFGF を添加した。

iPS 細胞を 10uM の Rho kinase 阻害剤 Y27632 で 1 - 2 時間処理した後、ReproCell 社の細胞解離液で処理し、適当

な大きさの塊に解離したのち、非接着性の丸底 96 穴プレート (Lipidure coat) で 1 週間浮遊培養して胚様体 (Embryoid body) を形成させた。あるいは 0.25% のトリプシン-EDTA 溶液で単一細胞に解離し、10000 個/well で同様に胚様体を形成させた。この間、中胚葉誘導因子であるアクチビンの他、レチノイン酸などを加えて比較した。その後、ゼラチンあるいはファイブロネクチンでコートした培養皿に接着させてさらに 1 週間培養した。

#### (倫理面への配慮)

難治性疾患患者由来の iPS 細胞ではなく、正常人由来のものを共同研究者の房木ノエミ博士から譲渡された。学内の倫理委員会での承認済みである。

#### C. 研究結果

非接着性丸底 96 穴プレートを使うことによって、胚様体の大きさのコントロールが可能になった。iPS 細胞を Y27632 で前処理した後、単一細胞に解離し、さらに Y27632 存在下で胚様体を形成させた場合が、最も再現率が高かった。解離後遠心 (1500 rpm, 5 分) する方法 (spin EB 法) も試みたが顕著な効果はなかった。アクチビンを添加したものは、全く因子を加えない場合に比較して、胚様体の発育がよく、内腔形成も良好であった。

一方、2次元での平面培養による分化誘導法も試みたが、フィーダーに依存して維持されている iPS 細胞を直接細胞外マトリクス上で分化させようとしても、接着性及び生存率が悪い。フィーダー細胞の混入の影響も無視できないため、フィーダーフリーで短期間培養してから分化誘導を試みたが、この間に分化能が障

害されていることが示唆された。最近 Thompson らがわずか 8 種類の化合物からなる単純な組成の培地 (E8) を発表した (Chen et al. Nat Methods, 2011)、これと ReproCell 社の FF 及び新世代の FF2 培地との比較を進めている。

#### D. 考察

山中らが樹立した第一世代の iPS 細胞には外来性因子が残存するのに対し、センダイウイルスベクターによる iPS 細胞は、外来因子フリーのためより高い分化能を期待できる。今後さらに条件を検討したい。難治疾患由来の iPS 細胞は個人情報保全等の法的整備が完了していないため、本分担研究では正常人由来のものを先行させる。もちろん計画全体としては難治疾患由来 iPS 細胞の使用整備を迅速に進める。

ReproCell 社の培地には Invitrogen 社の Knockout Serum Replacement (KSR) が用いられているが、KSR には血清由来のアルブミン分画が含まれるため、完全な無血清培地ではない。これに対して E8 は iPS/ES 細胞の培養で必須とされる  $\beta$ -メルカプトエタノールを敢えて除くことでアルブミンも不要になっており、ロット差に影響されないことが期待される。

ES細胞やiPS細胞は、株によってばらつきがあることが知られており、分化条件が株によって異なることが予測される。本計画では各疾患から最低 3 株の iPS 細胞を作ること为目标としているが、これですべての分化誘導のニーズを満たすのは難しい可能性がある。貴重な iPS 細胞株がそれぞれ同等に未分化状態を維持し、分化能をもつのが望ましい。マウスの ES

細胞やiPS細胞では、そのようないわゆる ground stateの条件が報告されているが、ヒトES/iPS細胞では確立されていない。E8のような培地がiPSの株による違いをどこまで均一化するのか検討したい。またJaenischらによってマウスES/iPS細胞のような形態とシグナル経路をもつヒト naïve iPSが報告されている (PNAS, 2010)。外来因子なしでの自己複製維持が10-15世代と一過性である欠点をもつものの、その間は単一細胞から継代でき、分化誘導には有益と考えられる。この方法も取り込んで、簡便で均一な分化誘導条件を確立したい。

#### **E. 結論**

外来因子フリーiPS細胞の、簡便で均一な分化誘導条件を確立し、早期に科学コミュニティに還元したいと考えている。

#### **F. 健康危険情報**

該当なし

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

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

研究分担者 房木ノエミ ディナベック株式会社  
細胞工学グループリーダー

## 研究要旨

熊本大学にて作製した難病疾患患者由来・線維芽細胞初代培養株から、染色体に傷をつけない細胞質増殖型 RNA ウイルスベクターであるセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いて iPS 細胞を作製した。分担者は研究代表者に初期化 4 因子を含む SeV ベクターを提供し、一方で新型高性能 SeV ベクターを開発し、筋ジストロフィー患者由来線維芽細胞（ディシュエンヌ型・ベッカー型）3 株から、複数株の iPS 細胞を樹立し、それぞれヒト ES マーカーの発現と、外来遺伝子がフリーになっていることを確認した上、バンク化のため細胞を凍結保管し、一部を研究分担者に送付した。本研究により樹立した iPS 細胞は、ゲノムへの外来遺伝子の組込がなく、遺伝的背景が均一で、本来の病態の再現がより自然な状態で可能となった。

### A. 研究目的

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

への提供と、新型ベクターの開発、一部疾患（筋ジストロフィー）患者由来外来遺伝子フリーのiPS細胞の樹立を分担した。

### B. 研究方法

熊本大学にて樹立された筋ジストロフィー患者（ディシュエンヌ型2例、ベッカー型1例）由来線維芽細胞を用い、山中四因子（ヒト*OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2*, *c-MYC*遺伝子）搭載SeVベクターにてiPS細胞の誘導を行った。山中四因子搭載SeVベクターは従来の方法で作製した<sup>(文献)</sup>。iPS細胞の誘導効率は、コロニーのヒトES細胞様形態と、アルカリホスファターゼ陽性を基準として判断し、播種した線維芽細胞数に対する陽性コロニー数にて誘導効率を算出した。得られたiPS細胞からRNAを抽



出し、逆転写酵素によりcDNAを作製してRT-PCRを行い、SeVベクターの残存およびヒトES細胞マーカーの発現を確認した。SeVベクターの残存は、RT-PCRの他に、抗SeV抗体による免疫染色も行い、確実に除去されていることを再確認した。外来遺伝子フリーを確認したiPS細胞株は、液体窒素タンクにて冷凍保管を行っており、バンクへ移行予定にしている。

#### (倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

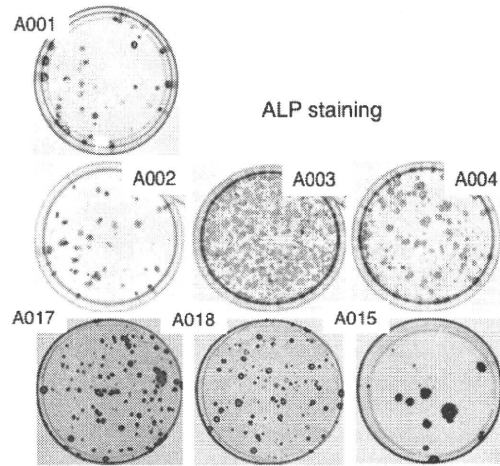
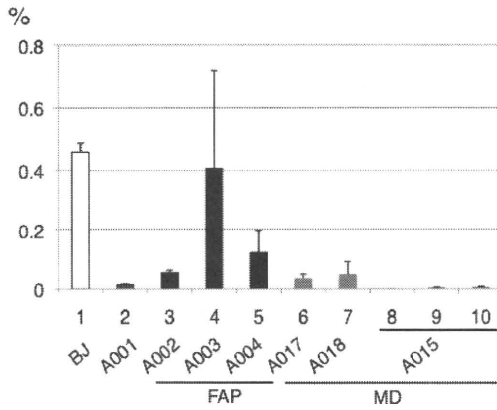
研究代表者には初期化用通常ベクターおよび血液細胞用高濃度ベクターを大量生産し、精製品を提供した<sup>(文献)</sup>。一方で筋ジストロフィー患者由来線維芽細胞(ディシユエンヌ型: DMD, A015, 17およびベッカー型: BMD, A018) から複数株のiPS細胞を樹立した。誘導効率および樹立株数を昨年度実績の糖原病およびFAP患者由来細胞からのものを合わせ図に示した(図1)。本年度も新たに昨年度のiPS細胞誘導を追加実施した。誘導の元となる線維芽細胞株により誘導効率が異なり、年齢・性別・疾患・継代数と相関はなかった。A015は通常のSeVベクター(kit)では誘導が難しかったが、新規に開発した温度感受性株(TS7)を高MOI(通常3のところを30)で使用した場合および、高効率3因子(OCT3/4, SOX2, KLF4)同時搭載SeVベクター(polycistronic, KOS)を使用することでiPS細胞の樹立に成功した。これらの外来因子フリー・難治性疾患由来iPS細胞株

のヒトESマーカーの発現を、RT-PCRで解析し、すべての株でNANOGおよびTERT遺伝子が発現していることを確認し、免疫染色でもOCT3/4, NANOG, Tra-1-60, -81, SSEA4陽性であった(図2)。RT-PCRおよび抗SeV抗体による免疫染色により、継代数8以降(誘導後約2~3ヶ月)にSeVベクター陰性を確認した(図3)。以上のiPS細胞株はすべてバンク化に備え凍結保管し、一部を熊本大学へ提供した。

#### D. 考察

細胞質増殖型・RNAウイルスであるSeV由来の組み換えベクターを用いて、我々は難病疾患患者由来線維芽細胞から短期間にて効率よく外来因子フリーのiPS細胞を誘導することに成功した。誘導の難しい細胞からは、より高効に誘導が可能な新型のSeVベクターを用いることにより問題を克服した。患者負担の少ない、血液細胞からiPS細胞の樹立方法も確立し、現プロジェクトに応用している。これらのiPS細胞株は染色体にランダムに外来遺伝子が組み込まれる恐れもなく、本来の親細胞の遺伝的形質を維持しているものと考えられ、その後の難治性疾患の発症機序や病態解析、薬効スクリーニングなどの応用研究に、外来因子挿入のノイズのない材料提供が可能となったと考えられる。最終年度は、さらに疾患数を増やし、バンク化の充実をはかると共に、得られたiPS細胞の機能解析や分化誘導、病態解析、遺伝子治療の可能性などの探索的な研究を熊本大学と共に進めていく予定である。

図1. Efficiency of induction (%)



no.	fibroblasts	disease	P	age/sex	SeV vector	ave. efficiency (%)	established SeV (-) clones
1	BJ	normal	8	neonatal /M	kit	0.46	NT
2	patient A001	Lysosome disease		34/M	kit	0.016	8
3	patient A002		10+1	51/F	kit	0.054	22+ 8
4	patient A003	FAP	5+4	33/F	kit	0.41	22+14
5	patient A004		2+10	44/F	kit	0.12	22+11
6	patient A017	DMD	3+1	2/M	kit	0.034	4
7	patient A018	BMD	1+1	8/M	kit	0.048	9
8					kit	0	0
9	patient A015	DMD	1+1	18/M	TS7, high MOI	0.0047	2
10					KOS polycistronic	0.0068	2

図2. Immunostaining

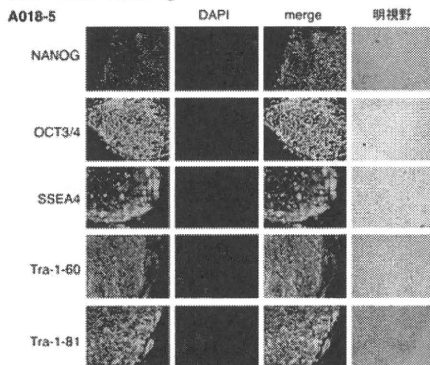
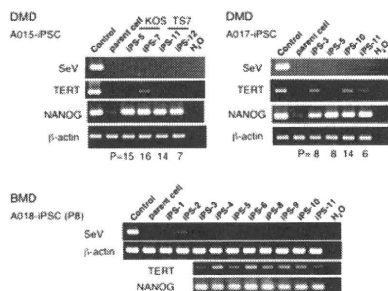


図3. RT-PCR



## E. 結論

熊本大学で樹立した筋ジストロフィー患者（ディシュエンヌ型、ベッカー型）由来線維芽細胞からSeVベクター（従来型・新型ベクター）を用いて複数株のiPS細胞の樹立に成功し、すべてのiPS細胞に対して、ヒトESマーカー：*NANOG*, *TERT*の発現と、外来遺伝子フリーを確認した上で、凍結保管を行った。また熊本大学に対しても、SeVベクター（従来型・血液細胞用高濃度ベクター）の提供を行い、多くの疾患由来iPS細胞の樹立に役立てた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya

H, **Fusaki N**, Hasegawa M, Fukuda K. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Cell Stem Cell. 2010, 7:11-14.

・ **房木ノエミ** : 「センダイウイルスベクターによるiPS細胞作製法」 Medical Science Digest (ニューサイエンス社) vol.37, No.1, 2011, p7-9.

## 2. 学会発表 国際会議

・ **Noemi Fusaki**, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa.: Simple and Efficient Preparation of Immaculate Human iPS Cells with Transgene-Free and No Chromosomal Damages Using an Extranuclear Manipulation System of Genetic Information, PlasmEx™. 13th ASGCT annual meeting, Washington DC, USA 2010/5/22

・ Hiroshi Ban, **Noemi Fusaki**, Toshiaki Tabata, Koichi Saeki, Akihiro Iida, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa.: Erasable Non-Integrating RNA Replicon Vectors for Generation of Immaculate iPS Cells Free from Transgenes and Sequence-Interference. 13th ASGCT annual meeting, Washington DC, USA 2010/5/21

・ **Noemi Fusaki**, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Koichi Saeki and Mamoru Hasegawa: TEMPERATURE SENSITIVE SENDAI VIRUS VECTORS ENABLE TO GENERATE COMPLETELY TRANSGENE-FREE HUMAN IPS CELLS EFFICIENTLY. ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, USA 2010/6/18

・ **Noemi Fusaki**, Hiroshi Ban, Toshiaki Tabata, Mamoru Hasegawa, **Hironobu Ihn and Takumi Era** : Comprehensive generation of intractable disease patient-specific induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors for cell banking using non-integrating Sendai virus vectors.

Keystone symposium 2011/1.31-2.4

## 国内会議

・ **房木ノエミ**、長谷川護: Highly efficient generation of transgene-free iPS cells using temperature sensitive Sendai virus RNA vectors. 発生生物学会 (京都) 2010/6/21 (招待講演)

・ **Noemi Fusaki**, Hiroshi Ban, Koichi Saeki, Toshiaki Tabata and Mamoru Hasegawa: SIMPLE AND EFFICIENT GENERATION OF FOREIGN-GENE-FREE HUMAN iPS CELLS WITHOUT CHROMOSOMAL DAMAGE USING SENDAI VIRUS RNA VECTORS. 日本遺伝子治療学会(宇都宮) 2010/7/1, Plenary

・ Hiroshi Ban, **Noemi Fusaki**, Akihiro Iida, Yasuji Ueda, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa: AN ERASABLE (HIT-AND-RUN) VECTOR BASED ON RNA REPLICON VIRUSES MAY BE USEFUL IN CELL-PROGRAMING/REPROGRAMING WITHOUT CHROMOSOMAL DAMAGES. 日本遺伝子治療学会(宇都宮)2010/7/1

・ **江良択実**、**房木ノエミ** : 「難治性疾患由来からのiPS細胞の樹立」  
日本再生医療学会 2011/3/1 (招待講演)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特願2010-192753

「多能性幹細胞を誘導するための組成物  
およびその使用」 伴 浩志、上田泰次、房  
木ノエミ、佐伯晃一、長谷川 護 (ディナ  
ベック株式会社)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

#### IV 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Era, T	Mesoderm cell development from ES cells	Methods Mol Biol.	636	87-103	2010
Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K.	Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells.	Cell Stem Cell	7	11-14	2010
房木 ノエミ	センダイウイルスベクターによる iPS 細胞作製法	Medical Science Digest.	37	7-9	2011

V 研究成果の刊行物・別冊

# Mesoderm cell development from ES cells

Takumi Era MD, PhD

Department of Cell Modulation, Institute of Molecular Embryology and  
Genetics, Kumamoto University,  
2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan.

TEL: 81-96-373-6589 FAX: 81-96-373-6590

Email: [tera@kumamoto-u.ac.jp](mailto:tera@kumamoto-u.ac.jp)

## Keywords

Embryonic stem cell (ES cell), Induced pluripotent stem cell (iPS cell),  
Mesoderm, Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2),  
Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ).

## **Abstract**

Pluripotent stem cells such as embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem (iPS) cells have attractive attention as a source of cells for use in therapeutic application. However, as the *in vitro* differentiation culture does not provide usefully positional information for cell type definition, this system definitely requires visible markers to identify and monitor the intermediates that present on the way of differentiation. We have been developing the cell surface markers against the various types of mesoderm in the ES cell culture. Using it, we have identified the intermediates of mesoderm and dissected their differentiation pathways in ES cell differentiation. The method described here could be useful for inducing and purifying mesoderm cells from iPS as well as ES cell cultures.

## **1. Introduction**

### **1.1. Mesoderm development in the embryos**

In mouse embryo, mesoderm development starts at E6.5 and, for a short time, dramatically produces three major types of mesoderm; organizer, embryonic mesoderm and extra-embryonic mesoderm (1, 2). The most initial mesoderm appears at a proximal region in epiblasts of embryo as an early gastrula organizer (EGO) (3). EGO migrates into anterior part of embryo and become to mid gastrula organizer (MGO) that contributes to axial mesoderm. While organizer migrates, the epiblast at posterior region subsequently begin to transform to second type of mesoderm; embryonic mesoderm, in primitive streak (4). Along with the elongation of primitive streak distally, embryonic mesoderm become to diversify region-specifically two types of mesoderms, paraxial and lateral mesoderm, which eventually forms a majority of mesoderm progenies such as bone and blood cells, respectively. The epiblasts at the proximal part of embryo also produce a third type of mesoderm; extra-embryonic mesoderm. The precursors of this mesoderm move into the nascent streak and migrate to extra-embryonic part in which they mainly give rise to primitive hematopoietic cells and endothelial cells (5, 6).

### **1.2. Flat culture for *in vitro* ES cell culture**

The major aim of *in vitro* ES cell culture is to establish the culture condition that induces ES cell to the efficient differentiation for specific cell lineages (7). Embryoid-body (EB) formation method seemed to be suitable for attaining this. The method is based on the idea that ES cell differentiation requires the environments which are similar to those present in the actual embryo. However, EB exhibits a complex structure that disturbs the cells inside to meet the appropriate signals from outside. As



a result, the culture conditions around EB are not able to exclude differentiation into unnecessary lineages. Previous our study demonstrated that EB culture is less efficient in inducing mesendoderm cells expressing *Goosecid*, which is one of the markers for EGO, than the two-dimensional (2D) culture on collagen IV-coated dishes (8). This result indicates an inherent limitation of EB system in guiding ES cell differentiation, as uncontrollable complexity is inevitably associated with three-dimensional architecture in EB. To overcome the obstacle of EB formation, we prefer to use the flat culture system rather than EB formation method for an *in vitro* ES cell differentiation.

### 1.3. Differentiation of mesoderm cells in *in vitro* ES cell culture

ES cell have the multiple potentials to give rise to a whole cell types in mouse body and to undergo unlimited symmetrical divisions with maintaining its pluripotency (9). The high ability for differentiation and unlimited growth capacity lead us to expect to utilize it as the source of cell therapies such as transplantation. Moreover, the forced differentiation system of ES cell *in vitro* has been expected to use as a good tool to find the developmental pathways into the specific cell lineage and to dissect them from others. However, as ES cell differentiation culture does not provide usefully positional information for cell type definition, this system definitely requires visible markers to identify and monitor the intermediates that present on the way of differentiation. In fact, availability of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2, FLK1) that marks the subtypes of mesoderm cells with a potential to give rise to hematopoietic cells (HPCs) and endothelial cells (ECs) facilitates our understanding on the developmental pathways of these lineages (10-12). Another important surface marker involving in mesoderm development is Platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ) that is mainly expressed in paraxial mesoderm during mouse embryogenesis (13-15). We have exploited these markers for dissecting the differentiation course of ES cell-derived mesoderm cells. Our previous results obtained from *in vitro* ES cell culture shows that PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> cell (DP) that initially appears at day 3.5 ES cell culture is a common precursor for PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>VEGFR2<sup>-</sup>(PSP) and PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup>VEGFR2<sup>+</sup>(VSP) cells (16). Based on the results of *in vitro* fate analysis, we found a new differentiation pathway in which the DP gives rise to both the PSP and the VSP that eventually differentiate into bone and cartilage cells, and HPCs and ECs, respectively (Fig. 1)(16). These indicate that PSP and VSP populations represent the paraxial and lateral mesoderm populations in actual mouse embryo, respectively. The analyses for gene expression in both populations also support the hypothesis that PSP and VSP correspond to paraxial and lateral mesoderms, respectively (Fig. 2).

## 2. Materials

### 2.1. ES cell lines

With numerous ES cell lines currently available, we recommend feeder-free ES cell lines such as CCE, EB3, EB5 and E14tg2a (*17, 18*). Before real experiments, each cell line should first be examined for its ability to generate VEGFR2<sup>+</sup> and PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> cells. CCE is usually analyzed in our laboratory.

### 2.2. Reagents for ES cell maintenance

1. KNOCKOUT-Dulbecco's modified Eagle's medium (KO-DMEM, Invitrogen cat. no. 10829-018) is stored at 4°C.
2. Leukemia inhibitory factor (LIF) (Chemicon International, cat. no. ESG1107) was purchased as 1x10<sup>7</sup> U/ml in a rubber-capped vial. Use a 1-ml syringe with a needle to push 1 ml of air into the bottle and pull out all the liquid. Aliquots of 100 $\mu$ l each (1x10<sup>6</sup> U) are stored in sterilized cryotubes at -80°C.
3. Fetal bovine serum (FBS) pretested for ES cells. (see **Note 1**).
4. 0.1% (w/v) Gelatin (Sigma cat. no. G2500)  
Add 0.5g Gelatin into 500ml deionized water (culture-grade) and autoclaved. Store at room temperature.
5. Dulbecoco's Phosphate Buffered Saline without calcium and magnesium chloride (D-PBS; Invitrogen cat. no. 14190-250).
6. 2-Mercaptoethanol (2-ME) (Sigma cat. no. M7522): stock solution: 1000X (0.1M). Add 70  $\mu$ l 2-ME to 10 ml PBS and sterilized by 0.2- $\mu$ m filter. Store up to 4 weeks at 4°C. Final concentration in medium: 10<sup>-4</sup> M.
7. L-Glutamine (200mM; 100X Invitrogen cat. no. 25030-081) and Penicillin-streptomycin (P/S; 100X Invitrogen cat. no. 15140-122) are stored in 15-ml centrifuge tubes as 5 ml aliquots at -20°C.
8. Non-Essential Amino Acids (NEAA; 100X Invitrogen cat. no. 11140-050) is stored at 4°C.
9. 0.25% (w/v) trypsin-EDTA (Invitrogen cat. no. 25200-072) is stored in 10 ml aliquots at -20°C.
10. 6 cm and 10 cm culture dishes (Becton Dickinson cat. no. 353802 and 353003)
11. ES cell culture medium: KO-DMEM + 15%FBS + 10<sup>-4</sup> 2-ME + 2mM L-glutamine + 1XP/S + 0.1 mM NEAA + 1000 U/ml LIF. Store up to 4 wk at 4°C.

### 2.3. Reagents for OP9 stromal cell maintenance

1. Minimum essential medium  $\alpha$  medium ( $\alpha$ MEM) with ribonucleosides and deoxyribonucleosides (Invitrogen cat. no. 12571-063)

2. FBS pretested for OP9 cells. (see **Note 1**).
3. D-PBS
4. L-Glutamine and Penicillin-streptomycin
5. 0.05% (w/v) trypsin-EDTA (Invitrogen cat. no. 25300-062) is stored in 10 ml aliquots at -20°C.
6. OP9 culture medium:  $\alpha$ MEM + 20%FBS + 2mM L-glutamine + 1XP/S.

#### **2.4. Reagents for *in vitro* ES cell differentiation without OP9**

1.  $\alpha$ MEM
2. FBS pretested for *in vitro* ES cell differentiation. (see **Note 2** ).
3. 2-ME: Final concentration in medium:  $5 \times 10^{-5}$  M.
4. L-Glutamine (200mM 100X)
5. Penicillin-streptomycin (100X)
6. BIOCOAT Collagen IV-coated 10cm dish (Becton Dickinson cat. no.35 4453)
7. Differentiation culture medium:  $\alpha$ MEM + 10%FBS +  $5 \times 10^{-5}$ M 2ME + 2mM L-Glutamine + 1X P/S (see **Note 3**)

#### **2.5. Reagents for *in vitro* ES cell differentiation with OP9**

1.  $\alpha$ MEM
2. FBS pretested for *in vitro* ES cell differentiation. (see **Note 2** ).
3. L-Glutamine (200mM 100X)
4. Penicillin-streptomycin (100X)
5. OP9 differentiation culture medium :  $\alpha$ MEM + 20%FBS + 2mM L-Glutamine + 1X P/S

#### **2.6. Reagents for Purification of mesoderm cells**

1. D-PBS
2. Cell dissociation buffer (Invitrogen cat. no. 13150-016)
3. 0.25% (w/v) Trypsin-EDTA (Invitrogen cat. no. 25200-072)
4. Neutralization buffer for Cell dissociation buffer and Trypsin-EDTA: D-PBS + 10%FBS
5. Normal mouse serum (NMS). NMS can be prepared from in-house or can be purchased (Chemicon international cat. no. S25-10ML). Sterilized by 0.2- $\mu$ m filter and aliquots of 500  $\mu$ l each are stored in sterilized tubes at -20°C.
6. Hank's balanced Salt Solution (HBSS) (10X Invitrogen cat. no. 14185-052)  
HBSS/BSA: 1X HBSS + 1% bovine serum albumin (BSA) (Sigma cat. no. A-1253)
7. HBSS/BSA/PI: HBSS/BSA with 5mg/ml propidium iodide (Sigma cat. no. P-4170)
8. Anti-VEGFR2 (AVAS12): Phycoerythrin-conjugated (eBioscience cat. no. 12-5821) and Allophycocyanin-conjugated (eBioscience cat. no. 17-5821)

9. Anti-PDGFR $\alpha$  (APA5)(eBioscience cat. no. 13-1401) Biotin-conjugated
10. Allophycocyanin-conjugated Streptavidin (SAV-APC eBioscience 17-4317)

### **2.7. Reagents for bone cell differentiation from ES cell-derived mesoderm cells**

1. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM Invitrogen cat. no. 10569-010)
2. FBS pretested for in vitro ES cell differentiation. (see **Note 2**).
3. L-Glutamine (200mM 100X)
4. Penicillin-streptomycin (100X)
5. Dexamethasone (Sigma cat. no. D8893)
6. Ascorbic acid 2-phosphate (Sigma cat. no. 49752)
7.  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma cat. no. G6251)
8. Recombinant Human BMP4 (R&D systems cat. no. 314-BP)
9. 24-well culture plate (Becton Dickinson, Falcon 353047)
10. Bone cell differentiation medium : DMEM + 10%FBS + 2mM L-Glutamine + 1X P/S + 0.1  $\mu$ M Dexamethasone + 50 $\mu$ M ascorbic acid 2-phosphate + 10mM  $\beta$ -glycerophosphate + 10 ng/ml BMP4
11. 4% Paraformaldehyde solution (PFA) (Sigma cat. no. 158127)
12. Alizarin red S (Sigma cat. no. A5533)
13. Ammonium hydroxide solution (28%, Sigma cat. no. 338818)
14. Alizarin red staining solution:

Solution A: 1g Alizarin red S + 100 mL Distilled water

Solution B: 0.1 ml Ammonium hydroxide solution + 100 mL Distilled water

Mix solution A well. Adjust the pH 6.36-6.40 with solution B. The pH is critical, so make fresh or check pH if the solution is more than one month old. Keep at room temperature upto 6 mo.

### **2.8. Reagents for cartilage cell differentiation from ES cell-derived mesoderm cells**

1.  $\alpha$ MEM
2. FBS pretested for in vitro ES cell differentiation. (see **Note 2**).
3. L-Glutamine (200mM 100X)
4. Penicillin-streptomycin (100X)
5. Dexamethasone
6. Ascorbic acid 2-phosphate
7. Recombinant Human TGF- $\beta$ 3 (R&D systems cat. no. 243-B3)
8. Recombinant Human BMP2 (R&D systems cat. no. 355-BM)
9. 24-well culture plate (Becton Dickinson, Falcon 353047)
10. Cartilage cell differentiation medium:  $\alpha$ MEM + 10%FBS + 2mM L-Glutamine + 1X P/S + 0.1  $\mu$ M Dexamethasone + 170 $\mu$ M ascorbic acid 2-phosphate