

厚生労働科学研究費補助金(再生医療実用化研究事業)  
(分担) 研究報告書

中胚葉分化誘導の標準化と評価

研究分担者 川端 健二

独立行政法人 医薬基盤研究所 創薬基盤研究部  
幹細胞制御プロジェクト プロジェクトリーダー

研究要旨：本研究は、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液細胞等）への分化プロトコルを標準化し、個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証することを目的とする。平成 26 年度は、昨年度に引き続き iPS 細胞から中胚葉系細胞への分化プロトコルの収集を行い、適切なプロトコルの抽出を試みた。その結果、胚様体形成法を用いることで実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞を分化誘導可能であった。また、ヒト iPS 細胞株が異なった場合でも再現性良く血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞が分化誘導可能であったことから、胚様体形成法はコントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコルとなり得る可能性が示された。

研究協力者

岡田淳雅：独立行政法人医薬基盤研究所

田代克久：独立行政法人医薬基盤研究所

山口朋子：独立行政法人医薬基盤研究所

A . 研究目的

ヒト人工多能性幹細胞（human induced pluripotent stem cells；ヒト iPS 細胞）は自己複製能と分化多能性を有しており、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞は創薬研究などへの応用が期待されている。近年、様々な分化誘導法が発表されている一方、同じ iPS 細胞

株を用いても他施設では同じ結果を再現できないことも多く、ヒト iPS 細胞の品質変動は大きな問題の一つとなっている。そこで本研究では、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液細胞等）への分化プロトコルを標準化し、個々の品質変動要因が細胞の分化誘導の再現性に及ぼす影響を評価・検証することを目指す。平成 26 年度は、昨年度に引き続き、iPS 細胞から中胚葉系細胞（血管内皮細胞・血液前駆細胞等）への分化プロトコルの収集および再現性の高いプロトコルの抽出を試みた。

## B . 研究方法

### B-1. ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 201B7 ( 京都大学、山中伸弥教授から供与 )、Tic ( JCRB Cellbank から供与 ; JCRB Number : JCRB1331 )、NEPB ( 筑波大学、須磨崎亮教授から供与 ) は 5 ng/mL の fibroblast growth factor 2 ( FGF2 : 片山化学 ) を含む ReproStem 培地 ( ReproCELL ) を用いて、マイトマイシン C 処理済のマウス胎児線維芽細胞 ( mouse embryonic fibroblast : MEF ) 上で培養した。ヒト iPS 細胞株は 4-5 日ごとに 0.1 mg/ml dispase ( Roche ) またはコロニーのピックアップにより継代した。

#### [ 血管内皮 ]

### B-2. 胚様体 ( embryoid body : EB ) 形成法による血管内皮細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導は以下の方法で行った。Accutase を用いてヒト iPS 細胞を回収後、20 ng/mL BMP4、2 ng/ml Activin A、10  $\mu$ M Rho-associated coiled-coil forming kinase ( ROCK ) inhibitor ( Y-27632 : Wako ) を含む StemPro-34 培地 ( StemPro-34 Nutrient Supplement ( Life Technologies )、50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid ( Sigma )、450  $\mu$ M 1-thioglycerol ( MTG ; Sigma )、2 mM L-Glutamine ( Life Technologies )、120  $\mu$ g/ml streptomycin および 200  $\mu$ g/ml penicillin を含む StemPro-34 Serum Free Medium ( Life

Technologies ) ) に懸濁後、96 穴 Lipidure-coat プレート ( Thermo Scientific ) の各ウェルに  $2 \times 10^4$  個の細胞を播種し EB を形成させた。2 日間培養後、中胚葉へと分化させるために 20 ng/mL BMP4 および 5 ng/ml VEGF を含む StemPro-34 培地に置換してさらに 2 日間培養し、培養 4 日目に 20 ng/mL BMP4、5 ng/ml VEGF および 5  $\mu$ M transforming growth factor ( TGF )  $\beta$  inhibitor ( SB431542 ; Wako ) を含む StemPro-34 培地で 2 日間培養した。培養 6 日目に EB を回収し、20 ng/ml VEGF、2 ng/ml FGF2 および 5  $\mu$ M SB431542 を含む StemPro-34 培地で置換し、3 - 4 日間 ( 培養 9 - 10 日間まで ) ペトリディッシュ上で培養した。また、目的の細胞集団をセルソーターにより分離し、100 ng/ml Endothelial cells growth supplement ( ECGS : Sigma )、100 ng/ml heparin ( Sigma ) および 20 ng/ml FGF2 を含む StemPro34 培地に懸濁した後、 $5 \times 10^4$  cells/well ( 48 well ) の密度で 20  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> の濃度でフィブロネクチンをコートしたプレートに播種した。その後、2 日おきに培地を置換しながら接着培養を行い、血管内皮細胞を誘導・増幅した。

### B-3. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離

培養 9 日目の EB を回収し、Trypsin/EDTA ( Life Technologies ) を加えて 37  $^{\circ}$ C で 5 分反応させた後、ピペティングにより単細胞に解離させた。その後、allophycocyanin ( APC ) 標識抗ヒト CD34 抗体 ( clone 581 ; BioLegend ) および phycoerythrin ( PE ) 標

識抗ヒト VE-Cadherin 抗体 (clone 16B1 : eBioscience) を 4、遮光で 40 分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、フローサイトメーター (BD LSRFortessa II ; BD Bioscience) を用いて CD34 発現 (+)VE-Cadherin+ 細胞の割合を解析した。

### **[ 血液前駆細胞 ]**

#### **B-4. EB 形成による血液前駆細胞への分化誘導**

ヒト iPS 細胞を Accutase により培養ディッシュから剥離し、10  $\mu$ M Y27632 を含む EB 形成培地 [ 50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid、450  $\mu$ M MTG、付属のサプリメントを加えた mTeSR (Stem Cell) ] 中でピペッティングすることにより単細胞に解離した。その後、1 x 10<sup>6</sup> 個の iPS 細胞と前日放射線処理した 6 x 10<sup>5</sup> 個 C3H10T1/2 細胞を 1 ng/ml ActivinA、10 ng/ml BMP4、10  $\mu$ M ROCK inhibitor を含む EB 形成培地に懸濁し、ペトリディッシュに播種した。2 日後 (Day 2)、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF を含む EB 分化培地 50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid、450  $\mu$ M MTG、2 mM L-Glutamine、インスリントランスフェリン (Life Technologies) を加えた IMDM (Sigma) ] に置き換えた。その 2 日後 (Day 4)、10 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10  $\mu$ M SB431542 を含む EB 分化培地で半分培地を交換し、更に 2 日培養した。分化誘導から 6 日目 (Day 6) に、2 ng/ml BMP4、5 ng/ml VEGF、10 ng/ml stem cell factor (SCF; Pepotech)、10 ng/ml Thrombopoietin (TPO; Peprotech) を含む EB 分化培地に培地を交換

した。2 日後 (Day 8) に半分培地交換を行い、血液前駆細胞の誘導を行った。

#### **B-5. フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析と細胞分離**

培養 9 日目の EB を回収し、Trypsin/EDTA (Life Technologies) を加えて 37 で 5 分反応させた後、ピペッティングにより単細胞に解離させた。その後、APC 標識抗ヒト CD34 抗体および fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト CD43 抗体 (clone 1G10; BD Biosciences) を氷上、遮光で 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、2% FBS 含有 PBS で再懸濁し、セルソーター (SONY SH-800) を用いて CD34 陽性 CD43 陽性細胞の割合を解析した。

## **C . 研究結果**

### **C-1 . ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導**

ヒト iPS 細胞から、安定的で再現性の高い血管内皮細胞への分化誘導法を開発するため、無血清培地を用いることとした。昨年度までに、胚様体 (embryoid body : EB) を形成させることで、201B7 株から安定的に CD34 と VE-Cadherin を共発現する血管内皮細胞様の細胞へ分化誘導可能であることを示した。そこで本年度は、前年度に引き続き、ヒト iPS 細胞から血管内皮細胞へのプロトコルを収集するとともに、201B7 株以外のヒト iPS 細胞株を用いても安定的に再現良くヒト iPS 細胞から血管内皮細胞が分化誘導可能か検討した。まず、昨年度に引き続きヒト iPS 細胞か

ら血管内皮細胞への分化誘導プロトコルを収集した。血液細胞への分化支持能を有することが知られている OP9 ストローマ細胞株とヒト ES 細胞を共培養することで、血管内皮前駆細胞である CD34 陽性細胞が効率良く分化誘導可能であることが報告されている (Blood, 2005; 105(2): 617-26., Blood, 2006; 108: 2095-2105., Stem Cells, 2009; 27: 559-567.)。そこで、同プロトコルでヒト ES/iPS 細胞から高効率に血管内皮前駆細胞を分化誘導できるのではないと考え、検討を行った。その結果、現在用いている胚様体形成を介した分化誘導法と比較して、CD34 陽性細胞への分化誘導効率ならびにその安定性が低いことが明らかとなった (data not shown)。

次に、201B7 株以外のヒト iPS 細胞を用いた場合でも胚様体形成法により安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能か否かについて検討した。その結果、201B7 株と比較して血管内皮細胞への分化誘導効率は低いものの、その他のヒト iPS 細胞株でも安定的に CD34 陽性細胞が分化誘導可能であった (Figure 1)。

また、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能かどうかについて 201B7 株を用いて検討した。その結果、実験者が異なった場合でも安定的に血管内皮細胞へ分化誘導可能であった (Figure 2) ことから、胚様体形成法はコントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコルとなり得る可能性が示された。

## C-2 . ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導

ヒト iPS 細胞から血液細胞を分化誘導するには、まず血液前駆細胞を得る必要がある。

ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へ分化誘導する方法として、支持細胞との共培養法、単層培養法や胚様体形成法などが報告されている。昨年度いくつかの手法で検討した結果、胚様体形成法がもっとも安定的にヒト iPS 細胞から血液前駆細胞へと分化誘導可能であることを示した。昨年度に引き続き、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化誘導プロトコルを収集した。本年度は、コロニー状のヒト iPS 細胞を分化誘導開始時に用いて実験を行った。本手法は、まず、ヒト iPS 細胞をコロニー状でマトリゲル上に播種し、2-3 日増殖させた後に培地交換を行うことで分化を開始する手法であり、ヒト iPS 細胞から肝細胞を分化させる際に汎用されている手法である。Activin A 存在下で培養し、中内胚葉系細胞を誘導した後に BMP4 および SCF、TPO などの血液細胞分化を支持するサイトカイン存在下で培養することにより中胚葉・血液前駆細胞様細胞の誘導を試みた。その結果、本手法では再現性良く血液前駆細胞を誘導することが出来なかった (data not shown)。

次に、胚様体形成法を用いることで、201B7 株だけでなく他のヒト iPS 細胞株を用いた場合でも安定的に血液前駆細胞が分化誘導可能かどうか検討した。その結果、201B7 株だけでなくヒト末梢血由来 iPS 細胞株である NEPB においても安定的に血液前駆細胞が分化誘導可能であることが示された (Figure. 3) 。また、201B7 株と比較して、ヒト血液由来 iPS 細胞株である NEPB で最も効率良く血液前駆細胞へと分化した。

また、実験者が異なった場合でも安定的に

血液前駆細胞へ分化誘導可能かどうかについて、NEPB 株および 201B7 株を用いて検討した。その結果、実験者が異なった場合でも安定的に血液前駆細胞へ分化誘導可能であった (Figure 4) ことから、胚様体形成法は、血管内皮細胞だけでなく、ヒト iPS 細胞から血液前駆細胞への分化においてもコントロールとして使用できる再現性の高い分化プロトコールとなり得る可能性が示された。

## D . 考察

iPS 細胞を研究へ応用する場合、iPS 細胞そのものではなく、iPS 細胞から特定の細胞に分化させる必要がある。昨年度、中胚葉(血管内皮細胞、血液細胞)への分化プロトコールの決定を目的に研究を行った結果、胚様体形成法が最も安定的に 201B7 株から血管内皮細胞および血液前駆細胞へ分化誘導可能であることを示した。そこで本年度は、201B7 株以外のヒト iPS 細胞株を用いて、同様の手法で安定的に血管内皮細胞および血液前駆細胞が分化誘導可能かどうか検討した。その結果、201B7 株だけでなく他のヒト iPS 細胞株においても安定的に血管内皮細胞および血液前駆細胞が得られることが明らかになった。また、実験者が異なる場合においても、本手法を用いれば再現性良く血管内皮細胞および血液前駆細胞へと分化誘導可能であることが示された。しかし、分化誘導効率に改善の余地があるため、来年度も高効率なヒト iPS 細胞由来血管内皮細胞および血液前駆細胞作製法の開発を目指し、プロトコールの収集およ

び検討を継続して行う予定である。また、iPS 細胞から血管内皮細胞および血液前駆細胞への分化誘導に使用する培地や、サイトカインやプレートを更に改良することで分化効率が向上する可能性もあるため、来年度も引き続き胚様体形成法を軸として、さらに再現性・安定性・有用性の高い分化誘導プロトコールの確立を行っていく予定である。

## E . 結論

実験者が異なった場合でも再現性高くかつ安定的に血管内皮細胞あるいは血液前駆細胞を分化誘導可能であったことから、胚様体形成法はコントロールとして使用できる分化プロトコールとなり得る可能性が示された。これらの結果は、ヒト iPS 細胞から分化誘導された細胞を用いた創薬研究の基盤技術となることが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tashiro K, Hirata N, Okada A, Yamaguchi T, Takayama K, Mizuguchi H, Kawabata K. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor separates hematopoietic and cardiac progenitor cells in Flk1-expressing mesoderm. *Stem Cells Transl Med.*, in press.
2. Okada A, Tashiro K, Yamaguchi T, Kawabata K. Selective differentiation into hematopoietic and cardiac cells from pluripotent stem cells based on the expression of cell surface markers. *Springer Protocol Methods in Molecular Biology ES Cells: Methods and Protocols- 2nd Edition.*, in press.
3. Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R, Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, Kawabata K, Mizuguchi H. Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 47: 16772-16777 (2014)
4. Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-x<sub>L</sub> mutant gene. *Cell Transplant.*, in press
5. Watanabe H, Takayama K, Inamura M, Tachibana M, Mimura N, Katayama K, Tashiro K, Nagamoto Y, Sakurai F, Kawabata K, Furue MK, Mizuguchi H.

HHEX promotes hepatic-lineage specification through the negative regulation of eomesodermin. *PLoS One.* 3: e90791 (2014)

6. Tashiro K, Nonaka A, Hirata N, Yamaguchi T, Mizuguchi H, Kawabata K. Plasma elevation of vascular endothelial growth factor leads to the reduction of mouse hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in the bone marrow. *Stem Cells Dev.*, 18: 2202-10 (2014)
7. Taura A, Furuta K, Yamaguchi T, Kawabata K, Tanaka S. Regulation of histamine synthesis and tryptase expression through transcription factors, Gfi1 and Gfi1b, in murine cultured mast cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 1: 81-6 (2014)

### 2. 学会発表

- 1 岡田淳雅、田代克久、山口朋子、平田信恵、菊池愛子、水口裕之、川端健二: CARはFlk1陽性中胚葉細胞から血液・心筋前駆細胞を分離可能な新規細胞表面分子である; 第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月14-18日
- 2 池田由美、山口朋子、田代克久、岡田淳雅、大川恭行、川端健二: 骨髄由来マスト細胞から各マスト細胞サブクラスへの分化誘導とサブクラス特異的因子の探索; 第64回日本薬学会近畿支部大会、京都、2014年10月11日
- 3 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Haruka Minami, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of human iPS cell-derived endothelial cells into brain endothelial cells for establishment of *in vitro*

blood brain barrier model; International Society for Stem Cell Research 12<sup>th</sup> Annual Meeting, Vancouver, Canada, June, 2014

- 4 池田由美、山口朋子、田代克久、大川恭行、川端健二: マスト細胞関連疾患に対する創薬ツールとしての各種マスト細胞サブセットの分化誘導法の確立; 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、名古屋、2014年5月23-24日
- 5 山口朋子、平林玲子、田代克久、岡田淳雅、水口裕之、川端健二: ヒトES/iPS細胞から皮膚型/粘膜型マスト細胞への分化誘導; 第15回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、名古屋、2014年5月23-24日

3. その他  
該当なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

川端健二、山口朋子

成熟マスト細胞の作製方法及び得られた成熟マスト細胞

出願番号：特願 2013-103582

出願日：平成 25 年 5 月 15 日

川端 健二、田代 克久

多能性幹細胞から脳血管内皮細胞を製造する方法

出願番号：特願 2014-038105

出願日：平成 26 年 2 月 28 日

### 2. 実用新案登録

該当なし

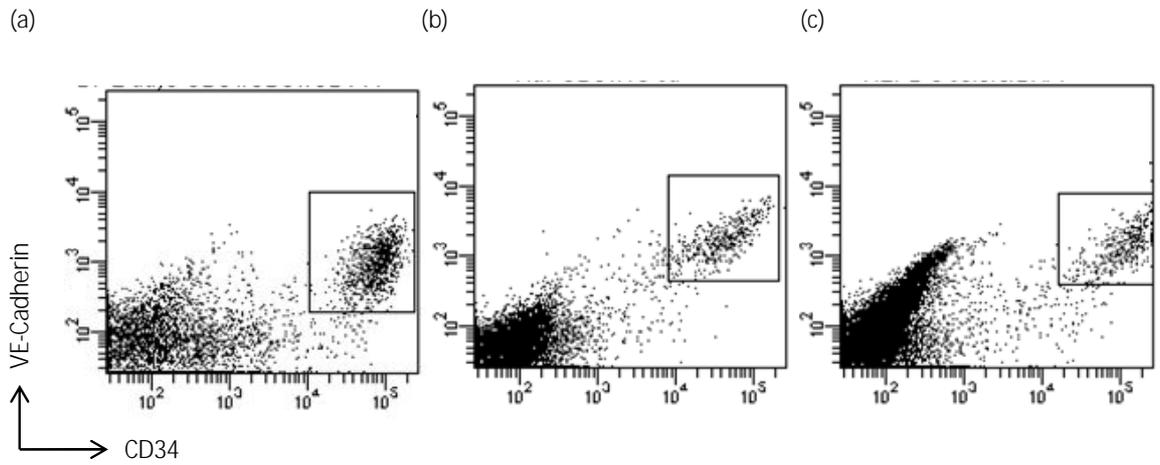


Figure 1 異なるヒトiPS細胞株から血管内皮細胞への分化誘導効率の違い  
 (a) 201B7株、(b)Tic株、(c) NEPB株からそれぞれ血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にフローサイトメーターにてCD34およびCD144 (VE-カドヘリン)の発現について検討した。

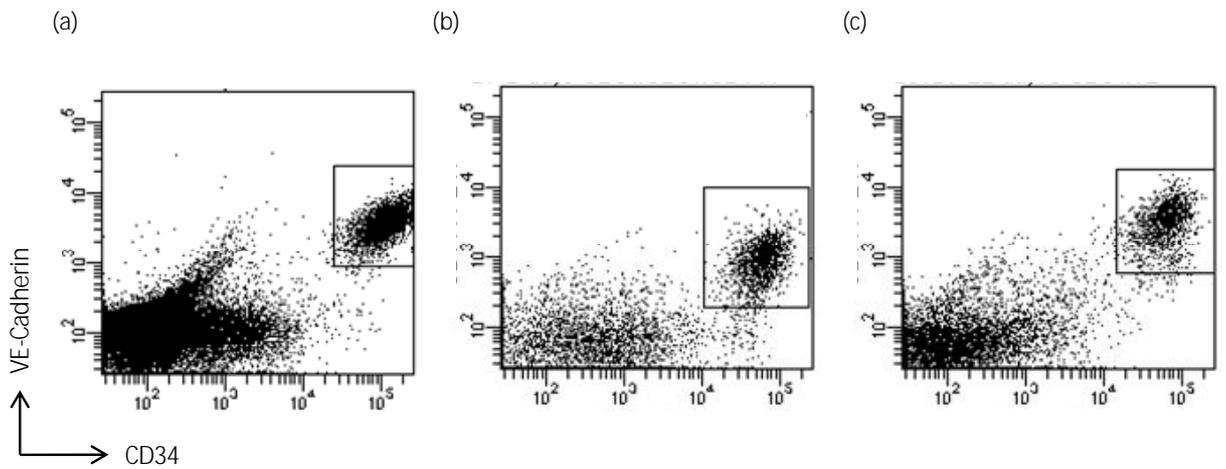


Figure 2 実験者が異なる場合における201B7株から血管内皮細胞への分化誘導効率の違い  
 201B7株からそれぞれ異なる実験者(3名)が独立して血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にフローサイトメーターにてCD34およびCD144 (VE-カドヘリン)の発現について検討した。

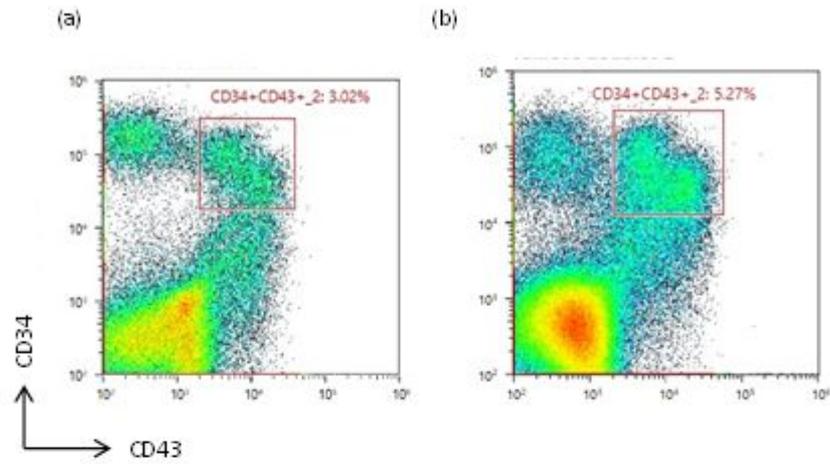


Figure 3 異なるヒトiPS細胞株から血液前駆細胞への分化誘導効率の違い  
 (a) 201B7株、(b) NEPB株からそれぞれ血管内皮細胞への分化誘導を行い、9日目にセルソーターにてCD34およびCD43の発現について検討した。

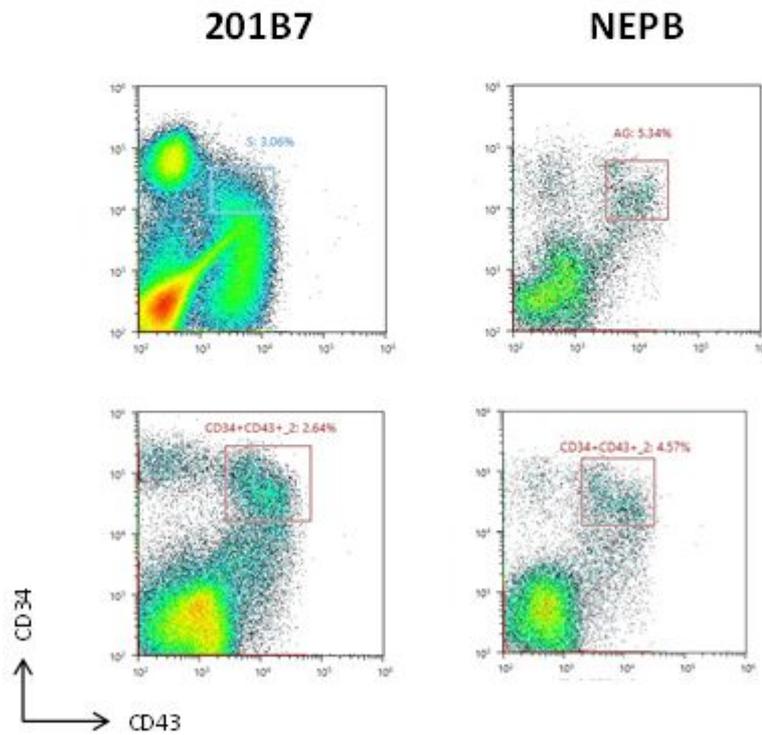


Figure 4 実験者が異なる場合における201B7株およびNEPB株から血液前駆細胞への分化誘導効率の違い  
 201B7株およびNEPB株からそれぞれ異なる実験者(2名)が独立して血液前駆細胞への分化誘導を行い、9日目にセルソーターにてCD34およびCD43の発現について検討した。