

201108002A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬総合研究事業）

安全なヒトiPS細胞を用いた  
テラーメイド血液細胞の作成に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 湯尾 明

平成24（2012）年 5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

安全なヒトiPS細胞を用いた

テーラーメイド血液細胞の作成に関する研究

湯尾 明

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

## III. 研究成果の刊行物・別刷

# I . 総括研究報告

安全なヒト i P S 細胞を用いた  
テラーメイド血液細胞の作成に関する研究

湯尾 明

## 総括研究報告書

# 安全なヒトiPS細胞を用いた テラーメイド血液細胞の作成に関する研究

研究代表者 湯尾 明 独立行政法人国立国際医療研究センター研究所疾患制御研究部長

**研究要旨** 安全な輸血医療を目指して、異種動物成分の混入を排除する培養法の開発のためにヒトiPS細胞からの無フィーダー分化誘導系による血液細胞の産生を試みた。培養法の基本は、我々独自の2段階培養（前半のsphere形成浮遊培養と後半の平面接着培養）である。本年度は、ヒトiPS細胞由来造血における血球貪食の機序の分子解析、センダイウイルスベクターによる安全なヒトiPS細胞の樹立、ヒト造血前駆細胞由来のヒトiPS細胞からの血球分化の試み、ヒトiPS細胞由来のマクロファージの日和見感染緑膿菌敗血症モデルマウスへの治療効果の検定、等の成果があった。

### A. 研究目的

血液成分の輸注は現代医療において不可欠であるが善意のボランティアに供給を依存しているため供給量に限りがあり、また、感染症の媒体となる危険をかかえている。従って、病原体混入がないクリーンな環境で安定して血液細胞成分を生成する技術を開発していくことは極めて重要である。

骨髄の造血幹細胞から血液細胞成分を増幅する試みは長年研究されてきたが、造血幹細胞は体外では十分に増幅しないことも確認された。一方、ES細胞は無限増殖能と多能性分化能を持つために再生医療における優れた材料として近年注目されている。即ち、ヒトES細胞から安定して試験管内で血液細胞成分を作成することが可能になれば輸血医療・移植医療において革命的な進歩をもたらされる。とりわけ、寿命が短いために現行の輸血療法では効果が乏しい好中球や体外での増幅が困難な造血幹細胞に関してはその恩恵は大きい。また、赤血球などの他の血球も、日本赤十字社の事業負担が大きいことを考慮すれば、ヒトES細胞からの産生が展開されれば、その意義は大きい。以上のような観点から、我々はヒトES細胞を用いて、無血清無フィーダー環境における未分化維持と血液細胞生成を試み、顕著な成果を上げてきた。特に、好中球の分化誘導系は、著名な国際学術誌に公表され世界的な反響を呼んだ（Sacki K

et al.. Stem Cells 27:59-67, 2009、国際特許：出願番号 PCT/JP2007/71811）。

一方、近年の細胞初期化技術の進歩により、体細胞を受精卵の状態に戻して、ES細胞のような万能細胞を作成する手法が相次いで報告され、ヒト多能性幹細胞（ヒトiPS細胞）の作成も内外で活発に行われる時代となった。しかしながら、ヒトES細胞と同様にヒトiPS細胞も多能性を有するとはいいながら、あるいは、多能性を有するが上に、特定方向への制御された効率の高い分化誘導は困難である。また、ヒトiPS細胞は、ヒトES細胞のような生命倫理問題は伴わないが、ウイルスベクターによって体細胞を強引に初期化することの危険性がつきまとうことは否定できない。

本研究においては、我々がヒトES細胞において開発した独自の血液細胞分化誘導技術をさらに洗練させてヒトiPS細胞に適応して効率の良い血液細胞産生を達成することが主な目標である。その際、医療への応用が主目的であるので、当然のことながら、マウスフィーダー細胞や牛胎児血清などの動物由来成分を出来るだけ排除することが重要である。また、現在のヒトiPS細胞はレトロウイルスベクターによって樹立されたためにウイルスベクター由来遺伝子がゲノムに組み込まれている物が殆どであり、このような危険性を排除することも重要な研究である。

## B. 研究方法

### 1. 細胞など研究材料

マウス胎児線維芽細胞 (murine embryonic fibroblasts, MEF) はマイトマイシンC

(MMC) 処理またはX線照射によって増殖を停止させて未分化維持用のフィーダー細胞として用いた。ヒト i P S 細胞は、京都大学 i P S 細胞研究所 (201B7、253G1) および独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 (#25) より供与を受けた。センダイウイルスベクターを用いてヒト臍帯血 CD 3 4 陽性細胞より樹立されたヒト i P S 細胞は、先端医療振興財団より供与された。ヒト i P S 細胞は、MMC 処理 MEF 上で 20%KSR 存在下に無血清培養により継代した。継代は週 2 回、コラゲナーゼ処理にて行い、細胞密度を 2 - 4 倍に希釈した。OP9 細胞は、20%牛胎児血清存在下で継代培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell、HUVEC) は、大日本住友製薬株式会社から購入した。新生児皮膚由来線維芽細胞 B J は A T C C から入手した。

### 2. センダイウイルスベクターを駆使したヒト i P S 細胞の樹立

新生児皮膚由来線維芽細胞 B J、HUVEC からヒト i P S 細胞の樹立を行った。山中 4 因子を搭載したセンダイウイルス (S e V) ベクター (SeV18+OCT3/4/TSΔF, SeV18+SOX2/TSΔF, SeV18+KLF4/TSΔF, SeVHNLc-MYC/TS15ΔF) を MOI3 にて感染させて、6 日間培養した後に X 線照射した MEF 上で FGF 存在下で培養した。培養過程で出現するヒト E S 細胞用のコロニーをマイクロピペットでつり上げて引き続き MEF 上で培養した。SeV ベクターと導入遺伝子は継代培養により希釈され最終的には高温培養によって消失した。得られた SeV ベクターによるヒト i P S 細胞は SSEA4、Oct3/4、Nanog などの多能性幹細胞特異的マーカーを発現していた。

### 3. 分化誘導プロトコール

サイトカイン、増殖因子は、分化誘導系によって、文献などを参考に一部異なる組み合わせを用いた。

① 当研究室独自の手法による場合は、未分化ヒト i P S 細胞をコラゲナーゼ処理により MEF の混入を避けて回収した後に、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine コート

低接着培養皿にて数日間スフェア形成させた。分化培養液には、15%牛胎児血清の他に、6 種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、20 ng/ml IGF-II (insulin-like growth factor II)、20 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor)、100 ng/ml SCF (stem cell factor)、100 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、50 ng/ml TPO (thrombopoietin)、100 ng/ml G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) を添加した。

② Bhatia らの手法による場合は、回収した未分化ヒト i P S 細胞を poly(2-hydroxyethyl methacrylate)コート低接着 6cm ディッシュにて数日間数日間スフェア形成させた。分化培養液には、20%牛胎児血清の他に、7 種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、20 ng/ml VEGF (vascular endothelila growth factor)、50 ng/ml BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、300 ng/ml SCF (stem cell factor)、300 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、10 ng/ml IL-3 (interleukin 3)、10 ng/ml IL-6 (interleukin 6)、3 U/ml EPO (erythropoietin) を添加した。

③ Elefanty らの手法による場合は、回収した未分化ヒト i P S 細胞を無血清培地に浮遊して低接着 96 穴プレートにおいて比重遠心してスフェアーを形成させた。分化培養液には以下の 9 種類のサイトカイン・増殖因子、すなわち、5 ng/ml IGF-II (insulin-like growth factor II)、5 ng/ml VEGF (vascular endothelila growth factor)、10 ng/ml BMP-4 (bone morphogenic protein 4)、20 ng/ml SCF (stem cell factor)、5 ng/ml FL (Flt-3 ligand)、5 ng/ml IL-3 (interleukin 3)、5 ng/ml IL-6 (interleukin 6)、5 ng/ml TPO (thrombopoietin)、5 U/ml EPO (erythropoietin) を添加した。

④ 上記の①②③の手法の長所を生かして、安定的に好中球、赤芽球、造血前駆細胞を産生させるために、異なる手法のサイトカインの種類や量などを中間的に改変する、もしくはどれかの手法のサイトカインの種類と量を組み合わせる、等して新たな分化誘導法の創出を試みた。

⑤ 上記の①②③④の手法に、更に牛胎児血清を排除して無血清培養を試みた。すなわち、元々無フィーダー培養であるので、動物由来成分を完全に排除した無血清・無フィーダー培養を検討した。

⑥ 上記の①②③④⑤いずれの場合も、分化誘導培養の後半において、スフェアをゼラチンコート培養皿での平面培養に移行した。サイトカイン・増殖因子はスフェア形成期間と同様である。

#### 4. コロニーアッセー

造血コロニーアッセーは、市販のキット (Methocult TM GF H4535) を用いて、メチルセルロース中にて造血因子のカクテル存在下 (SCF、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF、erythropoietin) で行い、2週間後のコロニー形成を倒立顕微鏡にて観察した。

#### 5. RT-PCR

市販のキット (RNeasy Mini Kit) により RNA 抽出後に cDNA を作成して行った。各種のグロビン遺伝子 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ グロビン)、インターフェロンの同定を行った。

#### 6. 免疫染色

グロビン蛋白 ( $\alpha$ グロビン、 $\beta$ グロビン) の免疫染色は、細胞をアセトン・メタノール固定した後に、1次抗体と反応させ、アレクサ標識2次抗体と反応させて、蛍光顕微鏡により観察した。

#### 7. 形態学的組織化学的観察方法

生細胞は、培養皿や培養フラスコのまま倒立顕微鏡により形態観察した。浮遊状態の血液細胞はスライドガラス表面にサイトスピン固定した後に、ライトギムザ染色、エステラーゼ染色、を行い、正立顕微鏡により観察した。

#### 8. フローサイトメトリー

細胞膜表面抗原の同定は、細胞を PBS 中で30分間1次抗体と反応させた後に FACSCalibur を用いて解析した。解析した抗原は、CD34、CD45、CD11b、CD16b、CD66 である。

#### 9. 貪食能

貪食能は、FMLP 存在下でのザイモザンの貪食により定量した。細胞はライトギムザ染色し、正立顕微鏡により貪食を観察した。

#### 10. 活性酸素産生能

活性酸素産生能は、既報の手法により NBT の還元により測定した。

#### 11. フィーダー機能の検定

我々のヒト多能性幹細胞からの血液細胞の分誘導はマウスのフィーダー細胞を用いない無フィーダー培養であるが、培養系には多くの接着細胞が共存し、それらの細胞がヒトフィーダー

細胞として造血を支えている可能性が有る。それを検定するために、ヒト多能性幹細胞由来の接着細胞とヒト CD 3 4 陽性血液細胞を共培養した後に NOG マウスの移植してマウス体内でどの程度ヒト CD 3 4 陽性血液細胞由来のヒト血液細胞が生着・増殖するかを検討した。

#### 12. 緑膿菌日和見感染モデル

マウスを用いた好中球減少緑膿菌敗血症モデル系は、エンドキサン投与の系を駆使して東京医科大学微生物学講座 (松本教授、山口博士) らとの共同研究によって行われた。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体は使用しないし、臨床研究もない。また、動物実験を行う計画はない。さらに、ヒトのクローンなどの生命倫理に抵触するような実験、研究はいつさい含まれない。

### C. 研究結果

#### 1. 京都大学より供給されたヒト iPS 細胞を用いた血液細胞分化誘導

当初の検討において、京都大学で樹立されヒト iPS 細胞を用いて造血細胞分化を行なったところが、マクロファージ主体の分化誘導であったが、一過性に造血前駆細胞も観察され、造血前駆細胞に対するマクロファージの血球貪食像が観察されたため、一端は産生された血球がマクロファージによって貪食されている可能性が示唆された。このような血球貪食を思わせる現象の分子解析として、様々のサイトカインの RT-PCR を行い、I 型インターフェロン (IFN  $\alpha$  1、IFN  $\alpha$  2、IFN  $\beta$  1) の血球分化に伴う発現誘導を認め、その上流の機序として IRF-3 の関与が示唆された。

#### 2. 国立成育医療研究センターより供給されたヒト iPS 細胞を用いた血液細胞分化誘導

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所にて樹立されたヒト iPS 細胞を用いて、我々独自の手法により、造血細胞分化を行なったが、試した1株 (#25、初期化4因子導入株) で嚢状構造体の形成が確認された。嚢状構造体の切開による血球回収後は、速やかに切り口がふさがり血球産生が再開された。回収された細胞は、ライトギムザ染色では成熟好中球も含まれ、エステラーゼ2重染色においても顆粒球系細胞の存在が明確に確認された。さらに、コロニーアッセーにおいても顆粒球系細胞の存在が

確認された。このような顆粒球系細胞は、CD45 陽性 CD11 b 陽性の食細胞系の成熟血液細胞で貪食能を有していた。好中球特異的抗原 CD16b は約 2 割が陽性であった。ヒト ES 細胞の時と異なり、60 日以上造血が持続し、嚢状構造体内部では好中球系の造血が長く保たれていた。このような結果は、ヒト ES 細胞と同様の中密度培養の時の所見であるが、更に、高密度培養、低密度培養も検討したところ、高密度培養や低密度培養においては、中密度培養と異なり嚢状構造体を形成せずに造血が進み、低密度培養においては、高い比率で好中球系の造血が認められた。このような好中球は NBT 還元応が陽性であることも確認した。

### 3. ヒト iPS 細胞から分化誘導した白血球のマウスモデルでの効果の検討

東京医科大学微生物学講座との共同研究により、エンドキサンによる白血球減少時における腸管内緑膿菌による敗血症モデル（致死率 100% 近く）を駆使して、ヒト iPS 細胞由来の食細胞（好中球とマクロファージ）が、この日和見感染敗血症モデルを救命できるか否かを検討した。中密度培養におけるマクロファージ優位のサンプルによる移植実験においては、被移植群では敗血症を起こすか死亡したが、移植群においては生存し、しかも敗血症症状を起こさなかった。このように、当初の検討においては有効性が示されたが、その後、低密度培養による好中球優位サンプルを移植したところ、治療効果が不明確となった。繰り返しの検討でも、有効性が明らかとはならず、基礎的な条件検討を再度詳細に行うこととなった。

また、マクロファージ優位の献体の有効性を検証するために、M-CSF 添加の効果を検討した。M-CSF 添加によって、マクロファージが大量に産生されており viability も良好であった。位相差顕微鏡では培養皿のむき出しの部分一面に球状細胞（単球系細胞）が接地している様子が観察されたが、嚢状構造体は認められる、球状がどこから産生されているのかは不明であった。このような M-CSF 添加マクロファージ優位検体の敗血症モデルへの効果に関しては、生存率に有為差ないが、敗血症症状の出現を遅らせる効果は認められたので、今後更に、移植細胞数を多くして N 数も確保して検討してゆく予定である。

### 4. ゲノムにウイルスベクターが取り込まれない安全なヒト iPS 細胞からの血液細胞分化誘導

### 導

ヒト臍帯静脈内皮細胞やヒト血液細胞から樹立したヒト iPS 細胞を用いて我々独自の手法により、血液細胞の分化誘導を行った。その結果、約 30% が好中球系の血球に分化した。しかしながら、ヒト血液細胞から樹立したヒト iPS 細胞における特段の成果は認められなかった。

### 5. 無血清造血前駆細胞誘導の試み

我々は、ヒト ES 細胞から独自の手法を用いて好中球の効率的な分化誘導を行うことに成功した (Saeki K et al., Stem Cells 27:59-67, 2009, 国際特許：出願番号 PCT/JP2007/71811)。しかし、この手法には牛胎児血清が含まれており、また、好中球以外の誘導には至適条件では無い。そこで、この手法に無血清かつ赤芽球形誘導条件（エリスロポエチン添加など）の加味などの修飾を加えて検討したところ、初めて無フィーダー無血清条件下での赤芽球の混在を確認し、動物由来成分排除法での多能性造血前駆細胞の誘導の可能性が示された。

### D. 考察

我々の独自の血球分化誘導法の特徴は、異種動物成分（特にマウスフィーダー細胞のような細胞そのもの）を排除して安全な移植材料を作成することにある。そのために、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞からの血液細胞分化誘導において頻繁に用いられている OP9 細胞のようなマウスフィーダー細胞を用いないで、分化培養開始時点でヒト ES 細胞（ヒト iPS 細胞）しか存在しない培養系である。ただし、分化の過程で出現する細胞は浮遊系の血球のみではなく、多くの接着細胞が共存しており、このことが血球産生の効率にも関わってくる訳であるが、共存する大量の接着細胞が「無用の」細胞ではないと考えている。すなわち、接着細胞は血液細胞の発生源となっているのみならず、血液細胞の増殖と分化をサポートしている支持細胞（フィーダー細胞）となっている可能性も十分考えられる。このようなヒト多能性幹細胞由来の造血支持細胞の解析は極めて重要であり、今後の検討課題としたい。

好中球は細菌や真菌からの感染防御に極めて重要である。好中球減少症の患者が難治性感染症に罹患し、G-CSF、抗生物質、抗真菌剤、外科的処置等の治療に反応しない場合に顆粒球輸血が考慮される。ヒト白血球型抗原適合性顆

粒球輸血の有効性は実証されているが、治療効果を得る充分量の顆粒球を常に確保することは難しい。我々は現行の顆粒球輸血療法に対する補助手段、代替手段の提供を目的に、ヒト i P S 細胞からの高純度好中球分化誘導法を開発すべく検討を行なった。このような感染防御における意義は、培養法の開発のみでは実証できず、日和見感染症モデルマウスなどの *in vivo* の系での実証が重要であると考えられるが、東京医大微生物学教室との共同研究により、一定の条件下においてはヒト i P S 細胞由来の好中球（もしくはマクロファージ）がモデルマウスの緑膿菌敗血症に有効である可能性が示された。

我々独自の分化誘導系は、血液細胞の中でも特に好中球（とマクロファージ）等の食細胞系の産生誘導が有利な系である。一方、ヒト多能性幹細胞からの血球産生に関しては、赤血球や造血幹細胞も大きく期待されている。しかし、我々独自の手法が安定した系であるのに対して、Bhatia らの手法や Elefanty らの手法は再現性がやや困難であり、我々の手法を軸としてサイトカインなどの濃度について他の 2 法を取り入れるという手法で培養を個々みて、赤芽球の共存が得られた。今後は、分子操作も含めて造血幹細胞の産生を試みたい。

ヒト i P S 細胞は、ドナーと同じ HLA を有しておりドナーに移植しても拒絶されないという大きな利点を有しており、再生医療、移植医療の切り札として大きく期待されている。レトロウイルスベクターを用いることによる染色体ゲノムへのウイルス断片の組み込み危険性は、本計画での研究手法であるセンダイウイルスベクターの使用によって克服される。実際に、センダイウイルスベクターによる安全なヒト i P S 細胞の樹立が順調に進捗した。その過程で、ヒト血管内皮細胞から樹立したヒト i P S 細胞が「質の良い」血管内皮細胞に分化することを確認した。これを血液にも応用して、ヒト血液細胞から樹立したヒト i P S 細胞の血液細胞への分化誘導に取り組んだが、現時点では顕著な成果には至っていない。一般的には、エピジェネティクスメモリーが作動して、i P S 細胞の元になった体細胞の方向へは分化しやすいと言われているが、血液細胞の場合はそうではないという報告もあり、今後更に検討を重ねてゆくべき課題である。

## E. 結論

本研究では、異種動物成分の混入を回避する

培養法の開発のために、ヒト i P S 細胞を用いて、無フィーダー分化誘導系による血液細胞の産生を試みた。培養法の基本は、前半の sphere 形成浮遊培養と後半の平面接着培養で、我々がヒト E S 細胞の系において開発した手法である。敷石状の細胞の増殖、中心部での嚢状構造物の形成を経て、血液細胞が産生された。産生された血液細胞は比較的分化した骨髄系の細胞で、好中球とマクロファージを多く含んでいた。動物由来成分の排除については無血清培養に部分的に成功した。また、本年度は、血液細胞由来のヒト i P S 細胞による血球分化に取り組んだが、期待されるような成果は未だ得られていない。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Gokoh M, Nakamura N, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K: Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells. *Cellular Reprogram* 13:361-370, 2011.
2. Nakamura N, Saeki K, Mitsumoto M, Matsuyama S, Nishio M, Saeki K, Hasegawa M, Miyagawa Y, Ohkita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Yuo A: Feeder-free and serum-free production of hepatocytes, cholangiocytes and their proliferating progenitors from human pluripotent stem cells: application to liver-specific functional and cytotoxic assays. *Cellular Reprogram* 14:171-185, 2012.

### 2. 学会発表

1. Nakamura N, Saeki K, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A: A feeder-free and serum-free production of multi-functional mature hepatocytes with electron microscopically valid morphologies: towards an establishment of the global standard for human ES/iPS-based drug discovery tools. 9th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 2011, Toronto, Ontario, Canada.
2. Saeki K, Nishio M, Yuo A, Saeki K, Hasegawa



- M: Endothel-mediated vascular smooth muscle growth suppression is deteriorated by senescence-associated degeneration via an induction of gene x: toward establishment of innovative therapeutics for angiostenosis. 6th Annual Frontier of Clinical Investigation Symposium (Vascular Disease 2011) (organized by "Nature Medicine") October 2011, San Diego, CA, USA.
3. Saeki K, Nshio M, Nakahara M, Saeki K, Hasegawa M, Yuo A: A novel system for the evaluation of vascular endothel-mediated smooth muscle growth inhibition: towards development of novel therapeutics for arteriostenosis. The 4th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, November 2011, Beijing, China.
4. Nishio M, Nakahara M, Yuo A, Saeki K: Directed differentiation of human pluripotent stem cells into brown adipocyte-like cells. The 4th Annual Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, November 2011, Beijing, China.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

発明の名称：多能性幹細胞由来高機能肝細胞とその製造方法及び薬剤代謝毒性試験方法  
発明者：湯尾 明、佐伯久美子、中村直子、松山さと子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社

特願 2011-019103

平成 23 年 1 月 31 日

発明の名称：多能性幹細胞由来褐色脂肪細胞とその製造方法並びに細胞療法的使用  
発明者：佐伯久美子、湯尾 明、西尾美和子、川崎正子、佐伯晃一、長谷川護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社

特願 2011-100218

平成 23 年 4 月 27 日

発明の名称：多能性幹細胞由来高機能肝細胞とその製造方法及び薬剤代謝毒性試験方法  
発明者：湯尾 明、佐伯久美子、中村直子、松山さと子、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川

護

出願人：独立行政法人国立国際医療研究センター総長、ディナベック株式会社

PCT/JP2012/052007

平成 24 年 1 月 31 日

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## Ⅱ．研究成果の刊行に 関する一覧表

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

なし

## 雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル   | 発表誌名               | 巻号 | 頁       | 出版年  |
|---|--|--------------------|----|---------|------|
| Gokoh M, Nakamura N, Matsuyama S, Nishio M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, <u>Yuo A</u> , Saeki K | Early senescence is not an inevitable fate of human induced pluripotent stem-derived cells | Cellular Reprogram | 13 | 361-370 | 2011 |

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・ 別刷

# Early Senescence Is Not an Inevitable Fate of Human-Induced Pluripotent Stem-Derived Cells

Maiko Gokoh,<sup>1</sup> Miwako Nishio,<sup>1</sup> Naoko Nakamura,<sup>1</sup> Satoko Matsuyama,<sup>1</sup> Masako Nakahara,<sup>1</sup> Shinnosuke Suzuki,<sup>1</sup> Masami Mitsumoto,<sup>1</sup> Hidenori Akutsu,<sup>2</sup> Akihiro Umezawa,<sup>2</sup> Kazuki Yasuda,<sup>3</sup> Akira Yuo,<sup>1</sup> and Kumiko Saeki<sup>1</sup>

## Abstract

Human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are expected to become a powerful tool for regenerative medicine. Their efficacy in the use of clinical purposes is currently under intensive verification. It was reported that hiPSC-derived hemangioblasts had severely limited expansion capability due to an induction of early senescence: hiPSC-derived vascular endothelial cells (VECs) senesced after one passage and hiPSC-derived hematopoietic progenitor cells (HPCs) showed substantially decreased colony-forming activities. Here we show that early senescence is not an inevitable fate of hiPSC-derived cells. Applying our unique feeder-free culture methods for the differentiations of human embryonic stem cells (hESCs), we successfully generated VECs and HPCs from three lines of hiPSCs that were established by using a retrovirus vector system. All hiPS-derived VECs could be subcultured by 2:1 ~ 3:1 dilutions up to 10 ~ 20 passages, after which the cells underwent senescence. Among the three lines of hiPSCs, two lines generated HPCs that bore comparable granulocyte colony-forming units to those of hESCs. Moreover, one line effectively reproduced HPCs within the sac-like structures, the fields of *in vitro* hematopoiesis, as in the case of hESCs. Surprisingly, release of neutrophils into culture supernatant persisted even longer (~60 days) than the case of hESCs (~40 days). Thus, the problem of early senescence can be overcome by selecting appropriate lines of hiPSCs and applying proper differentiation methods to them.

## Introduction

**H**UMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS (hiPSCs) hold great promise for the development of regenerative medicine with their unlimited expansion capacities and pluripotency that were equivalent to human embryonic stem cells (hESCs). Before translating the achievements of basic researches to medical purposes, however, the efficacy and safety of hiPSCs must be carefully scrutinized from various points of view. Large quantities of useful findings have been accumulating in the case of murine iPSCs (miPSCs); however, performing the studies on hiPSCs is particularly important because hiPSCs may not be the real equivalent of miPSCs as the hESCs may not be the genuine counterpart of murine ESCs (mESCs) (Tesar et al., 2007; Vallier et al., 2009).

So far, two major issues have been raised concerning the disadvantageous outcomes of iPSCs after differentiation.

One is a widely recognized matter of tumorigenicity, which was reported in the cases of miPSC chimeric mice (Okita et al., 2007) and the mice transplanted with miPSC-derived differentiated cells (Nelson et al., 2009). Already, several measures have been proposed to overcome this problem: an application of nonviral vectors (Okita et al., 2008; Yu et al., 2009), excisions of integrated transgenes (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009), a usage of L-myc instead of c-myc transgene (Nakagawa et al., 2008, 2010), and a selection of iPSC lines with least tumorigenicity after differentiation (Miura et al., 2009). Those strategies, along with the recent technological innovations to introduce the reprogramming factors via RNA-based (Fusaki et al., 2009; Seki et al., 2010; Warren et al., 2010) or protein-based systems (Kim et al., 2009; Zhou et al., 2009), are expected to make a great contribution toward the complete resolution of the problem.

<sup>1</sup>Department of Disease Control, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan.

<sup>2</sup>Department of Reproductive Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

<sup>3</sup>Department of Metabolic Disorder, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan.

The second issue is rather a newly proposed one: an induction of early senescence in hiPSC-derived differentiated cells (Feng et al., 2010). It was reported that every hiPSC established by using a retrovirus vector system suffered from expansion deficiency after differentiation into vascular endothelial cells (VECs), hematopoietic progenitor cells (HPCs), and retinal pigmented epithelium cells (Feng et al., 2010). Although the molecular mechanism of early senescence remains elusive, the effects of p53 inactivation, LIN28 activation and insertion of proviral transgenes into chromosomes were discussed (Feng et al., 2010). The finding of early senescence is worth reporting in that it has provoked a caution that we should use during our researches on hiPSCs. Nevertheless, we thought that their conclusion must be further validated in other situations, where differentiation processes are performed by distinct methods, because early senescence is often caused by cellular stresses and the degrees of stresses substantially vary depending on culture conditions.

We previously established feeder-free methods for neurophilic (Saeki et al., 2009) and vascular endothelial (Nakahara et al., 2009) differentiations of hESCs. By applying those methods to hiPSCs, we studied the incidence of early senescence during the differentiation of hiPSCs that were established by using a retroviral vector system. Our data indicate that early senescence is not an inevitable fate of the hiPSC-derived differentiated cells even in the presence of retroviral insertions of the reprogramming transgenes. We also show that hiPSC-derived VECs undergo senescence after 10~20 passages, as in the cases of primary human VECs, without entering crisis. Our results clearly show that the problem of early cellular senescence can be overcome by selecting appropriate lines of hiPSCs and applying proper differentiation methods to them.

## Materials and Methods

### Cell culture

The use of hESCs was performed in accordance with the Guidelines for Derivation and Utilization of Human Embryonic Stem Cells of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) of Japan, after approval by the institutional review board of International Medical Center of Japan (IMCJ). The hESCs (KhES-1, KhES-3) (Suemori et al., 2006) were provided by Kyoto University (Kyoto, Japan). The hiPSC were provided by either CiRA at Kyoto University (253G1 and 253 G4 (Nakagawa et al., 2008), 201B7 and 201B2 (Takahashi et al., 2007) or by National Research Institute for Child Health and Development (#25). The cells were maintained on dishes coated with  $\gamma$ -irradiated murine embryonic fibroblasts (MEFs) in DMEM/F12 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) supplemented with 20% Knockout™ Serum Replacement (KSR) (Invitrogen Corp.), 5 ng/mL fibroblast growth factor 2 (FGF-2; Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ), 1% nonessential amino acids solution (Invitrogen Corp.), 1 mM sodium pyruvate solution (Invitrogen Corp.), 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 2 mM L-glutamine (Invitrogen Corp.), 20 U/mL penicillin (Invitrogen Corp.) and 20  $\mu$ g/mL streptomycin (Invitrogen Corp.). The cells were passed twice a week (e.g., on Tuesday mornings and Friday evenings) by a treatment with dissociation liquid, which contains 0.25% trypsin (In-

vitrogen Corp.), 1 mg/mL collagenase IV (WAKO Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 20% KSR, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, at 37°C for 5 to 15 min and seeded at split ratios of 1:2 to 1:4 into new MEF-coated dishes. During the course of experiments, cells showed normal karyotypes.

### Vascular endothelial differentiation of hESCs/hiPSCs

Differentiation was performed as previously described (Nakahara et al., 2009) with a slight modification. The hESCs/hiPSCs were detached from culture plates by using the dissociation liquid for 15 min at 37°C. The mildly dissociated hESC/iPSC clumps were cultured in a 6-cm diameter low-attachment dish (Nalge Nunc International K.K., Tokyo, Japan) to form spheres using the differentiation medium consisting Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Sigma Chemical Co.) supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria), 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 3 mM L-glutamine, 10 U/mL penicillin, 20 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGFA), 20 ng/mL bone morphogenetic protein 4 (BMP4), 20 ng/mL stem cell factor (SCF), 10 ng/mL FMS-related tyrosine kinase-3 ligand (Flt3-L), 20 ng/mL Interleukin 3 (IL3), and 10 ng/mL IL6. After incubation for 3 days at 37°C under a 100% humidified condition in a 5% CO<sub>2</sub> gas incubator, spheres were subjected to adherent culture using 100 mm $\times$ 20 mm 0.1% porcine type A gelatin (Sigma Chemical Co.)-coated dishes in the differentiation medium described above. Media were changed twice a week. For passage, cells were harvested by treatment with 0.25% trypsin and 1 mM EDTA and replated at split ratios of 1:2 on new gelatin-coated dishes.

### Senescence-associated (SA)- $\beta$ -galactosidase assays

The  $1 \times 10^5$  VECs were cultured in 6-cm culture plates. After an incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator for 4~5 days, cells were subjected to SA- $\beta$ -galactosidase assays by using Senescence Detection Kit (BioVision Research Products Inc., Mountain View, CA) according to a manufacture's guidance.

### Cord formation assays

Matrigel™ Basement Membrane Matrix, phenol-Red free (Cat 356237, BD Biosciences, San Jose, CA) was loaded into the 24 multiwell dishes (95  $\mu$ L/well). After the dishes were incubated for 30 min at 37°C,  $1 \times 10^4$  cells per well were seeded in differentiation medium described above. Cell morphologies were observed after overnight culture under an inverted light microscope (Olympus Optical Co. Ltd, Japan).

### Uptake of acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL)

Cells were transferred in four-well chamber slide system (Nalge Nunc International Corp., Naperville, IL). After overnight culture, cells were washed by Hank's balanced salt solution (HBSS) twice and incubated in serum-free medium containing 10  $\mu$ g/mL of low-density lipoprotein from human plasma, acetylated, DiI complex (DiI Ac-LDL) (Invitrogen Corp.) for 4 h. After washing the cells by HBSS for three times, nuclei were counterstained using 10 nM of Hoechst 33342 (Sigma Chemical

Co.). After washing the cells, samples were observed under the fluorescence microscope (Olympus Optical Co. Ltd).

#### Flow cytometry

Cells were collected by a treatment with 0.2% EDTA or Dispase (BD Biosciences). After a wash in phosphate-buffered saline (PBS),  $1 \times 10^6$  cells were reacted with first antibodies on ice for 30 min. The expression level of each protein was analyzed using a FACSCalibur<sup>TM</sup> (BD Biosciences). The antibodies used were a mouse monoclonal antihuman Tie-2- allophycocyanin (APC) antibody (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), antihuman VEGF receptor 1 (VEGF R1)-PE antibody (R&D Systems Inc.), mouse antihuman CD45-PE (BD Biosciences), and mouse antihuman CD11b-PE (BD Biosciences). After antibody-staining procedures, cells were stained with propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co.), in the case of Tie-2 staining, or TO-PRO3 fluorescent dye (Invitrogen Corp.), in the cases of VEGF1, CD45, and CD11b staining, for 10 min. During analysis, dead cells were gated out as FL-2 higher fractions, in the case of PI staining, or FL4-higher fractions in the case of TO-PRO3 staining.

#### Immunostaining

The cells were fixed on slide glasses by using a cytospin apparatus (Cytospin 2) along with further fixation with acetone/methanol solution (1:3). The immunostaining procedure was performed as described elsewhere (Nakahara et al., 2009) with first antibody reactions using a rabbit polyclonal antihuman p16<sup>INK4A</sup> antibody (SC-20) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), a mouse monoclonal antihuman p21<sup>CIP1</sup> antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.), a rabbit polyclonal antihuman endothelial nitric oxide synthase (eNOS) antibody (H-159) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), or a rabbit polyclonal antihuman von Willebrand factor (vWF) antibody (Sigma Chemical Co.), followed by second antibody reactions using Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 chicken antimouse IgG (H+L), Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 goat antirabbit IgG (H+L), or Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 chicken antigoat IgG (H+L) (Invitrogen Corp.). Nuclear counterstaining was performed using 300 nM of 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI).

#### Hematopoietic differentiation of hESCs/hiPSCs

Differentiation was performed as previously described (Saeki et al., 2009). In brief, hESCs/hiPSCs were detached with 1 mg/mL collagenase IV (Invitrogen Corp.) and transferred to a 6 cm diameter low-attachment dish (Nalge Nunc International K.K.) coated with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine in 5 mL IMDM (Sigma Chemical Co.) supplemented with 15% FBS (PAA Laboratories GmbH), 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ M 2-mercaptethanol, 20 U/mL penicillin, and 20  $\mu$ g/mL streptomycin in the presence of 20 ng/mL insulin-like growth factor II (IGF-II; Pepro Tech Inc.), 20 ng/mL VEGFA (Pepro Tech Inc.), 100 ng/mL SCF (Pepro Tech Inc.), 100 ng/mL Flt3-L (Pepro Tech Inc.), 50 ng/mL thrombopoietin (TPO; Kirin Brewery Company, Ltd., Tokyo, Japan), and 100 ng/mL G-CSF (Kirin Brewery Company, Ltd.) (Differentiation medium) at a density of  $4 \times 10^5$

cells/mL. After primary differentiation for 3 days, the spheres were transferred to 10-cm diameter dish coated with 0.1% gelatin. Spheroid cells floating in the culture supernatant were collected over time and analyzed.

#### Colony assays

Colony assays were performed using Methocult TM GF<sup>+</sup>H4535 (Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada) in accordance with the manufacturer's recommendations. In brief, 0.3 mL of cell suspension, which contained 10 cells, was mixed in 3 mL of methylcellulose solution consisting of 1% methylcellulose, 30% FBS, 1% bovine serum albumin, 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 50 ng/mL SCF (Pepro Tech Inc.), 20 ng/mL interleukin 3 (IL-3; Pepro Tech Inc.), 20 ng/mL interleukin 6 (IL-6; Pepro Tech Inc.), 20 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Pepro Tech Inc.), 20 ng/mL G-CSF and 3 U/mL erythropoietin (Kirin Brewery Company, Ltd.) in 3.5-cm culture dishes. After 2 weeks, the number of colonies was counted. The morphology of the colonies was observed using an inverted light microscope (Olympus Optical Co. Ltd).

#### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

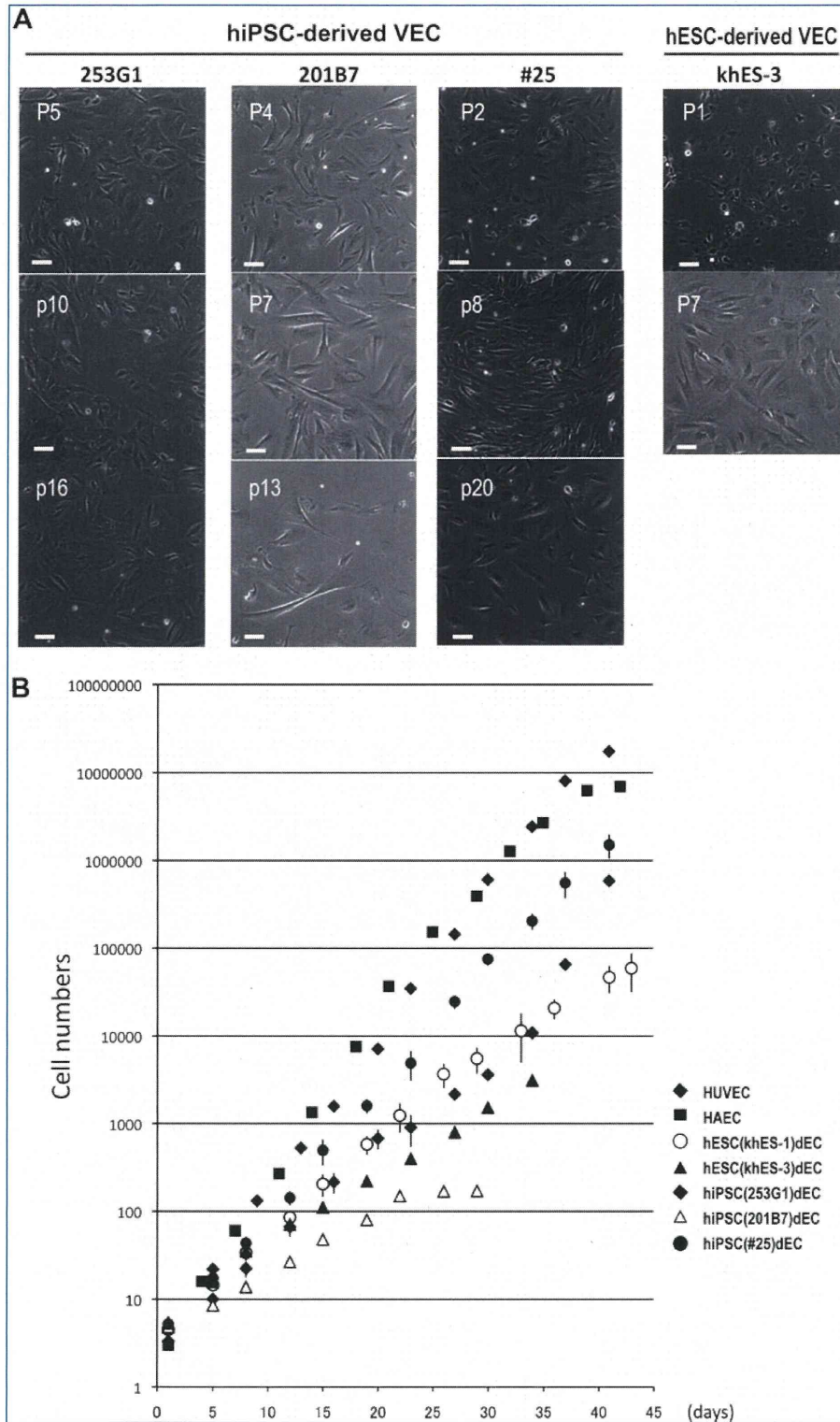
RNA was extracted from  $5 \times 10^6$  cells using an RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) and cDNA was synthesized using a Superscript II Kit (Invitrogen Corp.) in accordance with the manufacturer's protocol. The sequence of the primers used are as follows: vascular endothelial (VE)-cadherin; a forward primer 5'-TGGGCTCAGACATC CACATA-3' and a reverse primer 5'-TCACAGTCTCCCA TTGGGAAT-3', platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1); a forward primer 5'-GCAAAATGGGAAGA ACCTGA-3' and a reverse primer 5'-CACTCCTTCCAC CAACACT-3', interferon  $\alpha$ 1 (IFNA1); a forward primer 5'-GGAGTTTGATGGCAACCAGT-3' and a reverse primer 5'-CTCTCCTCCTGCATCACACA-3', interferon  $\alpha$ 2 (IFNA2); a forward primer 5'-GCAAGTCAAGCTGCTCTGTG-3' and a reverse primer 5'-GATGGTTTCAGCCTTTTGA-3', interferon  $\beta$ 1 (IFNB1); a forward primer 5'-ATTGCCTCAAG GACAGGATG-3' and a reverse primer 5'-AGCCAGGAGG TTCTCAACAA-3'. As a molecular marker, DNA MW Standard Marker 100 bp DNA Ladder (Takara Shuzo Co. Ltd., Shiga, Japan) was used.

#### Wright-Giemsa (WG) staining and special staining procedures

Viable cells in the dishes were observed directly using an inverted phase contrast light microscope (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan). Alternatively, the cells were fixed on glass slides using a cytospin centrifuge (Cytospin 2, SHANDON, Pittsburgh, PA), stained with WG solution (Muto Pure Chemical Co., Tokyo, Japan), and then observed using a light microscope (Olympus Optical Co. Ltd.). Double esterase staining was performed using the staining kit (Muto Pure Chemical Co.) according to the manufacturer's protocols.

#### Phagocytosis

hESC-derived neutrophils attracted to the lower chamber of Chemotaxel were suspended in HBSS containing 2.5% FBS





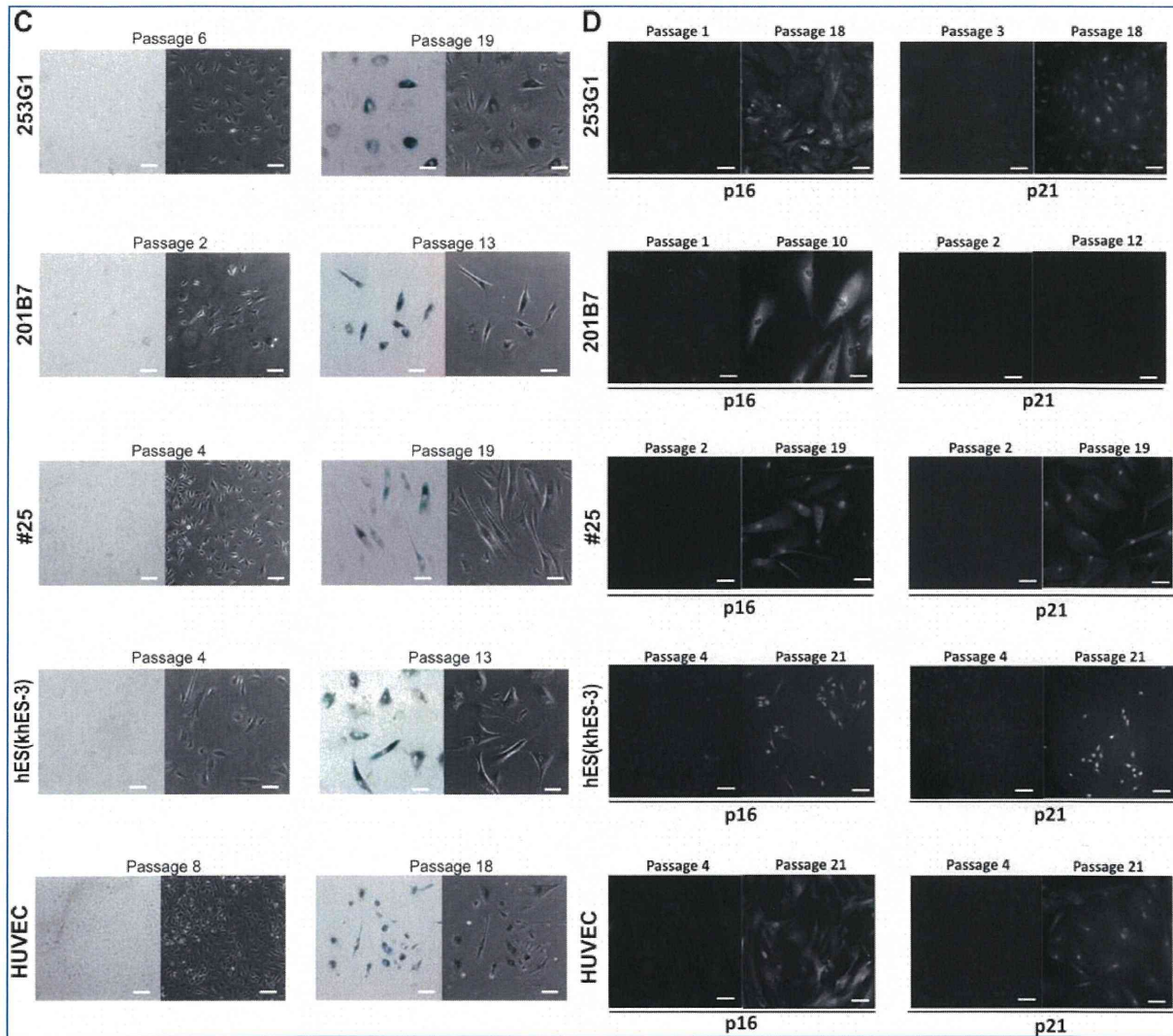


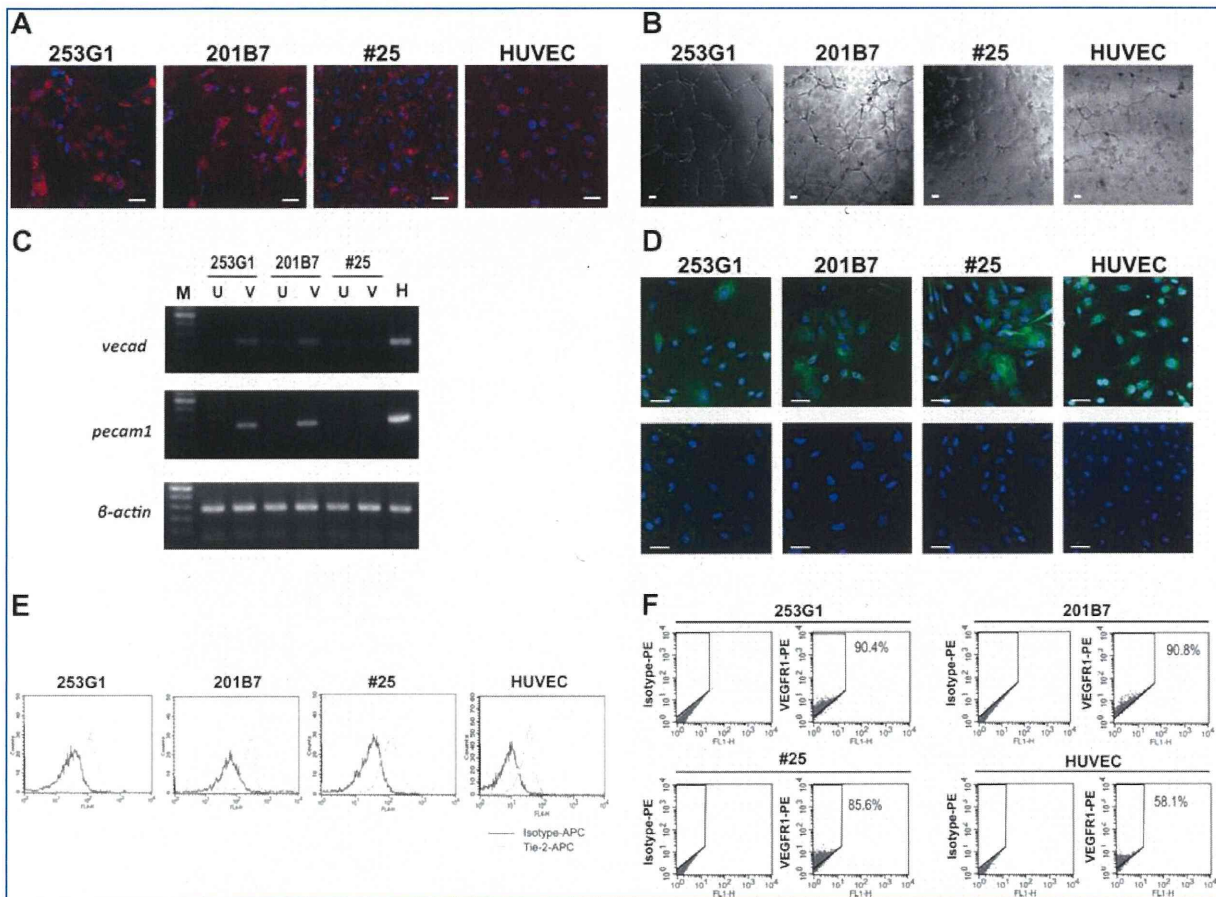
FIG. 1. (Continued).

and incubated at 37°C for 1 h with 5  $\mu$ L zymosan (1 mg/mL) in the presence of 100 nM fMLP. Subsequently, the cells were collected using a cytospin apparatus and stained with WG solution. Phagocytosis was determined by a microscope observation.

*Nitroblue tetrazolium reduction assay for respiratory burst activity*

The floating cells were collected by mild centrifugation of the culture supernatant. After washing with PBS, the cells

FIG. 1. The VEC differentiation of hiPSCs. (A) Phase contrast micrographs. Morphologies of hiPSC-derived and hESC-derived VECs were shown as indicated. Numbers on the photographs in white letters indicates the passage number of each VEC. Scale bars indicate 100  $\mu$ m. (B) Growth curves of various VECs. Average data with standard deviations from three independent experiments are shown in the cases of hiPSC(253G1)-derived VECs (closed triangles), hiPSC(201B7)-derived VECs (open triangles), hiPSC (#25)-derived VECs (gray circles), and hESC(khES-1)-derived VECs (open circles), whereas typical results from one or two experiments were shown in the cases of HUVEC (gray diamonds), HAEC (closed squares), and hESC(khES-3)-derived VECs (gray triangles). (C) SA- $\beta$ -galactosidase assays. The hiPSC (253G1, 201B7, and #25)-derived VECs, hESC (khES-3)-derived VECs, and HUEVC at indicated passage numbers were subjected to SA- $\beta$ -galactosidase assays. Scale bars indicate 100  $\mu$ m. (D) Expressions of senescence-associated genes. The hiPSC (253G1, 201B7, and #25)-derived VECs, hESC (khES-3)-derived VECs, and HUEVC at indicated passage numbers were subjected to immunostaining studies using an anti-p16 or anti-p21 antibody as indicated. Scale bars indicate 100  $\mu$ m.



**FIG. 2.** Evaluation of hiPSC-derived VECs. (A) Ac-LDL-uptaking assays. VECs derived from each hiPSC line (253G1, 201B7, and #25) and HUVEC were subjected to Ac-LDL-uptaking assays (red; dil-Ac-LDL, blue; nuclear staining by Hoechst dye). Scale bars indicate 100  $\mu$ m. (B) Cord formation assays. VECs derived from each hiPSC line (253G1, 201B7, and #25) and HUVEC were subjected to cord formation assays. Scale bars indicate 20  $\mu$ m. (C) RT-PCR analyses. The message expressions of VE-cadherin (*vecad*), PECAM1 (*pecam1*), and  $\beta$ -actin were determined by RT-PCR in undifferentiated hiPSCs (253G1, 201B7, and #25), as indicated "U," or VEC-differentiated hiPSCs, as indicated "V." As positive control, cDNA of HUVEC was used as indicated "H." "M" indicates the molecular marker. (D) The expressions of the eNOS protein. The hiPSCs (253G1, 201B7, and #25 as indicated)-derived VECs and HUVEC were subjected to immunostaining studies using an antihuman eNOS antibody with nuclear counterstaining by DAPI. Scale bars indicate 50  $\mu$ m. (E, F) The expressions of Tie-2 and VEGFR1 proteins. The VECs generated from hiPSCs (253G1, 201B7, and #25 as indicated) and HUVEC were subjected to flow cytometric analyses using an antihuman Tie-2 antibody (E) or an antihuman VEGFR1 antibody (F). A typical result from two to five experiments are shown.

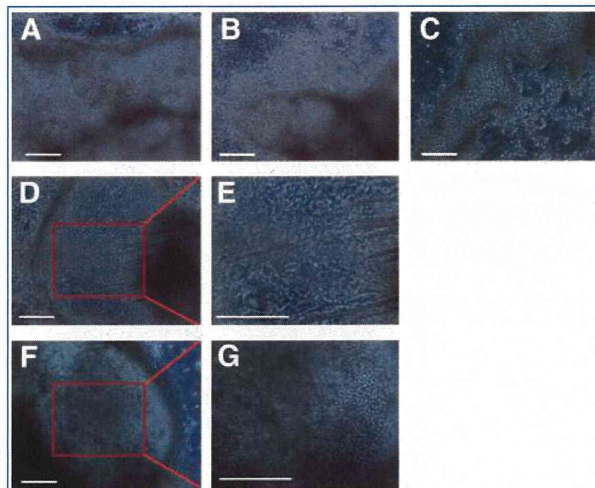
were resuspended in 1 mL RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) supplemented with 10% FBS containing 1 mg/mL nitroblue tetrazolium (NBT) (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) and 100 nM fMLP for 30 min at 37°C. After washing with PBS, the cells were resuspended in 10  $\mu$ L PBS and dropped onto Matsunami Adhesive Silane (MAS)-coated glass slides (Matsunami Glass Ind., Ltd. Osaka, Japan) and the formazan blue-black deposit-containing cells were observed using a light microscope (Olympus Optical Co. Ltd.).

## Results

### hiPSC can generate subculturable VECs

We previously established a feeder-free method for the vascular endothelial differentiation of hESCs (Nakahara et al.,

2009). The unique points of our method are (1) it is a two-tiered differentiation system with a sphere-forming floating culture and a subsequent attachment culture, (2) it uses multiple hematopoietic cytokines in addition to a conventionally used cytokine of VEGF, (3) it enables high-purity production of VECs without contamination by growth-competing pericytes, (4) it enables the production of VECs that can be subcultured up to 10~20 passages (Nakahara et al., 2009). Applying this method, we performed VEC differentiation of the following lines of hiPSCs: 253G1 and 253G4, which were established from adult human dermal fibroblasts by introducing three retroviral transgenes of *oct4*, *sox2*, and *klf-4* (OSK) (Nakagawa et al., 2008), 201B7 and 201B2, which were established from adult human dermal fibroblasts by introducing four retroviral transgenes of *oct4*,

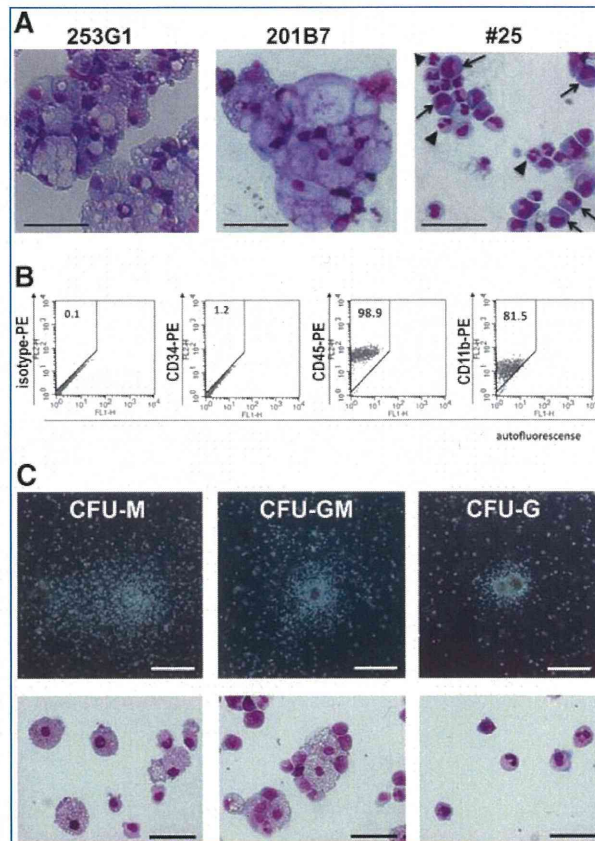


**FIG. 3.** Phase contrast microscopic observation during hematopoietic differentiation of hiPSCs. (A–C) Micrographs of the sac-like structures generated from 253G1 (A), 201B7 (B), and #25 (C). (D, E) Micrographs of the sac-like structures of 253G1 several days after manually puncturing the sac walls and releasing the inner hematopoietic cells. Note that the sac remained empty (E). (F, G) Micrographs of the sac-like structures of #25 several days after manually puncturing the sac walls and releasing the inner hematopoietic cells. Note that the sacs were refilled with hematopoietic cells (G). Scale bars indicate 200  $\mu\text{m}$ .

*sox2*, *klf-4*, and *c-my* (OSKM) (Takahashi et al., 2007) and #25, which were established from human embryonic lung fibroblasts of MRC-5 by introducing retroviral transgenes of OSKM.

Among the five lines, 253G1, 201B7, and #25 successfully generated VECs. Although cell morphologies slightly differed from one another (Fig. 1A), we could effectively expand the VECs generated from all the three lines: the hiPSC-derived VECs were subcultured by 2:1 ~ 3:1 dilutions up to 10 passages, in the case of 201B7, or even higher, in the cases of 253G1 and #25 (Fig. 1B). Both 253G1-derived and #25-derived VECs expanded with comparable growth rates to hESC-derived VECs, whereas the growth speed of 201B7-derived VECs was slightly lower. After 10 ~ 20 passages, the hiPSC-derived VECs underwent senescence as demonstrated by SA- $\beta$ -galactosidase assays as in the cases of hESC-derived VECs and HUVEC (Fig. 1C). In agreement with this, the expressions of senescence-associated gene products of p16<sup>INK4A</sup> and/or p21<sup>CIP1</sup> were induced in the senesced cells (Fig. 1D). Using the cells at exponentially growing phases, we evaluated the functions and marker expressions. All the hiPSC-derived VECs showed high Ac-LDL-uptaking capacities (Fig. 2A) and cord-forming activities (Fig. 2B). Although the expressions of VE-cadherin and PECAM1 messages were hardly detectable in #25-derived VECs (Fig. 2C), these cells showed comparable protein expressions of eNOS (Fig. 2D), Tie-2 (Fig. 2E), and VEGFR1 (Fig. 2F) to the other hiPSCs-derived VECs and HUVEC.

Thus, hiPSCs can generate VECs with equivalent expansion potentials to hESCs, although maturation levels of hiPSCs-derived VECs vary depending on the lines of hiPSCs.



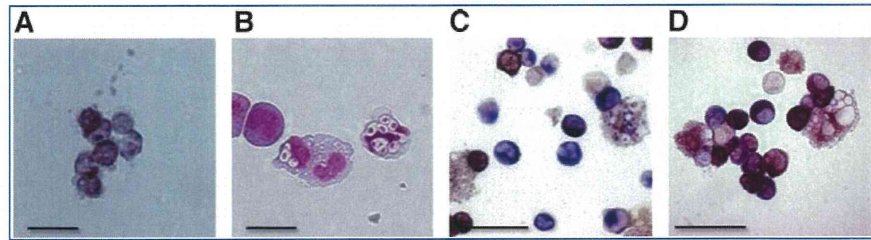
**FIG. 4.** Evaluation of hematopoietic potentials of hiPSC-derived cells (A) Cytological observation. Hematopoietic cells generated from hiPSCc (253G1, 201B7, and #25 as indicated) were stained by Wright-Giemsa solution. In #25-derived cells (right), azure granule-positive myeloid precursor cells (arrows) and segmented neutrocytes (arrow heads) were observed, whereas only macrophages were detected in 253G1-derived (left) and 201B7-derived (middle) cells. Scale bars indicate 50  $\mu\text{m}$ . (B) Flow cytometry. The #25-derived hematopoietic cells were subjected to flow cytometric analyses using antihuman CD34, CD45, and CD11b antibodies as indicated. Number on each figure indicates the percentage of the corresponding marker-positive cells. (C) Colony assays. The #25-derived hematopoietic cells were subjected to colony assays. CFU-M, CFU-GM, and CFU-G were determined by phase contrast microscopic observation (upper panels; scale bars indicate 500  $\mu\text{m}$ ), which were further confirmed by Wright-Giemsa staining studies (lower panels; scale bars indicate 50  $\mu\text{m}$ ).

#### *hiPSCs can generate reproducible HPCs with comparable colony-forming activities to hESCs*

We previously established a feeder-free method for the neutrophil differentiation of hESCs (Saeki et al., 2009). By our system, HPCs are generated within a unique construction named the "sac-like structure." Within this structure, HPCs are repeatedly generated: they are reproduced within a few days after manually puncturing the sac walls and releasing the inner HPCs into the culture supernatant (Saeki et al., 2009). The reproduction process can be repeated three or four times (Saeki et al., 2009).

**FIG. 5.** Functional assessments and special staining. (A, B)

The #25-derived hematopoietic cells were subjected to an NBT-reducing assay (A) or phagocytosis assay (B). Almost all the cells showed NBT-reducing activities (A) and zymosan-phagocytizing myeloid cells were often observed (B). Scale bars indicate 20  $\mu\text{m}$ . (C, D) The #25-derived hematopoietic cells (C) or hESC (khES-3)-derived hematopoietic cells (D) were subjected to double esterase staining assay. Note that typical neutrophil-specific dark blue staining patterns were clearly observed in #25-derived cells, whereas hESC-derived hematopoietic cells showed rather mixed (brownish blue) staining patterns. Scale bars indicate 50  $\mu\text{m}$ .



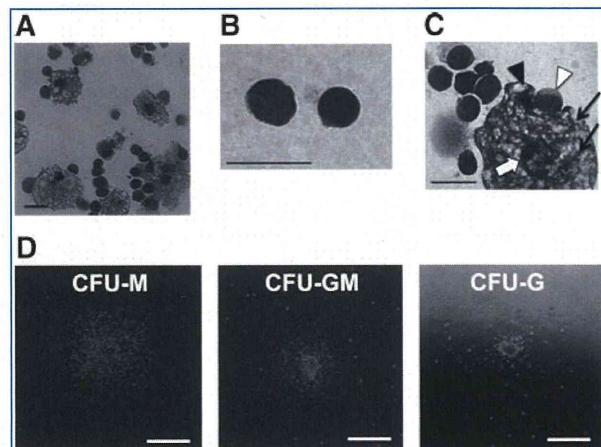
By applying this method, we performed neutrophil differentiation of 251G3, 201B7, and #25. All three lines successfully generated sac-like structures that were filled with abundant spheroid cells (Fig. 3A–C). However, the walls of 201B7-derived sacs seemed rather fragile because the inner spheroid cells spontaneously permeated the sac-like structures (Fig. 3B). Furthermore, we failed in reproducing spheroid cells after manually puncturing the sac walls and releasing inner spheroid cells into the culture supernatant (data not shown). In the case of 253G1, the sac walls seemed solid; however, spheroid cells were scarcely reproduced after sac wall puncturing (Fig. 3D and E). In contrast, spheroid cells were actively reproduced in the case of #25 (Fig. 3F and G). Eventually, the reproduction process persisted up to 60 days after the start of differentiation (data not shown), which was longer than that of hESCs (up to 40 days) (Saeki et al., 2009). Thus, the #25 line bears an equivalent, or even higher, spheroid cell-reproducing potential to hESCs.

We further evaluated the qualities of hematopoietic differentiation of 253G1, 201B7, and #25. First, cytological examinations were performed around day 30 of differentiation, when abundant neutrophil production was observed in the case of hESCs (Saeki et al., 2009). However, vast majorities of the products of 253G1 and 201B7 were macrophages (Fig. 4A, left and middle). On the other hand, various stages of granulocyte-lineage cells, from azurophilic granule-positive myeloid progenitors to segmented granulocytes, were observed in the case of #25 (Fig. 4A, right). Flow cytometric analyses demonstrated that #25-derived spheroid cells were highly positive for CD45, a pan-hematopoietic cell marker, and the majority of cells were positive for CD11b, a granulomonocytic marker (Fig. 4B). To confirm their hematopoietic activities, colony assays were performed (Fig. 4C). The #25-derived spheroid cells demonstrated equivalent, or even higher, colony-forming unit-granulocyte (CFU-G) ( $8.0 \pm 5.3/10^4$  cells;  $n = 3$ ), colony-forming unit-granulocyte/macrophage (CFU-GM) ( $12.3 \pm 5.5/10^4$  cells;  $n = 3$ ), colony-forming unit-macrophage (CFU-M) ( $21.0 \pm 3.5/10^4$  cells;  $n = 3$ ) to those of hESCs, whose average CFU-G, CFU-GM, and CFU-M per  $10^4$  cells were 2.3, 7.9, and 3.1, respectively ( $n = 2$ ). Thus, hiPSCs can produce HPCs with equivalent colony-forming activities to hESCs.

We also confirmed the functional maturation of #25-derived neutrophils by performing a superoxide production study (Fig. 5A), a phagocytosis assay (Fig. 5B), and double esterase-staining test (Fig. 5C). Interestingly, the

double-esterase staining test, in which neutrophil-specific esterase is stained blue while that of nonspecific monocyte/macrophage esterase is stained brown, demonstrated that #25-derived cells showed even clearer neutrophil-specific blue staining patterns than hESC-derived ones, the majority of which showed brownish blue or bluish brown staining (Fig. 5D). Thus, hiPSCs can generate neutrophil with equivalent, or even higher, maturation levels than hESCs.

For further assessment of possible hematopoietic potentials of 253G1-derived and 201B7-derived spheroid cells, we checked the morphologies of spheroid cells over time. Surprisingly, small round cells with high nucleus/cytoplasm



**FIG. 6.** The hiPCS-derived differentiated cells at early phases. (A–C) The 253G1-derived nonadherent cells at day 21 of differentiation were collected and stained by Wright-Giemsa solution. Abundant small cells with particularly high nuclear cytoplasmic ratios were detected (A, B). Note that the macrophage contained condensed nucleus-like substances (closed arrow head) and/or chromatin-like substances (arrows) in addition to its own nucleus (open arrow). Small cells were occasionally encompassed by the cytoplasm of macrophages (open arrow head). Scale bars indicate 20  $\mu\text{m}$ . (D) The 253G1-derived nonadherent cells at day 23 of differentiation were subjected to colony assays. CFU-M, CFU-GM, and CFU-G were determined by phase contrast microscopic observation. Scale bars indicate 500  $\mu\text{m}$ .