

④スタン I : 赤色 219号に含有されていた不純物であるスタン I が原因で、女性の顔面に、初期には発赤、かゆみなどの炎症症状をきたし、やがて紫灰色から紫褐色の色素沈着へと進展するリール黒皮症(女子顔面黒皮症)が1970年代中頃を中心に発生した。その後メーカーの安全性保証の強化に伴い、発生率は減少し、現在ではほとんど認められなくなった。

5.2.7 化粧品の安全管理^{1,25)}

GVP (Good Vigilance Practice : 製造販売後安全管理基準)に関する省令に基づき、医薬品、医薬部外品、化粧品および医療機器の各々に携わる製造販売業者は、市販後の安全性を担保するために、定められた基準にしたがって、情報の収集、作成、保管および報告を実行することが求められている。とくに、化粧品においては、成分のほとんどを自己責任のもとで配合することができるため、GVPは非常に重要なものといえる。 [森 真輝]

文 献

- 1) 薬事日報社 化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック検討会 (2006) : 化粧品・医薬部外品 製造販売ガイドブック 2006, 薬事日報社.
- 2) 日本化粧品工業連合会 編 (2008) : 化粧品の安全性評価に関する指針 2008, 薬事日報社.
- 3) 板垣 宏, 萩野滋延 (2008) : 動物実験代替法への化粧品企業における取り組み, ファルマシア, 44, 863-868.
- 4) The international agency for research on cancer (IARC) : IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC, Lyon.
- 5) Rietschel, R.L. and Fowler, J.F., Jr., Eds. (2001) : Fisher's contact dermatitis 5th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Pennsylvania.
- 6) 荒田次郎監修 (2004) : 標準皮膚科学 第7版, 医学書院.
- 7) 独立行政法人 科学技術振興機構 : 日本化学物質辞書 Web, http://nikkajiweb.jst.go.jp/nikkaji_web/pages/top.html
- 8) The national center for biotechnology information (NCBI) : PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- 9) Klaassen, C.D., Ed. (2007) : Casarett and Doull's toxicology - The basic science of poisons - 7th ed., McGraw-Hill, New York.
- 10) Champion, R.H., Burton, J.L. and Ebling, F.J.G., Eds. (1992) : Textbook of dermatology 5th ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 11) 国際化学物質安全性計画 (IPCS) : 国際化学物質安全性カード (ICSC) - 日本語版 -, <http://www.nihs.go.jp/ICSC/>
- 12) Baran, R. and Maibach, H.I., Eds. (1998) : Textbook of cosmetic dermatology 2nd ed., Martin Dunitz, London.
- 13) 日本ビタミン学会編 (1996) : ビタミンの事典, 朝倉書店.
- 14) 田村建夫, 廣田 博 (1999) : 化粧品科学—理論と実際 第3版, フレグランスジャーナル社.
- 15) The U.S. food and drug administration (FDA) : <http://www.fda.gov/>
- 16) 中村 淳, 高野勝弘 (2006) : 化粧品の国際法規制の現状とハーモナイゼーションの課題 国際法規制の現状とグローバル化ゼーション, フレグランスジャーナル, 1月号, 17-20.
- 17) 高橋理佳 (2006) : 米国の化粧品の法規制の現状と課題 国際法規制の現状とグローバル化ゼーション, フレグランスジャーナル, 1月号, 21-24.
- 18) The cosmetic ingredient review (CIR) (2007) : 2007 CIR Compendium, CIR, Washington, D.C.
- 19) The national institute for occupational safety and health (NIOSH) : Search the NIOSH Website, <http://www.cdc.gov/niosh/srchrpage.html>
- 20) 伊東和子 (2006) : EUにおける化粧品規制とその課題 国際法規制の現状とグローバル化ゼーション, フレグランスジャーナル, 1月号, 25-30.
- 21) European Commission-Enterprise and Industry : http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/html/consolidated_dir.htm
- 22) The international fragrance association (IFRA) : <http://www.ifraorg.org/>
- 23) 光井武夫編 (2001) : 新化粧品学 第2版, 南山堂.
- 24) Sato, Y., Katsumura, Y., Ichikawa, H., Kobayashi, T., Kozuka, T., Morikawa, F. and Ohta, S. (1981) : A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens, Contact Dermatitis, 7, 225-237.
- 25) 厚生労働省 : 医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療機器の製造販売後安全管理の基準に関する省令, 平成16年9月22日, 厚生労働省令第135号.

5.3 食品, 食品添加物, 食品汚染物質, 飼料添加物

5.3.1 食品

食品とは、食品衛生法第4条に「食品とは、すべての飲食物をいう。ただし、薬事法に規定する医薬品および医薬部外品は、これを含まない」と定義されている。飲食によって起こる健康障害は食性病害 (food borne disease) とも呼ばれている。食品衛生上、ヒトの健康維持に有害な因子が食品中に含まれる可能性は、その生産、採取、製造、輸入、加工、処理、保存、輸送、陳列、販売、調理、から摂取までの各段階で考慮しなければならない。

a. 食品による健康障害 この有害因子としては、食中毒や経口感染症を引き起こすコレラ、赤痢などの細菌、A型肝炎ウイルスなどのウイルス、トキソプラズマ、アニサキスなどの寄生虫のほかに、マイコトキシン (かび毒)、環境汚染物質 (ダイオ

キシソ類など)、残留農薬、容器からの溶出物といったいわゆる食品汚染物質。テトロドトキシソ (フグ毒)、ドーモイ酸 (記憶喪失性貝毒)、ムスカリン (キノコ毒)、サイカシン (ソテツ実に含まれる毒) といった天然毒性物質などもあり、きわめて多種多用である。本来トキシソロジー領域では、細菌、ウイルス、寄生虫などによる感染症ではなく、細菌毒素、天然毒性物質などの生物由来の化学物質と、産業化学物質、残留農薬や環境に由来する物質等人工的な化学物質が対象となるが、食中毒時などでは感染と毒素、双方が関与してくることに注意を払う必要がある。以下に、飲食によって起こる健康障害の代表例を原因により分類し記載する。

1) 食品自身によるもの 植物性・動物性の天然毒性物質 (フグ毒、貝毒、キノコ毒、青酸化合物など)、過剰摂取による被害 (イシナギ肝臓中のビタミン A) などがある。急性毒性だけでなく、発がんのおそれのある変異原性物質 (ソテツ実に含まれるサイカシンが腸内細菌により代謝を受けて生じるメチルアゾキシメタノール、ワラビの中のプタキロサイドなど) にも注意が必要である。また、食品由来の成分には、その作用・機能が未知の化学物質が存在するため、いわゆる健康食品を代表例として、過去の食経験が活かされないような抽出や濃縮が行われると、この未知成分による健康被害を引き起こされる可能性がある。実例として、トウダイグサ科の植物アマメシバによる閉塞性細気管支炎を挙げることができる¹⁾。

2) 食品の変質によるもの²⁾ 食品成分が微生物、酵素、酸素、光などにより質的に変化する (変質) ことがある。タンパク質が微生物により分解され、悪臭物質 (アンモニア、メルカプタン、硫化水素、インドール、アミン類など) を生成し変質することを一般に腐敗という。腐敗の進行は、温度、pH、水分含量、成分により著しく異なる。糖質、脂質等の成分も変質するがこの場合は一般に変敗といい、アルコールなど有用な化合物を生成する場合は発酵といい、区別されている。変敗の中では、自動酸化による油脂の変質が問題となることが多いが、これは熱、光、金属などにより加速される。高度不飽和脂肪酸 (リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸など) の油脂過酸化物および二次生成物であるマロンアルデヒドやアクロレインなどのアルデヒ

ド類などが生成する。

3) 細菌、かび、ウイルス、寄生虫などによる付着・汚染によるもの 食中毒菌 (腸炎ビブリオ菌、サルモネラ菌、ブドウ球菌など)、経口感染症の病原菌 (赤痢菌、腸チフス菌、コレラ菌、腸管出血性大腸菌 O 157 など) や、ウイルス (ノロウイルス、A 型肝炎ウイルスなど)、原虫 (アメーバ赤痢など)、寄生虫 (アニサキスなど) が原因で起きる。

かびの場合、マイコトキシソが問題となる。これは、かびなどの真菌類が産生する低分子の二次代謝産物で急性あるいは慢性毒性を現す。かびは熱に弱い、耐熱性のマイコトキシソが存在する (アフラトキシソは 300℃でも安定)。マイコトキシソの例として、アフラトキシソ、オクラトキシソ、フモニソ、パツリン、デオキシニパレノール、麦角アルカロイド (エルゴタミンなど) が挙げられる。

ヘリコバクター・ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、胃および十二指腸潰瘍の原因として注目されているらせん型の細菌である。経口感染が疑われている。ウレアーゼにより胃粘液中の尿素をアンモニアと二酸化炭素に分解し、生じたアンモニアで局所的に胃酸を中和し胃へ定着する。

牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) は、異常プリオンタンパクによって媒介されると考えられている病気の 1 つで、1990 年代になって BSE に感染した牛の特定危険部位 (脳、せき髄など) をヒトが食べたことによる発症が疑われる変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の症例が見つかり世界的に大問題となった。異常プリオンは、通常の調理による加熱では失活しない。

4) 加工過程で生成する化学物質によるもの³⁾ 発酵、燻蒸、加熱などの加工過程で実験動物において発がん性を有する、ニトロソアミンやヘテロサイクリックアミン (複素環アミン) などが生成することが示されている。ニトロソアミンは食品中にも微量存在しているが、それ以上の量が、食品どうしあるいは添加物等との組み合わせにより、生体内で容易に生じる。たとえば、野菜などに多量に含まれている硝酸塩が口腔や消化管内の細菌によって還元されて亜硝酸塩になり、胃内の酸性条件下で魚などに多く含まれる第二級アミンと反応しニトロソアミンが生成する。ヘテロサイクリックアミンは、アミノ酸やタンパク質の加熱により生成するもので、ト

リプトファンからは Trp-P-1 や Trp-P-2 が、グルタミン酸からは Glu-P-1 や Glu-P-2 などが生じる。魚干物を加熱調理すると MeIQ などが生成する。

フェオホルバイド (pheophorbide) は、クロロフィル分解物のひとつで、摂取したヒトに光過敏症を誘発することがある。1997年に粗悪なクロレラを摂取し光過敏症が起き問題となった。アワビの中腸腺の摂取時でも、含まれる葉緑素由来のフェオホルバイドと考えられる光過敏症例が報告されている。

不飽和脂肪酸は天然ではほとんどの場合シス型であるが、最近になって、植物油等の製造時の水素添加などの過程や加熱調理過程等でシス型の不飽和脂肪酸から生じるトランス脂肪酸による心血管系障害が懸念されている。なお、トランス脂肪酸は牛など反すう動物の胃内細菌により生成することも知られている。

5) 外来物質の混入、残留、汚染によるもの
環境汚染物質(ダイオキシン類, PCB, メチル水銀, カドミウム, 鉛, ヒ素, クロムなど), 過量の残留農薬・食品添加物・飼料添加物(ホルモン剤など), 食器や包装物からの溶出物(フタル酸エステルやビスフェノール A など), 放射性物質などが挙げられる。また水の汚染, たとえば, 塩素消毒時の消毒副生成物(トリハロメタンなど)や湖沼の富栄養化により大量発生したアオコ等らん藻由来の毒(マイクロシスチンなど)などにも注意が必要である。

また, 加工過程での生成や容器包装からの溶出による混入ではなく, 製品の保存中に新たな化学物質が生じるという事例もある。清涼飲料水中にベンゼンが低濃度検出されることが欧米等諸外国で公表され(2006年), 製品中の安息香酸(保存料)とアスコルビン酸(酸味料, 酸化防止剤)が, 製品の保存中に特定の条件下で反応し低濃度のベンゼンが生成することが判明した。その後ベンゼン生成を低減する措置がとられている³⁾。

6) 食物アレルギーによるもの ヒトによっては, 特定の食物の摂取によってアレルギーが引き起こされる。その多くは即時型のアレルギー反応であり, 重篤な場合は, 呼吸困難等のアナフラキシー症状を呈する。多くの場合, 抗原はタンパク質である。発生頻度が高い食物としては, えび, かに, 小麦, そば, 卵, 乳および落花生が知られている。これら7品目は特定原材料として, 表示が義務づけら

れている。また特定原材料に準ずるものとして, あわび, いくら, さば等の18品目についても表示が推奨されている。

7) 飲食物と医薬品の相互作用によるもの この例として, 1) 納豆(ビタミンK合成能が高い納豆菌)の摂取により, ワルファリンの作用が減弱, 2) 牛乳や高脂肪食摂取により, 難水溶性薬物(インドメタシン, ニトロフラントインなど)の吸収率が増加, 3) 食餌による胃酸分泌亢進により, 酸に不安定な薬物(ペニシリン, エリスロマイシンなど)の吸収率低下, 4) モノアミン酵素阻害薬(イソニアジドなど)投与を受けているヒトでの, ヒスタジンを含む魚の摂取によるヒスタミンによる中毒あるいはチーズやワインに含まれるチラミンの血圧上昇作用の促進, 5) グレープフルーツジュース中のフラノクマリン類に起因する薬物代謝酵素(CYP3A4)阻害による薬物(ニフェジピン, シクロスポリンなど)血中濃度の増大, あるいは酵素誘導による血中濃度の低下(セントジョーンズワートなどの摂取によるCYP3A4誘導, 芽キャベツによるCYP1A2誘導), などを挙げることができる。

このような食性病害を防ぐには食品の衛生管理と品質管理も重要となるが, この管理法として, 検査結果が明らかとなったときには出荷済みとなり手遅れとなる最終製品の抜き取り検査のようなものではなく, アメリカで開発された HACCP (hazard analysis and critical control point) という食品品質管理システムがある。食品の製造工程全般を通じて危害の発生原因を分析し重要管理事項を定めるもので, 日本の食品衛生法でも採用され日本の企業でも導入されつつある²⁾。

b. 食品衛生に関する法規²⁾ 日本での食品衛生行政は「飲食物その他の物品取締に関する法律」の制定にはじまり(1900年), 当時は内務省が行政を担当し警察官により取締りが行なわれた。第二次大戦後, 新憲法のもと食品衛生行政が厚生省の所管となり, これまでの食品衛生に関する法律, 規則が見直され「食品衛生法」が公布(1947年), 翌年施行された。この法律の目的は, 「食品の安全性の確保のために公衆衛生の見地から必要な規制その他の措置を講ずることにより, 飲食に起因する衛生上の危害の発生を防止し, もって国民の健康の保護を図ること」と定められている。食品衛生に関する監視,

指導のため、国、都道府県および政令指定都市に「食品衛生監視員」が設けられている。なお、2003年に残留農薬の規制に関して食品衛生法が改正となり、ポジティブリスト制が導入され、基準値が設定されていない農薬を一律基準である0.01ppm以上含む食品は、国内では流通できないこととなった。厚生労働省が管轄する調査・研究機関としては、国立医薬品食品衛生研究所、(独)国立健康・栄養研究所などがある。また厚生労働大臣の諮問機関として厚生労働省内に「薬事・食品衛生審議会」が設置されている。他方、厚生労働省が食品衛生法を管轄するのに対し、農林水産省は、『農林物質の規格化および品質表示に関する法律(JAS法: Japanese Agricultural Standard)』(1950年制定)を所管している。

なお、食品衛生法及びJAS法において、同じ期限表示項目に「品質保持期限」及び「賞味期限」という2つの用語が使用され、わかりにくい表現となっていたが、両省による「食品の表示に関する共同会議」の協議を経て、2003年より「賞味期限」に統一された。またこれと同時に食品衛生法とJAS法において別々に定義されていた「消費期限」の定義が統一された。

食品の安全を確保するための法律が厚生労働省と農林水産省に分かれていたが、2003年に『食品安全基本法』が公布・施行され両省から独立した『食品安全委員会』が設立された。食品安全委員会は、7名の委員から構成される。食品の安全性の確保に関する施策の策定に当たってはリスク評価とリスク管理を分離し、1) 食品健康影響評価(リスク評価)の実施、2) リスク評価に基づいた施策の策定(リスク管理)、3) 関係者相互間の情報および意見の交換(リスクコミュニケーション)を行うこととなった。リスク評価は新設の食品安全委員会が担当し、リスク管理はこれまで通り厚生労働省および農林水産省などが担当することとなった。また食品安全委員会は、関係者相互の情報と意見の交換によって社会的合意を得るという「リスクコミュニケーション」を推進することとなった。

c. 保健機能食品⁴⁾ 食品のなかには、国が定めた安全性や有効性に関する基準等を満たした「保健機能食品」がある(健康増進法・食品衛生法)。他方、いわゆる健康食品(栄養補助食品、健康補助

食品、サプリメントなどの名称も含む)は、法律上の定義はなく、広く健康の保持増進に資する食品として販売・利用されるもの全般を指している。保健機能食品は、特定保健用食品および栄養機能食品の2種類の類型からなり、それぞれ独自の表示をすることができる。

特定保健用食品は、身体の生理学的機能などに影響を与える保健機能成分を含み、厚生労働大臣により許可または承認された食品であり約850品目がある(2009年4月現在)(個別許可型)。栄養機能食品は、不足しがちな栄養成分(ビタミン・ミネラル)の補給のために利用される食品で、規格基準に適合すれば許可申請や届け出は不要である(規格基準型)。その他、健康や栄養に関する表示が行える食品として、病者用、乳児用、妊産婦用などの特別の用途に適するという表示ができる特別用途食品がある(病者用食品、高齢者用食品など)。特別用途食品として食品を販売するには、その表示について国の許可を受ける必要がある。これらを除いては、食品のもつ効果や機能を根拠なく表示することは、医薬品と誤認されるような効能・効果表示と見なされ、薬事法により禁止されている。

d. 遺伝子組換え食品(遺伝子組換え食品表示)²⁾

遺伝子組換え技術によって改良した生物から得られた食品を遺伝子組換え食品と呼ぶ。この技術により、食品生産を量的・質的に向上させるだけでなく、害虫や病気に強い農作物の改良や、加工特性などの品質向上に利用されることが期待されている。具体的には、除草剤グリホサートに抵抗性をもたせた大豆などの除草剤に耐性がある農作物、バチルス属の細菌由来の殺虫タンパク遺伝子を発現させたトウモロコシなどの害虫に抵抗性がある農作物、遺伝子操作でオレイン酸含量を増加させた大豆などの高栄養価の農作物などである。遺伝子組換えサケなども食用に検討されている。

遺伝子組換え食品のうち、大豆、とうもろこし、ばれいしょ、菜種、綿実、アルファルファ、てん菜を原材料とする加工食品については、食品衛生法施行規則で組換えDNA技術応用作物の食品に関する表示に関する規定が設けられており、農産物およびこれを原材料とする加工食品であって、加工後も組み換えられたDNAまたはこれによって生じたタンパク質が残存するものについては、「遺伝子組換え

表5.3.1 食品添加物の一日摂取量と許容一日摂取量 (ADI) との比較 (平成14・15年度) (文献5より抜粋)

食品添加物名	一日摂取量 (mg/人)	許容一日摂取量 (ADI) (mg/kg/day)	日本人の平均体重 (50kg) における一日あたりの許容摂取量 (mg/人)	摂取量のADIに占める割合 (%)
食用赤色2号アマランス	0.006	0.5	25	0.02
食用黄色4号タートラジン	0.469	7.5	375	0.13
亜硫酸	0.154	0.7	35	0.44
ソルビン酸	13.56	25	1250	1.08
アスパルテーム	5.853	40	2000	0.29
アセスルファムK	0.736	15	750	0.1
スクラロース	0.31	15	750	0.04

である」ことまたは「遺伝子組換え不分別である」ことを表示することが義務づけられている。

e. 放射線照射食品 食品貯蔵期間延長や殺菌・殺虫の目的のために、X線、ガンマ線や電子線などの放射線を照射することがある。日本ではジャガイモの発芽防止のための放射線照射のみが認められているが、外国では香辛料、食肉、果実等、多くの食品についても認められている。

5.3.2 食品添加物

a. 食品添加物の法規制 食品衛生法において、食品添加物 (food additive) は、「この法律で添加物とは、食品の製造の過程においてまたは食品の加工もしくは保存の目的で、食品に添加、混和、浸潤その他の方法によって使用する物をいう」と定義されている。日本の食品添加物は、1995年の食品衛生法の大幅改正以降、法規制上の分類では、下記の4種類に区分される。このうち、2~4が、いわゆる天然添加物に相当する。

1:「指定添加物」ソルビン酸やキシリトールなど393品目 (2009年6月現在)。

2:「既存添加物」クチナシ色素、カラメル、ペクチンなど418品目 (2009年6月現在)。アカネ色素が2004年に消除された。

3:「天然香料」バニラ香料やカニ香料など約600品目 (2009年6月現在) が例示されている。

4:「一般飲食物添加物」正式名:「一般に食品として飲食に供されている物であって添加物として使用されるもの」イチゴジュースや寒天など約100品目 (2009年6月現在) が例示されている。

指定添加物は、食品衛生法第10条に基づき、厚

生労働大臣が定めたもので、食品衛生法施行規則別表第1に収載されている。原則として、厚生労働大臣が定めたもの以外の製造、輸入、使用、販売等は禁止されており、この指定の対象には、化学的合成品だけでなく天然物も含まれている。ただし例外的に、「天然香料」および「一般飲食物添加物」を、指定制度の対象外としている。また今後新たに使われる食品添加物は、天然、合成の区別なくすべて食品安全委員会による安全性の評価を受け、厚生労働大臣の指定を受けたのち、「指定添加物」となる。既存添加物は、既存添加物名簿に収載されている。1995年に食品衛生法が改正され、指定の範囲が化学的合成品のみから天然物を含むすべての添加物 (ただし、天然香料と一般飲食物添加物を除く) に拡大された。既存添加物名簿に新たな品目を追加することは認められず、ヒトの健康を損なうおそれがあると認められるとき、および流通実態がないと認められるときには、既存添加物名簿から消除できる。2004年ヒトの健康を損なうおそれがあるとしてアカネ色素が消除された。天然香料は動植物から得られる天然の物質で食品に香りを付ける目的で使用される添加物、一般飲食物添加物は、一般に飲食に供されているもので添加物として使用されるものと定められている。

食品添加物は必要に応じて食品添加物の品目ごとあるいは対象となる食品ごとに規格 (添加物の本質・基原、含量、純度など成分について最低限遵守すべき項目を示した成分規格) や基準 (添加物の製造、使用、表示に関する基準) が定められている。

個々の食品添加物の成分規格・基準は「食品、添加

物等の規格基準」(厚生省告示, 1959年)に記載されている。この内容は、「食品添加物公定書」という名称で冊子体として4~8年ごとに刊行されている。「食品添加物公定書」は1960年にはじめて作成されたが、その後、製造・品質管理技術の進歩および試験法の発達等を受け改訂され、2009年現在、第8版が刊行されている。また、食品に使用した食品添加物は、指定添加物、既存添加物、天然香料、一般飲食物添加物の区別なく、原則としてすべて表示することが義務づけられている。保存料、甘味料等の8用途で使用したものについては、その用途名も併記する必要がある。用途名としては、1) 甘味料、2) 着色料、3) 保存料、4) 増粘剤、安定剤、ゲル化剤または糊料、5) 酸化防止剤、6) 発色剤、7) 漂白剤、8) 防かび剤または防ばい剤、の8種類が定められている(厚生省生活衛生局長通知「食品衛生法に基づく添加物の表示等について」)。

食品添加物のうち、香料、酸味料、調味料、乳化剤など14種類の目的に使用される食品添加物については、一括名による表示が認められている。米国では、経験や科学的な知見から専門家が判断して一般的な使用法においてリスクがないものとみなされた物質をGRAS (generally recognized as safe) 物質として使用できるようにしている⁷⁾。GRAS物質は「一般的に安全と考えられるもの」と訳されている。1958年の食品添加物規制の大幅な改訂の際に設けられた、GRAS物質の届け出には民間の科学的専門家による一定の定められた科学的手順に基づいた適切な評価があればよく、政府(FDA)の判断を除外するわけではないが要求していない点が特徴として挙げられる。米国のFlavor and Extract Manufacturers Association (FEMA)(米国食品香料製造者協会)ではFDAの了解のもとに、食品香料(フレーバー)に関するFEMA GRASと呼ばれる物質リストを作成しており、リスト中の物質は米国で自動的に食品に使用できることとなっている。

b. 食品添加物の安全性評価⁸⁾ 食品添加物の安全性評価は、物質の代謝や実験動物を用いた毒性試験結果等の科学的なデータに基づき、食品安全委員会の行う食品健康影響評価(リスク評価)によって審議され、食品添加物ごとに許容一日摂取量(acceptable daily intake: ADI)が設定される。この結果を受けて、薬事・食品衛生審議会において食

品添加物としての指定の可否、成分規格、使用基準などにつき審議・決定される。ADIは、ヒトがある物質を毎日生涯にわたって摂取し続けても、現在の科学的知見からみて、健康への悪影響がないと推定される一日あたりの摂取量であり、毒性試験から求められた無毒性量(NOEL)を安全係数で除して算出され、通常mg/kg/dayで表される。安全係数は通常、種差と個体差の観点からそれぞれに10倍を見込み、これらを乗じた100が用いられているが、固定されたものでなく、評価に使われたデータが不足している場合や現れた毒性が、神経毒性、発がん性、催奇形性など重篤な場合には追加の係数が加えられることがあり、500など数値は変わりうる。なお、いわゆる健康食品の主成分など、食品自身に由来し薬事法・食品衛生法等の法律で規定されていない化学物質に関しては、通常、安全係数の概念は適用されずADIの算出も行われない。

毒性試験については、標準的実施方法の指示のもと、(1) 28日反復投与毒性試験、(2) 90日反復投与毒性試験、(3) 1年間反復投与毒性試験、(4) 繁殖試験、(5) 催奇形性試験、(6) 発がん性試験、(7) 1年間反復投与毒性/発がん性併合試験、(8) 抗原性試験、(9) 遺伝毒性試験、(10) 一般薬理試験、を検討することが定められている(1996年厚生省通知「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針について」)。こうした毒性試験の整備に伴い、これまでに人体への悪影響を考慮して消除されたものだけで十数種にのぼる。例として、着色料の食用赤色1号(肝障害、肝がん)、甘味料のサイクラミン酸ナトリウム(チクロ)(膀胱がん、催奇形性)、甘味料のズルチン(肝障害、肝がん)、保存料のAF-2(変異原性、染色体異常試験陽性)、既存添加物であったアカネ色素(腎がん)がある⁹⁾。

食品添加物の摂取状況については、厚生労働省により、マーケットバスケット方式および食品添加物の生産流通統計量に基づく一日摂取量推定調査が実施されている。マーケットバスケット方式とは、スーパーなどで売られている食品を購入し、そのなかに含まれている食品添加物量を分析して測り、その結果に国民栄養調査に基づく食品の喫食量を乗じて推定摂取量を求める方式をいう。この調査結果の一例をADIとともに表5.3.1に示す⁵⁾。

c. 食品添加物規制の国際標準化⁵⁾ 食品添加

表5.3.2 マイコトキシンによる食品汚染²⁾(一部改変)

マイコトキシンの種類	主な原因カビ	主な汚染食品	毒性様式
	<i>Aspergillus</i> 属		
アフラトキシン (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂ など約20種類の誘導体)	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	ピーナッツ, トウモロコシ, 麦, 米, 綿実	肝がん, 肝障害
ステリグマトシスチン	<i>A. versicolor</i>	穀類	肝がん, 肝硬変, 血管肉腫
オクラトキシン	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i>	ピーナッツ, トウモロコシ, 麦, コーヒー豆	腎がん, 腎障害
	<i>Penicillium</i> 属		
ルテオスカイリン	<i>P. islandicum</i>	穀類 (米)	肝がん, 肝硬変
シトリニン	<i>P. citrinum</i>	穀類 (米)	腎障害
シトレオピリジン	<i>P. citreoviridae</i>	穀類 (米)	神経毒性
バツリン	<i>P. expansum</i>	麦芽根, 小麦, リンゴ加工品	消化管障害, 腎機能障害
	<i>Fusarium</i> 属		
ニバレノール	<i>F. culmorum</i>	トウモロコシ, 麦, 米	免疫系・造血器・消化管障害
デオキシニバレノール	<i>F. graminearum</i>	トウモロコシ, 麦, 米	免疫系・造血器・消化管障害
T-2トキシン	<i>F. sporotrichioides</i>	トウモロコシ, 麦, 米	免疫系・造血器・消化管障害
ゼアラレノン	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	トウモロコシ, 麦	不妊症 (エストロゲン様作用)
フモニシン	<i>F. moniliforme</i> (<i>F. verticillioides</i>)	トウモロコシ, 麦, 大豆, アスパラ	肝がん, 腎障害, ウマの白脳軟化症
	<i>Claviceps</i> 属		
麦角アルカロイド (エルゴタミンなど)	<i>C. purpurea</i>	穀類 (麦)	神経毒性, 循環器毒性, 流産

物の規格や基準については、それぞれの国の法律により定められており、各国間で相違点がある。他方で、国際的な貿易が盛んとなり、食品の輸出や輸入が増大し、食品の安全性を確保しつつ、規制を整合化することが、国際的な課題となっている。食品添加物については、国連食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization, FAO) / 世界保健機関 (WHO) の合同食品規格委員会 (コーデックス委員会; Codex Alimentarius Commission) の食品添加物部会において検討がなされている。また、食品添加物の安全性について国際的な評価を行う機関としては、国連食糧農業機関/世界保健機関合同食品添加物専門家会議 (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives: JECFA) がある。JECFAは、コーデックス委員会とは独立しているが、コーデックス委員会に対して助言を行っている。

5.3.3 食品汚染物質²⁾

有害な化学物質による食品の汚染は、偶然あるいは過失で混入する場合と、環境汚染物質として食品に残留する場合が考えられてきたが、最近ではメラ

ミン添加牛乳事件や事故米の食品への転用で明らかになったように、意図的な犯罪行為への対応も考慮する必要が出てきた。なお、メラミン混入ペットフードにより2007年に米国を中心に多数の犬や猫が腎不全等で死亡する事件が起きたが、米国獣医師会は、メラミンとその不純物シアヌル酸との反応から生じた結晶がその原因物質である可能性を報告している。

a. 加工製造中の不純物混入による汚染 この実例として、粉乳中にヒ素が混入したヒ素ミルク事件 (1955年)、米ぬか油にPCB (ポリ塩化ビフェニル) に混入した事件 (カネミ油症, 1968年) を挙げることができる。ヒ素ミルク事件では、乳質安定剤として使用された工業用リン酸水素二ナトリウムに含まれていた不純物ヒ素を摂取したために起き、乳児の死亡を招いた。カネミ油症では、油を加熱脱臭するために、熱媒体として使用したPCBが熱交換パイプから漏出し、油に混入したためとされており、塩素痤瘡、色素沈着、肝障害などを招いた。なお、この油症の原因物質は、PCBに含まれていた

ダイオキシン類の一種であるポリ塩化ジベンゾフラン (polychlorinated dibenzofurabin, PCDF) と考えられている。

その他、食品容器に由来する化学物質による汚染で問題となっているものに、プラスチック製品の可塑剤のフタル酸エステル、合成原料のビスフェノール A などが挙げられ、これらは内分泌攪乱物質の可能性が示唆されている。同様に食器用合成樹脂合成原料である塩化ビニルモノマー、ホルムアルデヒド、アクリロニトリルなどの漏出や陶器から溶出した鉛なども食品衛生上問題となる。鉛は他にも鉛製の水道管からの溶出が問題となる。

b. 環境中に排出された重金属・化学物質による汚染 この代表的な事例として、水俣病およびイタイタイ病が挙げられる。水俣病は、排水中の、触媒として使用した無機水銀から副生されたメチル水銀が、魚介類に蓄積し、ヒトがこれを摂取することにより起きたものとされており、四肢のしびれ、歩行障害などが起きた(熊本県水俣市, 1956年)。また有機水銀は、胎盤を介し胎児に移行し、生まれた子どもに脳性麻痺等の症状が出た。その後、新潟県阿賀野川流域においても有機水銀中毒という第二水俣病(新潟水俣病)が発生した(1965年)。現在、魚類に蓄積した有機水銀量については国際的に注意が払われており、日本では自然界で水銀を蓄積しやすいサメ、メカジキ、キンメダイ、クジラ類の一部、マグロ類等の妊婦の摂取について注意が喚起されている。イタイタイ病は、富山県神通川下流域で、鉱山廃水に含まれて排出されたカドミウムを多量に含む米を摂取したため起きたものとされており、骨が非常に脆くなり骨折しやすい患者が多く出た(1955年)。

近年、船底防汚剤、木材防腐剤などとして使用されたトリブチルスズなどの有機スズ化合物が、水生生物に対して低い濃度で作用し、内分泌攪乱物質である可能性が示唆され、海洋汚染物質として、ヒトへの生体影響が懸念されている。

その他、環境中の化学物質による汚染で問題視されるものとして、ゴミ焼却場などから排出されるダイオキシン類や残留農薬が挙げられる。ダイオキシン類は、ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン (polychlorinated dibenzo-o-dioxin, PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) およびコプラナー

リ塩化ビフェニル (coplanar polychlorinated biphenyl, Co-PCB) の総称である(ダイオキシン類対策特別措置法)。塩素置換数と置換位置によってそれぞれ数多くの異性体が存在する。空気中で塩素源と炭素源が300℃程度の不完全燃焼することにより発生する。したがって、この発生はプラスチックの不完全燃焼だけとは限らないこととなる。ダイオキシン類の毒性の強さは異性体によって異なり、もっとも毒性が強いのは2, 3, 7, 8-テトラクロロベンゾ-p-ジオキシン (2, 3, 7, 8-TCDD) である。ダイオキシン類の毒性評価に際しては、2, 3, 7, 8-TCDDに対する毒性等価係数 (TEF) がWHOから提唱され、各異性体の TEF と残留濃度の積の合計量 (TEQ) を用いて検討されている。モルモットに極めて低用量で急性毒性 (2, 3, 7, 8-TCDD による半数致死量は、600ng/kg) を示した以外にも、実験動物に対し免疫毒性、発がん性や催奇形性などの毒性を示す。遺伝子改変マウスを用いた実験等から、この作用の多くが芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; Ah レセプター) (ダイオキシン受容体) を介して引き起こされるものと考えられている。

c. かびによる食品汚染⁹⁾ かび等の真菌類による食品汚染の中では、発がん性等ヒトや動物に有害作用を有する二次代謝産物として産生される毒の総称であるマイコトキシン (mycotoxin) による健康被害がとくに問題となる。主なマイコトキシンの種類と原因かび、汚染源、毒性様式について表5.3.2に示した。アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、フサリウム属 (*Fusarium*) の3属によるものがほとんどである。アフラトキシン B₁ には強い肝毒性と強い発がん性がある。ピーナッツ、トウモロコシ、麦などの貯蔵、輸送の管理が不適切だった場合に発生する。マイコトキシンにより引き起こされる障害は、肝障害、腎障害以外にも、ゼアラレノンのように家畜で不妊を起こすもの、エルゴタミン (麦角アルカロイド) のように血管収縮作用や子宮平滑筋収縮作用を有するものなど多彩である。日本では2009年現在、アフラトキシン B₁、デオキシニバレノール、パツリンの3種について規制している。アフラトキシン B₁ は、食品衛生法第6条により、全食品を対象に検出されてはならないと規制されている。パツリンについて

は、りんごの搾汁（ジュース）を対象に含有量が0.050ppmを超えるものであってはならないと規制されている（パツリン告示法）。デオキシニバレノールは、小麦を対象に暫定的な基準値1.1ppmが定められている。

なお、エルゴタミンは片頭痛治療薬として利用され、ゼアラレノンエストロゲン活性を有し、またフモニシンはスフィンゴ脂質の生合成経路を阻害するが、このようにマイコトキシンのなかには、細胞分子機能解析用の生理活性物質としても研究用試薬として注目されているものがある。

5.3.4 飼料添加物

飼料添加物（feed additive）とは、「飼料の安全性の確保および品質の改善に関する法律」（飼料安全法）において、「飼料の品質の低下の防止その他の農林水産省令で定める用途に供することを目的として飼料に添加、混和、浸潤その他の方法によって用いられる物で、農林水産大臣が農業資材審議会の意見を聴いて指定するものをいう」と定義されている。法の規制対象とする家畜等は経済動物に限定することが妥当と考えられている。2003年に改正された政令で定められた動物（家畜等）は、家畜（牛、豚、めん羊、山羊およびしか）（馬は対象外）、家禽（鶏およびうずら）、みつばち、養殖魚（ぶり、まだい、まあじ、ひらめ、すずき、すぎ、くろまぐろ、うなぎ、あゆなど23種）の計31種となっている。飼料添加物は、飼料の品質の低下の防止（抗酸化剤、防かび剤、乳化剤等）、飼料の栄養成分その他の有効成分の補給（アミノ酸、ビタミン、ミネラルなど）、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進（抗生物質、合成抗菌剤、生菌剤等）を目的として添加される（2004年現在で合計153種）。それぞれ対象飼料や添加量が定められている。また、BSEの新たな発生を防止するため、牛の餌については、骨肉粉などの動物由来タンパク質が混入してはいけないことが定められている。

ヒトへの健康被害との関連では、過剰摂取あるいは抗生物質における薬剤耐性などが問題となるが、抗生物質、合成抗菌剤については、「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」によって、投与用量や出荷前の使用禁止期間が定められている。また、動物用医薬品として投与されたホルモン剤や抗生物質等の食肉への残留も問題となるが、これもこの省令

により投与用量や出荷前の使用禁止期間が定められている。したがって抗生物質はその用途により「飼料添加物」と「動物用医薬品」の両方に含まれ、飼料安全法、薬事法により、それぞれに使用規制がある。ヒトへの健康被害防止に際しては、これらの物質のモニタリングが重要となっている。

食品中の飼料添加物と動物用医薬品の残留は、残留農薬と同様にポジティブリスト制が導入されており、基準値が設定されていないものには、一律基準が適用される。残留基準は、食品安全委員会により定められたADIに基づき、厚生労働省の薬事・食品衛生審議会において定められる。

なお、犬、猫等の愛がん動物用の飼料（ペットフード）は、飼料安全法において規制の対象とされていなかったが、この安全性の確保を図るため、2009年6月1日より「愛がん動物用飼料の安全性の確保に関する法律（ペットフード安全法；農林水産省・環境省共管）が施行された。2009年6月現在、政令により愛がん動物は犬と猫と定められている。

〔北嶋 聡〕

文 献

- 1) 内藤裕史 (2007) : アマメシバ, 健康食品・中毒百科7, p.35, 丸善.
- 2) 石井秀美, 杉浦隆之編著 (2005) : 衛生薬学, 5食品衛生行政と法規 (p.96), 食品成分の変質と保存 (p.115), 8経口感染症と食中毒 (p.151), 9化学物質による食品汚染 (p.157) の各項参照, 朝倉書店.
- 3) 清涼飲料水中のベンゼンについて (平成18年7月) : 厚生労働省 報道発表資料 : <http://www-bm.mhlw.go.jp/houdou/2006/07/h0728-4.html>
- 4) 健康食品のホームページ : 厚生労働省 保健機能食品・健康食品関連情報 : <http://www-bm.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/hokenkinou/index.html>
- 5) 食品添加物に関するホームページ : 厚生労働省 : <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokuten/gaiyo.html>
- 6) 伊藤誉志男 (2007) : 日本人の食品添加物の一日摂取量調査研究 マーケットバスケット方式 (25年間のまとめ) : FFI JOURNAL, Vol. 212, p. 815-p. 838, No. 10.
- 7) Klaassen, C.D.編 (2004) : キャサレット&ドール トキシコロジー 第6版, 第30章 食品のトキシコロジー, サイエンティスト社, p.1216.
- 8) 小西 良子, 杉山 圭一 (2008) : カビ毒のリスク評価と国際的な動向, 食品衛生学雑誌 49 : 1-10.

Maintenance of Embryonic Stem Cell Pluripotency by Nanog-Mediated Dedifferentiation of Committed Mesoderm Progenitors

Atsushi Suzuki, Ángel Raya, Yasuhiko Kawakami, Masanobu Morita, Takaaki Matsui, Kinichi Nakashima, Fred H. Gage, Concepción Rodríguez-Esteban and Juan Carlos Izpisua Belmonte

Abstract Embryonic stem (ES) cells can be propagated indefinitely in culture while retaining the ability to differentiate into any cell type in the organism. The molecular and cellular mechanisms underlying ES cell pluripotency are, however, poorly understood. Here, we characterize a population of early mesoderm-committed (EM) progenitors that is generated from mouse ES cells by bone morphogenetic protein (BMP) stimulation. We further show that EM progenitors are actively dedifferentiated to ES cells by the action of Nanog, which, in turn, is directly up-regulated in EM progenitors by the combined action of leukemia inhibitory factor (LIF) and the early mesoderm transcription factor T/Brachyury. Finally, we demonstrate that this negative feedback mechanism contributes to the maintenance of ES cell pluripotency. These findings uncover specific roles of LIF, Nanog, and BMP in the self-renewal of ES cells and provide novel insights into the cellular bases of ES cell pluripotency.

Keywords Pluripotency · T (Brachyury) · Self-renewal · Mesoderm differentiation · Leukemia inhibitory factor

1 Introduction

Mouse embryonic stem (ES) cells are permanent cell lines derived from pre-implantation embryos [1, 2] that display the peculiarities of combining unlimited self-renewal and pluripotency abilities while retaining a normal karyotype. In practical terms, these peculiarities mean that mouse ES cells can be maintained in culture for indefinite periods of time while conserving their ability to differentiate into any cell

type if the appropriate context is provided, either in vivo or in vitro [3].

Strict culture conditions must be followed in order to maintain the self-renewal of pluripotent mouse ES cells. Two extrinsic culture requirements, a feeder layer of fibroblasts and the addition of fetal bovine serum, have been identified to be necessary to sustain proliferation of undifferentiated mouse ES cells and their activities pinpointed to specific molecules [4]. Thus, self-renewal of mouse ES cells can be sustained in feeder-free conditions by supplementing the culture media with the cytokine leukemia inhibitory factor (LIF) [5, 6]. In the absence of LIF, ES cell colonies flatten and form epithelial-like sheets [5, 6]. More recently, the self-renewal-promoting activity of animal serum has been identified to be mediated by ligands of specific families of the transforming growth factor- β (TGF β) superfamily, including the bone morphogenetic protein (BMP) family members BMP2 and BMP4, and the growth and differentiation factor (GDF) family member GDF6 [7]. In the absence of BMP/GDF signals, LIF is not sufficient to prevent the neural differentiation of ES cells, whereas the absence of both BMP/GDF and LIF stimulation results in a flattened cell phenotype similar to that of LIF withdrawal [7].

The intracellular signaling cascades initiated by both LIF and BMP/GDF that sustain self-renewal of mouse ES cells have been worked out in a significant degree of detail [4]. In summary, binding of LIF to its cognate LIF receptor results in the recruitment of gp130 and the formation of a ternary complex that catalyzes the tyrosine phosphorylation, dimerization, and nuclear translocation of the downstream signal transducer STAT3. BMP/GDF, in turn, promotes ES cell self-renewal by inducing the expression of members of the Inhibitor of differentiation (Id) family of negative transcriptional modulators, most likely mediated by activation of the TGF β downstream signal transducer Smad1 [7].

In addition to extrinsic requirements, the pluripotency of mouse ES cells has been shown to depend on intrinsic determinants, such as the expression of the POU transcription factor Oct4 [8] and the divergent homeodomain-containing

J.C.I. Belmonte (✉)
Gene Expression Laboratory, Salk Institute for Biological Studies,
10010 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037; Center of
Regenerative Medicine in Barcelona, Dr. Aiguader 88, 08029
Barcelona, Spain
e-mail: belmonte@salk.edu

factor *Nanog* [9, 10]. Both factors are absolutely required for ES cells to maintain their pluripotent identity. Thus, the lack [8] or down-regulation [11] of *Oct4* expression induces trophoectoderm differentiation, whereas ES cells lacking *Nanog* function differentiate to endoderm lineages [9]. The relationships between extrinsic and intrinsic determinants of ES cell identity are only recently beginning to be understood. The maintenance of pluripotent ES cell self-renewal by *Oct4* requires functional LIF/STAT3 and BMP/GDF/Id signaling cascades [7, 11], but the function of LIF/STAT3 does not appear to be the maintenance of *Oct4* expression [11]. Overexpression of *Nanog*, in turn, circumvents the necessity of either LIF or BMP/GDF stimulation [7, 10], although synergism between *Nanog* function and LIF/STAT3 signaling has been noted [10].

The manipulation of mouse ES cells is currently a standard tool in many laboratories, inasmuch as it allows the generation of mice carrying targeted gene mutations for the direct analysis of a gene's function. Moreover, the ability of mouse ES cells to give rise in vitro to virtually any cell type of the organism has been exploited to gain insights into the molecular and cellular mechanisms of cell differentiation to specific lineages. However, most of the recent interest in ES cell research results from the successful derivation of human pluripotent cell lines [12, 13], which created new prospects for future cell replacement therapies. Many basic questions about the biology of these promising cells need be answered if their potential is to be realized. Human ES cells share with their mouse homonyms the peculiarities of self-renewal and pluripotency. The molecular mechanisms by which self-renewal and pluripotency are maintained in human and mouse ES cells, however, appear to differ [14]. Moreover, the cellular bases of pluripotency of either mouse or human ES cells are largely unknown. How intrinsic and extrinsic determinants of ES cell identity crosstalk to maintain cell pluripotency, whether the symmetric self-renewal of pluripotent ES cells depends on a truly symmetrical cell division, on a particular resistance of ES cells to undergo cell differentiation – yet retaining the ability to do so, or on the reversal of early steps of cell differentiation, and what kinds of mechanisms operate in ES cells so they maintain pluripotency are still open questions.

Here we show that mouse ES cells cultured on feeders in the presence of LIF and serum contain committed mesoderm progenitors, the number of which is dependent on the amount of LIF in the culture medium. By clonal analyses, we show that, in the presence of LIF the commitment of these cells to mesoderm fate can be reverted, so that they give rise to fully pluripotent ES cells. We further demonstrate that the process of dedifferentiation of committed mesoderm progenitors is important to maintain the pluripotency of mouse ES cells over long-term cultures, and that this process is regulated by *Nanog*. Specifically, we show that *Nanog* expression is up-regulated in mesoderm progenitor cells by the combinatorial action of STAT3 and the mesoderm-specific transcription factor *T/Brachyury*. Finally, we provide evidence from gain- and loss-of-function experiments demonstrating that *Nanog* prevents the progression of BMP-induced mesoderm differentiation of ES cells by directly binding to Smad1 and interfering with the recruitment of co-activators, thus blocking the transcriptional activation of downstream targets, including that of *T/Brachyury*.

2 Results

To characterize the early steps of mouse ES cell differentiation toward mesoderm lineages, we generated transgenic ES cell lines expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the regulatory sequences of *T/Brachyury* (*T*), which encodes one of the earliest markers of mesoderm differentiation [15, 16]. The expression of eGFP in nine independent *T-eGFP* ES cell lines faithfully recapitulated that of endogenous *T*, as assayed by the presence of *T* transcripts in *T-eGFP*-positive [T(+)] cells sorted from embryoid bodies differentiated in vitro, and by their absence in *T-eGFP*-negative [T(-)] cells (Fig. 1A). Interestingly, colonies of undifferentiated *T-eGFP* ES cells grown under standard culture conditions (on a fibroblast feeder layer in culture medium containing serum and 1000 μ /mL of LIF) contained T(+) cells. These cells were found in small numbers (1–3 cells per colony) in colonies of otherwise undifferentiated morphology (6.7%, $n = 120$, Fig. 1B), and no colonies formed exclusively by T(+) were ever detected under these

Fig. 1 (continued) 400 μ /mL of LIF. Bar shows mean \pm SD ($n = 4$). (E, F, G) Colony formation from single T(-) or T(+) cells isolated from *T-eGFP* ES cells obtained at P20 with 1000 μ /mL of LIF (E), at P20 with 400 μ /mL of LIF (F), or at P4 without LIF (G). Scale bar = 10 μ m. Graphs show the percentage of colonies containing only T(+) or T(-) cells, or both types of cells (mosaic colony) formed from purified T(-) or T(+) cells. Bar shows mean \pm SD ($n = 3$; 40 colonies were examined in each dish). (H, I) ES cells cultured with 400 μ /mL of LIF expressed the mesoderm marker *T*, but not ectoderm or endoderm markers.

RT-PCR analyses of ectoderm (*Sox1*), mesoderm (*T*), and endoderm (*Hnf4 α*) marker genes in *T-eGFP* ES cells obtained at P20 (1000 and 400 μ /mL of LIF) or P4 (without LIF) (H). Western blotting analysis of T in *T-eGFP* ES cells obtained at P20 (1000 and 400 μ /mL of LIF) or P4 (without LIF) (I, J). Western blotting analysis of tyrosine-phosphorylated STAT3 (STAT3-P) in *T-eGFP* ES cells obtained at P20 (1000 and 400 μ /mL of LIF) or P4 (without LIF). Total STAT3 levels are shown as a control. Panels A-B and H-J are reproduced with permission of Nature Publishing Group [48].

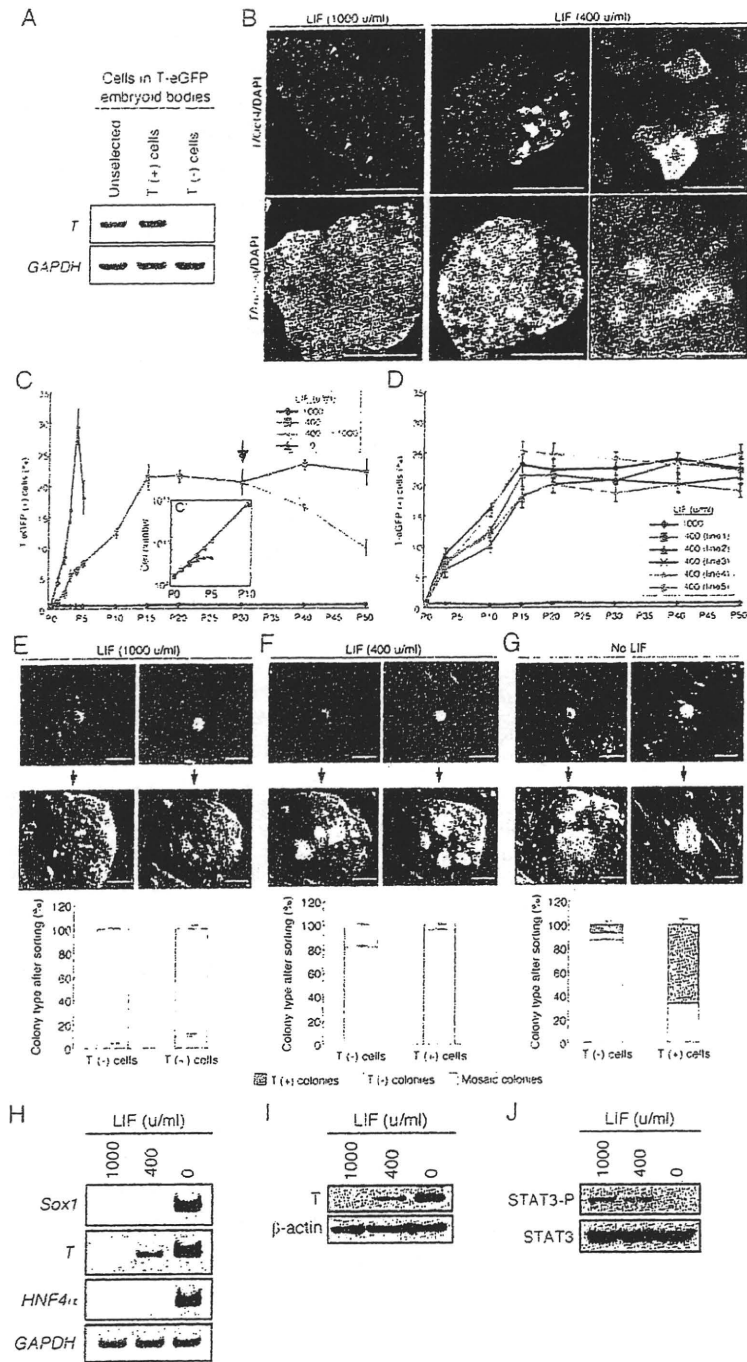


Fig. 1 LIF regulates the percentage of *T*-expressing cells in mouse ES cell cultures. (A) RT-PCR analysis of *T* expression in *T-eGFP* embryoid bodies (unselected cells), and in *T*(+) or *T*(-) cells isolated from *T-eGFP* embryoid bodies. *T-eGFP* expression recapitulated endogenous *T* expression. (B) Fluorescent images of *T* (eGFP)/Oct4 and *T* (DsRed2)/*Nanog* (eGFP) expression in mouse ES cell colonies at passage (P) 25 in culture with 1000 or 400 μ M of LIF. DAPI staining identifies individual cells in each field. *T*(+) cells were observed not only in colonies formed in culture with 400 μ M of LIF (right and center panels), but also in colonies formed in culture with 1000 μ M of LIF (left panels, arrowheads). Scale bar = 50 μ m (left and center

panels) or 10 μ m (right panels). (C) Flow-cytometric analysis of *T*(+) cells in *T-eGFP* ES cell cultures with various LIF concentrations (1000, 400, and 0 μ M). A portion of ES cells cultured with 400 μ M of LIF was retreated with 1000 μ M of LIF from P30 (shown by arrow). Bar shows mean \pm SD ($n = 4$). (C') Growth of *T-eGFP* ES cells expressed by the number of cells in culture with 1000, 400, or 0 μ M of LIF ($n = 4$). (D) Flow-cytometric analysis of *T*(+) cells in five independent ES cell lines carrying the *T-eGFP* reporter, cultured with 1000 or 400 μ M of LIF. Cell line 1, 2, 3, 4, and 5 corresponds to J1, SAT1, SAT2, SAT6, and SAT11, respectively. Five independent ES cell lines exhibited similar dynamics of *T*(+) cell-accumulation in culture with

culture conditions. Flow cytometric analyses of cultures of *T-eGFP* ES cells revealed a $0.59 \pm 0.05\%$ of T(+) cells ($n = 4$), a fraction that remained virtually invariable after more than 50 passages (Fig. 1C). These findings are consistent with the widely known (though frequently overlooked) fact that mouse ES cells, even when maintained under optimal culture conditions, exhibit some degree of spontaneous differentiation. Indeed, this very fact has been recognized as a hallmark of a "good" ES cell line [3]. Our observation is also consistent with the identification of *T* as a transcript selectively enriched in undifferentiated mouse ES cells [9, 17].

3 Mouse ES Cells Contain a Population of T-Expressing Cells

We reasoned that, if the fraction of T(+) cells remained constant at 0.5% after continuous passaging, the rate at which T(+) cells were produced by spontaneous differentiation must be in equilibrium with their disappearance. A priori, the most likely scenarios involved lengthening of the cell cycle and eventual mitotic arrest of T(+) cells, selective cell death, the progression of differentiation with loss of *T* expression, or a combination of these mechanisms. To directly address these possibilities, we analyzed the fate of individual T(+) cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS) and plated at clonal density. Surprisingly, T(+) cells gave rise to colonies that contained only a few or no T(+) cells, and which were of similar size and undifferentiated characteristics as those generated by T(-) cells, as judged by their morphology (Fig. 1E) and transcription profile (data not shown). These results suggest the possibility that T(+) cells are not selectively eliminated from undifferentiated ES cell cultures; rather, they undergo a dedifferentiation process that gives rise to undifferentiated T(-) progeny.

Since the addition of LIF is critical for the maintenance of undifferentiated ES cells, we next investigated whether the percentage of T(+) cells in our cultures depended on the amount of LIF in the culture medium. *T-eGFP* ES cells cultured in the absence of exogenous LIF differentiated extensively over time and could not be grown over five passages (Fig. 1C'). Under these conditions, the percentage of T(+) cells rose exponentially (Fig. 1C) and markers of ectoderm, mesoderm, and endoderm lineages were expressed (Fig. 1H), indicating that the majority of ES cells underwent spontaneous differentiation. T(+) cells sorted from cultures maintained for three to four passages in the absence of LIF displayed a dramatically reduced ability to generate colonies containing T(-) cells, when compared with cells grown in medium containing 1000 μM of LIF (Fig. 1G). In contrast, reduction of exogenous LIF to 400 μM resulted in colonies of normal ES cell morphology (Fig. 1B) that could be maintained in culture for over 50 passages with no signs

of differentiation or crisis. This finding is consistent with the range of exogenous LIF concentrations reported to sustain self-renewal of pluripotent mouse ES cells [6, 18], with the activation of STAT3 phosphorylation under these conditions (Fig. 1J), and with the fact that ES cells cultured in medium containing 400 μM of LIF for extended periods of time, when injected into blastocysts, result in degrees of chimerism and contribution to the germline not different from ES cells maintained in 1000 μM of LIF (our unpublished observations).

Despite their apparently undifferentiated morphology, colonies of *T-eGFP* ES cells adapted to grow in medium supplemented with 400 μM of LIF contained large numbers of T(+) cells (Fig. 1B). The adaptation process was gradual, so that the percentage of T(+) cells increased over time when the cells were switched to culture medium containing 400 μM of LIF and reached a plateau of $21.2 \pm 2.0\%$ at 15 passages ($n = 4$), after which the fraction of T(+) cells remained constant (Fig. 1C). Also, the expression of *T* at both mRNA (Fig. 1H) and protein (Fig. 1I) levels was increased in cultures supplemented with 400 μM of LIF when compared with *T-eGFP* ES cells grown in medium containing 1000 μM . To rule out the possibility that the increased number of T(+) cells under these conditions represented a peculiarity of the ES cell line used in these experiments (J1), we established four independent ES cell lines from a different genetic background (C57BL/6 \times 129/TerSv) that were used to generate additional *T-eGFP* transgenic lines. With small variations, all four lines displayed similar dynamics of accumulation of T(+) cells when cultured in medium containing 400 μM of LIF (Fig. 1D).

Other than the increased numbers of T(+) cells, we could not detect any differences in cultures maintained with 400 versus 1000 μM of LIF. Thus, the increase in *T* expression was not accompanied by up-regulation of other transcripts involved in mesoderm differentiation, and no markers of ectoderm or endoderm differentiation were detected in ES cell cultures supplemented with 400 μM of LIF (Fig. 1H). Moreover, T(+) cells generated under these conditions showed proliferation rates similar to T(-) cells when plated at high density (0.2×10^6 cells yielded $4.18 \pm 0.27 \times 10^6$ and $4.00 \pm 0.31 \times 10^6$ cells, respectively, after 7 days in culture, $n = 3$; see also Fig. 1C'), displayed an ability to give rise to T(-) cells comparable to that of T(-) cells when plated at clonal density (Fig. 1F), co-expressed the pluripotency-associated markers *Oct4*, *Nanog*, and *Rea1* (Figs. 1B, 3A), and stained positive for alkaline phosphatase (not shown). Importantly, the number of T(+) cells in cultures supplemented with 400 μM of LIF declined progressively after the concentration of the cytokine was increased to 1000 μM (Fig. 1C). Taken together, our results indicate that, in cultures of mouse ES cells, a population of T(+) cells exists

whose size is controlled by the amount of LIF present in the culture medium. Importantly, lowering the concentration of LIF to 400 u/ml did not appear to be detrimental for the self-renewal of mouse ES cells, even though T(+) cells formed up to 20% of the cells in these culture conditions. For these reasons, and since the size of the T(+) fraction was more amenable to analysis, we continued our studies in culture medium containing 400 μ /ml. of LIF.

4 Reversal of Mesoderm Commitment of ES Cells by LIF

To characterize the identity of T(+) cells, we first analyzed their ability to generate differentiated progeny. For this purpose, we performed in vitro differentiation assays of bulk *T-eGFP* ES cells as well as of sorted populations of T(+) and T(-) cells. In these assays, unsorted ES cells and T(-) cells behaved similarly, giving rise to differentiated cells that expressed markers of ectoderm, mesoderm, and endoderm fates (Fig. 2A). In contrast, embryoid bodies formed from T(+) cells differentiated exclusively into cells expressing markers of mesoderm lineages (Fig. 2A), indicating that the T(+) cells present in our cultures of *T-eGFP* ES cells were lineage-committed. Thus, we termed this population of T(+) cells "early mesoderm-committed" (EM) progenitors.

In our experiments of colony formation from sorted cells plated at clonal density (Fig. 1E, 1F), EM progenitors gave rise to large numbers of T(-) cells. In light of the mesoderm commitment of T(+) cells, two possible scenarios could account for these findings: T(-) cells generated in these conditions could represent (i) a further step of mesoderm differentiation of EM progenitors, in which *T* was no longer expressed [16]; or (ii) undifferentiated ES cells dedifferentiated from EM progenitors. To investigate these possibilities, we analyzed the differentiation potential of T(-) cells generated from EM progenitors (Fig. 2B). In vitro differentiation assays revealed that T(-) cells derived from EM progenitor cells were able to give rise to cells of ectoderm, mesoderm, and endoderm lineages (Fig. 2C). Moreover, T(-) cells readily generated beating cardiomyocytes that stained positive for myosin, albumin-positive cells after prolonged periods under differentiation-promoting conditions, and Tuj1-positive cells after treatment with retinoic acid (Fig. 2D). We also analyzed the ability of T(-) cells to colonize embryo lineages in vivo after their introduction into mouse blastocysts. To trace the progeny of the injected cells, a constitutively expressed LacZ reporter was introduced into *T-eGFP* ES cells. We recovered 11 embryos from 2 independent injections of T(+) derived T(-) cells into mouse blastocysts, of which 5 were overtly chimeric. In these embryos LacZ-positive cells

contributed to organs of ectoderm, mesoderm, and endoderm lineages (Fig. 2F-2K). As a control for our in vitro and in vivo differentiation assays of T(-) cells, we analyzed T(+) cells generated from EM progenitors. In all cases, T(+) cells behaved the same as T(+) cells isolated from bulk cultures of *T-eGFP* ES cells, displaying in vitro differentiation potential restricted to mesoderm lineages (Fig. 2C) and failing to contribute to embryogenesis in vivo (we could not detect any signs of chimerism in eight embryos recovered; Fig. 2E). Our results show that T(+) cells represent a population of EM progenitors that, in the presence of LIF, are able to recover the abilities of self-renewal, pluripotency, and chimera contribution characteristics of mouse ES cells.

5 Nanog Regulates the Dedifferentiation of EM Progenitors

In our characterization of the transcriptional profile of EM progenitors, we did not detect changes in the expression of the pluripotency-associated markers *Oct4* and *Rex1* or in the levels of *Gbx2*, *Fgf5*, or *Lif* expression (see Discussion below). However, we detected a clear up-regulation in the expression of the pluripotency-associated marker *Nanog*, when compared to that of ES T(-) cells (Fig. 3A). Indeed, aside from the expression of *T* itself, these two cell populations only appeared to differ in the level of *Nanog* expression, raising the possibility that *Nanog* function is mechanistically linked to the transition of ES cells to EM progenitors, or vice versa. We investigated this possibility by directly manipulating the level of *Nanog* expression in *T-eGFP* ES cells and analyzing the consequences of such manipulations in the size and characteristics of the T(+) and T(-) cell populations. The introduction of a *Nanog* expression transgene driven by a strong constitutive promoter resulted in sustained overexpression of *Nanog* transcripts in *T-eGFP* ES cells (Fig. 3B). In these conditions, the expression of *T* was down-regulated (Fig. 3B), and the transition of EM progenitors to ES cells was facilitated, as evaluated by the ~3-fold reduction of T(+) cells (Fig. 3F) and the ~17-fold increase in the percentage of colonies composed exclusively by T(-) cells generated by EM progenitors overexpressing *Nanog* (Fig. 3H, 3J), when compared to mock-transfected *T-eGFP* ES cells (Fig. 3E, 3H, 3I).

For the converse experiment, down-regulation of *Nanog* function, we assayed the efficiency of short-hairpin RNAs (shRNAs) to induce partial *Nanog* silencing, since complete loss of *Nanog* function is incompatible with the pluripotent phenotype of ES cells [9]. Introduction of *Nanog-shRNA* into *T-eGFP* ES cells resulted in a marked decrease in the levels of *Nanog*, as evaluated by RT-PCR (Fig. 3D) and immunoblotting with specific antibodies (Fig. 3C). In these

whose size is controlled by the amount of LIF present in the culture medium. Importantly, lowering the concentration of LIF to 400 u/ml did not appear to be detrimental for the self-renewal of mouse ES cells, even though T(+) cells formed up to 20% of the cells in these culture conditions. For these reasons, and since the size of the T(+) fraction was more amenable to analysis, we continued our studies in culture medium containing 400 μ /ml. of LIF.

4 Reversal of Mesoderm Commitment of ES Cells by LIF

To characterize the identity of T(+) cells, we first analyzed their ability to generate differentiated progeny. For this purpose, we performed in vitro differentiation assays of bulk *T-eGFP* ES cells as well as of sorted populations of T(+) and T(-) cells. In these assays, unsorted ES cells and T(-) cells behaved similarly, giving rise to differentiated cells that expressed markers of ectoderm, mesoderm, and endoderm fates (Fig. 2A). In contrast, embryoid bodies formed from T(+) cells differentiated exclusively into cells expressing markers of mesoderm lineages (Fig. 2A), indicating that the T(+) cells present in our cultures of *T-eGFP* ES cells were lineage-committed. Thus, we termed this population of T(+) cells "early mesoderm-committed" (EM) progenitors.

In our experiments of colony formation from sorted cells plated at clonal density (Fig. 1E, 1F), EM progenitors gave rise to large numbers of T(-) cells. In light of the mesoderm commitment of T(+) cells, two possible scenarios could account for these findings: T(-) cells generated in these conditions could represent (i) a further step of mesoderm differentiation of EM progenitors, in which *T* was no longer expressed [16]; or (ii) undifferentiated ES cells dedifferentiated from EM progenitors. To investigate these possibilities, we analyzed the differentiation potential of T(-) cells generated from EM progenitors (Fig. 2B). In vitro differentiation assays revealed that T(-) cells derived from EM progenitor cells were able to give rise to cells of ectoderm, mesoderm, and endoderm lineages (Fig. 2C). Moreover, T(-) cells readily generated beating cardiomyocytes that stained positive for myosin, albumin-positive cells after prolonged periods under differentiation-promoting conditions, and Tuj1-positive cells after treatment with retinoic acid (Fig. 2D). We also analyzed the ability of T(-) cells to colonize embryo lineages in vivo after their introduction into mouse blastocysts. To trace the progeny of the injected cells, a constitutively expressed LacZ reporter was introduced into *T-eGFP* ES cells. We recovered 11 embryos from 2 independent injections of T(+)-derived T(-) cells into mouse blastocysts, of which 5 were overtly chimeric. In these embryos LacZ-positive cells

contributed to organs of ectoderm, mesoderm, and endoderm lineages (Fig. 2F-2K). As a control for our in vitro and in vivo differentiation assays of T(-) cells, we analyzed T(+) cells generated from EM progenitors. In all cases, T(+) cells behaved the same as T(+) cells isolated from bulk cultures of *T-eGFP* ES cells, displaying in vitro differentiation potential restricted to mesoderm lineages (Fig. 2C) and failing to contribute to embryogenesis in vivo (we could not detect any signs of chimerism in eight embryos recovered; Fig. 2E). Our results show that T(+) cells represent a population of EM progenitors that, in the presence of LIF, are able to recover the abilities of self-renewal, pluripotency, and chimera contribution characteristics of mouse ES cells.

5 Nanog Regulates the Dedifferentiation of EM Progenitors

In our characterization of the transcriptional profile of EM progenitors, we did not detect changes in the expression of the pluripotency-associated markers *Oct4* and *Repl* or in the levels of *Gbx2*, *Fgf5*, or *Lif* expression (see Discussion below). However, we detected a clear up-regulation in the expression of the pluripotency-associated marker *Nanog*, when compared to that of ES T(-) cells (Fig. 3A). Indeed, aside from the expression of *T* itself, these two cell populations only appeared to differ in the level of *Nanog* expression, raising the possibility that *Nanog* function is mechanistically linked to the transition of ES cells to EM progenitors, or vice versa. We investigated this possibility by directly manipulating the level of *Nanog* expression in *T-eGFP* ES cells and analyzing the consequences of such manipulations in the size and characteristics of the T(+) and T(-) cell populations. The introduction of a *Nanog* expression transgene driven by a strong constitutive promoter resulted in sustained overexpression of *Nanog* transcripts in *T-eGFP* ES cells (Fig. 3B). In these conditions, the expression of *T* was down-regulated (Fig. 3B), and the transition of EM progenitors to ES cells was facilitated, as evaluated by the ~3-fold reduction of T(+) cells (Fig. 3F) and the ~17-fold increase in the percentage of colonies composed exclusively by T(-) cells generated by EM progenitors overexpressing *Nanog* (Fig. 3H, 3J), when compared to mock-transfected *T-eGFP* ES cells (Fig. 3E, 3H, 3I).

For the converse experiment, down-regulation of *Nanog* function, we assayed the efficiency of short-hairpin RNAs (shRNAs) to induce partial *Nanog* silencing, since complete loss of *Nanog* function is incompatible with the pluripotent phenotype of ES cells [9]. Introduction of *Nanog-shRNA* into *T-eGFP* ES cells resulted in a marked decrease in the levels of *Nanog*, as evaluated by RT-PCR (Fig. 3D) and immunoblotting with specific antibodies (Fig. 3C). In these

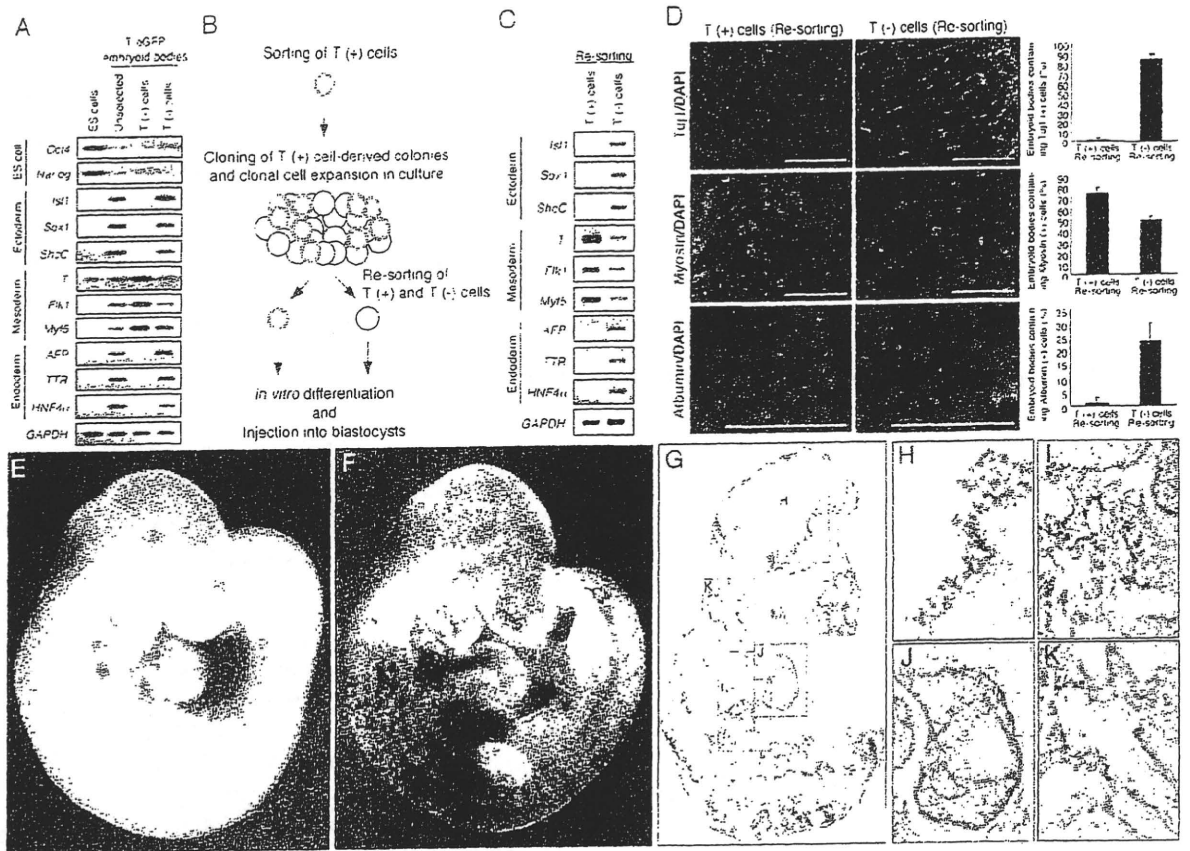


Fig. 2 Dedifferentiation of lineage-committed mesoderm progenitors into pluripotent stem cells. (A) RT-PCR analysis of ES cell, ectoderm, mesoderm, and endoderm marker gene expression in *T-eGFP* ES cells obtained at P20 (400 μ M of LIF), and in embryoid bodies derived from unselected *T-eGFP* ES cells, and from purified T(+) or T(-) cells (B) Schematic representation of the experimental procedure for characterizing T(+) and T(-) cells derived from a single T(+) cell (EM progenitor cell). A single T(+) cell formed a mosaic colony in clonal density cultures with 400 μ M of LIF. Each mosaic colony was independently picked up and expanded. Then, T(+) and T(-) cells originally derived from a single T(+) cell were re-sorted by FACS to analyze their differentiation potential *in vitro* (C, D), and *in vivo* by injecting into blastocysts (E, F, G, H, I, J, K). (C) RT-PCR analysis for ectoderm, mesoderm, and endoderm marker gene expression in embryoid bodies derived from re-sorted T(+) or T(-) cells. (D) Immunocytochemical

analysis of TuJ1 (neuronal lineage), myosin (muscle lineage), and albumin (hepatic lineage) production in embryoid bodies derived from re-sorted T(+) or T(-) cells. Scale bar = 100 μ m. Graphs show the percentage of embryoid bodies containing antigen positive cells. Bar shows mean \pm SD ($n = 3$; 30 embryoid bodies were examined in each dish). (E, F) Chimeric analysis demonstrating contribution of re-sorted T(+) (E) or T(-) (F) cells in E10 mouse embryos. β -galactosidase activity was used to visualize the contribution of re-sorted T(+) or T(-) cells in chimeric embryos. Images are *right* lateral view with the anterior to the *top*. (G, H, I, J, K) Histological images of the embryos shown in panel (F). A sagittal section counter stained with eosin (G) and close ups of different areas (H, I, J, K): (H) neuroepithelium; (I) gut tube and hepatic primordia; within septum transversum; (J) myocardial wall; (K) artery. Panels A-D are reproduced with permission of Nature Publishing Group [48]

conditions, cell colonies of undifferentiated ES cell morphology formed, and no signs of endoderm differentiation were apparent (not shown). However, the number of T(+) cells generated from EM progenitors expressing *Nanog-shRNA* more than doubled that of mock-transfected *T-eGFP* ES cells maintained under similar culture conditions (Fig. 3G). Also, EM progenitors expressing *Nanog-shRNA* generated ~20% of colonies composed exclusively of T(+) cells when plated at clonal density (Fig. 3H, 3K), indicating that the transition of EM progenitors to ES cells was impaired upon down-regulation of Nanog function. Together with the results of

our gain-of-function experiments, these findings demonstrate that Nanog controls the dedifferentiation of EM progenitors to ES cells.

6 Positive Regulation of *Nanog* Expression by T and LIF/STAT3

We next investigated the mechanism by which *Nanog* expression is up-regulated in EM progenitors. Based on our observations that *Nanog* expression is found to be increased

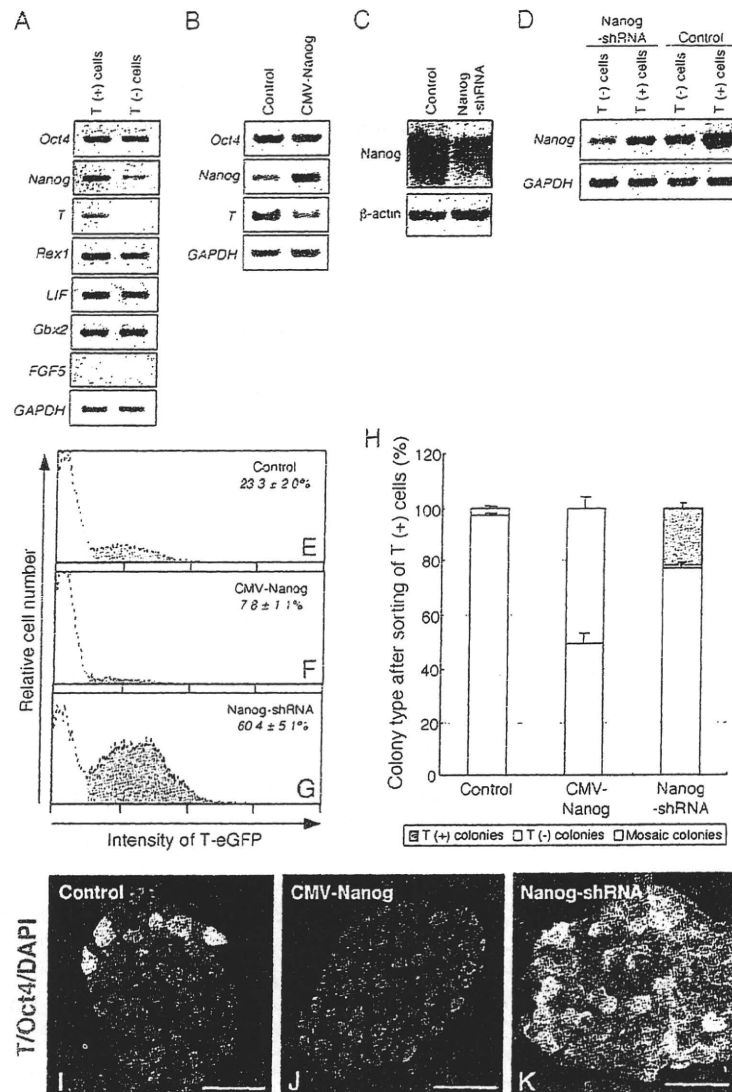


Fig. 3 *Nanog* is sufficient and necessary for dedifferentiation of EM progenitors into pluripotent stem cells. (A) RT-PCR analysis of gene expression in T(+) or T(-) cells isolated from *T-eGFP* ES cells. T(+) cells exhibited a higher level of *Nanog* expression. (B) RT-PCR analysis of *Oct4*, *Nanog*, and *T* expression in *T-eGFP* ES cells carrying control or CMV-*Nanog* constructs. Overexpression of *Nanog* is associated with down-regulation of *T* expression. (C) Western blotting analysis of *Nanog* in *T-eGFP* ES cells carrying control or *Nanog-shRNA* constructs. *Nanog-shRNA* efficiently down-regulates the level of *Nanog* protein in ES cells. (D) RT-PCR analysis of *Nanog* expression in T(+) or T(-) cells isolated from *T-eGFP* ES cells carrying control or *Nanog-shRNA* constructs. (E-G) Flow-cytometric analysis of T(+) cells produced

from purified T(+) cells carrying control (E), CMV-*Nanog* (F), or *Nanog-shRNA* (G) constructs. *T-eGFP* ES cells were transfected with each construct, then T(+) cells were isolated, selected with puromycin, and cultured for 7 days with 400 μ M of LIF. Percentages of T(+) cells are shown in each panel ($n = 4$, mean \pm SD). (H) Percentage of types of colonies in cultures of (E-G) before FACS analysis. Bar shows mean \pm SD ($n = 4$; 40 colonies were examined in each dish). (I-K) Fluorescent images of T(eGFP)/Oct4 expression in colonies formed in cultures of experiments shown in panels (E-G). DAPI staining identified individual cells in each field. Scale bar = 20 μ m. Panels A-D and I-K are reproduced with permission of Nature Publishing Group [48]

in cell populations with high levels of *T* expression (Fig. 3A), we first asked whether *T* could induce *Nanog* expression. For this purpose, we attempted to overexpress *T* in ES cells by transfecting a full-length cDNA driven by a constitutive promoter. Under these conditions, ES cells underwent

massive differentiation and could not be propagated, even in culture medium supplemented with 1000 μ M of LIF (not shown). As an alternative approach, we used a doxycycline-inducible conditional expression system. ES cells expressing the tetracycline-inducible transcriptional activator (rtTA)

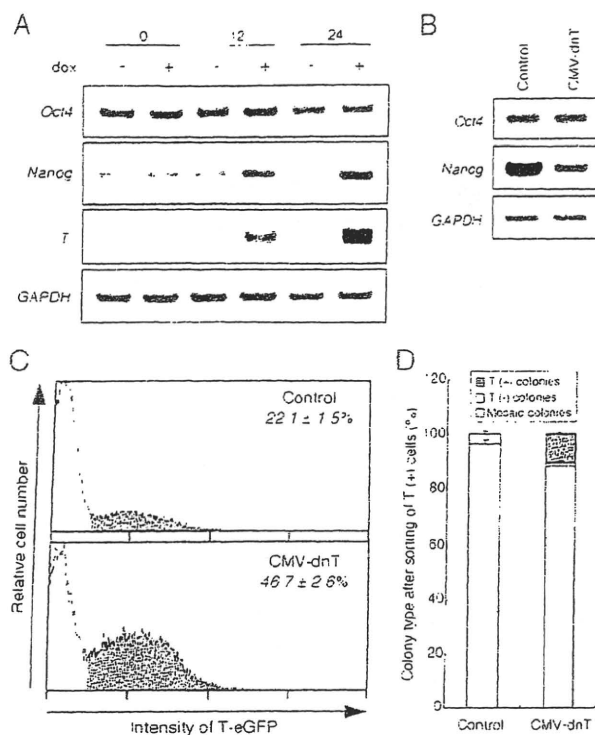


Fig. 4 T controls Nanog-dependent dedifferentiation of EM progenitors. (A) RT-PCR analysis of *Oct4*, *Nanog*, and *T* expression in doxycycline- (dox) dependent *T*-inducible ES cells cultured with 1000 μ M of LIF. *T* expression was induced by dox, and *Nanog* up-regulation was associated with an increased level of *T*. Numbers on the top indicate induction hours with dox. (B) RT-PCR analysis of *Oct4* and *Nanog* expression in *T-eGFP* ES cells carrying control or CMV-*dnT* constructs. *dnT* down-regulated *Nanog* expression without affecting *Oct4* expression in ES cells cultured with 400 μ M of LIF. (C, D) Blockage of T function impaired transition of T(+) cells to T(-) cells. Flow-cytometric analysis of T(+) cells produced from purified T(+) cells in the presence or absence of down-regulation of T by CMV-*dnT* (C). *T-eGFP* ES cells were transfected with each construct, then T(+) cells were isolated, selected with puromycin, and cultured for 7 days with 400 μ M of LIF. Percentages of T(+) cells are shown in each panel ($n = 4$, mean \pm SD). Percentage of types of colonies in cultures of (C) before FACS analysis (D). Bar shows mean \pm SD ($n = 4$; 40 colonies were examined in each dish). Panels A-B are reproduced with permission of Nature Publishing Group [48]

[19] were transfected with a construct containing the full-length *T* cDNA driven by a tetracycline-responsive promoter (T-rtTA ES cells). In the absence of doxycycline, T-rtTA ES cells cultured in medium supplemented with 1000 μ M

of LIF formed colonies of undifferentiated ES cells, with a morphology indistinguishable from parental untransfected ES cells. Under these conditions, *T* expression in T-rtTA ES cells was negligible, demonstrating the tight regulation of the inducible system (Fig. 4A). Upon addition of doxycycline to cultures of T-rtTA ES cells, *T* expression was induced progressively and became detectable by RT-PCR after 12 h of doxycycline induction (Fig. 4A). T-rtTA ES cells cultured in the presence of doxycycline started to acquire the characteristic flattened morphology of differentiated colonies 48–72 h after doxycycline induction (not shown). Importantly, *Nanog* expression increased in T-rtTA ES cells after 12 h of doxycycline induction, paralleling that of *T* (Fig. 4A). These results indicate that the expression of *Nanog* can be regulated by T and suggest that the up-regulation of *Nanog* expression found in EM progenitors may depend on their increased levels of T expression.

To test this possibility, we analyzed the consequences of blocking the function of T in ES cells in the expression of *Nanog* and the generation of EM progenitors. For this purpose, we used a truncated version of T previously shown to function as a dominant-negative (*dnT*) [20]. *T-eGFP* ES cells stably expressing *dnT* formed colonies with undifferentiated ES cell morphology in culture medium containing 400 μ M of LIF (see Discussion below). The level of *Nanog* expression in these cells, however, was down-regulated when compared with that of mock-transfected *T-eGFP* cells under similar culture conditions (Fig. 4B). Moreover, the blockade of T function resulted in an impaired transition of EM progenitors to ES cells (Fig. 4C, 4D), consistent with the reduced levels of *Nanog* expression found in these conditions. Thus, our results from gain- and loss-of-function experiments identify a negative feedback mechanism by which increased *T* expression in EM progenitors up-regulates the expression of *Nanog*, which, in turn, down-regulates *T* expression and promotes the regeneration of an ES cell phenotype.

To gain insights into the regulation of *Nanog* expression by T, we analyzed the mouse *Nanog* gene in the search of regulatory sequences. At 4.91 kb upstream of the translation start site of *Nanog*, we identified a 20-bp sequence forming an imperfect palindrome that shared homology with the proposed binding site for T [21] (Fig. 5A). We tested the ability of T to bind to oligonucleotides representing this sequence, but not to mutated versions thereof, by performing

Fig. 5 (continued) maintained with 400 μ M of LIF (E). Both the T- and STAT3-binding sites were required for activation of the *Nanog* EM enhancer activity in ES cells cultured with 400 μ M LIF (F). WT: -5203 to -4192 bp. MUT/T, MUT/S and MUT/TS indicate mutation in T-, STAT3- or both T- and STAT3-binding sites, respectively, in the *Nanog* EM enhancer. Bars show mean \pm SD ($n = 4$) (G) T and STAT3 physically interact inside cells. T and STAT3 were

co-immunoprecipitated when STAT3 was activated by LIF. (H) Fluorescent images of *T-eGFP* and *Nanog* EM enhancer DsRed2 expression in ES cell colonies formed in culture with 400 μ M of LIF. Co-expression of eGFP with DsRed2 in wild-type, but not when T- and/or STAT3-binding sites are mutated, indicates that the activity of the *Nanog* EM enhancer in EM progenitor cells is regulated by T and STAT3. Modified figure reproduced with permission from ref. [49]

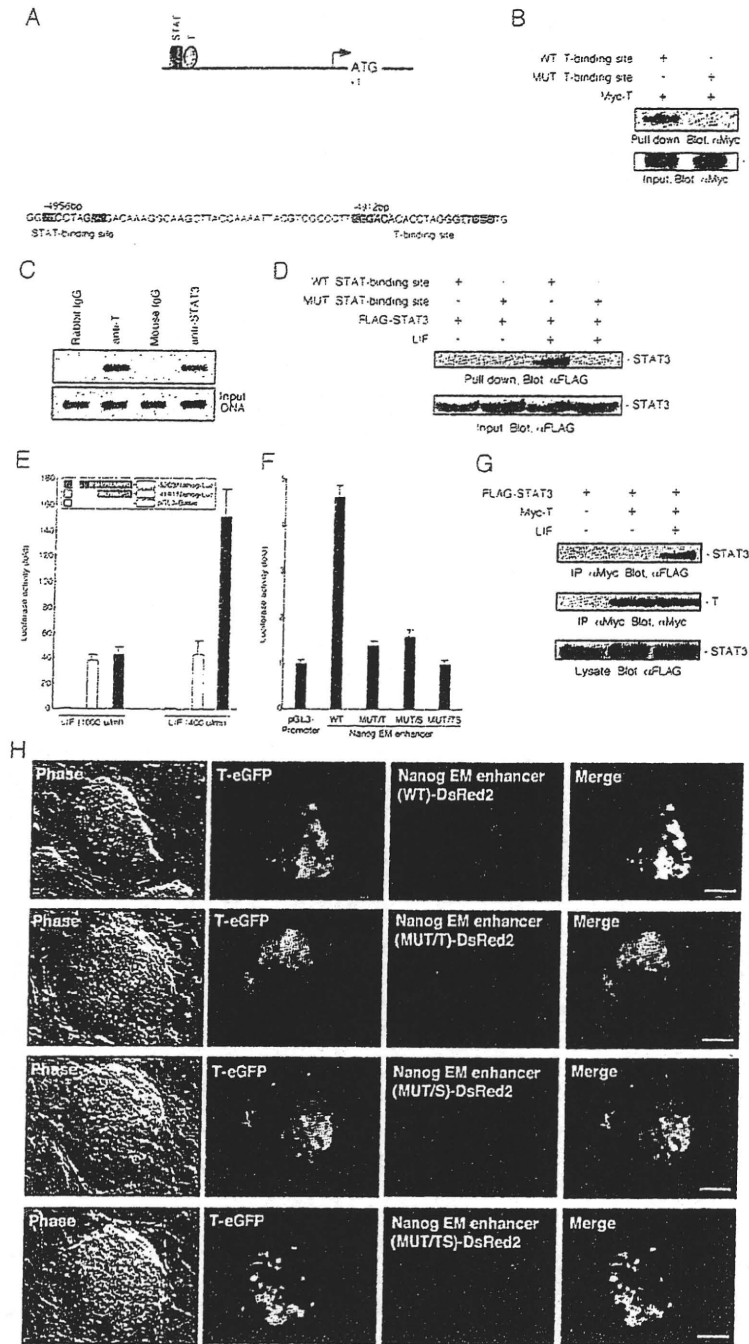


Fig. 5 Binding of STAT3 and T on *Nanog*EM enhancer is required for up-regulation of *Nanog* expression in EM progenitors. (A) Schematic representation of the 5'-upstream regulatory region of the mouse *Nanog* gene. Putative STAT- and T-binding sites are indicated. (B) T bound to the putative T-binding site in the *Nanog* regulatory region, as shown by pull-down assays. Wildtype (WT) and mutated (MUT) versions of double-strand oligonucleotides representing the putative T-binding site were used as probes. Input lysates were also blotted with anti-Myc antibody. (C) ChIP assay for the putative T- and STAT-binding sites in the *Nanog* regulatory region showed specific binding of T and STAT3

to the regulatory region. The lower panel is a PCR-amplification of input DNA prior to immunoprecipitation. (D) LIF-dependent binding of STAT3 to the putative STAT-binding site in the *Nanog* regulatory region. Wild-type and mutated versions of double-strand oligonucleotides for the putative STAT-binding site were used as probes. Input lysates were also blotted with anti-FLAG antibody. (E, F) Analysis of transcriptional activities of the *Nanog* regulatory region by luciferase reporter assay in mouse ES cells (1000 or 400 μ M of LIF). Both -5203*Nanog*-Luc and -4191*Nanog*-Luc showed a similar activation with 1000 μ M of LIF, whereas -5203*Nanog*-Luc activity was further increased in cultures

in vitro pull-down assays of biotin labeled oligonucleotides incubated with lysates of NIH3T3 expressing Myc-tagged T (Fig. 5B). We also investigated the ability of endogenous T to bind the region of interest in the *Nanog* promoter in vivo by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays of ES cells with a T specific antibody (Fig. 5C). Our search for putative regulatory elements in the *Nanog* promoter also identified a predicted STAT-binding site 44 bp upstream of the T-binding site (Fig. 5A). We tested the ability of STAT3 to bind to this site in vitro (Fig. 5D) and in vivo (Fig. 5C) using experimental approaches similar to the ones used to characterize the T-binding site. These results uncover the presence of functional binding sites for T and STAT3 in the mouse *Nanog* promoter.

We next analyzed the significance of the T- and STAT3-binding sites in the *Nanog* promoter for the biology of EM progenitors. We generated two constructs driving the expression of luciferase, one comprising 5.2 kb of the *Nanog* genomic sequence upstream of the translation start (-5203Nanog-Luc, which included both STAT3 and T-binding sites), and the other lacking the 5'-most 1 kb (and thus, both STAT3 and T binding sites, -4191Nanog-Luc). Transient transfection of ES cells with either reporter construct resulted in a similar ~40-fold transcriptional induction (compared to a promoterless luciferase construct) when ES cells were cultured in medium containing 1000 μ M of LIF (Fig. 5E), a condition in which EM progenitors are generated at very low frequency (Fig. 1C). These results indicate that the regulatory elements responsible for the constitutive expression of *Nanog* in ES cells are located in the first 4.2 kb of the mouse *Nanog* gene upstream of the translation start. Importantly, the transcriptional activity of the -5203Nanog-Luc was increased by ~4-fold with respect to that of -4191Nanog-Luc in ES cells adapted to grow in medium supplemented with 400 μ M of LIF (Fig. 5E), in which the EM progenitor population represents ~20% of the culture (Fig. 1C). These findings suggest that the enhancer element responsible for *Nanog* up-regulation in EM progenitors (*Nanog* EM enhancer) is located between -5203 and -4192 bp upstream of the translation start of the mouse *Nanog* gene, a region containing the functional STAT3- and T binding sites.

We then generated a luciferase reporter construct driven by the *Nanog* EM enhancer and a minimal promoter. This enhancer element increased transcription levels by ~4.5-fold when transiently transfected into ES cells cultured with 400 μ M of LIF (Fig. 5F). Moreover, the activity of the *Nanog* EM enhancer was lost when either or both the STAT3- and the T-binding sites were mutated (Fig. 5F). To visualize the activity of the *Nanog* EM enhancer in specific cells, we used it to drive the expression of a red fluorescent protein (DsRed2) reporter in ES cells. *T-eGFP* ES cells stably expressing this reporter showed activity of the *Nanog* EM enhancer only in EM progenitors, as evaluated by

the co-localization of eGFP and DsRed2 signals in these cells (Fig. 5H). Consistent with the results of the luciferase reporter assays, mutation of either or both STAT3- and T-binding sites in the *Nanog* EM enhancer abrogated the activity of this reporter in EM progenitors (Fig. 5H). Our results so far demonstrate that the up-regulation of *Nanog* expression in EM progenitors depends on the binding of STAT3 and T to specific sites in the EM enhancer in the mouse *Nanog* gene. Since the binding sites for STAT3 and T are located in close proximity to one another in the *Nanog* EM enhancer, and since both T-box transcription factors [22–24] and STAT3 [25, 26] have been described to physically interact with other transcription factors for the regulation of specific promoters, we decided to analyze whether T and STAT3 could interact inside the cell. We tested this possibility in NIH3T3 cells by co-transfecting expression vectors encoding tagged versions of STAT3 and T (FLAG-STAT3 and Myc T) and carrying out immunoprecipitation assays. Interestingly, we found an association of T with STAT3 only when nuclear translocation of STAT3 was activated by stimulation with LIF (Fig. 5G).

7 Nanog Directly Blocks Mesoderm Induction by BMPs

Our findings so far demonstrate that *Nanog* expression is up regulated in EM progenitors in the presence of LIF by the combined action of activated STAT3 and T, and that increased *Nanog* function promotes the transition of EM progenitors to ES cells. We reasoned that a likely mechanism of *Nanog* action in this process could be preventing the generation or blocking the effects of pro-differentiation factors. BMPs are potent inducers of mesoderm differentiation in the context of embryo development [27, 28], as well as in mouse ES cells [29–31]. EM progenitors, in turn, are generated rapidly during the first ~15 passages after reducing the LIF supplement in the culture medium from 1000 to 400 μ M (Fig. 1C). Thus, we tested whether the generation of EM progenitors in these conditions was modified by increasing or decreasing BMP signaling in cultures of ES cells. After three passages in medium containing 400 μ M of LIF, the size of the EM progenitor population reached ~6% in cultures of *T-eGFP* ES cells (Fig. 6A, see also Fig. 1C). This percentage almost doubled when cells were incubated in the presence of recombinant BMP2, BMP4, or BMP7 and was reduced by half upon incubation with noggin (Fig. 6A), a secreted factor that blocks BMP signaling [32, 33]. We then tested whether BMP signaling was also regulating the maintenance of EM progenitors. When pure populations of EM progenitors were plated in culture medium containing 400 μ M of LIF, ~75% of the resulting cells underwent a transition