

大霊長類研究所の明里教授の協力のもと、健康診断時採取された余剰血液を用いる。

2. SeV ベクターを使った ciPS 細胞の樹立

SeV ベクターによって患者由来線維芽細胞へ初期因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を一過性に発現させ ciPS 細胞の樹立を行う。

樹立した ciPS 細胞については、1)アルカリフォスファターゼ染色 2)Nanog, Oct3/4, SSEA-4, TRA-1-60の免疫染色による iPS 細胞の確認を行う。さらに、未分化マーカーの発現を PCR にて確認する。これらで ciPS 細胞に矛盾ないデータが得られたら、染色体検査を行い、正常核型であること、またチンパンジー由来であることを確認する。加えて、T リンパ球受容体の遺伝子の再構成をサザンブロット法にて確認し ciPS 細胞がチンパンジーの T リンパ球由来であることを確認する。

3. 樹立した ciPS 細胞の多分化能の確認

樹立した ciPS 細胞を、試験管内にて、神経外胚葉様細胞、中胚葉様細胞、内胚葉様細胞への分化を誘導する。また免疫不全マウス(NOD-Scid)へ移植し奇形種を形成させ、多分化能を調べる。

4. 樹立した ciPS 細胞への遺伝子導入

樹立した ciPS 細胞へ HHD (ヒト MHC の $\beta 2m$ 及び HLA-A2.1 の $\alpha 1 \cdot \alpha 2$ と、マウス MHC H2-D^b の $\alpha 3$ domain を融合した遺伝子)を導入。導入後ハイグロマイシンによるセレクションを開始。使う薬剤の濃度決定を行うために様々な濃度で iPS 細胞の維持培養を行う。

5. 樹立した iPS 細胞のナীব化

ヒトおよび ciPS 細胞から *in vivo* にて効率よく様々な組織を構築するには、これらの iPS 細胞をよりマウス ES 細胞の状態に近づけることが必要である。この作業をナীব化と呼ぶ。平成 25 年度に発表された方法(Nature, 504: 282-286, 2013)を用いてナীব化を行う。

(倫理面への配慮)

1) 倫理審査等

血液細胞からヒト由来 iPS 細胞作製とその解析については倫理委員会ですでに承認済みである。ヒト血液細胞の採取は同意のもと健康人ボランティア 1 名から行う。一般診療に用いられる方法で上腕より 10ml へパリン加採血を行う。したがって危険はない。iPS 細胞作製にあたり、チンパ

ンジーからのサンプルは、愛知県犬山市にある京都大学霊長類研究所に飼育中のチンパンジーから、健康診断で行う採血の余剰血を用いる。研究所内での共同研究申請を行い承認のもと行っている。

2) 人権擁護上の配慮

本研究は、個人ゲノムそのものの情報を得るわけではない。また、研究の成果を学術雑誌に投稿することや、学会等で発表する場合、個人が特定される個人情報は公表されることはない。血液細胞、作製した iPS 細胞は所属機関において施設できる研究室にて管理し、一般の人々やこの研究に関係ない他の研究者の目に触れることはない。したがって、iPS 細胞から個人の特定の情報につながることはない。また、ヒト iPS 細胞から個体を作製すること、ヒト胚への導入、ヒト胎児への導入、生殖細胞の作製は、行わない。

3) 不利益・危険性の排除や説明と同意

サンプル採取には、研究目的・予想される成果、患者情報の保護、予想される不利益等を同意書に記述している内容に準じて、担当医からの十分な説明の後(必要であれば代表申請者も同席して)、同意(インフォームド・コンセント)を得て行う。

本研究による成果が知的財産権の対象になる場合もあるが、提供者に権利が帰属したり、利潤を得ることはない。サンプル提供者にご負担していただく必要経費はなく、また、サンプル提供による謝金・交通費の支給もない。研究にかかる費用については、研究費から支出する。

C.研究結果

1. iPS 細胞樹立のためのチンパンジー血液の採取とリンパ球刺激

血液は、研究協力者の京都大霊長類研究所の明里教授の協力のもとチンパンジー 2 個体から健康診断時に採血した。フィコールを用いて分離した単核球をヒトと同様に IL-2 と抗 CD3 抗体にて刺激し、活性化した T リンパ球を後の iPS 細胞誘導に用いた。

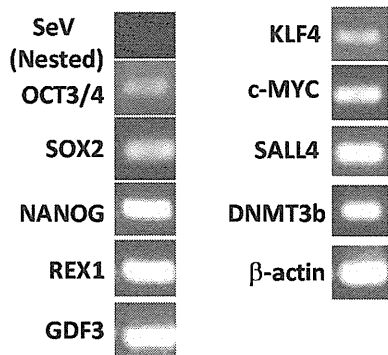
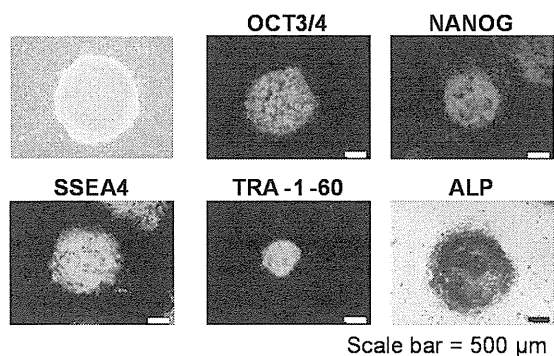
2. チンパンジーの血液細胞由来 ciPS 細胞の樹立

チンパンジーから末梢血液を採取し上述した作業に従い刺激した T リンパ球より、ciPS 細胞誘導を行った。iPS 細胞作製には初期化因子(Oct3/4,

Sox2, KLF4, c-Myc)を持つ非組込型センダイ・ウイルスベクター(SeV)を用いた。このベクターは染色体に組み込まれることなく、細胞質内で遺伝子を発現することができる。チンパンジーのTリンパ球株にてセンダイウイルスが感染することは確認済である。しかし、残念なことに、1個体目ではコロニーがほとんどなく、1クローンのみ樹立できた。原因は、抗CD3抗体での刺激が強すぎて細胞状態が悪化したためと考えられた。別の刺激方法にてiPS細胞誘導が可能か、まずヒト血液細胞を用いてPHAとConA刺激を行ったところ、これまでと同様の効率でiPS細胞コロニーを樹立することができた。そこで、チンパンジー2個体目では1) ConA刺激に変更2) FGF2の濃度を30ng/mlへ変更(他のサルでの樹立に高濃度を使っていたため)3) ウイルスの力価をMOI:10からMOI:30へ上昇等の変更を行った。その結果、多くのiPS細胞コロニーを認めた。平成25年度はこの方法にて、さらに3クローンのiPS細胞を得た。これで合計単離したiPS細胞コロニーを増幅し、SeVウイルス除去と未分化マーカーの発現を免疫染色、RT-PCRで調べ、その発現を確認した(図1)。

次に平成25年度に新たに作製したiPS細胞がチンパンジー由来の細胞であることをヒトとチン

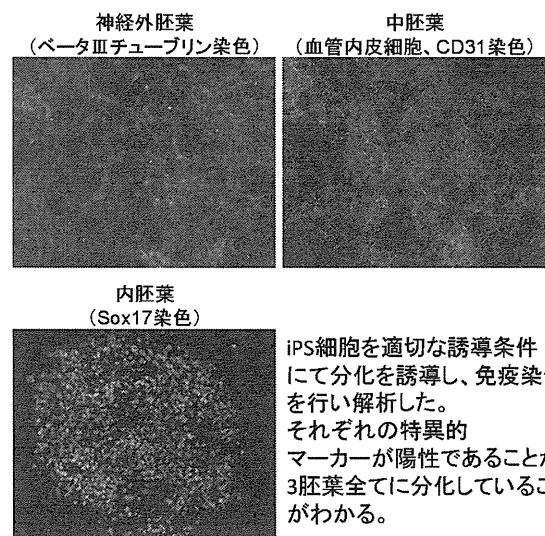
図1 新たに樹立したチンパンジー由来iPS細胞



パンジーで長さに違いある遺伝子をPCRにて増幅することで確認した。加えて、染色体検査にて正常核型であること、チンパンジーであることを確認した。また、Tリンパ球由来のiPS細胞であることを、iPS細胞のTリンパ球受容体遺伝子再構成の有無を調べ、確認した。

多分化能を見るために、試験管内分化誘導と奇形腫形成を行った。平成24,25年度に作製したiPS細胞はすべて試験管内で神経外胚葉、中胚葉、内胚葉系列の細胞へと適切な誘導条件下にて分化した(図2)。

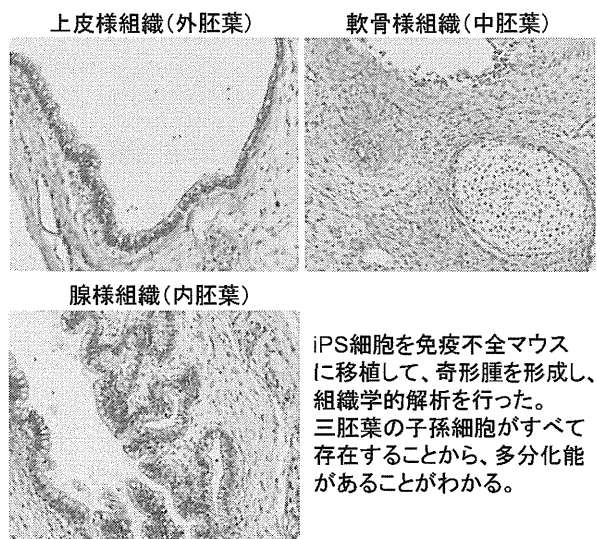
図2 iPS細胞の試験管内分化誘導



iPS細胞を適切な誘導条件にて分化を誘導し、免疫染色を行い解析した。それぞれの特異的マーカーが陽性であることから3胚葉全てに分化していることがわかる。

また免疫不全マウスの精巣へ移植して作製した奇形腫解析でも、外胚葉、中胚葉、内胚葉系列の細胞への分化能力を持つことを確認した(図3)。次に、樹立したチンパンジーiPS細胞へヒトHHD

図3 奇形腫解析による多分化能の証明



iPS細胞を免疫不全マウスに移植して、奇形腫を形成し、組織学的解析を行った。三胚葉の子孫細胞がすべて存在することから、多分化能があることがわかる。

遺伝子を導入するにあたり、使うハイグロマイシンによる薬剤の濃度決定を行った。その結果、1 μ g/ml以上の濃度ではiPS細胞が生存できないことがわかった。様々な現在導入方法の検討を行いどの方法が有効かを検討中である。

ヒトおよびチンパンジーのiPS細胞から生体内にて効率よく様々な組織を構築する、すなわちキメラ効率を上げるためには、これらのiPS細胞をよりマウスES細胞の状態に近づける、いわゆるナイーブ化が必要である。現在平成25年度に発表された方法(Nature, 504:282-286, 2013)を行っているが、今のところ成功していない。引き続き行うと同時に他の方法についても検討を随時行っていく。

D. 考察

チンパンジー2 個体より末梢血液を採取し、Tリンパ球を刺激後、iPS細胞樹立を行った。平成24年度に確立したConAを用いる方法に切り替えてリンパ球刺激を行うことで新たに2ラインの樹立に成功した。これらのiPS細胞を試験管内にて分化誘導を行い三胚葉系列の細胞へと誘導することができた。この時に用いた方法はヒトで使われている方法であり、用いたマーカーの抗体もヒト分子を認識するものであるが、チンパンジーにもうまく反応させることができた。抗体の認識するエピトープがヒトとチンパンジーで類似しているためと考えられる。本研究では、末梢血液細胞よりiPS細胞の樹立に成功したが、このように皮膚生検が難しい動物からのiPS細胞樹立には容易に行える血液からのiPS細胞誘導は有効である。

E. 結論

新たにチンパンジーの末梢Tリンパ球から2ラ

インiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞は形態的にも、また、未分化マーカーの発現でもiPS細胞に矛盾することがなかった。Tリンパ球受容体遺伝子サザンブロット解析からこのiPS細胞はTリンパ球由来であり、染色体検査あるいは遺伝子解析よりチンパンジー細胞由来であることが確認された。したがって、チンパンジー由来のiPS細胞が樹立されたと言える。さらに、試験管内での分化誘導、免疫不全マウスに移植し形成した奇形腫解析から作製したiPS細胞は多分化能を持つことが証明された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表
特になし
2. 学会発表
 1. 江良択実 難治性疾患由来iPS細胞の樹立、解析とそのバンク化 第130回熊本小児科学会2013年6月16日 熊本
 2. 江良択実 iPS細胞と再生医療 第14回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 2013年9月28日 東京

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

厚生労働科学研究費補助金(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
(分担)研究報告書

肝炎発症メカニズムの解析

研究分担者 佐々木 裕 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 教授
研究協力者 渡邊 丈久 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 助教
研究協力者 直江 秀昭 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 助教

研究要旨

B型肝炎ウイルス(HBV)はヒトとチンパンジーにしか感染せず、慢性化のメカニズムや治療法の開発が困難であった。また HBV 既感染患者は免疫抑制時に肝炎を発症することがあり(*de novo*肝炎)、近年その病態が注目されている。本研究では HBV が感染し、かつ免疫応答により肝炎が発症するキメラマウスモデルを確立し、B型肝炎ウイルス(HBV)の慢性化や*de novo*肝炎発症のメカニズム、治療法の開発に貢献する。キメラマウスを用いた HBV 感染による肝炎発症実験においては B型肝炎ウイルス抗原、抗体などの各種血清学的検査、および炎症マーカーを利用して感染の成立および肝炎の発症を判定する必要があるが、それらの測定法を確立した。

A. 研究目的

B型肝炎は肝炎、肝癌の主要な原因の1つであるが、HBV感染の慢性化のメカニズムなど、その病態は未だに解明されない部分が多い。なかでも HBV 既感染患者に免疫抑制時に肝炎を発症する*de novo*肝炎については研究が進んでいない。解析に必要な実験動物が不在であったことがその理由の一つである。*de novo*肝炎は、B型急性肝炎治療後に肝細胞内に存在する HBV-covalently closed circular DNA(cccDNA)がその原因と考えられている。

HBVの肝細胞内の生活環では HBV粒子は感染後に不完全2重鎖である HBV-Relaxed circular DNA(rcDNA)から完全2重鎖の HBV-cccDNAに変換される。そこからウイルス粒子の構成蛋白質をコードする mRNA が

転写され、逆転写により複製された HBV-rcDNAとともに HBウイルス粒子を形成する。この HBV-cccDNAからの転写活性が低ければ肝炎は顕在化しないと考えられる。免疫抑制状態では HBV-cccDNAからの転写が活性化することにより肝炎が再燃し、*de novo*肝炎を生じると考えられている。しかし免疫抑制により HBV-cccDNAの再活性化がメカニズムは解明されていない。

また活動性の B型慢性肝炎においては HBV-RNAから HBV-rcDNAへの逆転写を抑える核酸アナログが治療に用いられているが、投与により血清中の HBV-DNAが測定感度以下になっても核酸アナログの投与中止により血清 HBV-DNAが再検出される。これは HBV-cccDNAからの転写活性が高いことを示しており、この点からも HBV-cccDNAには転

写活性が高い状態とほとんどない状態の少なくとも 2 つ以上の状態が存在することが示唆され、エピジェネティクスの関与が考えられる。

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現の調節を行う仕組みである。DNA メチル化やヒストン修飾、およびクロマチン高次構造の変化によりゲノムからの転写活性は調節されている。その中で CTCF はクロマチン高次構造を制御する key 分子とされ、様々な生命現象に関与することがわかっている。私達は肝炎肝癌誘導遺伝子の制御に CTCF が関与していることを報告した(渡邊ら、2012)。CTCF は宿主側の蛋白質であるが、ウイルス感染に関与することが近年報告され、その病態が注目されており、HBV においてもその生活環に CTCF が関与する可能性がある。また HBV-cccDNA は肝細胞核内でスーパーコイル状の高次構造を呈しており、その転写活性の調節に HBV ゲノムの高次構造が関与している可能性が示唆される。

本研究では HBV 感染可能で免疫応答が正常な感染モデルマウス(ヒト/チンパンジー肝臓置換マウス)を作成し、病態解析と治療法確立の画期的なツールを開発することを目的とする。その中で私達の担当は、作成されたキメラマウスへの HBV 感染実験系を確立すること、並びに HBV-cccDNA の解析を中心とした肝炎発症メカニズムの解析を行うことである。

B. 研究方法

平成 24 年度、25 年度は(1)報告例を基に、作成されたキメラマウスに肝炎ウイルスを感染させるために必要な条件を具体的

に検討し、(2)キメラマウス完成後に HBV 解析に必要な実験系を確立する方針とした。さらに(3)HBV-cccDNA の制御メカニズムに関与すると思われるエピジェネティクス関連因子についての解析を行った。

C. 研究成果

(1)マウスへの HBV 感染条件を文献的に考察した。茶山らは HBV 感染患者の血清を 5 μ L 尾静脈より静注することによりマウスへの感染をなし得たと報告している(Hepatology, 2005)。該当患者の血液中の HBV-DNA 量と併せて考察すると $1 \times 10^5 \sim 10^6$ copy の投与で感染が成立しうると考えられた。

(2)本研究課題のキメラマウスを用いた HBV 感染による肝炎発症実験においては B 型肝炎ウイルス抗原、抗体などの各種血清学的検査、および炎症マーカーを利用して感染の成立および肝炎の発症を判定する。各々の発現は安定して定量可能になった。

(3)HBV-cccDNA からのウイルス RNA 転写の調節にはエピジェネティックな調節機構が働いている可能性がある。NCBI に記載されている HBV-DNA のゲノム配列を用いて、既知のエピジェネティック関連因子について *in silico* 解析を行った。その結果 HBV-DNA 内にはいくつかの肝特異的な転写因子の結合配列の他にエピジェネティックな調節機構の key 分子の一つである CTCF の結合が予想される配列が存在することを見出した。このことから HBV-cccDNA からの転写活性の制御に CTCF が関与していることが示唆された。さらに翻訳後修飾による CTCF の機能の変化が関与する可能性が考えられたため、蛋白 2 次元電気泳動法を用い

た翻訳後修飾の網羅的解析が可能な環境を整えた。実際 CTCF には複数の翻訳後修飾が関与しており、肝炎モデルマウス完成後すぐに HBV-cccDNA と CTCF の相互作用の解析が可能な状況である。さらに現在、CTCF 以外のエピジェネティクス因子が関連していないか解析するため、エピゲノム情報を保ったまま HBV-cccDNA を単離、解析する方法を検討中である。

D. 考察

(1) マウス完成後に実際に行うためのタイトレーションは必要であるが、目安となる数値は得られた。実際にマウスに投与する際には、患者プロファイルおよびゲノム情報の解析が進んでいる HBV 株より精製したウイルスを用いる。

(2) 血清学的検査は臨床検体で実際に行い既に診療に用いており、キメラマウスへの感染の判定は問題なく可能である。

(3) 同定した HBV ゲノム内の CTCF 結合配列に実際に CTCF が結合するか、ゲルシフトアッセイ (EMSA) 法、およびクロマチン免疫沈降 ChIP 法を用いて実際に HBV 内のゲノム配列と CTCF が結合するか、CTCF の翻訳

後修飾の影響があるか、などエピゲノム解析の体制を整えている。さらに HBV-DNA と宿主ゲノムとの相互作用および HBV-DNA が宿主 DNA に integrate されることによる宿主ゲノムの高次構造の変化についても解析を行う予定である。

E. 結論

肝炎発症実験において必要なB型肝炎ウイルス抗原、抗体などの各種血清学的検査、および炎症マーカー等の検出系を確立した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

書籍

なし

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
Iwashita H., <u>Shiraki N.</u> , Sakano D., Shiga M., Sasamoto K, Kume K., and Kume S.	Secreted Cerberus1 as a marker for quantification of definitive endoderm differentiation of pluripotent stem cells.	PLoS ONE	8	e64291	2013
山添太士・ <u>白木伸明</u> ・佐々木裕・ 糸 昭苑.	肝臓の再生医療	日本医師 会雑誌	142	791-795	2013
Sakano, D., <u>Shiraki, N.</u> , Kikawa, K., Yamazoe, T., Kataoka, M., Umeda, K., <u>Araki,</u> <u>K.</u> , Mao, D., Matsumoto, S., Nakagata, N., Andersson, O.,	VMAT2 identified as a regulator of late-stage beta cell differentiation.	Nat. Chem. Biol.	10	141-148	2014

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Secreted Cerberus1 as a Marker for Quantification of Definitive Endoderm Differentiation of the Pluripotent Stem Cells

Hidefumi Iwashita^{3,9}, Nobuaki Shiraki^{1,9}, Daisuke Sakano¹, Takashi Ikegami³, Masanobu Shiga³, Kazuhiko Kume¹, Shoen Kume^{1,2*}

1 Department of Stem Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, **2** The Global COE, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, **3** Dojindo Laboratories, Kumamoto Techno Research Park, Kumamoto, Japan

Abstract

To date, CXCR4 and E-cadherin double-positive cells detected by flow cytometry have been used to identify the differentiation of embryonic stem (ES) cells or induced pluripotent stem (iPS) cells into definitive endoderm (DE) lineages. Quantification of DE differentiation from ES/iPS cells by using flow cytometry is a multi-step procedure including dissociation of the cells, antibody reaction, and flow cytometry analysis. To establish a quick assay method for quantification of ES/iPS cell differentiation into the DE without dissociating the cells, we examined whether secreted Cerberus1 (Cer1) protein could be used as a marker. Cer1 is a secreted protein expressed first in the anterior visceral endoderm and then in the DE. The amount of Cer1 secreted correlated with the proportion of CXCR4+/E-Cadherin+ cells that differentiated from mouse ES cells. In addition, we found that human iPS cell-derived DE also expressed the secreted CER1 and that the expression level correlated with the proportion of SOX17+/FOXA2+ cells present. Taken together, these results show that Cer1 (or CER1) serves as a good marker for quantification of DE differentiation of mouse and human ES/iPS cells.

Citation: Iwashita H, Shiraki N, Sakano D, Ikegami T, Shiga M, et al. (2013) Secreted Cerberus1 as a Marker for Quantification of Definitive Endoderm Differentiation of the Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* 8(5): e64291. doi:10.1371/journal.pone.0064291

Editor: Jennifer Nichols, Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, United Kingdom

Received: December 28, 2012; **Accepted:** April 11, 2013; **Published:** May 22, 2013

Copyright: © 2013 Iwashita et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a Grant-in-Aid (#21390280 to SK and NEXT program from JST to SK), National Institute of Biomedical Innovation (to NS), and, in part, by a Global COE grant (Cell Fate Regulation Research and Education Unit). SK received funding from the Dojindo Laboratories. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Three of the authors are employees and are affiliated to the commercial funders of this research (Dojindo Laboratories). The ELISA kit described in this manuscript will be sold as a product by Dojindo Laboratories. There are no consultancy, patents associated with this manuscript. However, these do not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: skume@kumamoto-u.ac.jp

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Embryonic stem (ES) cells are derived from a pluripotent inner cell mass, which can be cultured indefinitely in an undifferentiated state and can be differentiated into most cell types in an organism. Therefore, ES cells have been proposed as a source of surrogate cells for use in regenerative medicine.

The definitive endoderm (DE) gives rise to the gastrointestinal organs, such as stomach, pancreas, liver, and intestine. The gastrointestinal organs are of great importance in their therapeutic aspects. Studies of ES cells have demonstrated that ES cell differentiation recapitulates early signaling events of differentiation into the 3 germ layers. Recent progress has identified several germ layer-specific markers of the early DE. Sox17 (Sry-box-containing gene 17), which encodes an endodermal HMG (high mobility group)-box transcription factor, is a DE-specific marker [1]. CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4), which is expressed in the mesoderm, is also expressed in the DE and is widely used in combination with E-cadherin for the prospective isolation of embryonic or ES cell-derived DE cells [2]. Our group previously identified DAF1 (decay accelerating factor)/CD55 as a novel DE marker [3]. Yasunaga et al., reported the use of the Sox17 promoter to drive the expression of the surface antigen-GFP (green

fluorescent protein) fusion protein, which genetically marked the DE with GFP.

Cerberus1 (Cer1; also known as Cerberus like 1 [Cerl1] or Cerberus related gene [Cerr1]) is a secreted protein, which belongs to the cysteine knot superfamily and includes TGF (transforming growth factor) β s and BMPs (bone morphogenetic proteins). Cer1 is first expressed in the anterior visceral endoderm at E6.5 and at E7.0 in the distal visceral endoderm and the definitive endoderm, which emanates from the anterior portion of the primitive streak. Cer1 is expressed in the anterior DE at E7.5 and is expressed in the foregut at the headfold stage. Later, Cer1 is expressed in a limited region in the somatic mesoderm, the pre-somitic mesoderm, and the presumptive foregut endoderm. Cer1 belongs to the Cer/Dan gene family, which contains the secreted antagonists of Nodal, Wnt, or BMP signaling pathways, and plays an important role in regulating these signals [4] [5][6] [7][8] [9].

We previously established a procedure to induce ES cells to sequentially differentiate into the mesendoderm, DE, and, finally, regional specific definitive endodermal tissues *in vitro* in a manner that mimics early embryonic inductive events *in vivo* by culturing ES cells on a monolayer of M15 cells [10] [11]. This M15 monolayer culture procedure turned out to be useful not only in

directing DE lineages, but also in directing the ES cells to the ectoderm and mesoderm lineages upon altering the culture conditions [12]. We performed gene array analysis of the ES cell-derived lineage-specific progenitors and demonstrated that genes enriched in each cell population are expressed in the normal embryos in a coordinated temporal-spatial fashion [3] [13]. Murine *Cerberus 1* (*Cer1*) is one of the genes that was up-regulated greater than 5-fold in both E-Cadherin+/CXCR4+ DE- and E-Cadherin+/DAF1+ DE-derived from ES cells. Its expression persisted in the DE in early embryos and, therefore, might serve as a good marker for detecting differentiation to DE. Here, to enable quick identification and quantification of the DE in whole ES cell cultures, we established ELISA systems to measure the amount of the secreted protein of mouse *Cer1* and human *CER1*.

Materials and Methods

Cell Lines

The ES cell line, SK7 [10], containing a *Pdx1* promoter-driven GFP reporter transgene, was cultured and differentiated as

previously described [11] [12]. A mouse iPS cell line (20D17) [14] and a mouse ES cell line (EB3) [15] were also used for endoderm differentiation. The mesonephric cell line M15 [16] was kindly provided by Dr. T. Noce (Mitsubishi Kagaku Institute of Life Science, Tokyo, Japan) and Dr. M. Rassoulzadegan (University of Nice-Sophia Antipolis, Antipolis, France) and is available from the European Collection of Cell Cultures (ECACC 95102517). M15 cells were treated with mitomycin C (Sigma) and were used as previously described [10] [11][12]. Use of the human ES cells was approved by the Kumamoto University Institutional Review Board and followed the hES cell guidelines of the Japanese government. Undifferentiated human ES cells (khES3) [17] and iPS cells (201B7 and 253G1) [18] were maintained as described [11].

Differentiation of ES and iPS Cells

For definitive endoderm (DE) differentiation, mouse ES/iPS cells were cultured on M15 cells with added recombinant human activin-A at 10 ng/ml (R&D Systems, Inc) and/or human bFGF at 5 ng/ml (Peprotech) for 3–7 d, as indicated. They were

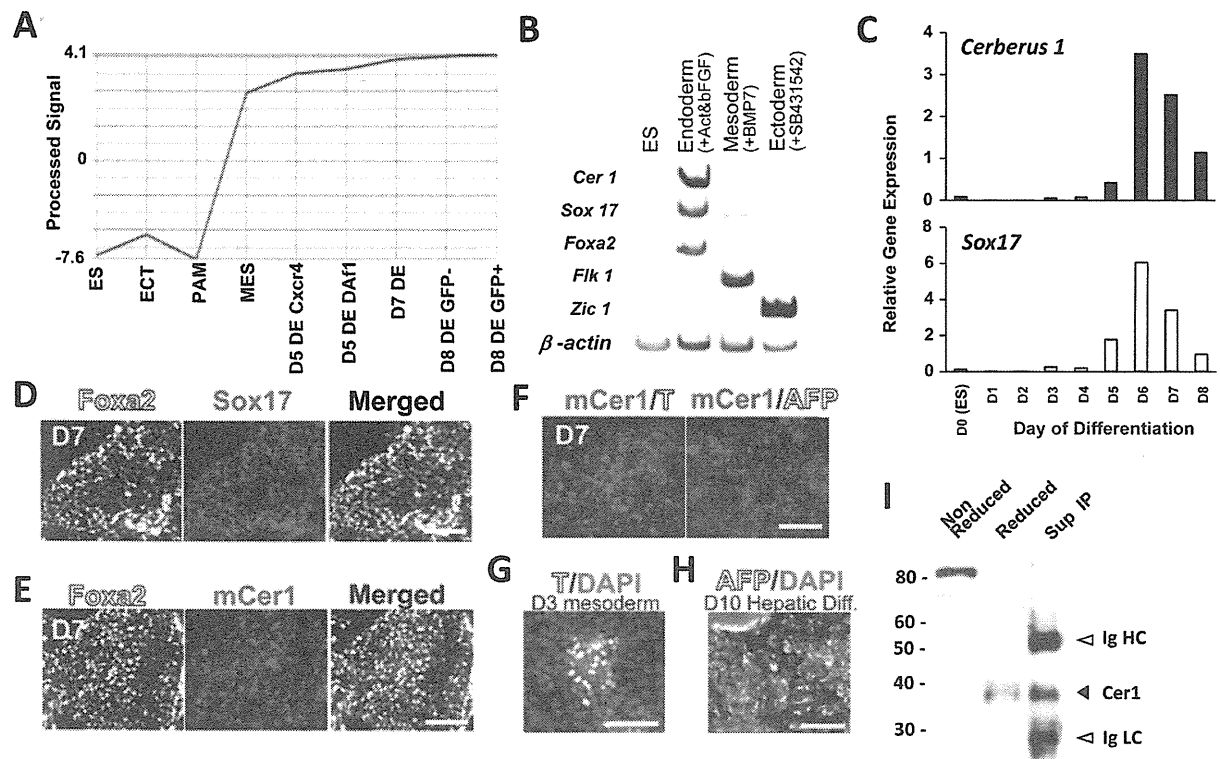


Figure 1. Murine *Cerberus 1* is a secreted protein expressed in the mouse ES cell-derived definitive endoderm. (A) *Cer1* is up-regulated in the definitive endoderm (DE) population and assayed by expression profiling analysis. Y axis: *Cer1* expression level; X axis: different germ layer cells and populations on different differentiation days (D) derived from ES cells. ES cells were differentiated into the 3 germ layers under different conditions [12] [25]. ES cell-derived differentiated cells of the ectoderm (ECT) (SSEA1–/Flk1–/PGFR α –), mesoderm (MES) (E-cadherin+/PDGFR α +), paraxial mesoderm (PAM) (E-cadherin–/PDGFR α +/Flk1–), and DE (E-cadherin+/CXCR4+ populations: D5 DE Cxcr4, D7 DE; and E-cadherin+/Daf1+ populations: D5 DE Daf1 [3] at D5 and D7) were prospectively isolated by the expression of specific cell surface antigens using flow cytometry. DE cells at D8 were further subdivided into *Pdx1*/GFP-negative and -positive populations (D8 DE GFP- and GFP+). (B) Semiquantitative RT-PCR of *Cer1*, *Sox17*, *Foxa2*, *Flk1*, and *Zic1* in ES cell-derived differentiated cells treated with activin A 10 ng/ml and bFGF 5 ng/ml, BMP 7 25 ng/ml, or SB432542 10 μ M. (C) Time-dependent expression of *Cer1* and *Sox17* detected by real-time PCR. (D, E, F) Immunocytochemical analysis. At D7, almost all *Foxa2*+ cells are co-stained for *Sox17* (E) *Cer1* is expressed in the *Foxa2*+ cells (F) *Cer1* positive cells do not express T or AFP at D7. (G) T is expressed in mouse ES derived mesoderm cells. (H) AFP is expressed mouse ES derived hepatic cells (I) Western blot analysis for *Cer1* with non-reduced/reduced whole cell extract of differentiated ES cells and immunoprecipitation of the supernatant (Sup IP). Scale bar = 100 μ M.
doi:10.1371/journal.pone.0064291.g001

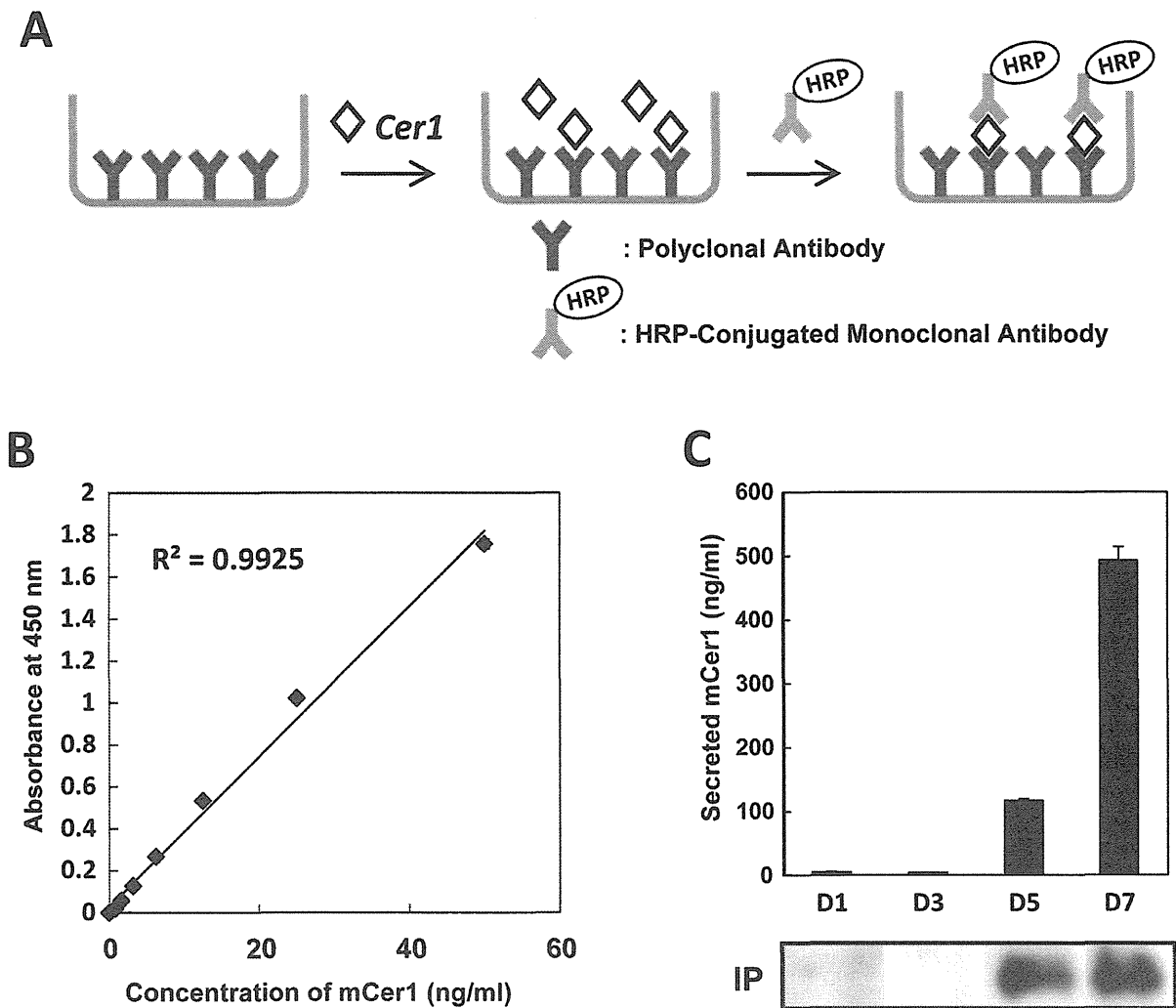


Figure 2. Establishment of an ELISA system for quantification of the secreted mouse Cer1 protein. (A) Schematic drawing of the ELISA system. (B) Standard curve using purified Cer1. (C) ELISA assays for the secreted Cer1 protein at differentiation days (D) 1, D3, D5, or D7. The supernatant was sampled 48 h (lower panel) after replacement with fresh media. Time-dependent expressions of Cer1 in the supernatant, detected by immunoprecipitation, are also shown (bottom panels). doi:10.1371/journal.pone.0064291.g002

subsequently analyzed using flow cytometry to assay for DE or Cer1 expression [10]. Human ES/iPS cells were cultured on a fibronectin- (Sigma) coated plate in RPMI-1640 (Invitrogen) supplemented with activin-A (100 ng/ml) and a B27 supplement without insulin (2%; Invitrogen) for 6 d [11] [19]. For re-plating of the DE cells, the cells were first dissociated with 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen) and then plated with a 10% FBS medium at concentrations of 0.25×10^5 , 0.5×10^5 , or 1.0×10^5 cells/well on a matrigel (BD) pre-coated 96-well plate. For neuroectoderm differentiation, ES cells were cultured on M15 cells in a differentiation medium supplemented with 10 μ M SB431542 (a TGF β inhibitor) (Calbiochem, San Diego) [12]. For mesoderm differentiation, mouse ES cells were cultured on M15 cells in a differentiation medium supplemented with 25 ng/ml BMP7 (R&D Systems, Inc.) [12]. Human iPS cells were grown using Stemline II serum-free medium (Sigma) supplemented with 50 ng/mL BMP4 (Peprotech) and ITS (Invitrogen) [20]. For hepatic differentiation

of mouse ES cells and human iPS cells, differentiation were done as described [11] [21].

Real-time and Semiquantitative Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Analysis

RNA was extracted from ES cells using the TRI Reagent (Sigma) or RNeasy micro-kit (Qiagen) and then treated with DNase (Sigma). Three micrograms of RNA was reverse-transcribed using MMLV reverse transcriptase (Toyobo) and oligo-dT primers (Toyobo). The primer sequences were as follows: *Cer1* forward 5'-GTCCAGGCTTGAAGATTC-3' and reverse 5'-AGGGCACAGTCCTGCAGGTC-3'; *Sox17* forward 5'-GAA-CAGTTGA- GGGGCTACAC-3' and reverse 5'-GTTTAGGGTTTCTTAGATGC-3'; *Foxa2* forward 5'-TGGTCACTGGGGACAAGGGAA-3' and reverse 5'-GCAA-CAACAGCAATAGAG- AAC-3'; *Flkl* forward 5'-CACCTGG-

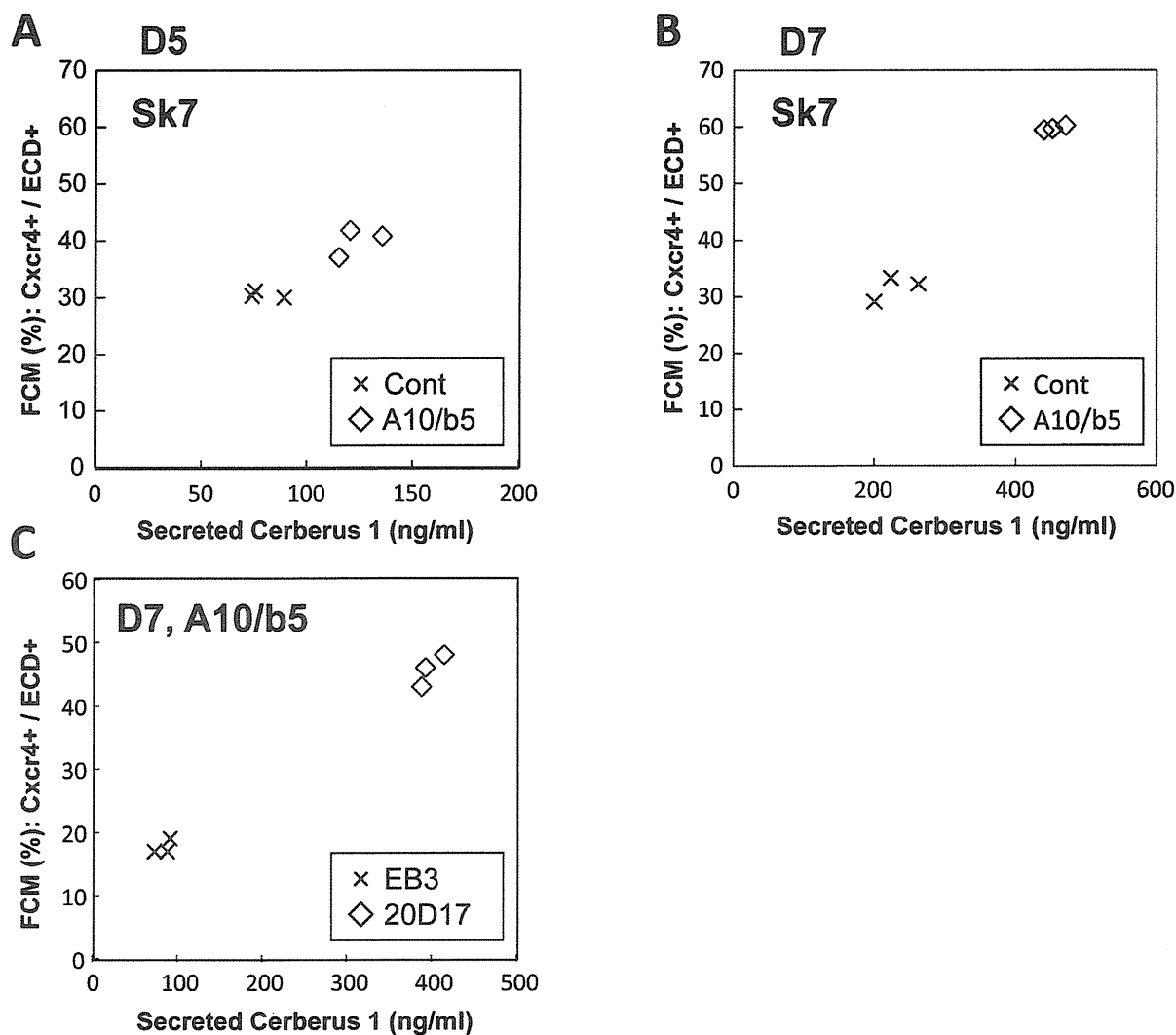


Figure 3. The amount of secreted Cer1 correlated with the proportion of DE differentiation of mouse ES/iPS cells. (A, B) The proportion of DE cells assayed by flow cytometry correlated with the amount of the Cer1 protein secretions assayed on day (D) 5 (A) or D7 (B) of differentiation using the SK7 ES cell line. Different growth factors were added for obtaining different degrees of definitive endoderm (DE) differentiation. A10, Activin 10 ng/ml; b5, bFGF 5 ng/ml; control (Cont), no growth factors. (C) The proportion of DE assayed by flow cytometry correlated with the level of the secreted mouse Cer1 assayed on D7 of differentiation added with activin and bFGF using the EB3 ES and 20D17 iPS cell lines.

doi:10.1371/journal.pone.0064291.g003

CACTCTCCACCTTC-3' and reverse 5'-GATTTTCATCC-CACTACCGAAAAG-3'; *Zic1* forward 5'-TCGTGTCTCCCA-CAAC-AGAC-3' and reverse 5'-GGGGTGTCTCGAGTTCAGG-3'; Human *GAPDH* forward 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3' and reverse 5'-CATGAGTCCTTCCACGATACC-AA-3'; Human *SOX17* forward 5'-ACTGCAACTATCCTGACGTG-3' and reverse 5'-AGGAAATGGAGGAAGCTGTT-3'; and Human *CER1* forward 5'-ACAGTGCCCTTCA-GCCAGACT-3' and reverse 5'-ACAACACTACTTTTTTACAGCCTTCGT-3'.

The PCR conditions for each cycle were: (1) denaturation at 96°C for 30 s, (2) annealing at 60°C for 2 s, and (3) extension at 72°C for 45 s. RT-PCR products were separated using 5% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, stained with SYBR

Green I (Molecular Probes), and visualized using a Gel Logic 200 Imaging System (Kodak).

Immunocytochemical Analysis

Differentiated ES cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at room temperature, permeabilized with 0.1% Triton-X100 (Nacalai Tesque) in PBS, blocked with 20% Blocking One (Nacalai Tesque), and then incubated with a diluted antibody in 20% Blocking One in PBST (0.1% Tween-20 in PBS) for 16 h at 4°C. After washing with PBST, cells were incubated with a secondary antibody and 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Roche Diagnostics) in PBST for 2 h. The following antibodies were used as primary antibodies: rabbit anti-AFP (A0008, Dako), rat anti-mouse Cer1 (MAB1986,

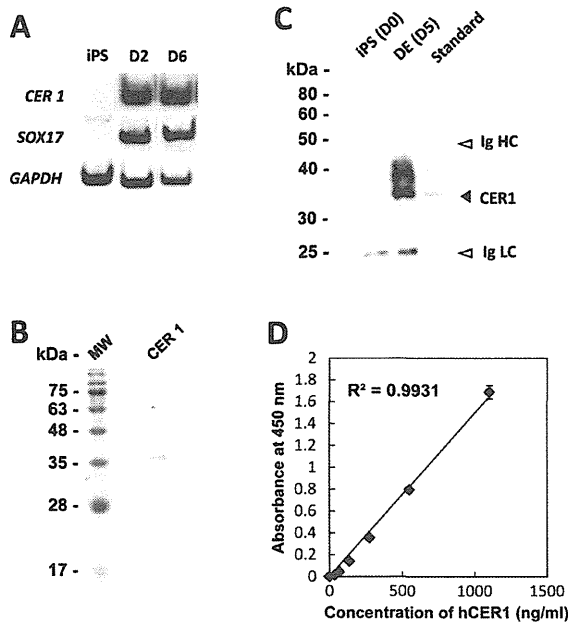


Figure 4. Establishment of an ELISA system for quantification of the secreted human Cer1 protein. (A) Time-dependent expressions of *CER1* and *SOX17* transcripts on differentiation day 2 (D2) and D6 of the human iPS cell line, 201B7 assayed by RT-PCR are shown. (B) SDS-PAGE analysis of recombinant human CER1 protein. (C) Western blot analysis of recombinant human CER1 (standard) and immunoprecipitation of the supernatant using undifferentiated iPS cells (D0) and differentiated DE (D5) medium. (D) Standard curve using recombinant human CER1. doi:10.1371/journal.pone.0064291.g004

R&D Systems, Inc), goat anti-mouse Cer1 (AF1986, R&D Systems, Inc), mouse anti-human CER1 (MAB1075, R&D Systems, Inc), goat anti-human CER1 (AF1075, R&D Systems, Inc), rabbit anti-Foxa2 (70–633, Millipore), goat anti-T (AFP2085, R&D Systems, Inc), and Alexa 488-,568 or 633-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes).

Flow Cytometry Analysis

Cells were dissociated with a cell dissociation buffer (Invitrogen), adjusted to 1×10^6 cells/50 μ l, and stained with their corresponding antibodies. The following antibodies were used: biotin- or Alexa 488-conjugated anti-E-cadherin monoclonal antibody (mAb) ECCD2, and biotin- or phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CXCR4 mAb 2B11 (BD Pharmingen). The stained cells were analyzed using a FACS Canto (BD Pharmingen). Data were recorded using the BD FACSDiva Software program (BD Pharmingen) and analyzed using the Flowjo program (Tree Star).

Western Blot Analysis

Cells and supernatants were lysed in a sample buffer (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 5% glycerol, and 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) and boiled for 3 min at 95°C. The samples were separated on SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Immobilon; Millipore, Bedford, MA) and detected with a goat anti-mouse Cer1 or goat anti-human CER1 antibody. Horseradish peroxidase-conjugated (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used as secondary antibodies (at 1:20,000 dilution). The chemilumines-

cent signals were detected with ECL Plus (GE Healthcare) and scanned by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

Immunoprecipitation

The culture supernatants were incubated with a binding buffer (50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 0.1% Triton X-100), prewashed protein G-Sepharose beads (GE Healthcare), and goat anti-mouse Cer1 or goat anti-human CER1 antibody at 4°C for 16 h. Then, the precipitated proteins were subjected to western blot analysis.

ELISA for Detecting Murine Cer1 and Human CER1

A goat anti-mouse Cer1 or goat anti-human CER1 antibody at 1 μ g/ml in PBS was immobilized onto 96-well plates (Nunc, MaxiSorp) for 16 h at 4°C. After washing with 0.05% Tween-20 in PBS (PBST), the plate was blocked with blocking one (Nacalai) in PBST. Standards or samples were added and allowed to react with the immobilized antibody at 25°C for 60–120 min. After washing with PBST, horseradish peroxidase-conjugated rat anti-mouse Cer1 or mouse anti-human CER1 antibody, prepared by using an easy labeling kit (Dojindo), were added and subsequently incubated at 25°C for 60 min. After washing with PBST, a TMB substrate solution (Kirkegaard & Perry Laboratories) was added to each well. Enzyme activity was determined by measuring the absorbance at 450 nm after termination of the reaction by the addition of equal 0.1 M sulfuric acid.

Preparation of Standard Human Cerberus Protein

A cDNA fragment of human *CER1* (nt. 1–804; NP_005445.1aa: 1–267) [22] was sub-cloned into a pCold I vector (TAKARA) with the His-tag sequence in the *N*-terminal. The CER1 recombinant protein was produced in the *Escherichia coli* strain Rosetta-gami (DE3) (Novagen). The bacteria were incubated overnight in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C and cooled on ice for 15 min. Protein production was promoted in 0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and incubated at 16°C for 16 h. The bacterial cells, collected by centrifugation, were immediately frozen in liquid N₂ and stored at –70°C until use. The bacteria cells were sonicated on ice containing a protease inhibitor cocktail (Nacalai). The supernatant was precipitated with a 30% saturation of ammonium sulfate on an ice bath. The precipitate was re-dissolved in a Tris buffer containing 5 mM imidazole and a protease inhibitor cocktail. It was then poured onto a Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) medium, pre-equilibrated with the same buffer, and gently swirled at 4°C for 16 h. After washing with the same buffer containing 100 mM imidazole, hCER1 was eluted in a stepwise manner (150–250 mM imidazole). The eluted hCER1 protein was concentrated with a filtration system (PALL), quantified by a Protein Quantification kit (Dojindo), and analyzed with 12.5% SDS-PAGE. The protein was stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) to show a single band of recombinant human CER1 protein.

Results

Murine Cerberus 1 is a Secreted Protein Expressed in the Definitive Endoderm Derived from Mouse ES Cells

Cer1 was one of the genes that were specifically up-regulated into the mesendoderm and CXCR4+/E-cadherin+ or DAF1+/E-cadherin+ DE populations at differentiation days (D) 5, 7, and 8 compared to that in undifferentiated ES cells, ectoderm (ECT), or paraxial mesoderm (PAM) in our gene array analysis (Fig. 1A) [3]. *Cer1* expression was maintained in the *Pdx1*/GFP-positive or negative populations (Fig. 1A; D8 DE GFP+ and D8 DE GFP-).

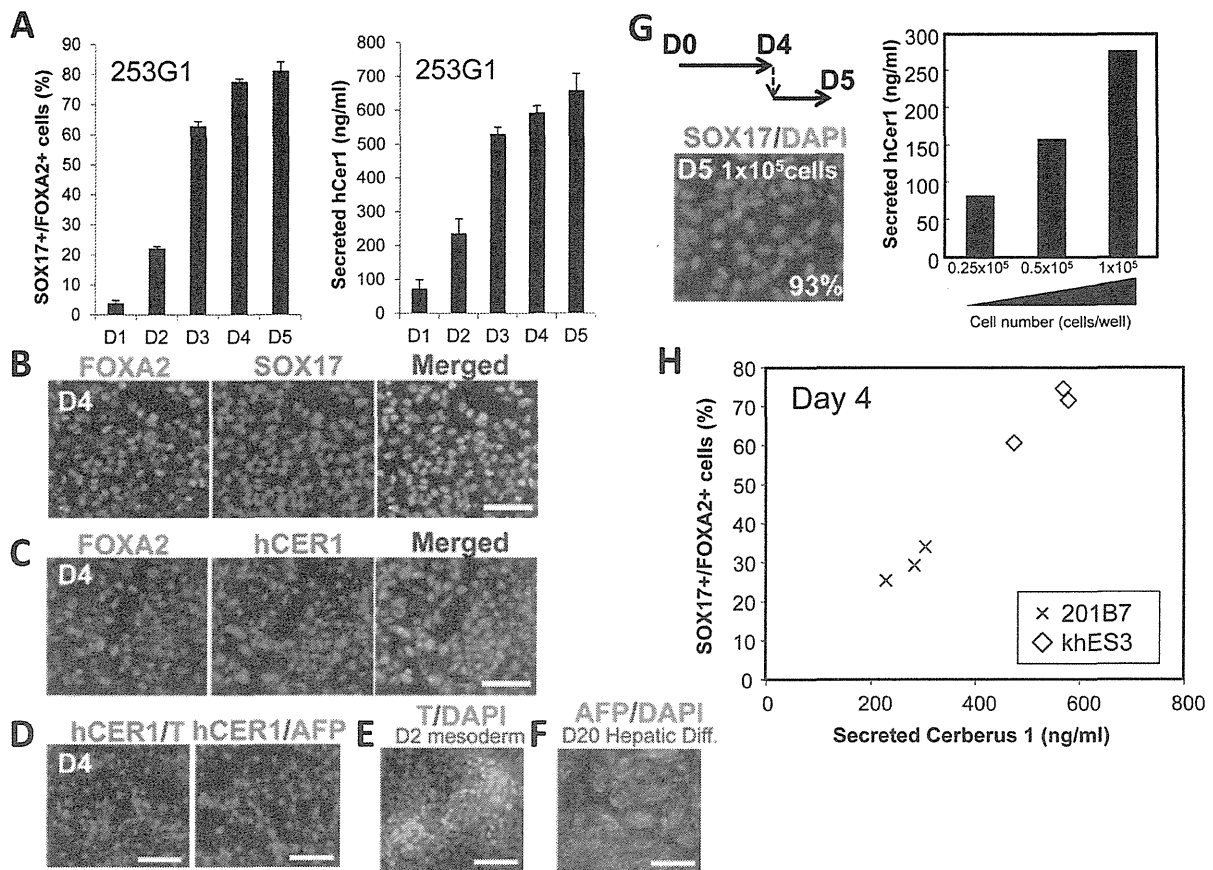


Figure 5. The amount of secreted CER1 correlated with the DE differentiation of human iPS cells. (A) The supernatant was sampled 24 h after replacement with fresh media on differentiation days 1 to 5 (D1 to D5) of the human iPS cell line (253G1). ELISA assays were performed to measure secreted CER1, and quantified by comparison with the standard CER1. The proportion of SOX17+/FOXA2+ DE was calculated from the immunocytochemical analysis results. Values represent the mean \pm S.E.M. (N=3). (B) At D4, approximately all the FOXA2+ cells co-expressed SOX17. (C) Human CER1 staining was observed in approximately all the FOXA2+ cells (D) CER1+ cells did not express T or AFP at D4 in our differentiation system. (E) T is expressed in human iPS cell-derived mesoderm cells. (F) AFP is expressed in human iPS cell-derived hepatic cells (G) ELISA and immunocytochemical analysis of the re-plated DE cells. (H) The proportion of SOX17+/FOXA2+ DE correlated with human CER1 secretion assayed on D4 of differentiation using the 201B7 human iPS cell line and khES3 human ES cell line. Scale bar=100 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0064291.g005

Cer1 was also expressed in the DE. To confirm *Cer1* expression in the DE, ES cells were selected to undergo differentiation in the cells of the 3 germ layers. Semiquantitative RT-PCR analysis revealed that, when ES cells underwent endoderm differentiation through the addition of activin A and bFGF, *Cer1* expression was up-regulated in conjunction with the expression of DE markers *Foxa2* and *Sox17*. This was not observed when ES cells were differentiated into the mesoderm, marked by *Flk1* expression triggered by BMP7, or neuronal ectoderm differentiation, marked by *ζic1* expression, when added with SB431542, an inhibitor for TGFβ signaling (Fig. 1B). Time-dependent expression of *Cer1* detected by real-time PCR revealed that *Cer1* expression reached peak differentiation on D6, which then decreased on D7. The expression of *Sox17* [1], a DE marker, showed a similar pattern (Fig. 1C). Immunocytochemical analysis using an anti-Cer1 polyclonal antibody confirmed that Cer1 was expressed in Foxa2+/Sox17+ DE cells. Furthermore, these Cer1+ cells did not express T, a mesoderm marker, or a visceral endoderm marker AFP at D7 under this condition (Fig. 1E–F). T or AFP was

expressed in mouse ES cell-derived mesoderm or hepatic cells (Figure 1G, H).

We then confirmed the expression of the Cer1 protein in the differentiated ES cells. The crude lysate from the ES cells derived from DE were extracted and subjected to a western blot analysis. Under non-reduced and reduced conditions, Cer1 was detected as an 80-kDa or a 39-kDa protein, respectively, indicating that Cer1 exists as a dimer, which has a slightly larger molecular weight than the 32 kDa previously reported [5]. We then asked whether we could detect the secreted Cer1 protein. Secreted Cer1 in the culture supernatant was immunoprecipitated with a polyclonal antibody against Cer1. Western blot analysis revealed that Cer1 was precipitated as a 39-kDa protein (Fig. 1I, arrow head).

These results indicate that the Cer1 protein is expressed and secreted upon the differentiation of ES cells into DE.

Establishment of an ELISA System for Quantification of the Secreted Mouse Cer1 Protein

To quantify the secreted Cer1 protein, we established an ELISA assay system. Fig. 2 shows a schematic drawing of the ELISA assay system. The polyclonal anti-Cer1 antibody was immobilized onto 96-well plates. Then, serial dilutions of standard Cer1 samples were added. The HRP conjugated anti-Cer1 monoclonal antibody was used to detect Cer1, and the substrate was added to visualize HRP activity (Fig. 2A). The Cer1 standard curve showed a good correlation between HRP activities and concentrations of the Cer1 protein (Fig. 2B).

We then used this ELISA system to quantify the secreted Cer1 protein in the differentiated ES cells (Fig. 2C). ES cells were differentiated into the DE lineage. Culture supernatants from differentiation D1 to D7 were assayed for ELISA and immunoprecipitation, which was followed by a western blot analysis. Secreted Cer1 was detectable from differentiation on D5, which further increased on D7 (Fig. 2C, upper panel). Immunoprecipitation analysis confirmed that the secreted Cer1 protein was present in the supernatant (Fig. 2C, lower panel).

The Amount of Secreted Cer1 Protein Correlates with the Proportion of DE Derived from Mouse ES/iPS Cells

To test if the secreted Cer1 protein could be used to assess the proportion of the DE, we examined the correlation of the amount of secreted Cer1 with flow cytometry analyses of the DE population. ES cells differentiated into the DE with the addition of activin A and bFGF, which gave rise to different proportions of the DE. The cells were then subjected to flow cytometry analysis for Cxcr4+/E-cadherin+ DE cells or an ELISA assay for quantification of the amount of the Cer1 protein secreted. Culture supernatants were collected on differentiation D5 or D7, 48 h after replacement with fresh media. At the same time, cells were analyzed by flow cytometry on D5 or D7. The amount of secreted Cer1 protein was higher on D7 than on D5 (Fig. 2C; Fig. 3), while the amount of secreted Cer1 correlated with the proportion of Cxcr4+/E-cadherin+ cells on D5 and D7 of the DE, respectively (Fig. 3A, B). We also confirmed these results with a mouse ES cell line (EB3) and a mouse iPS cell line (20D17). Cer1 secretion correlated with the proportion of the Cxcr4+/E-cadherin+ DE cells at D7 in these cell lines, which showed a different propensity for differentiation into the DE (Fig. 3C). Therefore, measuring the secreted Cer1 protein on the same differentiation day was useful to quantify DE population size from the ES/iPS cells.

Establishment of an ELISA System for Quantification of the Secreted Human CER1 Protein

To examine if the ELISA system (see above) could be applied to human ES/iPS cells, we differentiated a human iPS (hiPS) cell line (201B7) [18] into the DE. CER1 expression was detected on D2 and was coordinated with SOX17 expression, as detected by semi-quantitative RT-PCR analysis (Fig. 4A). We prepared the recombinant human CER1 protein for use as the standard protein for the ELISA assay. A His-tagged recombinant human CER1 protein was over-expressed in the bacteria and Ni-affinity chromatography was purified into a single band, as revealed by 12.5% SDS-PAGE and CBB staining (Fig. 4B). Immunoprecipitation followed by western blot analysis of the culture supernatant from the hiPS cell-derived DE on D5 confirmed the expression of CER1 (Fig. 4C). The recombinant CER1 was then used as the standard for the ELISA assay to quantify the amount of CER1 (Fig. 4D).

CER 1 is a Secreted Protein Expressed in the DE Derived from Human ES/iPS Cells

Next, we examined the correlation of the amount of secreted CER1 with immunocytochemical analyses of the DE population. Since the 201B7 hiPS cell line showed a low propensity for differentiation into the DE, we then used another hiPS cell line (253G1) [18]. 253G1 cells were differentiated into the DE and subjected to immunocytochemical analysis for SOX17+/FOXA2+ cells or ELISA assay to measure the amount of CER1 secreted. The secreted CER1 protein amount correlated with the amount of SOX17+/FOXA2+ cells (Fig. 5A). Similar to observations made using mouse Cer1, human CER1 was expressed in SOX17+/FOXA2+ DE cells (Fig. 5B, C) and did not overlap with T or AFP expression (Fig. 5D). T or AFP was expressed in human iPS cell-derived mesoderm or hepatic cells (Figure 1E, F). We re-plated cells in several cell densities on D4 (Fig. 5G). One day after replating (D5 equivalent), an ELISA assay and immunocytochemical analyses were performed. As a result, more than 90% of the cells were SOX17+ DE cells, and the amount of human CER1 increased depending on the cell numbers seeded (Fig. 5G). The ELISA assay of 201B7 and human ES cell line (khES3) revealed that human CER1 secretion correlated with the amount of SOX17+/FOXA2+ DE cells in both human iPS and ES cells (Fig. 5H). Taken together, the presented ELISA assay system enables the quantification of the amount of CER1 protein secreted and the proportion of DE differentiation of human ES/iPS cells.

Discussion

Here, we described the development of an ELISA assay system for detecting murine Cer1 protein or human CER1 secreted from the DE cells derived from mouse ES cells or human iPS cells. Quantification of the Cer1 protein using the ELISA assay system revealed an approximate correlation with the amount of DE cells, thereby indicating that the Cer1 ELISA system could be used for quick quantification of the number of DE cells derived from mouse or human pluripotent cells.

In our mouse ES cell differentiation system, where the DE and its derivatives could be induced, we observed the expression of Cer1 in mesendoderm cells, which were then up-regulated in D5 DE. High expression of Cer1 was maintained through D7 and D8 DE in the Pdx1-positive and Pdx1-negative cells. Cer1 was also expressed in the DAF1+/E-Cadherin+ DE [3]. This result is in agreement with our previous results that DAF1+/E-Cadherin+ is a good marker to detect the late DE, where CXCR4 expression decreased rapidly after establishment of the DE. *Cer1* transcript expression seemed to come to a peak before the secreted Cer1 protein. This may be a reflection of the fact that the accumulation of the Cer1 protein takes time, and there is a time lag between *Cer1* transcription and the secreted protein expression.

Cer1 is a secreted protein and is reported to be modified by *N*-glycosylation [5]. Our results suggested that the Cer1 expressed in mouse ES cells and human iPS cells are also *N*-glycosylated. Cer1 is known to primarily be expressed in early mouse embryos, first in the anterior visceral endoderm and anterior DE where it functions to bind and block Nodal and BMP signaling but not Wnt signaling [6] [23][24]. Cer1 expression in the anterior DE disappeared at later stages. Therefore, Cer1 is a marker for anterior DE, but not for the entire DE, in a stage dependent manner. Although Cer1 is reported to be expressed later in the mesoderm [5], we did not observe Cer1 expression in our ES cell differentiation system, where mesoderm cells could be induced by adding BMP (Fig. 1A, B) [12]. This might be due to the limited expression region of the Cer1 in the mesoderm and the low expression of Cer1, which

might not be detected in this narrow window of time. In both mouse and human differentiated cells, *Cer1* was expressed in Sox17+/Foxa2+ cells. These *Cer1*+ cells did not express T or AFP under our differentiation conditions (Fig. 1D–F and Fig. 5B–D). However, since *Cer1* is a marker for anterior DE, but not for the entire DE and is expressed in the mesoderm or visceral endoderm, we should be aware that the amount of *Cer1* is not always proportional to the total amount of DE in the various conditions of differentiation. Therefore, confirmation using other markers for DE, or differentiation using another protocol, is recommended.

Taken together, our present ELISA system for measuring the amount of mouse *Cer1* or human *CER1* secreted allows quick quantification of the DE in living ES/iPS cells. Secreted *Cer1* or *CER1* protein levels could be used as a parameter for comparing the propensity of differentiation into the DE among different ES/iPS cell lines. An ELISA assay for detecting *Cer1* or *CER1* secretions offers an easy and quick analysis and could be applied to

large-scale analyses. It is useful for monitoring differentiation of ES/iPS cells, particularly in experiments such as chemical screenings for drugs that potentiate subsequent differentiation of the DE lineages.

Acknowledgments

We thank members of the Gene Technology Center and the Center for Animal Resources and Development at Kumamoto University for their technical assistance. S.K. is a global COE member.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NS DS SK. Performed the experiments: HI NS DS. Analyzed the data: NS DS KK SK. Contributed reagents/materials/analysis tools: IK MS. Wrote the paper: NS DS SK. Financial supports: TI MS SK.

References

- Kanai-Azuma M, Kanai Y, Gad JM, Tajima Y, Taya C, et al. (2002) Depletion of definitive gut endoderm in Sox17-null mutant mice. *Development (Cambridge, England)* 129: 2367–2379.
- Yasunaga M, Tada S, Torikai-Nishikawa S, Nakano Y, Okada M, et al. (2005) Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nature biotechnology* 23: 1542–1550.
- Shiraki N, Harada S, Ogaki S, Kume K, Kume S (2010) Identification of DAF1/CD55, a novel definitive endoderm marker. *Cell structure and function* 35: 73–80.
- Shawlot W, Deng JM, Behringer RR (1998) Expression of the mouse cerberus-related gene, *Cer1*, suggests a role in anterior neural induction and somitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 6198–6203.
- Biben C, Stanley E, Fabri L, Kotecha S, Rhinn M, et al. (1998) Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Developmental biology* 194: 135–151.
- Belo JA, Bachiller D, Agius E, Kemp C, Borges AC, et al. (2000) Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development. *Genesis (New York, NY: 2000)* 26: 265–270.
- Schier AF (2003) Nodal signaling in vertebrate development. *Annual review of cell and developmental biology* 19: 589–621.
- Foley AC, Korol O, Timmer AM, Mercola M (2007) Multiple functions of Cerberus cooperate to induce heart downstream of Nodal. *Developmental biology* 303: 57–65.
- Belo JA, Silva AC, Borges A-C, Filipe M, Bento M, et al. (2009) Generating asymmetries in the early vertebrate embryo: the role of the Cerberus-like family. *The International journal of developmental biology* 53: 1399–1407.
- Shiraki N, Yoshida T, Araki K, Umezawa A, Higuchi Y, et al. (2008) Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26: 874–885.
- Shiraki N, Umeda K, Sakashita N, Takeya M, Kume K, et al. (2008) Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 13: 731–746.
- Shiraki N, Higuchi Y, Harada S, Umeda K, Isagawa T, et al. (2009) Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. *Biochemical and biophysical research communications* 381: 694–699.
- Ogaki S, Harada S, Shiraki N, Kume K, Kume S (2011) An expression profile analysis of ES cell-derived definitive endodermal cells and Pdx1-expressing cells. *BMC developmental biology* 11: 13.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313–317.
- Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J (2002) Phenotypic Complementation Establishes Requirements for Specific POU Domain and Generic Transactivation Function of Oct-3/4 in Embryonic Stem Cells. *Society* 22: 1526–1536.
- Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, et al. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: 391–401.
- Suemori H, Yasuchika K, Hasegawa K, Fujioka T, Tsuncyoshi N, et al. (2006) Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochemical and biophysical research communications* 345: 926–932.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872.
- Shiraki N, Yamazoe T, Qin Z, Ohgomori K, Mochitate K, et al. (2011) Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells in vitro using a feeder-free basement membrane substratum. *PLoS one* 6: e24228.
- Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, et al. (2011) A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS one* 6: e22261.
- Umeda K, Suzuki K, Yamazoe T, Shiraki N, Higuchi Y, et al. (2012) Albumin gene targeting in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vector to monitor hepatic differentiation. *Stem cell research* 10: 179–194.
- Lah M, Brodnicki T, Maccaroni P, Nash A, Stanley E, et al. (1999) Human cerberus related gene *CER1* maps to chromosome 9. *Genomics* 55: 364–366.
- Silva AC, Filipe M, Kuerner K-M, Steinbeisser H, Belo JA (2003) Endogenous Cerberus activity is required for anterior head specification in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 130: 4943–4953.
- Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H (1999) letters to nature The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 4: 707–710.
- Ogaki S, Harada S, Shiraki N, Kume K, Kume S (2011) An expression profile analysis of ES cell-derived definitive endodermal cells and Pdx1-expressing cells. *BMC developmental biology* 11: 13.

肝臓の再生医療

山添太士*¹ 白木伸明*² 佐々木裕*³ 糸 昭苑*⁴

キーワード●肝幹/前駆細胞, 多能性幹細胞, 幹細胞移植, 分化誘導法

■ はじめに

肝疾患における再生医療への期待は、肝臓が再生能力の高い臓器であるがゆえに、臓器移植が発達した現在においてもなお大きい。1998年に Thomson らがヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) を確立し、2007年に高橋・山中らがヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を創出したことで、この気運はさらに高まっている。

すなわち、このような無限の増殖能をもち、多能性をもった細胞から肝細胞を誘導できれば、臓器移植の障壁であるドナー不足という問題を解決できると考えられる。また、受精卵の破壊を伴う ES 細胞の樹立という倫理問題と移植後の拒絶反応という問題を、iPS 細胞は患者本人の体細胞から作るという点で回避できる。しかしながら、この iPS 細胞においても腫瘍化の問題や、樹立と分化誘導にかかる時間や費用の問題をクリアする必要がある。本稿では、肝疾患における再生医療、特に幹細胞の導入に焦点を絞り、研究の現状と問題点、さらには今後の展望についてまとめる。

□ ターゲットとしての肝疾患

再生医療とは、幹細胞あるいはその分化細胞を移植することで損傷した臓器や組織の再生を促す医療である。実際には、機能不全を起こした臓器や器官に対して、それを構成する実質細胞やその前駆細胞を移植する内容である。

肝疾患においては急性肝不全や肝硬変を背景とした慢性肝不全が、この再生医療の対象となりうる。病態としては各種ウイルス性肝炎、薬物性肝炎、自己免疫性疾患によるものが多くを占めるが、ウイルソン病をはじめとする遺伝性疾患や代謝性疾患も含まれる。

□ 幹細胞の再生医療への応用

多分化能を有する幹細胞を利用した再生医療を実現化しようとする、①肝臓という臓器を作り上げ移植する臓器移植、②肝臓の機能単位であるグリソン構造あるいは肝細胞索構造を作り移植する組織移植、③肝臓の最小構成単位である肝細胞あるいはその前駆細胞を作り移植する細胞移植、④病態の改善に寄与する新しい細胞群の移植などが考えられる。現在のところ、

Stem cell therapy for liver diseases

*¹Taiji Yamazoe : Department of Stem Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University/Department of Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, *²Nobuaki Shiraki, *³Shoen Kume : Department of Stem Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, *⁴Yutaka Sasaki : Department of Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

*¹ 熊本大学発生医学研究所 (多能性幹細胞分野), 熊本大学大学院生命科学研究部研究員 (消化器内科), *² 熊本大学発生医学研究所 (多能性幹細胞分野) 助教, ** 教授, *³ 熊本大学大学院生命科学研究部教授 (消化器内科)

表1 ヒト肝疾患に対して臨床応用された細胞移植の過去の報告

移植細胞	疾患	参考論文
成熟肝細胞	Crigler-Najjar 症候群 I 型	Fox IJ, et al : <i>N Engl J Med</i> 1998 ; 338 : 1422-1426.
	OTC 欠損症	Horslen SP, et al : <i>Pediatrics</i> 2003 ; 111 : 1262-1267.
	Refsum 病 (ペルオキシソーム病)	Sokal EM, et al : <i>Transplantation</i> 2003 ; 76 : 735-738.
	糖原病 I 型	Muraca M, et al : <i>Lancet</i> 2002 ; 359 : 317-318. Dhawan S, et al : <i>Clin Pharmacokinet</i> 2006 ; 45 : 317-324.
	急性肝炎 (臓器移植前)	Bilir BM, et al : <i>Liver Transpl</i> 2000 ; 6 : 32-40. Schneider A, et al : <i>Transplantation</i> 2006 ; 82 : 1115-1116.
	肝不全	Strom SC, et al : <i>Transplant Proc</i> 1997 ; 29 : 2103-2106. Strom SC, et al : <i>Semin Liver Dis</i> 1999 ; 19 : 39-48.
	アルギニノコハク酸分解酵素欠損症	Stéphenne X, et al : <i>Gastroenterology</i> 2006 ; 130 : 1317-1323.
	肝切除後肝不全	Ezzat TM, et al : <i>Liver Int</i> 2011 ; 31 : 773-784.
胎児由来肝細胞	劇症肝炎	Habibullah CM, et al : <i>Transplantation</i> 1994 ; 58 : 951-952.
骨髄由来細胞	非代償性肝不全	Gordon MY et al : <i>Stem Cells</i> 2006 ; 24 : 1822-1830. Terai S, et al : <i>J Hepatobiliary Pancreat Surg</i> 2005 ; 12 : 203-207. am Esch JS 2nd, et al : <i>Stem Cells</i> 2005 ; 23 : 463-470. Houlihan DD, et al : <i>Gastroenterology</i> 2008 ; 135 : 438-450. 本邦でも治験中

臓器の3次元構築は研究が進められているところではあるが、③や④に挙げた細胞移植という方法が、最も臨床応用に近いと考える。

Ⅲ 細胞移植と臓器移植

幹細胞の臨床応用としては、細胞移植という形での応用の可能性が高い。しかしながら臓器移植の技術が進歩し臨床応用されている反面、肝細胞移植の臨床報告はいまだ少ない。これまでに肝疾患患者への臨床応用がなされた細胞移植の報告を表1にまとめた。

移植対象となった肝疾患は、急性あるいは慢性の肝不全をはじめ、肝切除後肝不全患者に対する臓器移植へのブリッジングとして施行されている。そのほか、遺伝性疾患として Crigler-Najjar 症候群 I 型や尿素サイクル異常症、糖原病 I 型、Refsum 病 (ペルオキシソーム病)、第 VII 因子欠損症、家族性高コレステロール血症が挙げられる。患者への侵襲が少なく、繰り返しの治療が可能であるとされるものの、移植された細胞数は全肝の 5% 程度と少なく、その組

織定着率も低いと考えられている¹⁾。

そこで、低分子デキストランや免疫抑制薬、あるいはマイクロビーズなどの生体工学的な修飾をすることでこの問題の解決が試みられている。将来的には、同様の問題が幹細胞由来細胞移植においても解決されなければならないと考えられるため、肝細胞移植で得られた知見を応用する必要がある。

Ⅳ 移植方法

細胞移植の場合、臓器移植と比べて侵襲が少ないものの、投与方法によって侵襲と移植効率に差が生じる²⁾。たとえば、骨髄性幹細胞移植でよく用いられる末梢血管からの全身投与は簡便で低侵襲であるが、肺などの毛細血管にトラッピングされる可能性がある。

次に肝臓へ局所注入する方法や、門脈内へ経皮あるいは下腸間膜静脈から注射する方法、脾臓を介して移植する方法などが挙げられる。これらは侵襲性が高いものの直接的な投与経路である。しかしながら、慢性肝不全の背景にある

表2 臨床応用に向けて、実験的に用いられているモデル

移植に用いられる候補細胞*: 臍帯血, 胚性幹細胞 (ES 細胞), 間葉系幹細胞, 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞), 肝組織幹/前駆細胞, iHep 細胞など

実験動物モデル**: Fumarylacetoacetate hydrolase 欠損 (Fah^{-/-}) マウス, Multidrug resistance-associated protein 2 欠損 (Mrp2^{-/-}) マウス, Albumin enhancer/promoter urokinase-type plasminogen activator (uPA) トランスジェニックマウス, Dipeptidyl peptidase 4 欠損 (DPP4^{-/-}) ラット, Gunn ラット, Long-Evans Cinnamon ラット, 長瀬無アルブミン血症ラット, 薬剤 [レトロルシン, 四塩化炭素, CDE 食, DDC (3,5-diehoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine) 食, アセトアミノフェン] による肝障害マウス/ラット, 70% 肝切除マウス/ラット

(*Baddour JA, et al: *Birth Defects Res C Embryo Today* 2012;96:1-29, Shiota G, et al: *Hepatol Res* 2012;42:15-21, Allameh A, et al: *Clin Biochem* 2012;45:385-396/**Weber A, et al: *Liver Transpl* 2009;15:7-14, Basma H, et al: *Gastroenterology* 2009;136:990-999, Tonkin JN, et al: *Stem Cell Res* 2008;1:195-204)

肝硬変では、門脈圧亢進症や肝内シャント形成による影響も、治療の際には考慮すべき問題となりうる。

特別な場合として、新生児においては臍帯静脈も投与経路の1つとして利用されている。ほかには、肝機能を代替させる目的で細胞シートなどの生体工学 (バイオエンジニアリング) 技術による異所性移植や、人工肝臓として体外装置の応用が考えられている。

Ⅴ 細胞のソース

さまざまな幹細胞が肝臓を構成する細胞へと分化可能なことが報告されている。先に述べた ES 細胞 iPS 細胞のほかに、間葉系幹細胞や骨髄幹細胞も肝前駆細胞へと分化できる可能性が示されている。

間葉系幹細胞は脂肪や骨髄由来で中胚葉分化が主に研究されてきたが、2004年に Lee らが *in vitro* 分化誘導法を報告し³⁾、本邦にて臨床試験も行われている。また、2003年に寺岡らが臍帯血から得られる幹細胞が肝分化能を有することを報告している⁴⁾。

組織幹細胞の存在がいわれて久しいが、肝臓にも肝幹細胞あるいは前駆細胞の存在が想定されている。ラットやマウスなどの齧歯目を特定の薬剤で処理したときに認められる oval cell や small hepatocyte といった肝前駆細胞がよく研究されており、ヘリング管 (細胆管) や小葉間胆管に存在しているとされる^{5,6)}。ヒトにお

いてはいまだ明確には特定されていないが、ウイルス性肝炎や肝硬変および慢性肝疾患に oval cell に似た肝前駆細胞が動員されていると報告されている⁷⁻¹⁰⁾。

将来的には、こういった細胞集団が単離もしくは他の多能性幹細胞から誘導可能となれば、移植の候補細胞となる可能性がある。また最近では関谷・鈴木らは線維芽細胞から多能性幹細胞を介さず直接に肝細胞を誘導しうることを明らかにし、iHep 細胞として名付けている¹¹⁾。

現在、盛んに研究されているこれら候補となる細胞群と、これらのホストとなる肝疾患モデル動物を表2にまとめた。

Ⅵ 分化誘導法

ヒト ES 細胞からの肝分化誘導法としては、Rambhatla らによる酪酸ナトリウムと肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた方法が2003年に報告された¹²⁾。この方法では、大部分の ES 細胞が細胞死を起こすものの、わずかに残った細胞群の7、8割で肝細胞マーカーが陽性であった。この方法では分化効率に問題があったが、その後、胚様体形成法と呼ばれる初期胚に似たスフェロイド培養により、あらゆる胚葉へと自然誘導的な分化誘導方法が普及した。

われわれの研究室では M15 細胞と呼ばれるマウス中腎由来細胞株との共培養によって、マウスおよびヒト ES 細胞を肝細胞へと分化誘導しうることを報告した¹³⁻¹⁶⁾。M15 細胞の担う