

## 2. ヒト iPS 細胞由来移植細胞の品質・安全性確保の上での課題

現在、ヒト iPS 細胞由来移植細胞のような「細胞・組織加工製品」（最近は「再生医療製品」ともいう）の国内実用化には、主に2つのルートがある。1つは、治験を行った上で厚生労働省の製造販売承認を受けて保険適用医療として実現するルート、言い換えれば薬事法上の「業」としての実用化である。もう1つは、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成22年厚生労働省告示第380号）に則った臨床研究（ヒト幹細胞臨床研究）の成果に基づく先進医療・高度医療評価制度による医療、若しくは保険適用外医療としての実用化であり、これらは医療法・医師法の下で行われる「医療行為」として実施される。ヒト幹細胞臨床研究は、手続きや費用などの面で治験よりも実施が比較的容易であるものの、治験の国際ガイドライン（ICH-GCP）に沿った国内 good clinical practice（GCP）ガイドラインの準拠が義務ではなく、得られたデータを薬事承認申請資料としてそのまま使用できない場合が多い。また臨床研究と自由診療全般において言えることであるが、医療費が高額になりやすいことに加えて、長期フォローアップが困難であり、有効性のネガティブデータも公開され難い傾向があるという問題点があり、安全性・有効性情報が蓄積されないことが指摘されている。

いずれのルートをとるにせよ、ヒト iPS 細胞由来移植細胞の製造の流れは、大まかに、原材料となる体細胞の採取、体細胞の培養、iPS 細胞株の樹立、目的とする機能細胞への誘導、製剤化ということになる。こうした製造工程の中での品質・安全性上の主要な課題としては例えば、「体細胞やその他の原材料のウイルス等による汚染の有無の評価」、  
「体細胞やその他の原材料の品質特性評価」、  
「樹立した iPS 細胞の品質特性の評価・管理」、  
「分化誘導後の目的細胞の品質特性の評価・管理」、  
「目的細胞投与後の免疫応答対策」といったものが挙げられるが、中でも、ヒト iPS 細胞由来移植細胞に懸念されている課題は、「細胞の造腫瘍性（tumorigenicity）の評価・管理」である。

## 3. ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の造腫瘍性の評価

「造腫瘍性（tumorigenicity）」とは、動物に移植

された細胞集団が増殖することにより悪性又は良性の腫瘍を形成する能力を言う。ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株を樹立した際には、どのくらい初期胚内の多能性幹細胞の性質を保っているかを確認する必要があるが、その際、細胞の多能性の証明は通常、免疫不全動物に細胞を移植して動物体内でのテラトーマ（teratoma, 奇形腫）の形成を確認し、移植した細胞が内・中・外胚葉系の様々な細胞種に分化することを示すことによってなされている。つまり、ヒト ES/iPS 細胞は造腫瘍性を元来の特性として保持しており、この点がヒト体細胞・体性幹細胞とは大きく異なる。したがって、ヒト ES/iPS 細胞を加工して製造される医薬品・医療機器（平成25年5月衆議院提出の薬事法改正案では「再生医療等製品」の一種となる）<sup>1-6)</sup>においては、未分化細胞の混入・残留により異所性組織形成や腫瘍形成が惹起されるリスクがあり、最終製品の造腫瘍性の評価と管理が重要な課題となる。このことは、可能な限り最終製品で用いられる目的細胞を純化し、残存する未分化な ES/iPS 細胞を除去する工夫が必要であることを意味し、実際、その取り組みに関する報告はこれまでに多く存在する。<sup>1-6)</sup>

注意しなければならないことは、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の実用化・品質評価においては、こうした取り組みと同時に、未分化の ES/iPS 細胞の混入・残留量を高感度で確認する方法や、最終製品に混入・残留した未分化の ES/iPS 細胞等の造腫瘍性細胞に起因する安全性上の問題の評価方法が必要だということである。しかしながら、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞に関する造腫瘍性評価方法の開発とその体系化・標準化は、ES/iPS 細胞から特定の細胞種への効率的な分化誘導法の開発や、残存 ES/iPS 細胞の除去方法の開発などに比べて著しく立ち遅れており、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞を用いた再生医療・細胞治療の実現における最大の隘路と



佐藤陽治

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・部長、博士（薬学）。1995年に東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了後、米国シンシナティ大学医学部・ポスドク。'98年に国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部・研究員として着任の後、遺伝子細胞医薬部・主任研究官、同・室長を経て、'12年より現職。

して残されたままの状態にある。この問題の解決なしには、ほとんどの場合、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の実用化・産業化の達成はほぼ不可能である。

#### 4. WHO の造腫瘍性試験ガイドライン

「造腫瘍性評価方法の開発とその体系化・標準化が立ち遅れている」と上で述べたが、現在、細胞の造腫瘍性試験に関する国際的なガイドラインが1つだけ存在する。それは、世界保健機関 (World Health Organization; WHO) の生物薬品標準化専門委員会第 47 次報告 (1998) (Technical Report Series No. 878, TRS 878) にある Annex I 「生物薬品製造用の *in vitro* 基材としての動物細胞の使用の要件」<sup>7)</sup> というものである。WHO TRS 878 にある造腫瘍性試験の内容は、極めて大雑把に言えば、「ヌードマウス等の動物 10 匹に  $10^7$  個の細胞を投与して 16 週間観察し、陽性対照としては HeLa 細胞などを用いる」というものであるが、注意しなければならないのはその適用対象と目的である。

WHO TRS 878 の造腫瘍性試験の適用対象は、あくまでワクチンやタンパク質製剤など、ヒトを対象に *in vivo* 又は *ex vivo* で投与される生物薬品を製造する際に *in vitro* 基材として用いられるヒト又は動物由来の細胞株である。「患者に移植する細胞」及び「治療を目的に患者に移植する細胞株の原料となる細胞」は、WHO TRS 878 の対象外とされており、その特性解析においては規制当局等との議論が必要とされている。

WHO TRS 878 における造腫瘍性試験の目的は、生物薬品用細胞基材となる細胞株の均一なバンク (セル・バンク) の造腫瘍性の程度又は有無を正確に把握することにある。造腫瘍性の程度的大幅な変化又はその有無に変化が生じた場合、細胞特性になんらかの異常が起こったという指標となる。つまり、既知あるいは未知のウイルス感染、変異原性物質やストレスによる遺伝子変異・発がん遺伝子活性化など、原因はいずれにせよ、セル・バンクの安定性上の異常が発生したことを検出するための方策として、セル・バンクの造腫瘍性を細胞特性指標の 1 つとして評価し、品質管理に活用することが必要とされているわけであり、試験の目的が非常に限定されたものであることに注意しなければならない。

#### 5. ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の造腫瘍性試験

ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の製造における造腫瘍性試験の目的は何か、ということについて、改めて考えてみたい。実は、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の製造における造腫瘍性試験には、目的別に以下の 3 種類があり得る。①原料の品質管理のための造腫瘍性試験、②製造工程管理のための造腫瘍性試験、③最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験、である。以下にこれら 3 種の造腫瘍性試験の特徴と方法について述べる。

**5-1. 原料 (細胞基材) の品質管理のための造腫瘍性試験** ヒト ES 細胞株やヒト iPS 細胞株は、文字通り、ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の原料である。これらはヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞という生物製剤の一種を製造するための細胞基材である。したがって、これらにおける「造腫瘍性」とは、すなわち生物製剤の原材料 (細胞基材) の品質特性の 1 つと捉えることができる。

ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の原料としてのヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性における懸念事項は、WHO TRS 878 におけるセル・バンクの品質管理の考え方と同様に、「セル・バンクの造腫瘍性が既定の範囲内にあるか？」ということになる。ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の原料としてのヒト ES/iPS 細胞バンクの造腫瘍性の意味づけは WHO TRS 878 における細胞基材の造腫瘍性の意味づけとほぼ同じであることから、その評価方法についても、WHO TRS 878 の方法を準用することが可能であると考えられる。

**5-2. 製造工程 (中間製品) 管理のための造腫瘍性試験** ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の中間製品となる細胞集団には、目的細胞ないしその前駆細胞に加え残存多能性幹細胞及びその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。中間製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」とは、製造工程管理のための指標としての意味合いがある。製造工程管理における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」という 2 点がある。

中間製品の中に「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということに関しては、ES/iPS

細胞のマーカー遺伝子ないしマーカータンパク質を利用した方法により評価することが可能である。手技としては後述する定量 RT-PCR やフローサイトメトリーなどが挙げられる。これらの方法の詳細については後で述べる。

中間製品の中に「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということを評価するための方法としては、例えば細胞増殖特性の評価（不死化細胞の検出）や軟寒天コロニー形成試験（足場非依存性増殖細胞の検出、後述）が挙げられる。造腫瘍性形質転換細胞の検出に *in vivo* 造腫瘍性試験系を活用することも考えられるが、最終製品（ないし中間製品）の中に含まれるわずかな造腫瘍性細胞を検出する必要があるため、WHO TRS 878 の方法よりも十分に低い検出限界を備えている必要がある。検出限界の低い試験系としては、T 細胞、B 細胞及び NK 細胞を欠失した NOD/SCID/ $\gamma$ Cnull (NOG) など、ヌードマウスよりも免疫力の低下した重度免疫不全マウスシステムを利用することが考えられる。<sup>8-10)</sup> ただし新規動物モデルを用いた科学的リスク評価のためには、細胞・組織加工製品の造腫瘍性の定量化方法の検討と、その標準化が必要である。

**5-3. 最終製品の安全性評価のための造腫瘍性試験** ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞の最終製品中の細胞集団、すなわち「投与細胞」には、目的細胞に加え、混入する前駆細胞や残存多能性幹細胞及びその他の目的外細胞が含まれている可能性がある。また、最終製品の造腫瘍性試験における「造腫瘍性」には、ヒトでの生着部位での腫瘍形成能を考察する材料であることが要求される。すなわち、最終製品における造腫瘍性関連の懸念事項には、「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」ということと「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに加え、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を形成するか」ということが挙げられる。最終製品の中に「どのくらいヒト ES/iPS 細胞が残存しているか」、「目的外細胞として造腫瘍性形質転換細胞が含まれているか」ということに関しては、ES/iPS 細胞のマーカー遺伝子又はマーカータンパク質の検出、細胞増殖特性の評価、軟寒天コロニー形成試験などで評価できる可能性がある。

一方、「投与細胞が、生着する微小環境で腫瘍を

形成するか」という懸念については、*in vivo* 造腫瘍性試験が必要となる。その場合に考慮すべき点としては、①試験系の検出限界、②投与細胞数、③投与部位などが挙げられる。投与部位については可能ならばヒトでの投与部位に相当する部位を選択すべきである。もしも、物理学的障害を生ずるなどの理由により当該部位に対する投与細胞数に限界がある場合には、可能であれば投与部位を変更するのではなく、動物とヒトとの間の当該投与部位の相対的スケール比に応じて投与細胞数を調節する。すなわち、生着する微小環境と投与細胞との相互作用による腫瘍形成の可能性を考察することを優先する。免疫特権、炎症、虚血など、特殊な投与環境における細胞の挙動は動物モデルにおける *in vivo* での評価でなければ、考察することが困難だからである。

#### 6. 造腫瘍性関連 *in vitro* 試験—われわれの検討の結果—<sup>11)</sup>

細胞集団の造腫瘍性、あるいは細胞集団中の造腫瘍性細胞を検出する系としていくつかの *in vitro* 試験系があるが、それぞれに長所と短所がある。この点についてわれわれが検討した結果を *in vivo* 試験法と併せて Table 1 にまとめた。なお、核型分析などの染色体異常を検出することを目的とする試験については、技術的に確立されているものの、得られた結果と細胞の造腫瘍性との相関性が低いことが多く、最終製品の造腫瘍性を評価するというよりも、原材料の品質又は製造過程における製品の遺伝的安定性を評価するという目的で実施されるべきものと言える。

軟寒天コロニー形成試験は、がん細胞の多くが足場非依存的に増殖するのに対して接着性正常細胞は足場が存在しないとアポトーシス（アノイキス）を起こすという性質を生かした試験系で、細胞を分散して軟寒天に封入し、足場非依存的な細胞増殖を検出する試験である。この試験系では、細胞のクランプ残存や寒天中での凝集による足場依存的細胞増殖を防ぐためには単一細胞への分散が重要である。一方、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞はトリプシン処理などによる分散によってアポトーシスを起こす特異な性質を持つことが知られている。そこで、ヒト iPS 細胞が軟寒天培地中で増殖するかどうかについてわれわれが検討したところ、単一細胞に分散したヒト iPS 細胞は軟寒天培地中では増殖しないこと

Table 1. Comparison of the Tumorigenicity-associated Assays

Assay	Soft agar colony formation assay	Flow cytometry	qRT-PCR	<i>In vivo</i> tumorigenicity assay using SCID mice <sup>12)</sup>
Measurement standard	Colony formation	Expression of marker protein for pluripotency	Expression of marker gene for pluripotency	Tumor formation
Purpose	Detection of anchorage independent growth	Detection of undifferentiated pluripotent cells	Detection of undifferentiated pluripotent cells	Detection of tumorigenic or undifferentiated pluripotent cells
Time	30 d	1 d	6 h	12–16 w
Advantage	Inexpensive	Rapid Analyzing individual cells	Rapid and simple Quantitative  Highly sensitive	Direct  Analyzing tumor formation in a specific microenvironment
Disadvantage	Indirect Not applicable to hiPSCs	Indirect Detecting only the cells that express the known marker molecules  Gating techniques strongly influence the result	Indirect Detecting only the cells that express the known marker genes	Costly Time-consuming
LLOD	1% of PA-1	0.1% of hiPSC (TRA-1-60)	= < 0.002% of hiPSC* (Lin28)	245 undifferentiated hESCs with 10 <sup>6</sup> feeder fibroblasts (0.025%)

\* Not based on the calculation found in Ref. 13) because the background signal from the negative controls (primary RPE cells) was not detectable.

が明らかとなった。ヒト ES/iPS 細胞の分散誘導性アポトーシスを抑制されている ROCK 阻害剤 Y-27632 存在下で検討した場合も、軟寒天培地中での増殖は認められなかった。これらの結果から、軟寒天コロニー形成試験は未分化なヒト iPS 細胞の混入を検出する目的には適さないということが示唆された。

次に、試験系が機能していない可能性を否定するため、及び正常細胞中への悪性形質転換細胞の混入に関する検出限界を検討するために、軟寒天培地中でのヒト卵巣テラトカルシノーマ細胞 PA-1 のコロニー形成を評価したところ、播種した細胞数が多くなるに伴って検出された PA-1 細胞のコロニーの数も多くなっていた。一方、陰性コントロールとして初代培養ヒト網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium; RPE) 細胞を用い、ウェルあたり  $1 \times 10^4$  個の細胞を播種したところ、30 日間の培養でもコロニーは認められなかった。次に今回の軟寒天コロニー形成試験系における PA-1 細胞の検出感度を評価した。正常細胞のモデルケースとして初代培養 RPE 細胞を用い、試験系の検出限界を求める目的で、これに 1%、0.5%、0.25% の割合で PA-1 細胞を添加するスパイク実験を実施した。その結果、1

% の割合で PA-1 細胞を添加することにより、20 日の間にコロニー形成が認められたが、0.5% ないし 0.25% の割合で PA-1 細胞を添加した場合は、コロニー形成が検出されるまでに 30 日を要した。ネガティブコントロール (初代培養 RPE 細胞のみ) と比較して計算した場合、軟寒天コロニー形成試験系を用いて正常細胞 (初代培養 RPE 細胞) 中に混入する PA-1 細胞を検出するには、混入率が RPE 細胞の数の 1% 以上必要であることが明らかとなった。

特定のマーカータンパク質を指標に未分化ヒト iPS 細胞を検出する系として、フローサイトメトリーがある。正常細胞のモデルケースとして初代培養 RPE 細胞を用いてわれわれが検討したところでは、未分化細胞マーカーとされる Oct3/4, Sox2 及び TRA-1-60 に対する特異的抗体によって、未分化 iPS 細胞と分化細胞とが峻別できることが確認された。特に、TRA-1-60 は未分化 iPS 細胞だけでなく、胚性がん細胞 (embryonal carcinoma) でも発現しているとされており、品質・安全性評価の上で有用と考えられる。初代培養 RPE 細胞に iPS 細胞をスパイクする実験により、正常細胞 (初代培養 RPE 細胞) に混入する未分化細胞の検出限界を検

討した結果、0.1%以上の混入量であれば有意な検出シグナルが得られることが明らかとなった。

定量性 RT-PCR は、特定のマーカー遺伝子発現を指標に未分化ヒト iPS 細胞を検出する高感度な系だと当然のように考えられるが、どのマーカーが最適であるか、そして検出感度はどのくらいか、ということに関する情報は意外なことにほとんどない。そこでわれわれは、未分化細胞に選択的に発現するとされる遺伝子として *OCT3/4*, *KLF4*, *C-MYC*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*, *REX1* を選び、これらの中でどの遺伝子発現が未分化細胞の混入指標として最適か、最適な遺伝子を使用した場合の混入未分化細胞の検出限界はどのくらいかを、検討した。正常細胞のモデルケースとしては、軟寒天コロニー形成試験及びフローサイトメトリーのときと同様に初代培養 RPE 細胞を用いた。検討の結果、初代培養 RPE 細胞であっても、*C-MYC*, *KLF4* 及び *REX1* は、ヒト iPS 細胞での発現を 100%とした場合、数%–25%のレベルで発現していることが明らかとなった。基礎科学としての細胞生物学・分子生物学の視点に立てば、この程度の発現量の差でも「未分化細胞選択的発現」と言えるかもしれない。しかしながら、患者あたりの 1 回の投与量が  $10^4$ – $10^9$  個とされる iPS 細胞由来移植細胞の中にわずかに残留する iPS 細胞の検出を行うには、この程度の選択性では全く不十分である。一方、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28* の初代培養 RPE における遺伝子発現量は、対 iPS 細胞比で 1/1000 未満であった。RPE 細胞に iPS 細胞をスパイクして検討した結果、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* を指標にした iPS 細胞の検出限界はそれぞれ、0.01%, 0.06%, 0.07%であった。*LIN28* については、初代培養 RPE 中の発現が全く検出されなかったため、「ネガティブコントロールのシグナル値の平均値+標準偏差の 3 倍」という通常の方法により下方検出限界を求めることはできなかった。しかしながら、スパイク実験及びヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞を用いた検討から、0.002%程度の iPS 細胞が混入した際にも *LIN28* の有意な発現シグナルが観測されることが明らかとなっている。すなわち、*LIN28* を指標にすれば、約 5 万個 RPE 中に 1 個の割合で混入する未分化 iPS 細胞を検出できることになる。この方法は、われわれの知り得る限り、分化細胞中の残存ヒト iPS 細胞の検出方

法としては、学術論文として公表されている方法の中で最も感度が高く、平成 25 年 8 月から開始されている神戸の理化学研究所と先端医療センター病院の自己 iPS 細胞由来 RPE 細胞を用いた臨床研究計画の中でも品質管理試験として採用されるに至っている。現在われわれは、プローブや酵素などの反応条件及び測定方法の改良により、更なる感度の上昇を試みているところであり、将来的には、iPS 細胞由来 RPE 細胞だけでなく、より汎用性の高い iPS 細胞由来移植細胞の評価方法に発展することが期待される。

なお、不死化細胞を *in vitro* で検出する系としては、上に紹介した方法のほか、所定の培養期間を超えて細胞を培養し、その増殖特性を解析する試験がある。これらを組み合わせて未分化細胞及び不死化細胞の存在を否定できれば、最終製品の造腫瘍性はかなり低いことが示唆されるが、臨床試験に進むことの妥当性は、投与細胞数、投与部位、リスクマネジメントプラン、あるいは *in vivo* 造腫瘍性試験データ等によって製品毎に判断されるべきだと考えられる。

## 7. おわりに

ヒト ES/iPS 細胞由来移植細胞のような細胞・組織加工製品（再生医療製品）を対象にした造腫瘍性試験ガイドラインはいまだに存在しない。したがって、現時点では、細胞・組織加工製品の中でも特に造腫瘍性に関して懸念の強い製品について、本稿で挙げたタイプの異なる試験を複数実施し、総合的に判断すべきであると考えられる。なお、個別の製品で示すべき具体的評価事項は、原材料や製品の特性・対象疾患・リスクマネジメントプランなどを勘案して製品毎に判断されるものである。適切な試験（を組み合わせた）結果・評価についても、ヒトでの結果を完全に保証するものではなく、各試験法の能力と限界を理解したうえで、リスク評価・リスクマネジメント立案及びインフォームド・コンセントの受領を行うことが重要であると考えられる。

われわれが開発した定量性 RT-PCR の方法において iPS 細胞の混入の指標として用いられる *LIN28* は、幹細胞の自己複製能の維持に関与していると言われており、京都大学の山中伸弥博士のグループとヒト iPS 細胞の樹立で先陣争いをしていたウィスコンシン大学のジェームズ・トムソン博士のグルー

ブがヒト体細胞から iPS 細胞を誘導する際に用いた初期化因子の 1 つとして有名な遺伝子である。また、細胞分化促進因子又はがん抑制因子として知られるマイクロ RNA の一種、let-7 のプロセッシングを阻害するとも言われている。<sup>14)</sup> ヒト生殖細胞腫瘍では LIN28 が過剰発現しているとの報告<sup>15)</sup>もあることから、LIN28 はヒト iPS 細胞の未分化性のマーカーとしてだけでなく生殖細胞腫瘍の悪性度のマーカーとしても有用であることが示唆される。われわれの予備的な定量性 RT-PCR を用いた検討によれば、LIN28 はヒト iPS 細胞においては高発現しているものの、生殖組織以外の多くのヒト組織において発現が全く認められていない。すなわち、分化細胞においては「極度に厳密な」発現制御が行われていることになる。しかしながら、その意義とメカニズムは全く明らかではない。これらを明らかにすることは、細胞の未分化性、多分化能、分化の制御機構という基礎研究の大きな課題に対して重要なインプットとなることが強く予想される。われわれの *in vitro* 評価法の開発目的は「薬学」としての iPS 細胞由来移植細胞の品質・安全性確保のためであったが、そうした視点からの技術開発研究（実用化研究）を続けることで、運よく、医薬品実用化の出口との関連を説明し易い、すなわち実用化の点からも基礎研究の対象としても重要と考えられる因子 (LIN28) を同定することができた。「薬学」の本質は安全で有効な医薬品を迅速に患者のもとに届ける方策を探ることである。したがって医薬品の実用化のための評価技術開発研究は「薬学」の要であって、非常に重要である。しかし、そうした視点のみならず、得られた成果の「生物学」的な意義づけを考え、それをきっかけに開始される基礎研究によって、新しい薬のシーズや標的分子の発見という新しいフロンティアに到達することができるかもしれないという希望を持つことも、「薬学」をエンジョイするには非常に重要な要素だと私は感じている。

**謝辞** 本総説で紹介した研究において終始多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました西川伸一先生 (AASJ)、川真田 伸先生 (先端医療振興財団)、高橋政代先生 (理研 CDB)、また多くのご協力を頂きました国立医薬品食品衛生研究所の皆様にご感謝の意を表します。

## REFERENCES

- 1) Lee M. O., Moon S. H., Jeong H. C., Yi J. Y., Lee T. H., Shim S. H., Rhee Y. H., Lee S. H., Oh S. J., Lee M. Y., Han M. J., Cho Y. S., Chung H. M., Kim K. S., Cha H. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **110**, E3281–E3290 (2013).
- 2) Schuldiner M., Itskovitz-Eldor J., Benvenisty N., *Stem Cells*, **21**, 257–265 (2003).
- 3) Chung S., Shin B. S., Hedlund E., Pruszk J., Ferree A., Kang U. J., Isacson O., Kim K. S., *J. Neurochem.*, **97**, 1467–1480 (2006).
- 4) Tang C., Lee A. S., Volkmer J. P., Sahoo D., Nag D., Mosley A. R., Inlay M. A., Ardehali R., Chavez S. L., Pera R. R., Behr B., Wu J. C., Weissman I. L., Drukker M., *Nat. Biotechnol.*, **29**, 829–834 (2011).
- 5) Choo A. B., Tan H. L., Ang S. N., Fong W. J., Chin A., Lo J., Zheng L., Hentze H., Philp R. J., Oh S. K., Yap M., *Stem Cells*, **26**, 1454–1463 (2008).
- 6) Tohyama S., Hattori F., Sano M., Hishiki T., Nagahata Y., Matsuura T., Hashimoto H., Suzuki T., Yamashita H., Satoh Y., Egashira T., Seki T., Muraoka N., Yamakawa H., Ohgino Y., Tanaka T., Yoichi M., Yuasa S., Murata M., Suematsu M., Fukuda K., *Cell Stem Cell*, **12**, 127–137 (2013).
- 7) World Health Organization (WHO). “Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks, Proposed replacement of TRS 878, Annex 1.”: ([http://www.who.int/biologicals/Cell\\_Substrates\\_clean\\_version\\_18\\_April.pdf](http://www.who.int/biologicals/Cell_Substrates_clean_version_18_April.pdf)), cited 26 October, 2013.
- 8) Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., Suzue K., Kawahata M., Hioki K., Ueyama Y., Koyanagi Y., Sugamura K., Tsuji K., Heike T., Nakahata T., *Blood*, **100**, 3175–3182 (2002).
- 9) Machida K., Suemizu H., Kawai K., Ishikawa T., Sawada R., Ohnishi Y., Tsuchiya T., *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 123–127 (2009).
- 10) Kanemura H., Go M. J., Nishishita N., Sakai N., Kamao H., Sato Y., Takahashi M.,

- Kawamata S., *Sci. Rep.*, **3**, 2334 (2013).
- 11) Kuroda T., Yasuda S., Kusakawa S., Hirata N., Kanda Y., Suzuki K., Takahashi M., Nishikawa S., Kawamata S., Sato Y., *PLoS One*, **7**, e37342 (2012).
- 12) Hentze H., Soong P. L., Wang S. T., Phillips B. W., Putti T. C., Dunn N. R., *Stem Cell Res.*, **2**, 198–210 (2009).
- 13) Miller J. N., Miller J. C., “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry,” 5th ed., Person Education Limited, Harlow, 2005.
- 14) Nam Y., Chen C., Gregory R. I., Chou J. J., Sliz P., *Cell*, **147**, 1080–1091 (2011).
- 15) West J. A., Viswanathan S. R., Yabuuchi A., Cunniff K., Takeuchi A., Park I. H., Sero J. E., Zhu H., Perez-Atayde A., Frazier A. L., Surani M. A., Daley G. Q., *Nature*, **460**, 909–913 (2009).

特集 高齢者医療における再生医療の可能性

総説

## 2. 再生医療・細胞治療の臨床研究から実用化までの道のり

村岡ひとみ 佐藤 陽治

## KEY WORD

再生医療 ■ 臨床研究 ■ 先進医療 ■ 治験 ■ 薬事法

## SUMMARY

■わが国では、再生医療など(再生医療または細胞治療)の実用化には、「臨床研究」を経て「先進医療」や「保険外診療」に向かうルートと、「再生医療等製品」の治験を経て薬事承認を受けるルートがあるが、国民のアクセシビリティや国際展開という面から考えると、前者のルートの真の出口も後者を経た保険診療だとされている。ただし、わが国における再生医療などの開発は、医薬品などの国際ガイドラインに沿った国内基準への準拠が義務ではない臨床研究からスタートすることが多く、得られたデータを製品の薬事承認申請資料としてそのまま使用できないという問題を克服することが大きな課題となっている。

## はじめに

超高齢化社会では、加齢に伴って引き起こされる種々の難治性疾患に対する医療の提供が課題であり、特に、失われた機能の回復への期待は大きい。近年のヒト胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞の登場によって、失われた組織の再生を目指す再生医療が現実のものとして考えられるようになってきたが、このような新しい概念をこれまでの医療や医薬品の規制の枠組みの中で実用化することは容易ではない。

## 再生医療・細胞治療の開発の道筋

わが国において、ヒトまたは動物の細胞に培養そのほかの加工を施したものをを用いた再生医療など(再生医療または細胞治療)を実用化するための道筋には、「医療としての開発トラック」

と「製品としての開発トラック」との2つがある。医師・歯科医師が自らの患者に「医療」を施すことを目的に、ヒトまたは動物の細胞に医師・歯科医師が自ら加工を施し、これを患者に投与することはこれまで、「医師法」「医療法」などの医事関連法規や「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」などの行政指針に従い、「臨床研究」およびその結果を踏まえた「先進医療」(保険診療との併用が認められる保険外診療)あるいは「保険外診療」として行われてきた。ちなみに、平成25年成立の「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(通称「再生医療新法」)施行後は、医師・歯科医師は細胞の加工を外部の「特定細胞加工物製造業者」に委託することが可能となる一方で、そのリスク区分に応じて、再生医療等提供計画を厚生労働大臣などに提出しなければならない。

一方、ヒトまたは動物の細胞に培養そのほかの加工を施し、再生医療などに用いられること

■むらおか ひとみ(国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部 さいとう ようじ(国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部部長、名古屋市立大学大学院薬学研究科客員教授、大阪大学大学院薬学研究科招聘教授、九州大学大学院薬学研究科客員教授)



を目的とした製品(再生医療等製品)を開発するトラックでは、「薬事法」の規制を受け、薬事法に基づき、治験を行った上で品質、有効性および安全性を示し、厚生労働省の製造販売承認を受けなければならない。なお、平成25年改正の「薬事法」の施行に伴い、法律名が「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」(略称「医薬品医療機器等法」)に変更されるとともに、再生医療等製品(遺伝子治療用製品を含む)は、医薬品からも医療機器からも独立した第3のカテゴリーとして分類される。再生医療等製品のうち、申請に関わる再生医療等製品が均一でない場合、治験により効能、効果または性能を有すると推定され、安全性の確認が行われたものは、条件および期限付製造販売承認を得ることができるようになるなど、特別な規制が適用される。

「製品としての開発トラック」では、薬事法に記され、かつ医薬品国際ガイドライン(ICHガイドライン)に沿った国内基準(例えば Good Laboratory Practice (GLP)、Good Manufacturing Practice (GMP)/Quality Management System (QMS)、Good Clinical Practice (GCP)など)に従う必要がある。すなわち、その必要がない「医療としての開発トラック」と比べ、費用も時間も余計にかかる。ただし、「医療」としての「臨床研究」は、研究費が尽きれば実施不可能になるという点で持続可能な医療ではないことが問題である。「先進医療」では実施可能な医療機関が限定されると同時に、製品の品質にばらつきが生じるおそれがあり、また「保険外診療」は、開発に多くの投資を要する新規製品を用いるために高額となりやすく、いずれの場合も多くの国民が享受できないおそれがある。したがって、国民が広くアクセスできるようにするためには、治験を通じて薬事法上の承認を得て保険診療として実施されることが好ましい。

「先進医療」は、再生医療などの「医療としての開発トラック」における実用化の出口ととらえられることもあるが、実は「健康保険法等の一部を改正する法律」において「先進医療」は「厚生労働大臣が定める高度の医療技術を用い

た療養その他の療養であつて、保険給付の対象とすべきものであるか否かについて、適正な医療の効率的な提供を図る観点から評価を行うことが必要な療養」とされており、真の出口とはされていない。同法律の示す真の実用化の出口はあくまで「保険診療」である。

なお、欧米では緊急時や治験などの例外を除き、ヒト・動物の細胞に培養そのほかの加工を施したものを臨床適用する場合には、「医療」か「製品」かの区別なく、ICHガイドラインに沿った薬事の基準に則って開発した上で、その有効性、安全性および品質について製品ごとに、規制当局の審査を受け承認を受けなければならない。したがって、日本国内で開発された再生医療などを国際的に展開することを考えた場合も、治験を通じて薬事法上の承認を得る方が好ましい。

### 再生医療の実用化の問題点と 医師主導治験

わが国における再生医療・細胞治療の開発は、大学などの研究機関の研究者の臨床研究により行われる場合が多い。「医療としての開発トラック」における臨床研究は、手続きや費用などの面で治験よりも実施が比較的容易であるものの、ICHガイドラインに沿った国内基準への準拠が義務ではない。このため、再生医療などの実用化の最終的な出口が保険診療だということになると、得られたデータを製品の薬事承認申請資料としてそのまま使用できないことが多いことが問題である。

つまり、新規の再生医療・細胞治療に関して、臨床研究で有効性・安全性を確認してから産業化を目指して薬事承認を得ようとしても、多くの場合には、国際ガイドラインと整合性のある国内基準に則った治験をやり直さなければならない。また、臨床研究を行った結果を基に実施される先進医療も、前述の通り、法的には保険診療(と薬事承認)を最終的な出口としているが、出口に至るための具体的な道筋はどこにも示されていない。このため、保険診療という出口にたどり着くために乗り越えるべき技術的要件は

薬事法(および関連する基準・指針など)で明らかにされている。臨床研究から始まった開発の場合、いかにすれば効率的にその要件を満たすことができるかという点が乗り越えられない壁となっている。

「医療」と「製品」の区別のない欧米では、「臨床研究」(医療・研究目的の臨床試験)と「治験」(商業目的の臨床試験)という区別はなく、すべての臨床試験は医薬品の国際ガイドラインに準じた各国の規制に従う必要がある。したがって、大学などにおける非商業的な臨床試験にも多くの資金・労力が必要となるものの、企業への技術移転が日本よりスムーズに進みやすい仕組みだといわれている。つまり、上記課題の解決の方法の1つとしては、大学病院や研究機関であっても、欧米のように最初から治験として開発するということが考えられる。わが国では10年ほど前まで、治験を企画・実施する主体は企業のみということになっていたが、平成14年7月公布の改正薬事法により、医師・歯科医師も自ら主体となって治験を企画・実施することが可能となった(医師主導治験)。医師主導治験の積極的な実施は、医師が開発した治療法・製品を一般に普及するための効果的な方策となると考えられる。医師主導治験の実施には、医師のデータ・技術の企業への橋渡しの仕組み(実施医療機関の体制整備費、治験薬の製造、プロトコル作成、データ管理業務、治験相談などの費用を補助するなどの支援、研究費など)をさらに充実させる必要があることから、文部科学省・厚生労働省は「臨床研究・治験活性化5か年計画2012」などの中で、日本医師会治験促進センターや中核病院・拠点医療機関などと協力し、医師主導治験を含めたわが国の治験実施の環境整備に努めている。しかしわが国の現状としては、欧米のようにすべての臨床研究を医師主導治験に置換する環境にはなっていない。

### 「医療としての開発」と「製品としての開発」をつなぐ道

こうした状況下で、再生医療などの臨床研究

を効率的に保険診療へ結びつけて行くために必要なのは、臨床研究におけるデータと製品の質を、重要なポイントだけでも、できる限り治験グレードにそろえることだと考えられる。そのためには、臨床研究であっても治験であっても再生医療等製品のすべてに最低限必須・共通の要件や基準・評価技術を定め、これに各製品の種類・特性、対象疾患、開発段階などに応じた上乘せ方策を適用するというアプローチが有効だと考えられる。こうした最低限の要件などは「ミニマム・コンセンサス・パッケージ(MCP)」と呼ばれている<sup>1)</sup>。再生医療などの開発においてMCPは、例えば臨床研究そのほかの「医療としての開発」と「製品としての開発」の切れ目のない移行を可能にする共通のプラットフォームともなると考えられ、その充実が重要と考えられる。

平成25年11月に「再生医療新法」と「医薬品医療機器等法」が成立したことに伴い、日本の再生医療などの開発環境は大きな転換期を迎えようとしている。平成26年2月現在、厚生労働省ではこれらの法律の施行に向けた政省令や基準・指針などの策定が進んでいるところである。こうした規制の中において、MCPの具体像の認識をすべてのステークホルダーで共有し、「再生医療新法」下の臨床研究であっても、少なくともそのMCPについては開発の早期から着実に踏まえることが可能となるような体制を整備し、柔軟に運用することが、今後、再生医療・細胞治療の臨床研究から真の実用化の出口としての保険診療に効率的に結びつけるためのカギになると筆者らは考えている。

### 文 献

- 1) 早川堯夫: ヒト幹細胞加工製品の品質及び安全性の確保について。厚生労働省 厚生科学審議会科学技術部会第18回ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の見直しに関する専門委員会(平成24年5月9日)。 <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000029kw0-att/2r9852000002a0tg.pdf> (平成26年2月15日アクセス)

# BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes

Mariko Moriyama<sup>1,2,4</sup>, Hiroyuki Moriyama<sup>1,4</sup>, Junki Uda<sup>1</sup>, Akifumi Matsuyama<sup>2</sup>, Masatake Osawa<sup>3</sup> and Takao Hayakawa<sup>1</sup>

Transcriptome analysis of the epidermis of *Hes1*<sup>-/-</sup> mouse revealed the direct relationship between Hes1 (hair cell enhancer of split-1) and BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3), a potent inducer of autophagy. Keratinocyte differentiation is going along with activation of lysosomal enzymes and organelle clearance, expecting the contribution of autophagy in this process. We found that BNIP3 was expressed in the suprabasal layer of the epidermis, where autophagosome formation is normally observed. Forced expression of BNIP3 in human primary epidermal keratinocytes (HPEKs) resulted in autophagy induction and keratinocyte differentiation, whereas knockdown of BNIP3 had the opposite effect. Intriguingly, addition of an autophagy inhibitor significantly suppressed the BNIP3-stimulated differentiation of keratinocytes, suggesting that BNIP3 plays a crucial role in keratinocyte differentiation by inducing autophagy. Furthermore, the number of dead cells increased in the human epidermal equivalent of BNIP3 knockdown keratinocytes, which suggests that BNIP3 is important for maintenance of skin epidermis. Interestingly, although UVB irradiation stimulated BNIP3 expression and cleavage of caspase3, suppression of UVB-induced BNIP3 expression led to further increase in cleaved caspase3 levels. This suggests that BNIP3 has a protective effect against UVB-induced apoptosis in keratinocytes. Overall, our data provide valuable insights into the role of BNIP3 in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes.

*Journal of Investigative Dermatology* advance online publication, 6 February 2014; doi:10.1038/jid.2014.11

## INTRODUCTION

The skin epidermis is a stratified epithelium. Stratification is a key process of epidermal development. During epidermal development, the single layer of basal cells undergoes asymmetric cell division to stratify, and produce committed suprabasal cells on the basal layer. These suprabasal cells are still immature and sustain several rounds of cell divisions to form fully stratified epithelia. Recent studies have identified numerous molecules involved in epidermal development, although how these molecules coordinate to induce proper stratification of the epidermis remains to be elucidated. Previously, by integrating both loss- and gain-of-function studies of Notch receptors and their downstream target Hes1

(hair cell enhancer of split-1), we demonstrated the multiple roles of Notch signaling in the regulation of suprabasal cells (Moriyama *et al.*, 2008). Notch signaling induces differentiation of suprabasal cells in a Hes1-independent manner, whereas Hes1 is required for maintenance of the immature status of suprabasal cells by preventing premature differentiation. In light of the critical role of Hes1 in the maintenance of spinous cells, exploration of the molecular targets of Hes1 in spinous layer cells may lead to the discovery of the molecules required for differentiation of spinous layer cells to granular layer cells. Because Hes1 is thought to be a transcriptional repressor (Ohtsuka *et al.*, 1999), loss of Hes1 is expected to cause aberrant upregulation of genes that are normally repressed in spinous layer cells. To identify these genes, we previously conducted comparative global transcript analysis using microarrays and found several candidates that may play a crucial role in regulating epidermal development (Moriyama *et al.*, 2008). One of the genes that was highly expressed was *BNIP3* (*BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3*), an atypical pro-apoptotic BH3-only protein that induces cell death and autophagy (Zhang and Ney, 2009).

The molecular mechanism through which BNIP3 induces cell death is not well understood; however, it has been reported that BNIP3 protein is induced by hypoxia in some tumor cells and that the kinetics of this induction correlate with cell death (Sowter *et al.*, 2001). In contrast,

<sup>1</sup>Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Higashi-Osaka, Osaka, Japan; <sup>2</sup>Platform for Realization of Regenerative Medicine, Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Hyogo, Japan and <sup>3</sup>Division of Regeneration Technology, Gifu University School of Medicine, Gifu, Gifu, Japan

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Mariko Moriyama, Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan. E-mail: mariko@phar.kindai.ac.jp

Abbreviations: 3-MA, 3-methyladenine; BNIP3, BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Hes1, hair cell enhancer of split-1; HPEK, human primary epidermal keratinocyte; Q-PCR, quantitative PCR

Received 18 July 2013; revised 10 December 2013; accepted 18 December 2013; accepted article preview online 8 January 2014

BNIP3-induced autophagy has been shown to protect HL-1 myocytes from cell death in an ischemia-reperfusion model (Hamacher-Brady *et al.*, 2007). Induction of autophagy by BNIP3 has a protective effect in some conditions, whereas in others it is associated with autophagic cell death. Recent evidence also suggests that BNIP3, through autophagy, is also required for the differentiation of chondrocytes under hypoxic conditions (Zhao *et al.*, 2012).

Autophagy was initially described based on its ultrastructural features of the double-membraned structures that surrounded the cytoplasm and organelles in cells, known as autophagosomes (Mizushima *et al.*, 2010). To date, only microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), a mammalian homolog of yeast Atg8, is known to be expressed in autophagosomes and, therefore, it serves as a widely used marker for autophagosomes (Kabeya *et al.*, 2000; Mizushima *et al.*, 2004). Autophagy is an evolutionarily conserved catabolic program that is activated in response to starvation or changing nutrient conditions. Recently, autophagy was shown to be involved in differentiation of multiple cell types, including erythrocytes, lymphocytes, adipocyte, neuron, and chondrocyte (Srinivas *et al.*, 2009; Mizushima and Levine, 2010).

Epidermal cornification, the process of terminal keratinocyte differentiation, requires programmed cell death in a similar but different pathway from apoptosis (Lippens *et al.*, 2005). Cornification is also accompanied by activation of lysosomal enzymes and organelle clearance. Moreover, some researchers have reported that autophagy may play a role in epidermal differentiation (Haruna *et al.*, 2008; Aymard *et al.*, 2011; Chatterjea *et al.*, 2011). Therefore, it is likely that BNIP3 is involved in cornification through cell death or autophagy.

In this study, transcriptome analysis of *Hes1*<sup>-/-</sup> mouse epidermis revealed that Hes1 could directly suppress BNIP3 expression in epidermal keratinocytes. We also found that BNIP3 was expressed in the suprabasal layer of the human skin epidermis, where autophagosome formation was observed. BNIP3 was also sufficient to promote cornification through induction of autophagy. Finally, we found that BNIP3 had a protective effect against UVB-induced apoptosis in keratinocytes *in vitro*. Our data thus indicate that BNIP3, an inducer of autophagy, is involved in the terminal differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes.

## RESULTS

### Hes1 directly represses BNIP3 expression in epidermal cells and keratinocytes

We previously performed a microarray analysis with epidermal RNAs isolated from wild-type and *Hes1*<sup>-/-</sup> mice (Moriyama *et al.*, 2008) and found that BNIP3 was preferentially overexpressed in *Hes1*<sup>-/-</sup> epidermis. The upregulation of *Bnip3* in the *Hes1*<sup>-/-</sup> epidermis was confirmed by quantitative PCR (Q-PCR) and immunofluorescent staining (Figure 1a and b). As Hes1 is thought to be a transcriptional repressor (Ishibashi *et al.*, 1994), it might play a repressive role in the regulation of BNIP3 expression. In accordance with this hypothesis, BNIP3 expression in *Hes1*<sup>-/-</sup> epidermis at embryonic day 15.5 was observed in

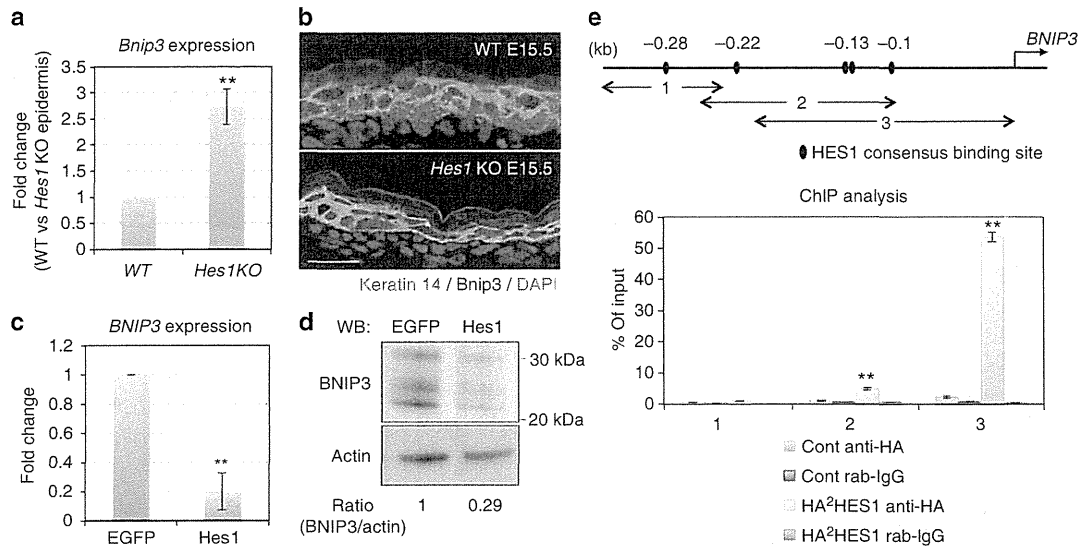
the suprabasal layers (Figure 1b), where Hes1 has been reported to be expressed in wild-type epidermis at the same age (Blanpain *et al.*, 2006; Moriyama *et al.*, 2008). To confirm whether Hes1 suppresses BNIP3 expression, an adenoviral vector expressing Hes1 was used to infect human primary epidermal keratinocytes (HPEKs) and, subsequently, the expression level of BNIP3 was quantified by Q-PCR and western blot analysis. The BNIP3 protein was detected as multiple bands between 22 and 30 kD as previously reported (Vengellur and LaPres, 2004; Walls *et al.*, 2009; Mellor *et al.*, 2010; Sassone *et al.*, 2010). We found that Hes1 induced a substantial reduction of BNIP3 expression in HPEKs at the mRNA and protein levels (Figure 1c and d), demonstrating that Hes1 is involved in the repression of BNIP3. To determine whether Hes1 directly regulates *BNIP3* expression, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays. We identified at least 5 Hes1 consensus binding sites 1 kb upstream of the transcription initiation site of the human *BNIP3* gene, and subsequent Q-PCR analysis revealed that a DNA fragment located at -247 to -87 was slightly amplified from crosslinked chromatin isolated by Hes1 immunoprecipitation (Figure 1e). We also found an additional site between -212 and +22 that was strongly amplified. These data clearly show that Hes1 specifically binds to the promoter region of *BNIP3* and directly suppresses its expression.

### BNIP3 is expressed in the granular layer of the epidermis, where autophagosome formation is observed

To determine the BNIP3 expression profile in the epidermis, we performed immunofluorescent staining in human skin epidermal equivalent. BNIP3 was expressed in the granular layer of epidermal equivalent 18 days (Figure 2a and b) or 24 days (Figure 2c and d) after exposure at the air-liquid interface. BNIP3 expression in the granular layer was also observed in the normal human skin epidermis (Figure 2g and h). Recent reports show that BNIP3 is expressed in mitochondria and that it induces autophagy (Quinsay *et al.*, 2010). In addition, some researchers have reported that autophagy may play a role in epidermal differentiation (Haruna *et al.*, 2008; Aymard *et al.*, 2011; Chatterjea *et al.*, 2011). We therefore investigated whether autophagy occurred in the epidermis, especially in the granular layers. To quantitate the level of autophagy, cytosol to membrane translocation of the autophagy marker EGFP-LC3 (Kabeya *et al.*, 2000) was monitored in a human skin equivalent model (Mizushima *et al.*, 2004). When autophagy is active, autophagosomes containing EGFP-LC3 are visible as fluorescent puncta (Kabeya *et al.*, 2000). As expected, EGFP-LC3 puncta were observed in the granular layers of the epidermal equivalent (Figure 2e). Moreover, endogenous LC3 dots were observed in the granular layers of normal human skin epidermis (Figure 2f). These data suggested that BNIP3 might be involved in the induction of autophagy in the granular layer of the epidermis.

### BNIP3 is required for terminal differentiation of keratinocyte by induction of autophagy *in vitro*

To investigate the involvement of BNIP3 in the induction of autophagy, we transduced HPEKs stably expressing EGFP-LC3



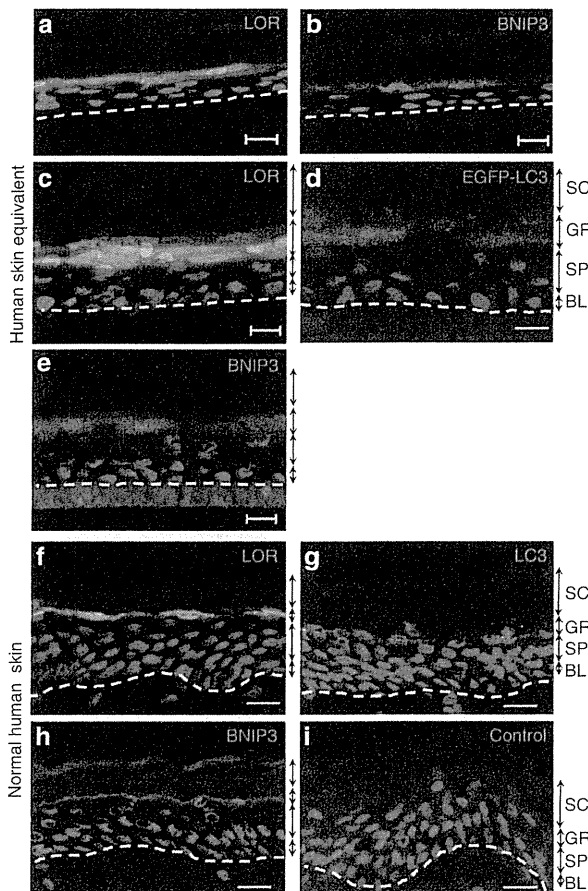
**Figure 1. BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3) is directly suppressed by HES1(hairy and enhancer of split-1).** (a) Quantitative PCR (Q-PCR) analysis of *Bnip3* expression in dorsal skin epidermis from either wild-type (WT) or *Hes1* knockout (KO) embryo (embryonic day 14.5 (E14.5)). (b) Immunofluorescent analysis of *Bnip3* expression in dorsal skin epidermis from either WT or *Hes1* KO embryo (E15.5). Keratin 14 staining is shown in green and *Bnip3* staining is shown in red. The blue signals indicate nuclear staining. Scale bars = 20  $\mu$ m. (c) Q-PCR and (d) western blot analysis of *BNIP3* expression in human primary epidermal keratinocyte (HPEK) cells infected with adenoviruses expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) or *Hes1*. (e) Specific binding of *Hes1* to the *BNIP3* promoter. HPEK cells were infected with adenoviral constructs expressing hemagglutinin (HA)-tagged *Hes1*, and processed for chromatin immunoprecipitation (ChIP) with an anti-HA antibody and normal rabbit immunoglobulin G (Cont rab-IgG) as a nonimmune control. Q-PCR amplification of the region of the *BNIP3* gene described in the indicated map (upper panel; nucleotides -360 to -244 (1); nucleotides -247 to -87 (2); -212 to +22 (3)) was also performed. The amount of precipitated DNA was calculated relative to the total input chromatin. All the data represent the average of three independent experiments  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$ .

with a *BNIP3* adenoviral vector. *BNIP3* expression was found to be sufficient to trigger the formation of EGFP-LC3 puncta that was significantly reduced by addition of 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor of autophagy (Figure 3a and b). On the other hand, *BNIP3* knockdown markedly decreased the punctuate distribution of EGFP-LC3 in differentiated HPEKs (Figure 3c and d). Furthermore, flow cytometry analysis using a green fluorescent probe used to specifically detect autophagy (Cyto-ID autophagy detection dye) (Chan *et al.*, 2012) also showed that *BNIP3* was required for the autophagy induction (Figure 3c and f). These data indicate that *BNIP3* is involved in the induction of autophagy in HPEKs. Intriguingly, these data also confirm the previous finding that autophagosome induction is accompanied by keratinocyte differentiation (Haruna *et al.*, 2008). We observed that the number of mitochondria was decreased in the granular layers, where *BNIP3* expression and autophagosome formation was observed (Figure 4a). In addition, mitochondria were significantly decreased in the differentiated HPEKs *in vitro* (Figure 4b). Colocalizations of mitochondria and EGFP-LC3 dot were observed only in the differentiating keratinocytes (Figure 4c), suggesting the contribution of autophagy in the decrease of mitochondria. *BNIP3* expression was also correlated with decreased mitochondria in HPEKs, whereas addition of 3-MA restored mitochondrial numbers (Figure 4d). Furthermore, we also observed colocalization of mitochondria

and EGFP-LC3 dot in *BNIP3*-overexpressing HPEKs (Figure 4e). These data indicated that mitochondria were removed by *BNIP3*-induced autophagy. Next, we investigated the involvement of *BNIP3* in the differentiation of epidermal keratinocytes. Western blot analysis and immunofluorescent staining revealed that *BNIP3* expression increased during differentiation (Figure 5a and b). Knockdown of *BNIP3* significantly suppressed keratinocyte differentiation when the cells were treated with differentiation medium (Figure 5c and d), indicating that *BNIP3* is required for terminal differentiation of keratinocyte. On the other hand, forced expression of *BNIP3* in HPEKs markedly stimulated loricrin expression (Figure 5e and f). To determine whether *BNIP3*-dependent keratinocyte differentiation was induced by autophagy, 3-MA was added to the cells transduced with *BNIP3*. As shown in Figure 5e and f, 3-MA notably abolished the keratinocyte differentiation induced by *BNIP3*, suggesting that *BNIP3* is required for terminal differentiation of keratinocyte by induction of autophagy.

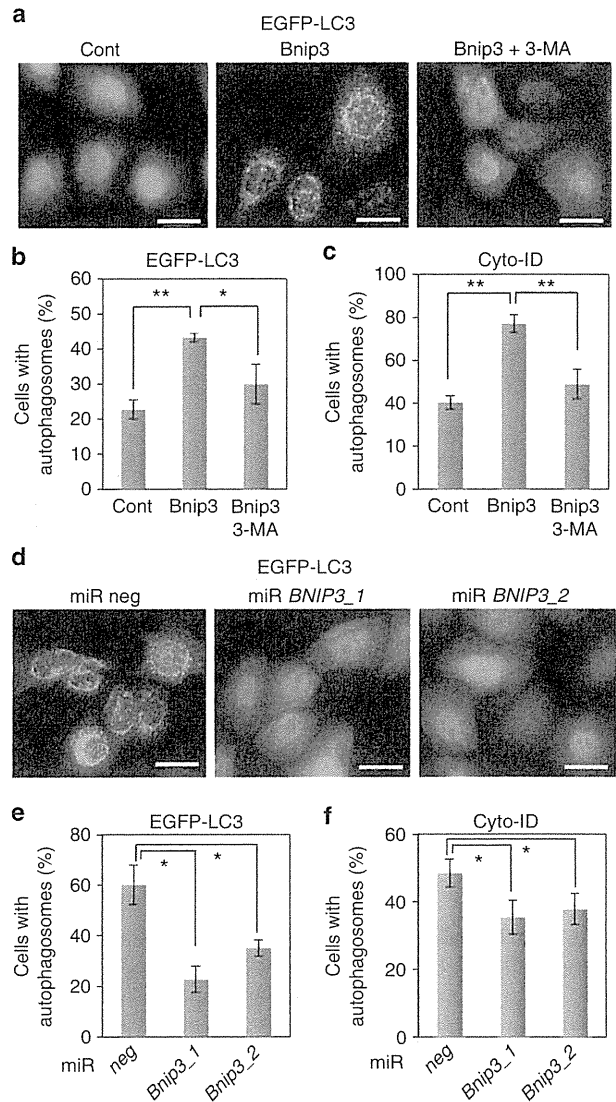
#### BNIP3 maintains epidermal keratinocytes

To further determine the roles of *BNIP3* in epidermal differentiation, the human skin epidermal equivalent was reconstituted from HPEKs stably expressing a *BNIP3* RNA interference (RNAi). Unfortunately, we did not observe drastic differentiation defects; however, we unexpectedly discovered

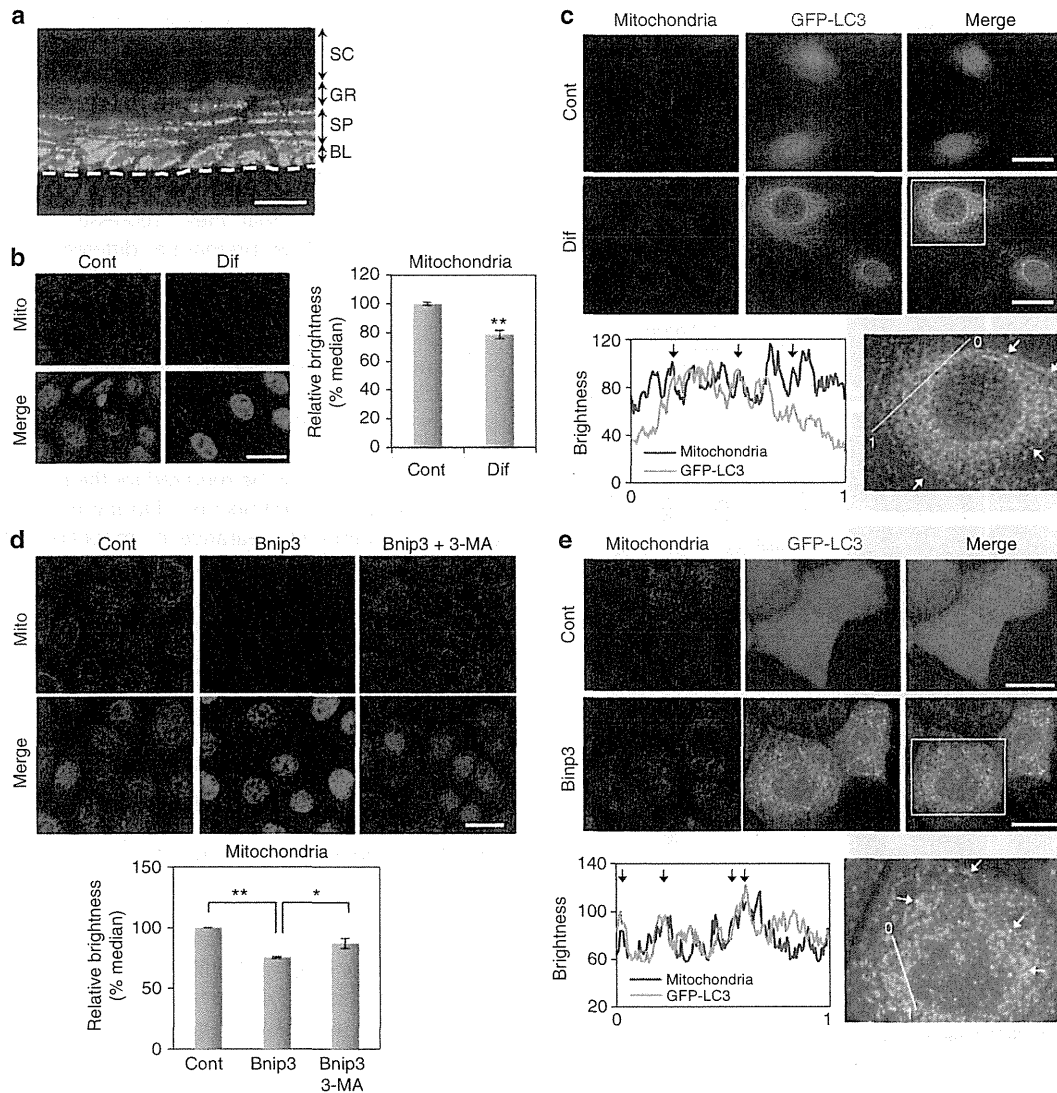


**Figure 2. BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3) is expressed in the granular layer of the human epidermis.** (a–e) Human skin epidermal equivalents were constituted from (a–d) normal human primary epidermal keratinocytes (HPEKs) or (e) HPEKs transfected with EGFP-LC3 by lentiviral vector. Cells were grown for (a, b) 18 days and (c–e) 24 days after exposure at the air–liquid interface. (f–i) Normal human skin epidermis. (a, c, f) Expression pattern of loricrin (LOR). (b, e, h) Expression pattern of BNIP3. (i) Control staining without BNIP3 antibody is shown. (d) Autophagosome formation determined by EGFP-LC3 puncta. (g) Endogenous expression pattern of LC3. The blue signals indicate nuclear staining. The dotted lines indicate (a–e) the boundary between the epidermis and the membrane or (f–i) the boundary between the epidermis and the dermis. Scale bars = 20  $\mu$ m. BL, basal layer; GL, granular layer; SC, stratum corneum (cornified layer); SP, spinous layer.

that “sunburn-like cells” existed in BNIP3 knockdown epidermal equivalent (Figure 6a and b). We therefore hypothesized that BNIP3 might play a key role in the survival of epidermal keratinocytes. To evaluate this hypothesis, HPEKs were irradiated with 20 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. UVB irradiation triggered the formation of autophagosome that was significantly reduced by BNIP3 knockdown (Figure 6c–e). As shown in Figure 6f, UVB irradiation induced cleavage of caspase3 and BNIP3 expression. Intriguingly, knockdown of UVB-induced BNIP3 by RNAi further increased the amount of cleaved caspase3, suggesting that BNIP3 is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis (Figure 6f).



**Figure 3. BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3) stimulates autophagy.** (a, b) EGFP-LC3-expressing human primary epidermal keratinocytes (HPEKs) were transfected with DsRed (Cont) or BNIP3. As an inhibitor of autophagy, 3-methyladenine 3-MA (5 mM) was added. Cells were then stained with anti-EGFP at 24 hours after transfection. (a) EGFP-LC3 staining is shown in green. Scale bars = 20  $\mu$ m. (b) The percentage of EGFP-LC3-positive cells with more than five puncta were quantified and are presented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SD. (c) HPEKs were transfected with DsRed (Cont) or BNIP3. As an inhibitor of autophagy, 3-MA (5 mM) was added. Autophagy induction was determined by Cyto-ID staining and quantified by flow cytometry. (d, e) EGFP-LC3-expressing HPEKs were transfected with miR neg, miR BNIP3\_1, or miR BNIP3\_2 and induced to differentiate. Cells were then stained with anti-EGFP at 8 hours after differentiation induction. (d) EGFP-LC3 staining is shown in green. Scale bars = 20  $\mu$ m. (e) The percentage of EGFP-LC3-positive cells with more than five puncta were quantified and are presented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SD. (f) HPEKs were transfected with miR neg, miR BNIP3\_1, or miR BNIP3\_2 and induced to differentiate. Autophagy induction was determined by Cyto-ID staining and quantified by flow cytometry. All the data represent the average of three independent experiments  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$ ; \* $0.01 < P < 0.05$ .



**Figure 4. Autophagy stimulates mitochondrial degradation.** (a) Distribution pattern of mitochondria. The blue signals indicate nuclear staining. The dotted lines indicate the boundary between the epidermis and the membrane. Scale bars = 20  $\mu$ m. BL, basal layer; GL, granular layer; SC, stratum corneum (cornified layer); SP, spinous layer. (b) Nondifferentiated control (Cont) or differentiated human primary epidermal keratinocytes (HPEKs; Dif) were subjected to immunofluorescent staining 2 days after induction of differentiation. Mitochondrial staining is shown in red. The blue signals indicate nuclear staining. Scale bar = 20  $\mu$ m. The graph indicates the percent of median brightness calculated by BZ Analyzer Software (Keyence) as the mean of three independent experiments  $\pm$  SD. (c) EGFP-LC3-expressing HPEKs were differentiated. Cont or Dif were stained with anti-mitochondria (red) and anti-EGFP (green) 8 hours after induction of differentiation. Graph indicates the linescan analysis of the red and green fluorescent channels. Initial point of linescan is indicated as 0, and terminal point is indicated as 1. The arrows mark the colocalization of the two proteins. (d) HPEKs were transduced with enhanced green fluorescent protein (EGFP; Cont) or BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3). As an inhibitor of autophagy, 3-methyladenine 3-MA (5 mM) was added. Cells were then fixed and stained with anti-mitochondria 48 hours after transduction. Scale bar = 20  $\mu$ m. The graph indicates the percent of median brightness calculated by BZ Analyzer Software (Keyence) as the mean of three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ ; \* $0.01 < P < 0.05$ . (e) EGFP-LC3-expressing HPEKs were transduced with mock (Cont) or BNIP3. Cells were then fixed and stained with anti-mitochondria (red) and anti-EGFP (green) 24 hours after transduction. Graph indicates the linescan analysis of the red and green fluorescent channels. Initial point of linescan is indicated as 0, and terminal point is indicated as 1. The arrows mark the colocalization of the two proteins.

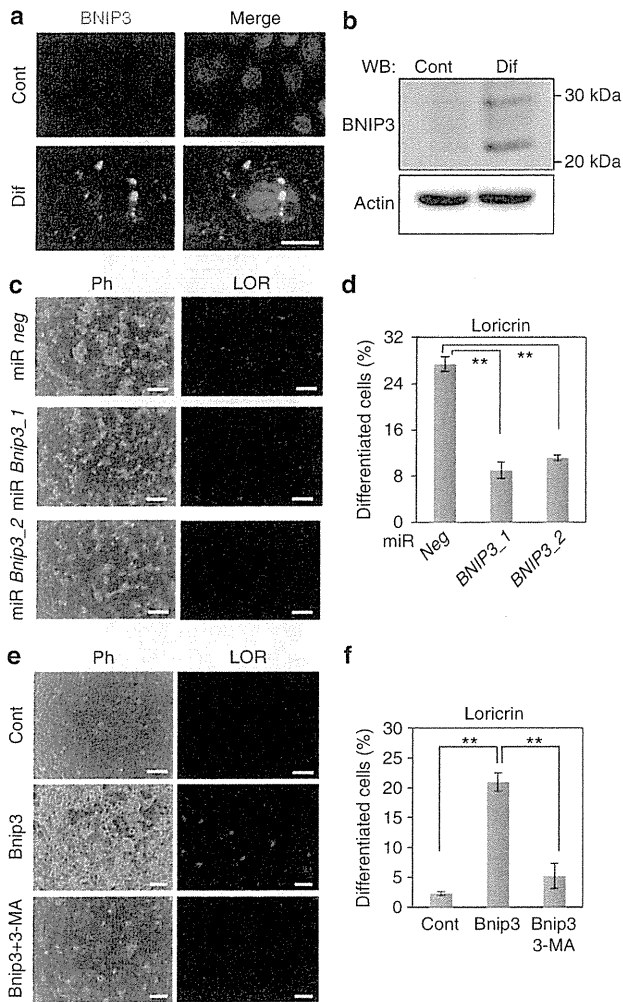
## DISCUSSION

In this study, we demonstrated that BNIP3, a potent inducer of autophagy, plays a role in the terminal differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. It has been suggested that autophagy plays a role in the skin epidermis, but few

attempts have been made to clarify the involvement of autophagy in skin epidermis.

We found that the HES1 transcriptional repressor directly suppressed BNIP3 expression in mouse epidermis and HPEKs (Figure 1). Moreover, our results revealed that BNIP3 was





**Figure 5. BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3) is required for the differentiation of keratinocytes *in vitro*.** (a, b) Human primary epidermal keratinocytes (HPEKs) were differentiated and BNIP3 expression was observed. (a) Nondifferentiated control (Cont) or differentiated HPEKs (Dif) were subjected to immunofluorescent staining. BNIP3 staining is shown in green. Mitochondrial staining is shown in red. The blue signals indicate nuclear staining. Scale bar = 20  $\mu$ m. (b) Western blot (WB) analysis. Proteins extracted from Cont or Dif were probed with anti-BNIP3 or anti-actin. (c, d) HPEKs were infected with adenoviral vectors expressing miR *neg*, miR *BNIP3\_1*, or miR *BNIP3\_2* followed by induction of differentiation. Cells were then immunostained with a loricrin antibody 9 days after transduction. (e, f) HPEKs were infected with adenoviral vectors expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP; Cont) or BNIP3 and subjected to immunofluorescent staining against loricrin (LOR) 6 days after transduction. As an inhibitor of autophagy, 3-methyladenine 3-MA (5 mM) was added. Phase contrast images (Ph) and LOR staining are shown. Scale bars = 200  $\mu$ m. (d, f) Percentages of LOR-positive differentiated cells were calculated by computerized image analysis. The data represent the average of three independent experiments  $\pm$  SD. \*\**P* < 0.01.

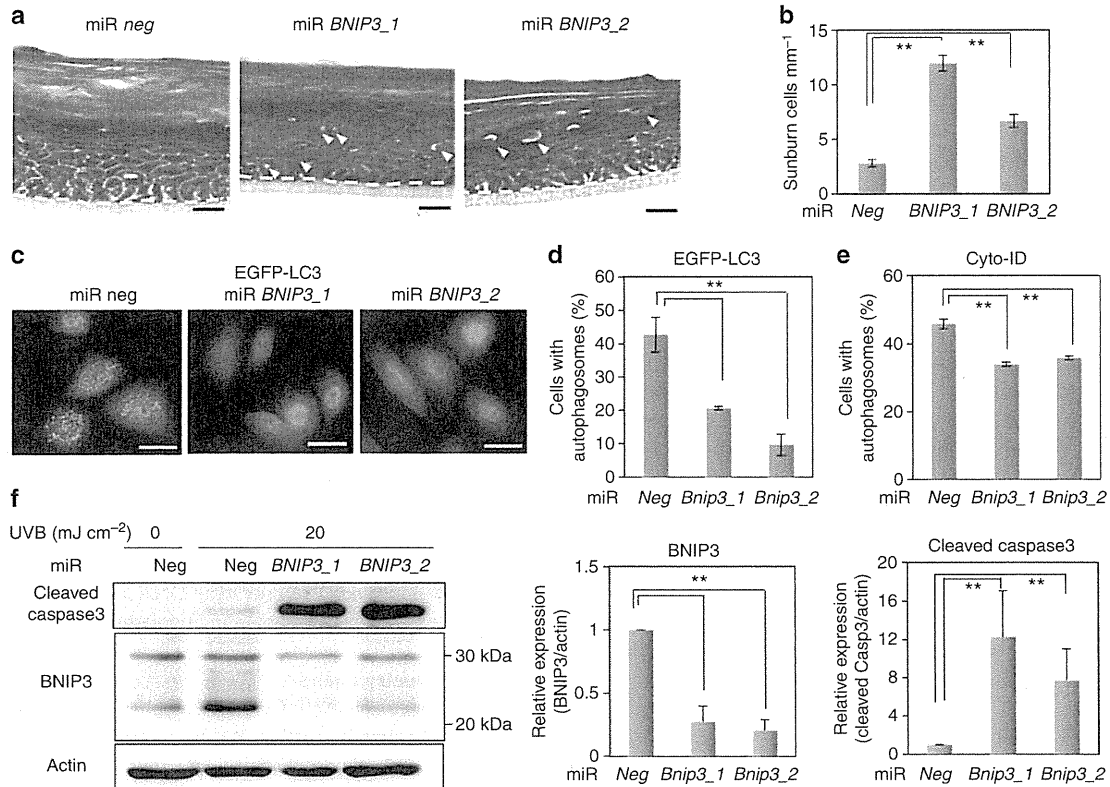
expressed in the granular layers of mouse epidermis, its human skin epidermal equivalent, and its normal human skin epidermis (Figures 1 and 2). These data are consistent with our

previous report showing that Hes1 is expressed in the spinous layers, where it represses the regulatory genes for differentiation to maintain the spinous cell fate (Moriyama *et al.*, 2008). Hence, it can be inferred that Bnip3 expression is suppressed in the spinous layers by Hes1, whereas it is upregulated in the granular layers where Hes1 expression is absent. In addition, our finding that BNIP3 is required for keratinocyte differentiation fits our idea that Hes1 represses certain regulatory genes to prevent the premature differentiation of spinous cells. Our *in vitro* data suggest that BNIP3 is involved in keratinocyte differentiation through autophagy (Figures 3–5). The mechanisms underlying the involvement of autophagy in keratinocyte differentiation remain elusive; however, considering that keratinocyte differentiation induced mitochondrial clearance and BNIP3 expression (Figure 4 and 5), BNIP3-induced autophagy may be responsible for the removal of mitochondria that may be required for the terminal differentiation of epidermal keratinocytes. During reticulocyte differentiation, programmed clearance of mitochondria induced by BNIP3L/Nix, a molecule closely related to BNIP3, has been reported to be a critical step (Schweers *et al.*, 2007). Therefore, keratinocytes likely possess the same differentiation mechanism that reticulocytes have, although further investigation will be required for elucidation.

In contrast to the results from differentiation in two-dimensional culture, we did not observe drastic differentiation defects in the BNIP3 knockdown human epidermal equivalent except for the existence of “sunburn-like cells” (Figure 6). This might be because of the incomplete suppression of BNIP3 in the BNIP3 knockdown keratinocytes, and/or might be because of the redundancy between BNIP3 and BNIP3L/Nix, a homolog of BNIP3, as we found in our preliminary study that Bnip3l is also expressed in the epidermis (data not shown). Although the phenotypes of BNIP3-null mice were published in 2007, these researchers found that BNIP3-null mice had no increase in mortality or apparent physical abnormalities (Diwan *et al.*, 2007). Generally, impairment of epidermal differentiation or skin barrier formation results in an obvious defect. Thus, BNIP3-null epidermis seems to exhibit subtle, if any, abnormalities. On the basis of these findings, the involvement of BNIP3 in epidermal differentiation must be investigated in the future. In-depth analysis of the BNIP3-null epidermis phenotype could help elucidate the role of BNIP3 in mouse epidermal differentiation.

Despite the lack of obvious differentiation defects in the human epidermal equivalent, our data showing that BNIP3 knockdown caused the appearance of “sunburn-like cells” is regarded as an example of apoptosis (Young, 1987), revealing a new role of BNIP3 in keratinocyte maintenance. Furthermore, requirement of BNIP3 for protection from UV-induced apoptosis was confirmed in two-dimensional keratinocyte cultures (Figure 6e). The underlying mechanism of this prosurvival function of BNIP3 in keratinocytes remains unclear; however, previous reports have demonstrated that hypoxia-induced autophagy through BNIP3 is critical for the prosurvival process (Bellot *et al.*, 2009). Recently, it has been reported that UVA induces autophagy to remove oxidized phospholipids and protein aggregates in epidermal keratino-





**Figure 6. BNIP3 (BCL2 and adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3) promotes cell survival in the reconstituted epidermis and keratinocytes.** (a) Morphology of the human skin epidermal equivalents from human primary epidermal keratinocytes (HPEKs) infected with lentivirus expressing miR *neg*, miR *BNIP3\_1*, or miR *BNIP3\_2*. Arrowheads indicate sunburn-like cells. (b) The number of sunburn-like cells per mm was counted and plotted as the means of 10 sections  $\pm$  SD. (c–e) HPEKs were infected with adenovirus expressing miR *neg*, miR *BNIP3\_1*, or miR *BNIP3\_2*, and irradiated with UVB. (c) Cells were stained with anti-EGFP at 8 hours after UVB irradiation. (d) The percentage of EGFP-LC3-positive cells with more than five puncta were quantified and are presented as the mean of three independent experiments  $\pm$  SD. (e) Autophagy induction was determined by Cyto-ID staining and quantified by flow cytometry. The data represent the average of three independent experiments  $\pm$  SD. (f) Cells were subjected to western blot analysis at 8 hours after irradiation. The blot shown is representative image of three independent experiments. Graphs indicate relative band intensities as determined by ImageJ software and plotted as the means of three independent experiments. Scale bars = 20  $\mu$ m. \*\* $P$  < 0.01.

cytes (Zhao *et al.*, 2013). Because our data indicate that UVB-induced autophagy is mediated by BNIP3 (Figure 6c and d), it is possible that autophagy induced by BNIP3 also plays a role in the maintenance of keratinocytes. Further analysis is required to confirm these results.

UV-induced apoptotic cells appear within 12 hours and are predominately located in the suprabasal differentiated keratinocyte compartment of human skin (Gilchrest *et al.*, 1981). Moreover, differentiated keratinocytes appear to be most sensitive to the UV light that induces p53-dependent apoptosis (Tron *et al.*, 1998). Tron *et al.* (1998) demonstrated that differentiated keratinocytes in p53-null mice exhibited only a small increase in apoptosis after UVB irradiation compared with the increase observed in normal control animals (Tron *et al.*, 1998). Interestingly, because p53 has been reported to directly suppress BNIP3 expression (Feng *et al.*, 2011), BNIP3 might be abundantly upregulated in suprabasal cells in p53-null animals, resulting in the resistance to UVB-induced apoptosis. Indeed, our preliminary study

showed that p53 knockdown enhanced UV-induced BNIP3 expression in HPEKs (data not shown). Therefore, BNIP3 expression in suprabasal cells appears to be important for the protection of differentiated keratinocytes from normal environmental stress such as weak UV exposure *in vivo*.

A recent report on a role for autophagy in epidermal barrier formation and function was identified in *atg7*-deficient mice (Rossiter *et al.*, 2013). The authors showed that autophagy was constitutively active in the suprabasal epidermal layers as we report in this study (Figure 2). However, in contradiction to our results, the authors concluded that autophagy was not essential for the barrier function of the skin. This may be because of the presence of an alternative Atg5/Atg7-independent autophagic pathway (Nishida *et al.*, 2009) in the epidermis. This Atg5/Atg7-independent pathway is also independent of LC3, but forms Rab9-positive double-membrane vesicles. Moreover, protein degradation via this pathway is inhibited by 3-MA and is dependent on Beclin 1. Our data demonstrate that: (1) BNIP3 induced the formation of

EGFP-LC3 puncta (Figure 4) and (2) 3-MA significantly diminished the formation of GFP-LC3 puncta and keratinocyte differentiation induced by BNIP3 (Figure 5). These findings suggest that BNIP3 in the epidermis induced both conventional and Atg5/Atg7-independent autophagy. Intriguingly, GFP cleaved from GFP-LC3 also accumulates in the Atg7-deficient epidermis (Rossiter *et al.*, 2013), thereby demonstrating the existence of an alternative autophagic pathway (Juenemann and Reits, 2012) in the epidermis. Further investigation will be required to determine whether Beclin 1 and Rab9 are indispensable for the BNIP3-induced autophagy and subsequent differentiation of keratinocytes.

In summary, our data reveal that expression of BNIP3 in granular cells induces autophagy and is involved in the terminal differentiation and maintenance of skin epidermis. Studies on the involvement of autophagy in skin epidermis have attracted considerable attention recently. In addition, increasing evidence suggests the involvement of BNIP3 in the differentiation of several cell types, including oligodendrocytes (Itoh *et al.*, 2003), osteoclasts (Knowles and Athanasou, 2008), and chondrocytes (Zhao *et al.*, 2012); however, the precise role of BNIP3 in this process remains to be investigated. Our study thus provides new insights into the functions of BNIP3 in differentiation and homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Histology and immunofluorescent analysis

Samples and embryos were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in optimal cutting temperature compound, frozen, and sectioned at 10  $\mu$ m. Sections were then either subjected to hematoxylin and eosin staining or immunohistochemical analysis as previously described (Moriyama *et al.*, 2006). Details are described in Supplementary Materials Online.

### Cell culture

HPEKs were purchased from CELLnTEC (Bern, Switzerland) and maintained in CnT-57 (CELLnTEC) culture medium according to the manufacturer's protocol. For induction of differentiation, the medium was changed to CnT-02 (CELLnTEC) at confluent monolayers of HPEKs, followed by adding calcium ions to 1.8 mM. The generation of human skin equivalents was performed using CnT-02-3DP culture medium (CELLnTEC) according to the manufacturer's protocol.

### Design of artificial microRNAs and plasmid construction

Oligonucleotides targeting a human BNIP3 sequence compatible for use in cloning into BLOCK-iT Pol II miR RNAi expression vectors (Invitrogen, Carlsbad, CA) were obtained using the online tool BLOCK-iT RNAi Designer. The oligonucleotide sequences used in this study are shown in Supplementary Table S1 online. Cloning procedures were performed following the manufacturer's instructions.

### Adenovirus and lentivirus infection

Adenoviruses expressing EGFP, Hes1, BNIP3, and miR *BNIP3* were constructed using the ViraPower adenoviral expression system (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Lentivirus expressing EGFP-LC3 (from Addgene plasmid 21073, Cambridge, MA) and miR *BNIP3* plasmid was constructed and used to infect keratinocytes as previously described (Moriyama *et al.*, 2012; Moriyama *et al.*, 2013).

### RNA extraction, complementary DNA generation, and Q-PCR

Total RNA extraction, complementary DNA generation, and Q-PCR analyses were carried out as previously described (Moriyama *et al.*, 2012). Details of the primers used in these experiments are shown in Supplementary Table S2 online.

### Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described (Moriyama *et al.*, 2012; Moriyama *et al.*, 2013). Details are described in Supplementary Materials Online.

### ChIP assay

The ChIP assay was performed using the SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) according to the manufacturer's instructions. Hemagglutinin-tagged Hes1 was immunoprecipitated with rabbit polyclonal antibody against hemagglutinin tag (ab9110, Abcam, Cambridge, MA). Immunoprecipitated DNA was analyzed by Q-PCR. Relative quantification using a standard curve method was performed, and the occupancy level for a specific fragment was defined as the ratio of immunoprecipitated DNA over input DNA. Details of the primers used in these experiments are shown in Supplementary Table S2 online.

### Flow cytometry analysis

For autophagy detection, Cyto-ID Autophagy detection kit (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA) was used according to the manufacturer's instructions. Details are described in Supplementary Materials Online.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Shogo Nomura, Ayumi Kitagawa, and Riho Ishihama for technical support; Dr Takashi Ueno for helpful discussions; Dr Hiroyuki Miyoshi for the CSII-EF-RfA, pCMV-VSVG-RSV-Rev, and pCAG-HIVg/p plasmids; Dr Tamotsu Yoshimori for pEGFP-LC3 plasmid; and Dr Ryoichi Kageyama for *Hes1* KO mice. This work was supported by MEXT KAKENHI grant 23791304 to MM. This work was also supported in part by grants from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan and a grant from the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO).

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

### REFERENCES

- Aymard E, Barruche V, Naves T *et al.* (2011) Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? *Exp Dermatol* 20:263–8
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P *et al.* (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 29:2570–81
- Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA *et al.* (2006) Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev* 20:3022–35
- Chan LL, Shen D, Wilkinson AR *et al.* (2012) A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* 8:1371–82
- Chatterjea SM, Resing KA, Old W *et al.* (2011) Optimization of filaggrin expression and processing in cultured rat keratinocytes. *J Dermatol Sci* 61:51–9

- Diwan A, Krenz M, Syed FM *et al.* (2007) Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest* 117:2825–33
- Feng X, Liu X, Zhang W *et al.* (2011) p53 directly suppresses BNIP3 expression to protect against hypoxia-induced cell death. *EMBO J* 30:3397–415
- Gilchrest BA, Soter NA, Stoff JS *et al.* (1981) The human sunburn reaction: histologic and biochemical studies. *J Am Acad Dermatol* 5:411–22
- Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE *et al.* (2007) Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* 14:146–57
- Haruna K, Suga Y, Muramatsu S *et al.* (2008) Differentiation-specific expression and localization of an autophagosomal marker protein (LC3) in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 52:213–5
- Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y *et al.* (1994) Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J* 13:1799–805
- Itoh T, Itoh A, Pleasure D (2003) Bcl-2-related protein family gene expression during oligodendroglial differentiation. *J Neurochem* 85:1500–12
- Juenemann K, Reits EA (2012) Alternative macroautophagic pathways. *Int J Cell Biol* 2012:189794
- Kabeja Y, Mizushima N, Ueno T *et al.* (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19:5720–8
- Knowles HJ, Athanasou NA (2008) Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte-osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol* 215:56–66
- Lippens S, Denecker G, Ovaere P *et al.* (2005) Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* 12(Suppl 2):1497–508
- Mellor HR, Rouschop KM, Wigfield SM *et al.* (2010) Synchronised phosphorylation of BNIP3, Bcl-2 and Bcl-xL in response to microtubule-active drugs is JNK-independent and requires a mitotic kinase. *Biochem Pharmacol* 79:1562–72
- Mizushima N, Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12:823–30
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M *et al.* (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15:1101–11
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140:313–26
- Moriyama H, Moriyama M, Sawaragi K *et al.* (2013) Tightly regulated and homogeneous transgene expression in human adipose-derived mesenchymal stem cells by lentivirus with tet-off system. *PLoS One* 8:e66274
- Moriyama M, Durham AD, Moriyama H *et al.* (2008) Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell* 14:594–604
- Moriyama M, Moriyama H, Ueda A *et al.* (2012) Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. *BMC Cell Biol* 13:21
- Moriyama M, Osawa M, Mak SS *et al.* (2006) Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol* 173:333–9
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K *et al.* (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461:654–8
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G *et al.* (1999) Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18:2196–207
- Quinsay MN, Thomas RL, Lee Y *et al.* (2010) Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy* 6:855–62
- Rossiter H, Konig U, Barresi C *et al.* (2013) Epidermal keratinocytes form a functional skin barrier in the absence of Atg7 dependent autophagy. *J Dermatol Science* 71:67–75
- Sassone J, Colciago C, Marchi P *et al.* (2010) Mutant Huntingtin induces activation of the Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein (BNIP3). *Cell Death Dis* 1:e7
- Schweers RL, Zhang J, Randall MS *et al.* (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19500–5
- Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P *et al.* (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61:6669–73
- Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM (2009) Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase. *Cells Tissues Organs* 189:88–92
- Tron VA, Trotter MJ, Tang L *et al.* (1998) p53-regulated apoptosis is differentiation dependent in ultraviolet B-irradiated mouse keratinocytes. *Am J Pathol* 153:579–85
- Vengellur A, LaPres JJ (2004) The role of hypoxia inducible factor 1alpha in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts. *Toxicol Sci* 82:638–46
- Walls KC, Ghosh AP, Ballesta ME *et al.* (2009) bcl-2/Adenovirus E1B 19-kd interacting protein 3 (BNIP3) regulates hypoxia-induced neural precursor cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:1326–38
- Young AR (1987) The sunburn cell. *Photodermatology* 4:127–34
- Zhang J, Ney PA (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* 16:939–46
- Zhao Y, Chen G, Zhang W *et al.* (2012) Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1alpha/BNIP3 signaling pathway. *J Cell Physiol* 227:639–48
- Zhao Y, Zhang CF, Rossiter H *et al.* (2013) Autophagy is induced by UVA and promotes removal of oxidized phospholipids and protein aggregates in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 133:1629–37

# **Role of Notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions**

Hiroyuki Moriyama<sup>1,\*</sup>, Mariko Moriyama<sup>1,\*</sup>, Haruki Isshi<sup>1</sup>, Shin Ishihara<sup>1</sup>, Hanayuki Okura<sup>2</sup>, Akihiro Ichinose<sup>3</sup>, Toshiyuki Ozawa<sup>4</sup>, Akifumi Matsuyama<sup>2</sup> and Takao Hayakawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University, Higashi-Osaka, Osaka, Japan.

<sup>2</sup> Platform of therapeutics for Rare Disease and Health Policy, National Institute of Biomedical Innovation, Kobe, Hyogo, Japan.

<sup>3</sup> Department of Plastic Surgery, Kobe University Hospital, Kobe, Hyogo, Japan.

<sup>4</sup> Department of Dermatology, Osaka City University, Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.

\*These two authors contributed equally to this work.

Running title: MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIA

Address correspondence to:

Dr. Hiroyuki Moriyama

Pharmaceutical Research and Technology Institute

Kinki University

3-4-1 Kowakae

Higashi-Osaka

Osaka 577-8502

Japan

Tel&Fax: +81-6-4307-4312

Email: moriyama@phar.kindai.ac.jp