

(生物製剤承認申請)に基づく。重篤ないし致命的な疾病のための新薬については、十分に管理の行き届いた臨床試験によってサロゲート・エンドポイントに対する有効性、または生存や不可逆的病状以外のエンドポイントに対する有効性を示すことができれば販売承認がなされる場合がある。ただし、臨床研究は続行し、有用性を確認しなければならない。市販後調査も必要。

iii. Priority Review Policy (優先審査制度)

CDER または CBER による優先的な審査により、審査期間を通常約 10 ヶ月のところから約 6 ヶ月に短縮させる制度。生物製剤の場合には、重篤または致命的な疾病の治療、診断または予防における有効性ないし安全性において有意な改善をもたらす製品、または有意な改善をもたらす可能性のある製品とみなされれば適用される。^{9,10}

iv. Orphan Drug Designation (オーファン製品指定)

1983 年に「オーファンドラッグ法」(Orphan Drug Act) が制定され、対象患者が国内で 20 万人以下の医薬品、または国内に 20 万人以上患者がいるが開発して販売承認を得るまでの費用が国内の売り上げでは賄えないということが合理的に考えて期待できないような医薬品・生物製剤については、これをオーファン製品として指定し、臨床研究に対する研究費支援、臨床研究費用の税控除、FDA に対する申請手数料の免除、および 7 年間の市場独占権を認めている。オーファン製品指定の審査はオーファン製品開発室 (OOPD: Office of Orphan Products Development) で行われる。FDA の情報サイト：

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd> によれば、現在、少なくとも 80 程度の HCT/P がオーファン製品指定を受けていることが分かる。ただし、オーファン製品 (生物製剤) として FDA から販売承認を受けた HCT/P はまだない。

C-3-2 医療機器

すべての資料を一括して提出する通常の PMA に加え、出来るだけ早く機器の販売を可能にするための方法として申請書の早い時期から申請者と協力する方法として、Modular PMA、Streamlined PMA、Product Development Protocol (PDP) がある。また、稀少疾病・障害のために使用する医療機器の開発促進策として、人道機器特例承認 (HDE: Humanitarian Device Exemption) がある。

i. Modular PMA (モジュラーPMA)

申請者は PMA を、製造、前臨床試験、臨床試験等に細分化したモジュール (部分) に分解する。モジュールは個別に完成され、順次 FDA に提出・審査される。最初の段階で、モジュール提出計画(PMA シェル)を策定し、内容に関して申請者と FDA とで合意する必要がある。各モジュールを受理した後、ただちに審査を開始する。最後のモジュールが提出された時には、審査の多くが終了しているため、審査が手早く終わることが期待できる。なお、審査料は最初の PMA モジュールを提出する前に支払う。モジュラー PMA は、PMA 申請書提出が間近である場合や、機器の設計が流動的で変更する可能性が高い場合には不向きである。

ii. Streamlined PMA (簡素化 PMA)

簡素化 PMA は CDRH の臨床検査機器課で始められた方法である。従来型 PMA 同様に PMA 資料を一括提出するが、FDA が機器の技術・用途をよく理解している場合に適用される。簡素化 PMA 審査は、FDA ガイダンスまたは FDA が評価済みの公開の審査方法がある場合や、類似製品の審査経験を FDA が豊富に持つ場合に用いることが適当であるとされる。

iii. PDP (Product Development Protocol) (製品開発プロトコール)

21 CFR 814.19 に規定される販売承認を得るための方法。FDA が製品開発プロトコールを完成したことを公示したクラス III 医療機器は PMA 承認を持つとみなされる。試験開始前にプロトコール (仮説、目的、エンドポイント等) を根拠として承認する。PDP の過程に進む製品としては、技術が業界で十分確立しているものが

理想的である。

iv. **HDE (Humanitarian Device Exemption)**
(人道使用機器特例承認)¹¹

21 CFR 814.100-126 に規定される。人道使用機器 (HUD, Humanitarian Use Device) とは、米国内で年間 4 千人以下が罹患ないし発症する疾病または病態の治療または診断において患者にとって有益で、他に有効な機器が存在しない医療機器と定義される。このような稀な疾病に対する医療機器の開発の費用は、患者の数が少ないゆえに売り上げによって回収することが難しいことから、政府による開発振興策が講じられている。HUD 指定もオーファン製品指定と同様に OOPD で行われる。HUD として販売するためには、HDE (人道使用機器特例承認) 申請を CDRH に提出し、承認を得なければならない。HDE 申請は内容的に PMA 申請に類似しているが、PMA にある有効性に関する要件を免除される点が特徴的である。すなわち、有効性を合理的に立証する臨床試験結果は必要とされない。ただし安全性についての評価は必要で、機器によって不合理または明らかな病気・障害のリスクに患者をさらすようなことがないこと、想定されるベネフィットが病気・障害のリスクを上回ること、現在利用可能な機器や代替治療法のリスク・ベネフィットを考慮すること、が必要とされる。他に HDE に特徴的なこととして、使用される医療施設の倫理委員会 (IRB) の承認が必要であることが挙げられる (21 CFR 814.124)。機器が HDE 承認を受けていれば、患者へのインフォームドコンセントは要求されない。なお HUD の製造については QSR 準拠が原則であるが、免除請求が可能で、FDA の判断で QSR 準拠を免除されることがある。なお、FD&C Act Section 520 (m) (21 U.S.C. 360j) によって、実費以上の値段で販売して利益を得ることは禁止されている。ただし、2007 年小児用医療機器安全性・改善法 (The Pediatric Medical Device Safety and Improvement Act of 2007, Public Law 110-85) により、小児の患者ないし小児の集団への適用を目的とし、2007 年 9 月 27 日以

降に承認された HUD については、既定の出荷数を超えない範囲で利益目的に販売しても構わない。HDE の審査期間は 75 日以内と規定されている。これまでに医療機器として販売承認を受けた 351HCT/P の中では、培養皮膚製品である Epicel と OrCel が、それぞれ熱傷と表皮水疱症の適用において HDE 承認を受けている (表 2)。

C-4 FDA オーファン製品開発室

1983 年に成立したオーファンドラッグ法には、稀少な疾病・病態の診断、予防または治療を目的とした製品の開発を連邦政府がサポートすることが国の方針であるということが明示されている。本法律に対応するための組織として、FDA にはオーファン製品開発室 (OOPD) がある。OOPD の任務は、稀少疾病用製品 (医薬品、生物製剤、医療機器、医療用食品 (医師の監視下でのみ使用でき疾病や栄養管理用として特別に使用される食品)) の開発と評価を推進することであり、オーファン指定の申請のあった製品について、科学的データおよび臨床データに基づき、当該製品が稀少疾病用製品に該当するかどうか、および公的に開発を推進すべきかどうかについての評価が行われている。また OOPD は稀少疾病に関し、産官学および患者団体の意見集約の場としても機能している。

C-5 販売未承認の製品の臨床利用

上記制度の他に、米国では未承認の生物製剤および医療機器の臨床利用は、重篤・致命的・代替療法のない疾病に対する緊急的もしくは人道的使用において認められている。これはあくまで例外的な措置 (広い意味でのコンパッションネート・ユース (人道的使用)) であって、基本的には研究ではないものの、臨床試験として FDA に登録する必要がある。生物製剤に関しては、通常の IND 申請を行うことができない緊急時、臨床プロトコル外の患者、特定の個人患者に使用することが可能である。医療機器に関しては、臨床試験中の緊急時での使用、臨床試験の基準外の患者への使用、臨床試験途中の患者の追加、臨床試験完了後で販売承認前使用が可能になっている。

C-6 FDA 安全性・イノベーション法

2012年7月、「FDA 安全性・イノベーション法」(FDASIA: Food and Drug Administration Safety and Innovation Act)が成立した。この法律は、革新的な医薬品、医療機器、ジェネリック医薬品およびバイオ後続品の審査料を徴収するFDAの権限やその他の制度改革について定めたものであり、再生医療/細胞・組織利用製品の開発・実用化にも大きな影響を与えるものになると考えられる。

C-6-1 審査料

FDASIAでは製薬業界とFDAとの間で審査料の交渉が可能なが明文化されている。また、2013—2017会計年度の間も継続して医薬品審査の促進を目的とした審査料を徴収する権限をFDAに認めている。審査料の値上げと引き換えに、FDAは「審査の迅速性の確保」「審査過程における申請者とのコミュニケーションの緊密化」「稀少疾病等の患者とのコミュニケーションの拡充」「組織パフォーマンスの自己評価」を実施することになる。また、ジェネリック医薬品およびバイオ後続品の審査料についてはFDASIAで初めて明文化された。

C-6-2 ファースト・トラックと加速承認

FDASIAには、重篤・致命的な疾病の治療を目的とした医薬品の審査・承認プロセスに関する改正がいくつか記されており、これらの改正により、再生医療/細胞・組織利用製品の審査も加速されると期待される。FDASIAでは、ファースト・トラックの指定を受けた医薬品等の開発振興および審査促進をFDAに求めている。また、加速承認制度を強化し、ファースト・トラック指定製品を含めた難病治療薬の販売承認審査を迅速化するための仕組みの整備も求めており、FDAは関連ガイダンス案をFDASIAの発効から1年以内に作成し、その翌年に正式に発出することが求められている。

さらにFDASIAでは、重篤な疾病・病態の治療を目的とし、かつ既存の治療方法よりも明らかに優れていることが予備的な臨床データによって示された治療法を「打開的治療法」(Breakthrough Therapy)とし、その指定を受けた医薬品の開発と審査の促進もFDAに求めており、FDAは打開的治療法に関するガイダンス案をFDASIA発効後18カ月以内に作成し、その翌年に正式に発出することが求められている。

C-6-3 稀少疾病

稀少疾病治療薬の開発促進については上の他にも幾つかの条項があり、例えば、稀少疾病

の関係者(産業界、アカデミア、患者団体など)とFDAとの対話の機会を設けることや、審査に際して稀少疾病に関する外部専門家の意見を必要に応じて聴取することが求められている。また、小児稀少疾病(出生から18歳までに発症する稀少疾病)の治療薬開発には優先審査制度が適用されることになっている。

D & E. 考察および結論

FDASIAにあるように、米国はアンメット・ニーズを克服するための革新的医薬品・医療機器の開発と実用化の促進を国の方針とし、その実現のため、FDAには制度のさらなる改善が求められている。

近年の科学の発展とともに、重篤・致命的な稀少疾病に対する標的分子やバイオマーカーの同定・開発が行われるとともに、再生医療からのアプローチも多く試みられるようになり、これらを駆使した革新的な医薬品・医療機器の開発に期待が集まっている。医薬品・医療機器の安全性・有効性の判断にはリスクとベネフィットのバランスが重要であるが、その評価においては製品が革新的であればあるほど開発者にとっても審査側にとっても未知・未経験の要素が多くなる。そうした状況下で、稀少疾患・難病に苦しむ患者にいち早く新しい治療法を届けるにはどうしたらよいのか、という大きな問題の解決策を探る際、本稿で挙げた米国の制度における考え方が参考になると考えられる。

(参考文献)

1. 平成12年12月26日医薬発第1314号別添1「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」
2. 平成15年5月20日厚生労働省告示第210号「生物由来原料基準」
3. 平成22年11月1日厚生労働省告示第380号「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」
4. 平成20年2月8日薬食発第0208003号「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」
5. 平成20年9月12日薬食発第0912006号「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」
6. FDA Definition of Primary Mode of Action of a Combination Product.

- Federal Register Vol. 70, No. 164 August 25, 2005
7. FDA Guidance for Industry and FDA Staff: Minimal Manipulation of Structural Tissue Jurisdictional Update. September, 2006
 8. FDA Guidance for Industry: Fast Track Drug Development Programs – Designation, Development, and Application Review. January, 2006
 9. FDA/CDER MAPP 6020.3 Review Classification Policy: Priority (P) and Standard (S). July 16, 2007
 10. FDA/CBER SOPP 8405 Complete Review and Issuance of Action Letters. September 20, 2004
 11. FDA Guidance for HDE Holders, Institutional Review Boards (IRBs), Clinical Investigators, and FDA Staff – Humanitarian Device Exemption (HDE) Regulation: Questions and Answers. July 8, 2010

F. 研究発表

F-1 論文発表

1. Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GKR6-deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nat Commun*. 2013;4: 1532.
2. 安田智, 佐藤陽治 安全性評価の総論、造腫瘍性試験の現状と展望「幹細胞医療の実用化技術と産業展望」(シーエムシー出版)印刷中
3. Kuroda T, Yasuda S, Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products *Biol Pharm Bull*. 2013;36:189-92.
4. 佐藤陽治, 村岡ひとみ 再生医療分野の関連規制: FDA の動向 「稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発」(編集: 技術情報協会) pp330-335 (2012), 技術情報協会, 東京
5. Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y, Ide T, Nishida M, Kurose H. Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent and GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*. 2012; 287:35669-77.
6. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e37342.

F-2 学会発表

1. K Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. The Final Version of Japanese Guidelines on Ensuring Quality and Safety of Products Derived from Processing of Various Human Stem Cells. World Stem Cell Summit 2012, West Palm Beach, Florida, USA (2012年12月3-5日)
2. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, Matsuyama A, Yamanaka S, Yamato M. Japanese guidelines on ensuring quality and safety of products derived from engineered human stem cells—after public consultation—. 3rd TERMIS World Congress 2012, Vienna, Austria (2012年9月5-8日)
3. 佐藤陽治 再生医療/細胞・組織加工製品の安全性評価 第39回日本毒性学会年会 (2012年7月17日)
4. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Suzuki K, Kawamata S, Sato Y. Validation of in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012年6月13-16日、横浜)
5. 黒田拓也, 安田智, 草川森士, 鈴木和博, 川真田伸, 佐藤陽治 ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞中に残存する未分化細胞の in vitro 高感度検出法の開発と評価 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月12日、横浜)
6. 佐藤陽治 国際協調と日本のあるべき姿 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会 (2012年6月13日、横浜)

7. 佐藤陽治 ヒト多能性幹細胞加工製品の製造における造腫瘍性評価 第11回日本再生医療学会総会再生医療学会(2012年6月12日、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 取得特許	なし
H-2 実用新案登録	なし
H-3 その他	なし

表 1 361HCT/P であるための要件 (21CFR1271.10(a))

(1) HCT/P の処理が最小限* (minimal manipulation)
(2) HCT/P が、細胞・組織の採取部位と同等な部位への適用 (homologous use) にのみ限定される場合で、そのことが表示、宣伝等に反映されている
(3) 製造工程に他の物質 (水、クリスタロイド、滅菌剤、保存料、または貯蔵剤を除く) と細胞または組織との複合体化が含まれず、かつ水、クリスタロイド、滅菌剤、保存料、または貯蔵剤の添加によって当該 HCT/P に関して新たな臨床上の安全の上での懸念を生じない
(4) 以下の何れかに該当する場合 : <ol style="list-style-type: none"> 1) HCT/P に全身的な作用がなく、その主たる機能として生細胞の代謝活性に依存することがない場合 ; または 2) HCT/P に全身的な影響がある、またはその主たる機能として生細胞の代謝活性に依存することがある場合で : なおかつ <ol style="list-style-type: none"> i) 自己への使用を目的とする場合 ; ii) 一親等または二親等の血縁関係の同種のための使用である場合 ; または iii) 生殖目的の使用である場合。
*注 : 最低限の処理 (minimal manipulation) の要件 (21CFR1271.3(f)) ⁷ <ol style="list-style-type: none"> ① 構造のある組織については、再建、修復または置換における当該組織の有用性に関して組織本来の特性に変化を与えるものではないこと ; また、 ② 細胞ないし構造のない組織については、細胞または組織の本来の生物学的特性に変化を与えるものではないこと

表2 FDAの販売承認を得ている351HCT/P(2013年3月現在)

製品名	細胞/足場材料	適用	分類	承認
Carticel	自己軟骨細胞	軟骨損傷	生物製剤	BLA
Provenge	自己樹状細胞 (PAP抗原提示)	転移性 前立腺がん	生物製剤	BLA
laViv (azficel-T)	自己線維芽細胞	ほうれい線解消 (美容整形)	生物製剤	BLA
HemaCord (HPC-C)	同種臍帯血	造血幹細胞移植	生物製剤	BLA
Gintuit (Apligraf (Oral))	同種角化細胞 /ウシ由来コラーゲン	歯肉再生	生物製剤	BLA
Epicel	自己角化細胞 /マウス細胞層	熱傷	医療機器	HDE
Apligraf (Graftskin)	同種角化細胞 +同種線維芽細胞 /ウシ由来コラーゲン	皮膚潰瘍	医療機器	PMA
TransCyte (Dermagraft-TC)	同種線維芽細胞 /ナイロン基材	熱傷	医療機器	PMA
Dermagraft	同種線維芽細胞 /ポリグラクチンメッシュ	皮膚潰瘍	医療機器	PMA
OrCel	同種角化細胞 +同種線維芽細胞 /ウシ由来コラーゲン	熱傷 表皮水疱症	医療機器	PMA(熱傷) HDE(表皮水疱症)

分担研究課題

研究分担者 氏名 末盛 博文 所属 京都大学再生医科学研究所

研究要旨：ES細胞を用いた細胞移植医療においてその原材料と言えるES細胞自体の安全性の確保は非常に重要である。様々な合成培養系を検討し、培養液・基質ともに十分な品質管理がなされた条件下での未分化維持培養の可能性を検討した。合成培養系での培養が可能であるが、長期培養時にゲノム安定性に関してより詳細な分析が今後とも必要である。

A. 研究目的

ES細胞などのヒト幹細胞を用いた様々な臨床利用に向けての基盤研究が進展しており、実際に臨床への適用が近づいてくる中で、このような新しい医療を実現する上で、製造管理や品質試験、前臨床試験やその評価方法などについて汎用性の高い技術基盤を構築することは、ES細胞医療の安全性・有効性を確保する上で非常に重要であるが、いまだ十二分に確立されているとは言えない状況にある。

そこで本研究では、このような再生医療の実用化のため、移植組織の主たる出発材料であるES細胞の原材料としての安全性をどのように確立するかを、ES細胞の自己増殖機構の解明とその利用という観点から、培養技術論的なアプローチを中心に検討する。この研究により「安全なES細胞」を再生医療に供する科学的・技術的基盤の構築に資することを目的とする。

B. 研究方法

「細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確認申請記載要領(薬食審査発0420第1号平成22年4月20日)」など関連する指針等に留意し、ES細胞の臨床利用を実現する上で問題となりうる培養技術に関連した要素について検討する。

培養液・基質などについて高度な品質管理が可能ないわゆる合成培地・基質の性能評価と、これらに使用による細胞の品質に対する影響を分析する。

(倫理面への配慮)

京都大学再生医科学研究所におけるヒトES細胞株の樹立研究と使用研究は、政府指針に沿った文部科学大臣からの確認をすでに受けている。本研究はこれらの研究に含まれる。

C. 研究結果

ES細胞などのヒト多能性幹細胞の臨床応用ためには感染性因子の混入を可能な限り避けるとともに、多能性幹細胞の特性に重大な変化を及ぼさない培養技術の開発が不可欠である。安全性を確保するうえで重要な問題としては、培養環境から品質管理が困難な成分の排除すること、また培養工程を正確に管理することがあげられる。我々が従来から進めている、医薬品製造基準に基本的に適合した培養および工程管理の有効性を検証した。動物由来成分を含まない培養液と化学合成された基質を用いて培養をおこなったのち、仮想的にバンクスケールでの凍結保存ストックの作成を行った。また凍結保存サンプルについて品質検査を行い、これまでのところ未分化細胞としての特性を保持していることを確認した。あわせて、ヒトES細胞の自己増殖機構に着いての分子生物学的解析や、組換えタンパク質を基質の用いた培養方法の開発をおこなった。

D. 考察

医薬品製造グレードに準じて細胞培養を行うことは、ヒトES/iPS細胞のように培養操作が煩雑であり、また種々の環境変化により特性

変化を起こしやすいとされている多能性幹細胞では、いまだ解決が必要な問題を多く抱えているのが現状である。今回は実際の製造工程にほぼ近い形で中規模のマスターセルバンク構築のウェットランにともない、品質評価を実施し特性がバンク構築の過程で変化することがないことを示すことができたものとする。

E. 結論

動物由来成分を含まない培養液の使用や、厳格な工程管理を含む現状のシステムでのバンク構築の実現性は一定のレベルで実証出来たと言える。今後は簡便なバンク構築のための新規技術の導入開発や、安全性を確保するための品質評価をより効率的に行う技術の開発が必要である。また過度に安全性を追求することがないように適切な基準値の設定について科学的な検証、議論が求められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells.

Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E.

Nat Commun. 2012 Dec 4;3:1236.

The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells.

Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji N, Suemori H, Dunn NR.

Genes Dev. 2012 Nov 15;26(22):2471-6.

2. 学会発表

Takamichi Miyazaki, Sugiko Futaki, Hirofumi Suemori, Yukimasa

Taniguchi, Masashi Yamada, Miwa Kawasaki, Maria Hayashi, Hideaki

Kumagai, Norio Nakatsuji, Kiyotoshi Sekiguchi,

Eihachiro Kawase

ISSCR2012 (国際幹細胞学会 第 10 回年次大会)、2012 年 6 月 13 日～16 日
パシフィコ横浜

MANUFACTURING AND BANKING OF CLINICAL-GRADE HUMAN EMBRYONIC STEM CELL LINES IN A GMP FACILITY

Takada Kei, Hirai Masako, Kawase Eihachiro, Hamao Mari, Kashigi Fumi, Suemori Hirofumi, Nakatsuji Norio, Takahashi Tsuneo A.

ISSCR2012 (国際幹細胞学会 第 10 回年次大会)、2012 年 6 月 13 日～16 日
パシフィコ横浜

蛍光プローブ(KP-1)の ES/iPS 細胞特異的蓄積における ABC タンパク質の関与

富岡麻衣子、藤林悠人、平田直、山内香織、南一成、永田 紅、山中伸弥、中辻憲夫、末盛博文、上杉志成、植田和光

第 85 回日本生化学会年会 2012 年 12 月 14-16 日 (福岡)

RECOMBINANT HUMAN LAMININ E8 FRAGMENTS (LM-E8s) SUPPORT THE EFFICIENT ADHESION AND EXPANSION OF DISSOCIATED HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS UNDER DEFINED AND XENO-FREE CONDITION.

Miyazaki, Takamichi, Futaki, Sugiko, Suemori, Hirofumi, Taniguchi, Yukimasa, Yamada, Masashi, Kawasaki, Miwa, Hayashi, Maria, Kumagai, Hideaki, Nakatsuji, Norio, Sekiguchi, Kiyotoshi, Kawase, Eihachiro

World Stem Cell Summit 2012, 2012 年 12 月 3 日～5 日, Florida, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

III. 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

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
安田智, 佐藤陽治	安全性評価の総論、造腫瘍性試験の現状と展望	江上美芽, 水谷学	幹細胞医療の実用化技術と産業展望	シーエムシー出版	東京	2013 (予定)	印刷中
佐藤陽治, 村岡ひとみ	再生医療分野の関連規制:FDAの動向	技術情報協会	稀少疾患／難病の診断・治療と製品開発	技術情報協会	東京	2012	330-335

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A , Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K.	Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer.	Cell Metab	16(3)	394-406	2012
Higuchi A, Ling QD, Hsu ST, Umezawa A .	Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation.	Chem Rev	112(8)	4507-4540	2012
Sugawara T, Nishino K, Umezawa A , Akutsu H.	Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells.	Stem Cell Res Ther	3(2)	8	2012
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.	Cell Reprogram	14(2)	171-185	2012
Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y , Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H.	GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance.	Nat Commun	4	Article number:1532	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuroda T, Yasuda S, Sato Y.	Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products.	Biol Pharm Bull	36	189-92	2013
Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y , Ide T, Nishida M, Kurose H.	Induction of cardiac fibrosis by β -blocker in G protein-independent and GRK5/ β -arrestin2-dependent signaling pathways.	J Biol Chem	287	35669-77	2012
Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y.	Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human iPS cells.	PLoS One	7	e37342	2012
Miyazaki T, Futaki S, Suemori H. , Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E.	Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells.	Nat Commun	3	Article number:1236	2012
Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji N, Suemori H. , Dunn NR.	The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells.	Genes Dev	26(22)	2471-2476	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Production of Functional Classical Brown Adipocytes from Human Pluripotent Stem Cells using Specific Hemopoietin Cocktail without Gene Transfer

Miwako Nishio,¹ Takeshi Yoneshiro,⁴ Masako Nakahara,¹ Shinnosuke Suzuki,¹ Koichi Saeki,⁵ Mamoru Hasegawa,⁵ Yuko Kawai,⁶ Hidenori Akutsu,⁷ Akihiro Umezawa,⁷ Kazuki Yasuda,² Kazuyuki Tobe,⁸ Akira Yuo,¹ Kazuo Kubota,³ Masayuki Saito,⁹ and Kumiko Saeki^{1,*}

¹Department of Disease Control, Research Institute

²Department of Metabolic Disorder, Diabetes Research Center, Research Institute

³Department of Radiology

National Center for Global Health and Medicine, Tokyo 162-8655, Japan

⁴Laboratory of Histology and Cytology, Department of Anatomy, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

⁵DNAVEC Corporation, Ibaraki 300-2511, Japan

⁶LSI Sapporo Clinic, Sapporo 065-0013, Japan

⁷Department of Reproductive Biology, Center for Regenerative Medicine, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo 157-8535, Japan

⁸The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Toyama, Toyama 930-0194, Japan

⁹Department of Nutrition, School of Nursing and Nutrition, Tenshi College, Sapporo 065-0013, Japan

*Correspondence: saeki@ri.ncgm.go.jp

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.001>

SUMMARY

Brown adipose tissue is attracting much attention due to its antiobese effects; however, its development and involvement in metabolic improvement remain elusive. Here we established a method for a high-efficiency (>90%) differentiation of human pluripotent stem cells (hPSCs) into functional classical brown adipocytes (BAs) using specific hemopoietin cocktail (HC) without exogenous gene transfer. BAs were not generated without HC, and lack of a component of HC induced white adipocyte (WA) marker expressions. hPSC-derived BA (hPSCdBA) showed respiratory and thermogenic activation by β -adrenergic receptor (AdR β) stimuli and augmented lipid and glucose tolerance, whereas human multipotent stromal cell-derived WA (hMSCdWA) improved lipid but inhibited glucose metabolism. Cotransplantation of hPSCdBA normalized hMSCdWA-induced glucose intolerance. Surprisingly, hPSCdBAs expressed various hemopoietin genes, serving as stroma for myeloid progenitors. Moreover, AdR β stimuli enhanced recovery from chemotherapy-induced myelosuppression. Our study enhances our understanding of BA, identifying roles in metabolic and hemogenic regulation.

INTRODUCTION

Brown adipose tissue (BAT) is involved in nonshivering thermogenesis during cold exposure (Enerbäck et al., 1997) and diet-induced thermogenesis (Feldmann et al., 2009). It also

contributes to the prevention of aging-associated obesity, as demonstrated in *Ucp1* null mice (Kontani et al., 2005). In large-sized mammals, the majority of BAT disappears within a few days after birth; however, some portions remain and function through adulthood. ¹⁸F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in combination with computed tomography (¹⁸F-FDG-PET/CT) along with histological and gene expression studies has shown the presence of functional BAT in adult humans in supraclavicular and paravertebral regions (Cypess et al., 2009; Virtanen et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Saito et al., 2009; Yoneshiro et al., 2011). Although accumulating evidence has shown an inverse correlation between the amounts of active BAT and the development of metabolic syndrome in humans (Ouellet et al., 2011; Jacene et al., 2011), the cause-and-effect relationship between BAT and metabolic improvement remains unsubstantiated. Moreover, the whole picture of the development of human BAT is not clarified yet; for example, it remains elusive whether BAT derives from a common progenitor with myoblast, immature mesenchymal cells from which white adipocyte (WA) is also generated or from vascular components such as endothelial and perivascular cells (Tran et al., 2012; Gupta et al., 2012), and whether bone morphogenic protein 7 (BMP7) (Tseng et al., 2008) is sufficient or additional cytokines are required for BA differentiation. The newly proposed concept of brite adipocytes, WA-derived BA-like cells (*brown + white = brite*) (Petrovic et al., 2010), makes the situation complex, often encumbering an understanding of classical BAT development. For an advanced understanding of BAT, establishing a method to generate BAs from pluripotent stem cells, including embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), is of great use. Recently, a trial to program human iPSCs (hiPSCs) into BA via transferring of exogenous genes was reported (Ahfeldt et al., 2012); however, biological effects of the programmed BA on lipid/glucose metabolism remains unevaluated. Moreover, artificially programmed

Cell Metabolism

Brown Adipose Production by Hemopoietin Cocktail

cells are not applicable to the investigations on natural developmental pathways of human BA.

The existence of BAT in bone marrow (BM), which attenuates with aging and diabetes, was reported in mice (Krings et al., 2012). Also, a nontumorous infiltration of BAT in human BM was reported in a case of essential hyperthrombocythemia (Thorns et al., 2008). A functional link between BM fat and hemopoiesis was first reported by Dexter et al. (Dexter et al., 1977), who showed that BM adipocytes with mitochondria-attached multilocular lipid droplets were essential for the maintenance of colony-forming units-spleen (CFU-S), a short-term repopulating hematopoietic progenitor cell (HPC) distinct from hematopoietic stem cell (HSC). Although the microenvironment for HSC (reviewed in Kiel and Morrison, 2006; Arai and Suda, 2007) and B cells (Nagasawa, 2007) has been intensively studied, that for myeloid progenitor cells (MPCs) remains poorly understood. Moreover, controversial findings have been reported regarding the effects of "BM adipocyte" on the committed HPCs: some reports showed its capacity to support lymphopoiesis (Gimble et al., 1990) and granulopoiesis (Gimble et al., 1992), while others showed its inhibiting effects for hematopoiesis (Ookura et al., 2007, Naveiras et al., 2009). The controversy may come from, at least in part, the heterogeneity of bone marrow fat cells including BAT versus white adipocyte tissue (WAT).

During our research into the feeder-free hematopoietic differentiation of hPSCs, we serendipitously found the existence of BA-like cell clusters surrounding the hematopoietic centers and an induction of BA-selective gene, *PRDM16* (see Figure S1 online). Because the hematopoietic differentiation was achieved under a completely feeder-free condition, a de novo hematopoietic stroma must be generated from hPSCs per se. Eventually, murine C3H10T1/2 line, a commonly used feeder for the hematopoietic differentiation of monkey (Hiroyama et al., 2006) and human (Takayama et al., 2008) ESCs, can differentiate into functional BA (Tseng et al., 2008). Thus, an association between BA development and hemopoiesis has been suggested.

After a process of trial and error, we established a high-efficiency method to produce functional BAs from hPSCs including human ESCs (hESCs) and hiPSCs. Involvement of hPSC-derived BAs (hPSCdBAs) in metabolic improvement, its service as a stroma for MPCs, and the existence of BA in vertebral BM are also shown.

RESULTS

Directed Differentiation of Human PSC into Functional BA

By utilizing a specific hemopoietin cocktail (HC) composed of KIT ligand (KITLG), fms-related tyrosine kinase 3 ligand (FLT3LG), interleukin-6 (IL-6), and vascular endothelial growth factor (VEGF) along with the previously reported BA inducer BMP7 (Tseng et al., 2008), we successfully established a highly efficient BA differentiation method for hESCs and hiPSCs (Supplemental Information). The differentiated cells exclusively contained multilocular lipid droplets (Figure 1A), as confirmed by oil red O staining (Figure 1B). Quantitative RT-PCR studies demonstrated the induction of BAT-specific genes of *UCP1* and *PRDM16*, which were not detected in human multipoint stromal cell-derived WA (hMSCdWA) (Figure 1C). Although

depletion of BMP7 significantly lowered BA differentiation efficiency as reported by Tseng et al. (Tseng et al., 2008) (Figure S2), BA differentiation was completely abolished by HC depletion even in the presence of BMP7 (Figure 1D). Expression of a series of BAT-selective and BAT/WAT-common genes, but not WAT-selective genes, was also determined (Figure 1E). UCP1 protein expression was confirmed by immunostaining studies, showing that over 95% of the BA differentiated cells expressed UCP1 at mitochondria (Figure 2A), and also western blotting, showing the presence of a 32 kDa band in the differentiated cells (Figure 2B). Lipid staining illustrated the wide distribution of mitochondria within the cytosol, some of which resided close to lipid droplets (Figure 2C). Electron micrographs confirmed the presence of multilocular lipid droplets and abundant mitochondria rich in transverse cristae (Figure 2D and Figure S3A), some of which located in close vicinity to lipid droplets (Figure S3B), in contrast to hMSCdWA, which showed meager mitochondria (Figure S3C).

We next evaluated the functional maturation of hESC/hiPSC-derived BAs. First, thermogenic potential was evaluated. Treatment with a β -adrenergic receptor, isoproterenol, augmented the expression of *UCP1*, a major contributor to thermogenesis, and *PRDM16*, a major inducer of *UCP1* expression, in hPSCdBAs (Figures 3A and 3B, left). Isoproterenol-responsive thermogenic activation (Jackson et al., 2001) was further confirmed in vivo by subcutaneous transplantation of hPSCdBAs into mice (Figures 3A and 3B, right). Respiratory activation was also assessed in vitro: hPSCdBAs showed considerably higher basal and maximum OCRs than hMSCdWA as demonstrated by a standard Mito Stress Test (Figure 3C). Responsiveness to a β 3-adrenergic receptor-selective agonist, CL316,243, was also determined: statistically significant upregulation in oxygen consumption rates (OCRs) was determined in the cases of hPSCdBAs in response to CL316,243, whereas no significant changes were observed in the cases of hMSCdWA and immature hPSCs (Figure 3D). Upregulation of OCR was further determined in isoproterenol-treated hPSCdBAs (data not shown).

Together, these findings support the production of functional BAs from hPSCs.

Effects of hPSC-Derived BA on Lipid and Glucose Metabolism

Because endogenous BAT reportedly reduces blood triglyceride (TG) levels in response to cold stimuli (Bartelt et al., 2011), we examined the effects of transplantation of hPSCdBA on lipid metabolism. Compared to immature hPSC-transplanted mice, hPSCdBA-transplanted mice (Figure 4A, middle column) and hMSCdWA-transplanted mice (Figure 4A, right column) showed reduced fasting TG levels. Olive oil tolerance tests further confirmed that hPSCdBA transplantation augmented resistance to oral lipid loading (Figure 4B).

Next, effects of hPSCdBAs on glucose metabolism were evaluated. Ten-week-old mice were subcutaneously injected with saline, hESC-derived BA (hESCdBA), or hMSCdWA, and blood glucose levels were measured over time (Figure 4C). Fasting blood glucose levels were significantly lowered in hESCdBA-transplanted mice compared to saline-injected mice ($p = 0.0032$; $n = 3$) and to hMSCdWA-transplanted mice ($p = 0.0030$;

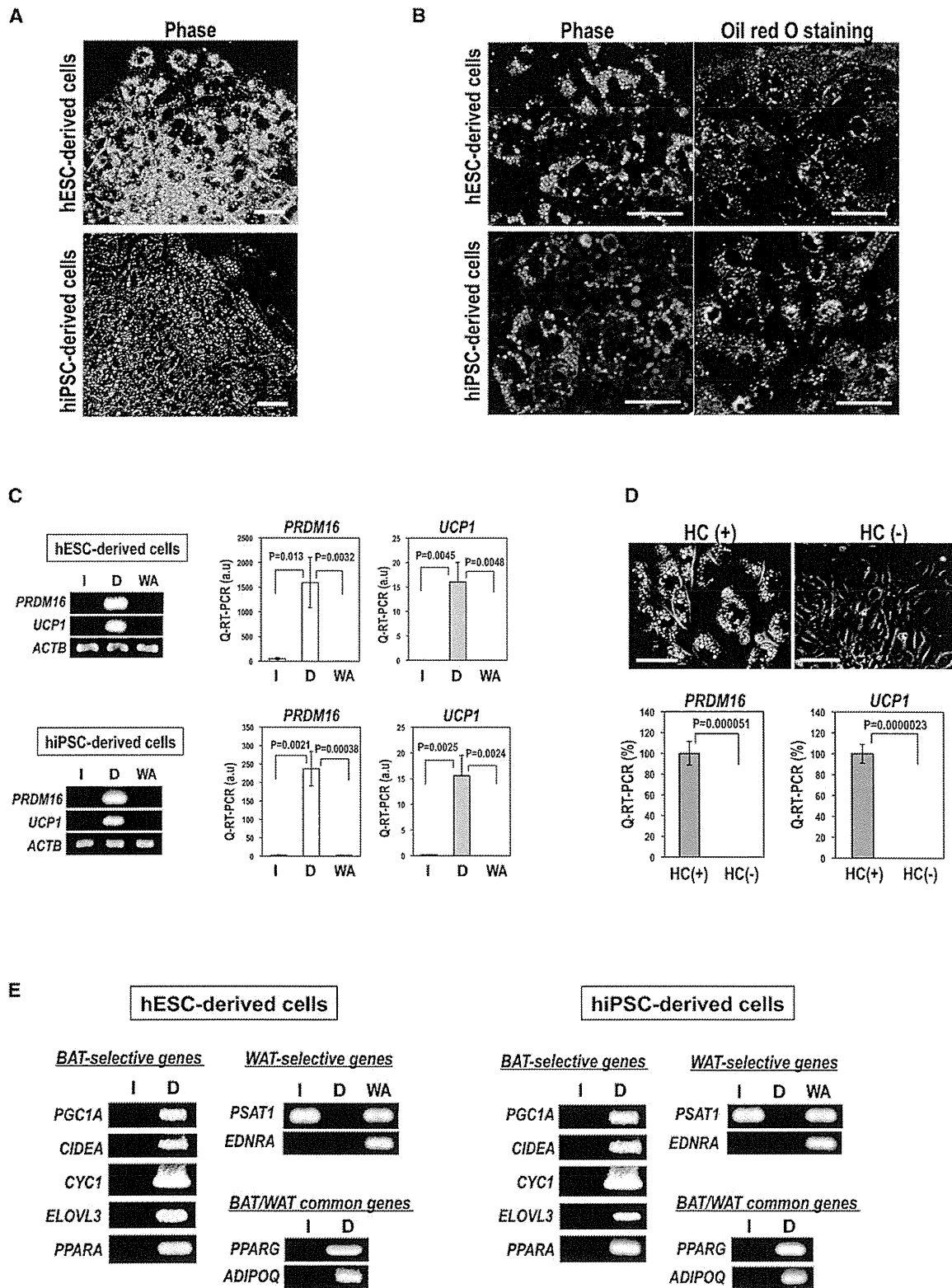


Figure 1. Differentiation of hPSCs into BAs

(A) Microscopy of hPSC-derived cells. Scale bar, 50 μ m.

(B) Oil red O staining (right) with phase contrast microscopy (left). Scale bar, 40 μ m.

(C) Expression of *PRDM16* and *UCP1* determined by RT-PCR (left) or real-time PCR (middle and right). The error bars represent average \pm standard deviation (SD) (n = 3).

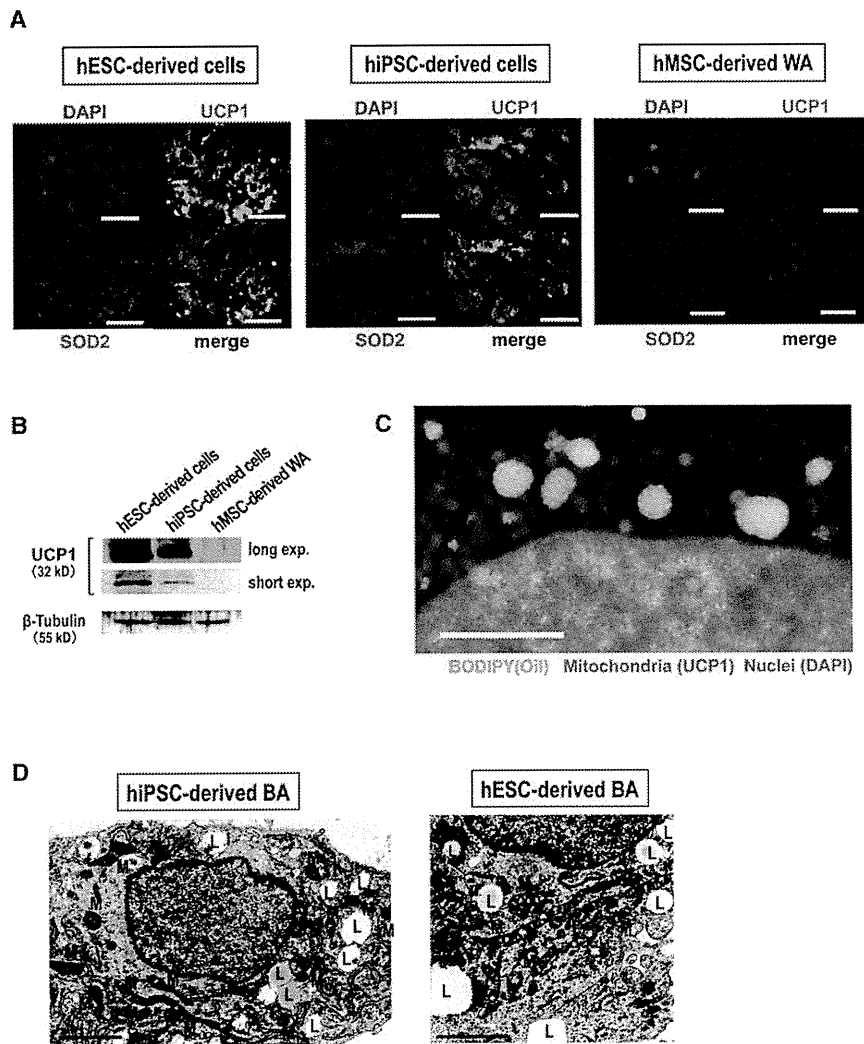


Figure 2. Analyses on Protein Expressions and Fine Structures

(A) Immunostaining using an anti-UCP1 and anti-SOD2 antibody as indicated. Scale bar, 50 μ m. (B) Western blotting using an anti-UCP1 as indicated. (C) Lipid staining. hESC-derived differentiated cells were stained by an anti-UCP1 antibody (red) and BODIPY 493/503 (green). Scale bar, 5 μ m. (D) EM of hiPSC-derived cells (left) and hESC-derived cells (right). L, lipid droplets; M, mitochondria. Scale bar, 2 μ m.

(data not shown), confirming that hMSCdWA transplantation deteriorates glucose metabolism. The different effects between hESCdBA and hMSCdWA were not due to the difference in cell survival, as we clearly detected the existence of transplanted cells (Figure S4A). Moreover, deterioration of glucose metabolism by hMSCdWA transplantation could not be attributed to inflammation, because we did not observe any signs of inflammation, such as macrophage infiltration (Figure S4B). In addition, hMSCdWA did not express tumor necrosis factor α (*TNFA*), and it expressed only a low level of *IL1B* (Figure S4C).

We also examined longer-term effects of hPSCdBA transplantation using immunocompromised NOG mice (Ito et al., 2002). Fasting blood glucose level-lowering effects of hESCdBA were determined at least for 3 weeks (Figure 4G). Cells with multilocular lipid droplet (Figure 4H) that expressed UCP1 (Figure 4I)

and human HLA-A,B,C (Figure 4J) were determined by histological analyses. Around the graft tissue, microvasculatures were also detected (Figure 4H arrowheads).

Finally, we assessed possible therapeutic effect of hESCdBA on hMSCdWA-induced deterioration of glucose metabolism. Although no significant changes in fasting blood glucose values and HOMA-IR values were observed (Figure 4K and 4L), cotransplantation of an equivalent number of hESCdBA ameliorated the deleterious effect of hMSCdWA, significantly lowering the 30 min blood glucose values ($p = 0.0014$; $n = 3$) (Figure 4M).

All those findings together indicate that (1) hPSCdBAs improve both lipid and glucose metabolism, (2) hMSCdWA improved lipid but deteriorates glucose metabolism, and (3) hPSCdBAs ameliorate adverse effects of hMSCdWA on glucose metabolism.

$n = 3$) (Figure 4D). Surprisingly, hMSCdWA-transplanted mice showed elevated homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) values compared not only with hESCdBA-transplanted mice ($p = 0.0003$; $n = 3$) but also with saline-injected mice ($p = 0.0011$; $n = 3$) (Figure 4E), indicating that hMSCdWA induces insulin resistance despite its favorable effect on lipid metabolism. Similar results were obtained when 6-week-old younger mice were used for the assay (data not shown). As shown in Figure 4F, oral glucose tolerance tests (OGTTs) further demonstrated that hESCdBA transplantation reduced 15 min blood glucose values compared to saline injected ($p = 0.010$; $n = 3$), while hMSCdWA-transplanted mice exhibited elevated 30 min blood glucose values compared not only with hESCdBA-transplanted mice ($p = 0.0034$; $n = 3$) but also with saline-injected mice ($p = 0.0055$; $n = 3$). Similar results were obtained when 6-week-old younger mice were used for the assay

(D) BA differentiation in the presence or absence of HC. Microscopy (upper) and expressions of *PRDM16* (lower left) and *UCP-1* (lower right) by real time PCR were shown. Scale bar, 50 μ m. The error bars represent average \pm SD ($n = 3$).

(E) Expression of BAT-selective, BAT/WAT-common, and WAT-selective genes examined by RT-PCR. I, immature hPSC; D, differentiated hPSC; WA, hMSCdWA.

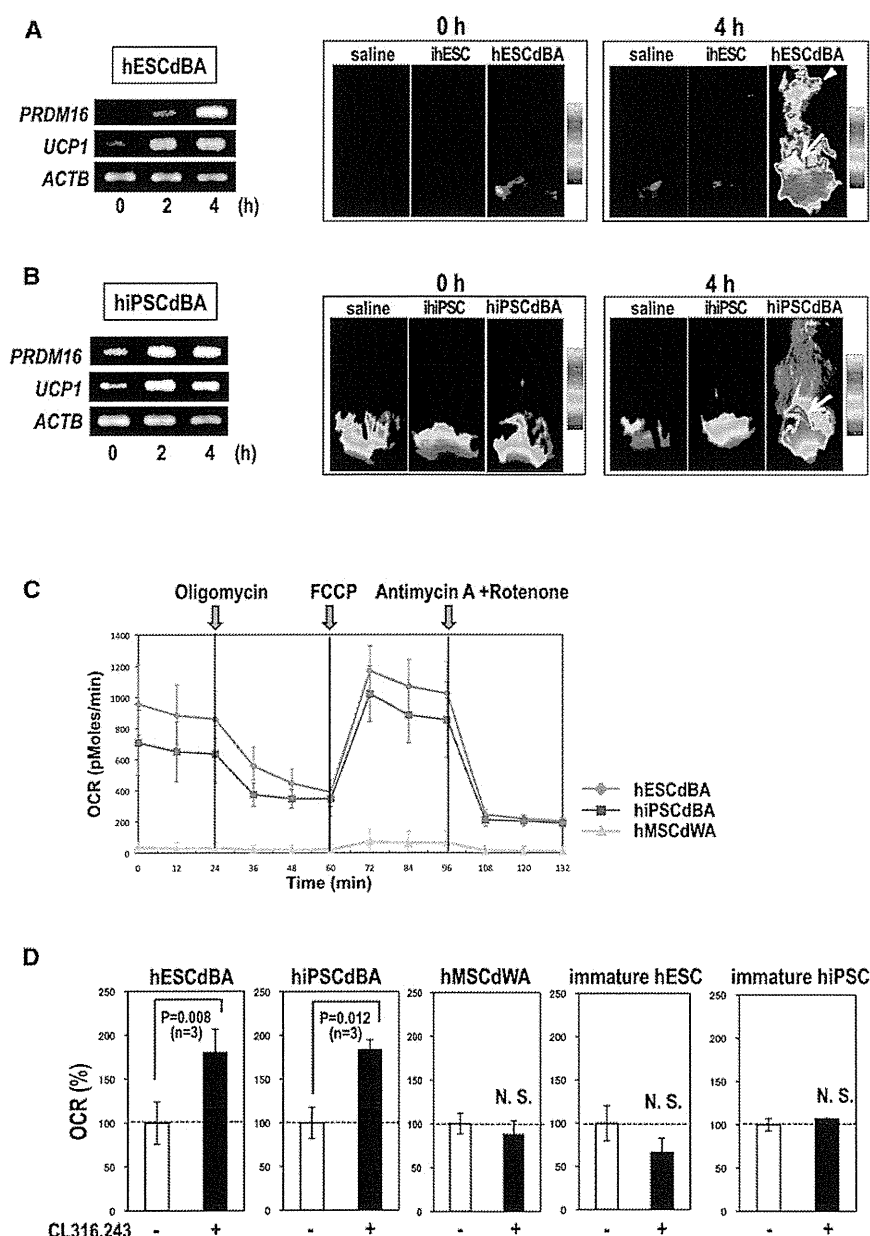


Figure 3. Thermogenic and Mitochondrial Respiratory Activation

(A and B) Thermogenesis studies. hESCdBA (A) and hiPSCdBA (B) were treated with isoproterenol. Gene expression was examined by RT-PCR over time (A, left; B, left). Thermographic images of mice transplanted with saline, immature hESC (ihESC), hESCdBA, immature hiPSC (ihPSC), or hiPSCdBA before and after isoproterenol treatments are shown (A, right; B, right). Arrows indicate regions of transplantation; arrowheads indicate areas of endogenous murine BAT.

(C) Mito stress tests were performed using hESCdBA, hiPSCdBA, and hMSCdWA as indicated.

(D) OCR was measured in hESCdBA, hiPSCdBA, hMSCdWA, immature hESCs, and immature hiPSCs after a 4 hr incubation with or without CL316,243. The error bars in (C) and (D) represent average \pm SD (n = 3).

ment (Figure 5B). Thus, our method correctly mimics the classical BAT development but not a brite adipocyte pathway via immature mesenchymal stem cell differentiation.

We further evaluated the detailed role of each hematopoietin. The absence of any one of the components of HC lowered the quality of BA differentiation, reducing cellular viability and/or percentages of multilocular lipid-containing cells (Figure 5C). Gene expression studies further showed that VEGF was required for *PRDM16* expression, whereas *KITLG*, *IL6*, or *FLT3LG* was required for subsequent *UCP1* expression (Figure 5D). Surprisingly, depletion of either *KITLG*, *IL6*, or *FLT3LG* paradoxically induced the expression of a WAT marker, phosphoserine aminotransferase 1 (*PSAT1*) (Seale et al., 2007), and a lateral plate mesoderm marker, *vegfr2*. Thus, the HC is essential for the differentiation of

hPSCs into classical BA, and the omission of any of the HC components results in WAT lineage commitment.

We also examined intracellular signaling by performing inhibitor analyses. Because a *BMPR1a* inhibitor (*BMPR1a-i*) and *p38* MAPK inhibitor (*p38-i*) reportedly hamper BA differentiation (Sellayah et al., 2011), effects of these two inhibitors, along with those of a MAP kinase-ERK kinase (*MEK-i*) inhibitor (*MEK-i*), were examined. We found that *BMPR1a-i* induced massive cell death during the floating culture step of BA differentiation (Figure 5E, second left). Cell death had been induced as early as day 1 (data not shown). Similar results were obtained from the case of *AKT* inhibitor (*AKT-i*). (Figure 5E, right). Thus, *BMPR1a*-dependent signaling is required for the survival of immature sphere-forming progenitor cells, from which mature BA will be produced. We then followed up the *p38-i*- and *MEK-i*-treated

Signaling for BA Differentiation

To confirm that our differentiation technique correctly reproduced classical BAT development via myoblastic differentiation (Timmons et al., 2007; Seale et al., 2008; Sun et al., 2011), the expression of a series of developmental markers was examined. As shown in Figure 5A, myoblastic *MYF5* expression was transiently upregulated during the initial floating culture step of differentiation. Moreover, the expression of a paraxial mesoderm marker, platelet-derived growth factor receptor α (*PDGFRA*) (Sakurai et al., 2006), was upregulated. By contrast, the levels of immature mesenchymal stem cell marker, *NG2* and *PDGFRB* (Crisan et al., 2008), as well as a lateral plate mesoderm marker, *VEGFR2* (Sakurai et al., 2006), were reduced. The precedence of myoblastic differentiation was further confirmed by the transient induction of *PAX3/7*, which are involved in myogenic commit-

cells until day 10, when mature BA was generated. In the case of hESC, p38-i treatment reduced the number of lipid droplet-containing cells (Figure 5F, upper middle), while MEK-i treatment exerted minimal effects (Figure 5F, upper right). Compatible to these morphological findings, p38-i treatment, but not MEK-i treatment, lowered *PRDM16* and *UCP1* expression levels (Figure 5G, left half). By contrast, p38-i treatment exerted minimal effects on hiPSCs (Figure 5F, lower middle), whereas MEK-i treatment induced cogeneration of the cells with unilocular lipid droplets (Figure 5F, lower right). Compatibly, *PRDM16* and *UCP1* expressions were only slightly reduced in p38-i-treated hiPSCs but clearly reduced in MEK-treated hiPSCs (Figure 5G, right half). Therefore, p38 MAPK and ERK signaling play important roles in BA differentiation depending on the lines or kinds of hPSCs.

A Functional Link between BA and Hematopoiesis

There has been a controversy regarding the effect of BM adipocytes on the proliferation and differentiation of committed HPCs. For example, murine BM adipocytic lines are reportedly capable of supporting lymphopoiesis (Gimble et al., 1990) and granulopoiesis (Gimble et al., 1992), whereas human BM-derived fat cells generated by a dexamethasone/insulin treatment reduce colony-forming capacities of HPCs (Ookura et al., 2007). We hypothesized that the controversy came from the heterogeneity of BM adipocytes and that BA, but not WA, serves as a stroma for committed HPCs for the following reasons: (1) hematopoietic stromal cells essential for maintaining CFU-S exhibit morphological resemblance to BA rather than to WA (Dexter et al., 1977); (2) the murine embryo-derived C3H10T1/2 cell line (Reznikoff et al., 1973), which differentiates into mature BAT on BMP7 treatment (Tseng et al., 2008), is widely used as a feeder for the hematopoietic differentiation of monkey (Hirayama et al., 2006) and human (Takayama et al., 2008) ESCs; (3) BM is replaced by WA in severe myelosuppressive states including aplastic anemia; and (4) treatment with dexamethasone/insulin induces differentiation into WA but not BA.

To validate our hypothesis, human umbilical cord blood CD34⁺ HPCs were cultured on hESCdBA layers for 1 week in the absence of any recombinant hematopoietic cytokines. Then, floating cells were subjected to intrabone marrow transplantation (IBM-T) into alymphocytic NOG mice, and after 8 weeks, splenic chimerisms were measured to assess the expansion of CFU-S. For a control, CD34⁺ cells were directly transplanted without culturing on hPSCdBA layers (Figure 6A). As shown in Figure 6B, splenic chimerisms were significantly higher in hPSCdBA-cocultured CD34⁺-transplanted mice than in mice with direct transplantation ($p = 0.041$; $n = 3$). Moreover, percentages of human CD33-positive myeloid cells were larger in cocultured CD34⁺-transplanted mice (4.8 ± 0.13 versus 3.0 ± 0.19 ; $p = 0.00022$; $n = 3$, data not shown), while no significant changes in B lymphocyte percentages were observed (data not shown). These findings indicate that hPSCdBA serves as a stroma for MPCs, promoting their expansion/differentiation and homing to the spleen.

We also examined the expression of hematopoietic cytokines involved in the expansion and differentiation of committed HPCs. Various hemopoietin genes including thrombopoietin (*THPO*), *IL6*, *IL3*, colony-stimulating factor 3 (*CSF3*), colony-

stimulating factor 2 (*CSF2*), and erythropoietin (*EPO*) were expressed in hESCdBA (Figure 6C, middle lanes) and hiPSCdWA (data not shown). On the other hand, hMSCdWAs expressed only *IL6* among these hemopoietins (Figure 6C, right lanes). Moreover, the expression levels of the hemopoietin genes in hESCdBA (Figure 6D) and hiPSCdBA (data not shown) were upregulated by isoproterenol treatments, further supporting the notion that hPSCdBA serves as stroma for committed HPCs.

To evaluate *in vivo* relevance, we examined whether isoproterenol treatment could enhance the recovery from antitumor agent-induced myelosuppression by enhancing the expansion/differentiation of MPCs. Mice were treated with 5-fluorouracil (5-FU), and bone marrow cells were collected and analyzed over time (Figure 6E). As reported by Hofer et al. (Hofer et al., 2007), 5-FU-treated mice were at the nadir at day 3, when a decline in total enucleated cell number (11.33 ± 1.74 versus 4.87 ± 0.96 [$\times 10^6$], $p = 0.0023$; $n = 3$) (Figure 6F) as well as a reduction in early myeloid cells (Figures S5A–S5C) were observed. Although total cell number (8.70 ± 0.40 ; $n = 3$) (Figure 6F) and the percentages of R1 fraction (Figures S5A and S5B) were eventually upregulated at day 7 as a sign of a recovery from myelosuppression, the mice still suffered from a shortage of mature myeloid cells (Figures S5A–S5C). By contrast, isoproterenol-treated mice showed higher enucleated cell number (10.93 ± 1.14 , $p = 0.032$; $n = 3$) (Figure 6F) with significantly larger R2 fraction percentages (Figures S5A and S5B). Cytological studies confirmed all those findings (Figure S5C).

The existence of BA in BM has long been suggested despite the lack of direct evidence (reviewed in Motyl and Rosen, 2011). A relationship between osteoblast and BA was reported in mice (Calo et al., 2010). Moreover, murine BM fat reportedly expresses various BA-selective messages (Krings et al., 2012). To assess the possible existence of BA in human BM, expressions of BAT-specific markers, *UCP1* and *PRDM16*, were examined using commercially available human BM RNA samples. As shown in Figure 7A, expression of both genes was detected by RT-PCR, whereas they were undetectable in human BM-originated MSC-derived WA (hBM-MSCdWA). To further assess the existence of active BM-BAT *in vivo*, ¹⁸F-FDG-PET/CT examinations were performed in healthy young volunteers (24.8 ± 5.8 of age; $n = 20$) with or without cold stimuli (Saito et al., 2009; Yoneshiro et al., 2011). We identified cold-stimulated ¹⁸F-FDG uptake in vertebral BM (Figures 7B–7D), whose signal intensities showed an intimate correlation with those of BATs ($p < 0.001$), but not of those of brain, heart, spleen, or muscle (Figures S6A and S6B). The presence of vertebral BM was histologically examined using 3-week-old murine vertebral BM samples: we successfully detected the cells with BA morphologies (Figure 7E) that were positive for UCP1 protein expression (Figure 7F). Collectively, those findings strongly suggest the presence of functional BA in the BM of vertebrae.

DISCUSSION

We established a highly efficient method for the differentiation of hPSCs into functional BAs. This is the first success in generating functional classical BA pluripotent stem cells without exogenous gene transfer. By virtue of its technological merits, our method provides a valuable tool for BAT research. Functional

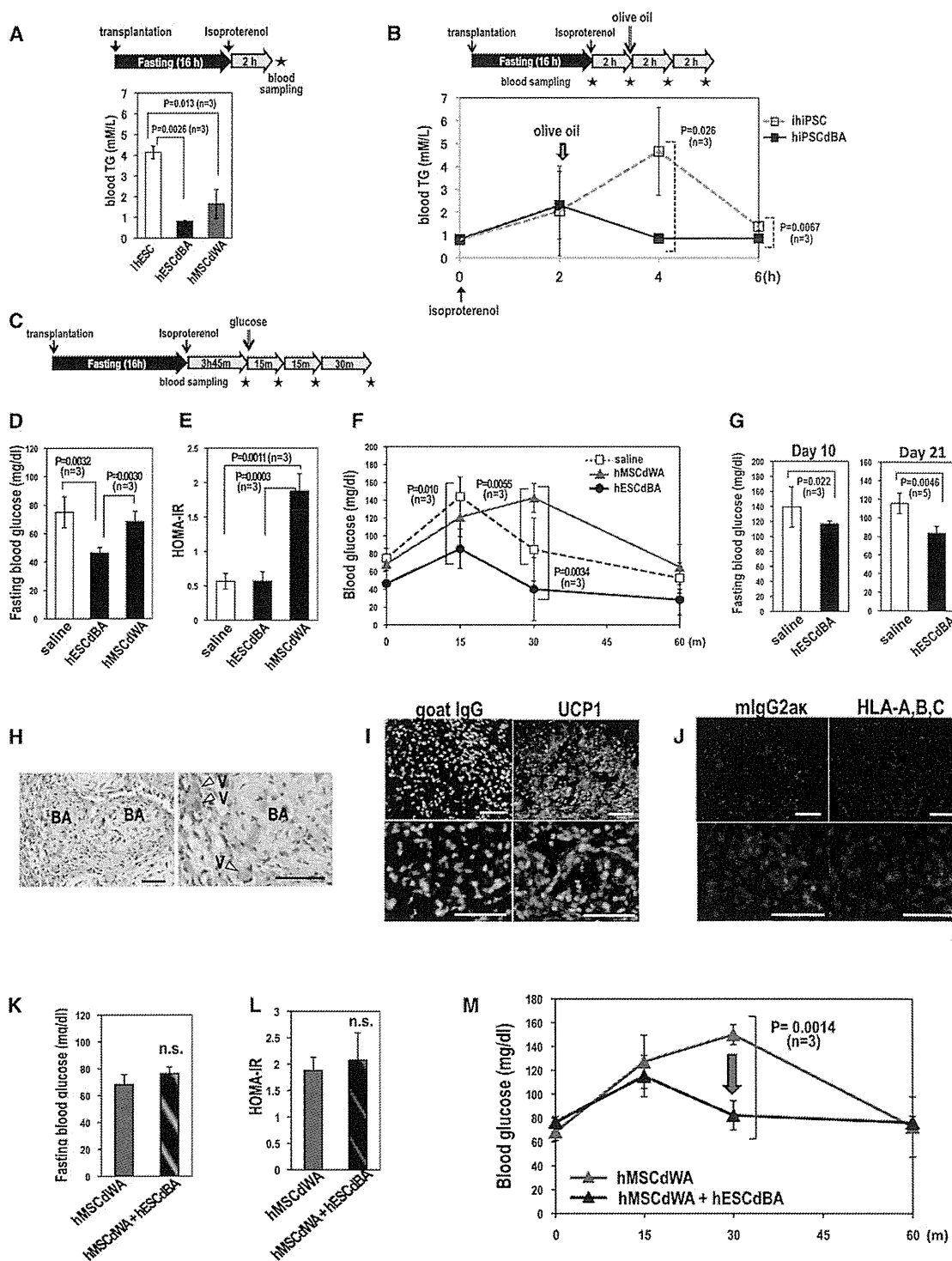


Figure 4. Metabolic Improvement by hPSC-Derived BA Transplantation

(A) Blood TG clearance tests. Immunocompetent ICR mice were transplanted with immature hESCs (ihESC) (n = 3 mice), hESCdBA (n = 3 mice), or hMSCdWA (n = 3 mice). After 16 hr starvation, isoproterenol was administered and blood TG levels were measured.

(B) Oral fat tolerance tests. ICR mice were transplanted with immature hiPSC (ihPSC) (n = 3 mice) or hiPSCdBA (n = 3 mice). Olive oil was orally loaded, and blood TG levels were measured over time after isoproterenol treatments.

(C–F) OGTT. ICR mice were injected with saline (n = 3 mice), hESCdBA (n = 3 mice), or hMSCdWA (n = 3 mice), and OGTT was performed (C). Fasting blood glucose levels (D), HOMA-IR (E), and blood glucose values after oral glucose loading (F) are shown.

(G–J) Immunocompromised NOG mice were injected with saline or transplanted with hESCdBA. At indicated time points, fasting blood glucose levels were measured. Three mice (day 10) or five mice (Day 21) were used for each condition (G). Histological studies were performed by HE staining (H) and