

可能となれば、全てヒト細胞から成る *in vitro* BBB モデルの作製へと繋がると考えられる。

D-2-2. hiPSECs から脳血管内皮細胞への分化誘導

ラットグリオーマ細胞株である C6 細胞と共培養した hiPSECs は、単独培養と比較し、強固なタイトジャンクションを形成することを明らかにした。また、得られた細胞は各種トランスポーターの発現量も増加しており、特に P-gp に関しては排出トランスポーターとして機能していることも確認された。したがって、C6 細胞との共培養により、hiPSECs は脳血管内皮細胞へと成熟化していることが示された。C6 細胞はアストロサイト様の性質を有しており、これまでに C6 細胞との共培養系によりヒト脳血管内皮細胞の性質が維持されることが報告されている。しかし、C6 細胞との共培養系によってナイーブなヒト血管内皮細胞が脳血管内皮細胞へと分化・成熟するという事実は、本研究において初めて見出した C6 細胞の機能であり、非常に興味深い知見である。一方で、C6 細胞は HUVEC のタイトジャンクション形成にほとんど影響を及ぼしていなかった。これは、HUVEC が成熟血管内皮細胞として機能していた臍帯静脈から単離された細胞であるため、C6 細胞との共培養系においても、強固なタイトジャンクションを形成する脳血管内皮細胞へ

の分化転換は生じなかったものと考えられる。つまり、これらの結果から、ヒト脳血管内皮細胞の作製には、運命決定されていない（組織特異性を獲得していない）血管内皮細胞が、BBB 構成細胞からのシグナルを受けることが必要であると考えられる。

ヒトの脳組織から大量の血管内皮細胞を採取することは困難であること、そして、他の組織・臓器から血管内皮細胞を単離したとしても、脳血管内皮細胞への性質転換が困難であることを考慮すると、特定の環境刺激を与えずに作製可能な hiPSECs は、ヒト脳血管内皮細胞作製のための有用な細胞ソースであると考えられる。

D-2-3. ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞への分化誘導法の最適化

前述したヒト iPS 細胞由来の脳血管内皮細胞の作製法は、C6 細胞との共培養により hiPSECs を脳血管内皮細胞へと成熟化させる方法であるため、脳血管内皮細胞の作製効率が C6 細胞の状態に影響されるという問題が残されていた。その問題を解決するために、C6CM の脳血管内皮細胞への成熟促進採用について検討した結果、C6CM を用いて培養した場合でも、C6 細胞との共培養した場合と同様に hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化を誘導できることが示され、hiPSECs の脳血管内皮細胞への成熟化が C6 細胞の状態に左右されるという懸念が解決されただけでなく、ヒト iPS 細胞

由来脳血管内皮細胞の作製にあたり、全ての工程を無血清・無フィーダー細胞条件下で行うことが可能となり (Figure 22)、脳血管内皮細胞の作製効率と再現性に影響を与える要因がほぼ取り除くことに成功した。現在知られているヒト由来脳血管内皮細胞は、量的確保が困難である、あるいは作製効率が不安定という問題を抱えており、それがヒト BBB モデル等の創薬基盤として重要な培養モデル作製の障害であった。本研究により確立されたヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の作製法は、上記問題点が全て解決された方法であり、今後の創薬研究における高い汎用性と幅広い応用性が期待される。

hiPSECs から脳血管内皮細胞への成熟化が、C6CM を用いた培養でも確認されたことから、C6 細胞由来の液性因子がヒト脳血管内皮細胞の成熟化を促進することが示された。そこで、ヒト脳血管内皮細胞の成熟化を制御する分子基盤の解明ならびにヒト脳血管内皮細胞の高効率作製法の開発を目指すため、さらに、C6 細胞由来の成熟化促進因子の探索を行った。これまでに Wnt-7a および Wnt-7b による Canonical-Wnt 経路の活性化がマウス脳内における血管形成に極めて重要であることが報告されているが、ヒト脳血管内皮細胞の成熟化にも関与するのかは不明なままであった。本研究により、脳血管内皮細胞の成熟化において、Canonical-Wnt シグナルがヒトでも機能し

ていることが明らかとなった。一方で、阻害物質存在下でも C6CM による脳血管内皮細胞への成熟化作用が顕著にみとめられたことから、本作用では中核的ではなく補助的に働いていることが示唆された。また、Wnt-5a による Non-canonical Wnt 経路の活性化がヒト脳血管内皮細胞株におけるタイトジャンクション形成の亢進に関与することが報告されていたため、Wnt-5a を hiPSECs へ作用させたが、タイトジャンクション形成能の亢進はみられなかった。この結果は、C6CM による脳血管内皮細胞の成熟化作用に Non-canonical-Wnt シグナルは関与しないことを示している。ごく最近、マウスやラットを用いた実験から、脳血管内皮細胞の成熟化に関与する液性因子として、Shh、TGF- β などが報告されたが、これら液性因子もヒトで同等の機能を有するのかは不明である。今後、ヒト iPS 細胞由来脳血管内皮細胞の高効率作製法の開発のため、それら因子の成熟化への関与の検証ならびに C6 細胞由来液性因子の同定を行う必要がある。

本研究で確立されたヒト iPS 細胞由来の脳血管内皮細胞の作製法は、生体内における脳血管内皮細胞の発生過程を模倣したシンプルかつ安定的な方法であることから、今後のヒト由来脳血管内皮細胞作製のプラットフォームとなり得る。その裏では、脳血管内皮細胞の作製効率が低い、成熟化した脳血管内皮細胞の長期的な維持が困難で

ある、といった問題がまだ残されている。
本研究では、アストロサイト様の性質を有する C6 細胞のみに着目して研究を行ってきた。しかし、脳内の血管内皮細胞の周囲にはアストロサイトの他に、ペリサイト、ミクログリア、神経細胞など多種の細胞が近接して存在している。今後、上記の問題を解決するため、C6 細胞に加えてそれら脳構成細胞を混合して培養することも必要であると考えられる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞から支持細胞との共培養法あるいは EB 形成法を介して CD34 陽性 CD43 陽性血液前駆細胞へ分化誘導する方法を確立した。また、ヒト iPS 細胞由来 CD34 陽性 CD43 陽性血液前駆細胞からメチルセルロース法を用いることで、マスト細胞が分化誘導可能であることが示された。さらに、ヒト iPS 細胞由来血液前駆細胞から脱顆粒応答能を有するマスト細胞が分化誘導可能であることが示された。

ヒト iPS 細胞から EB 形成を介して血管内皮前駆細胞を安定的に作製する方法を確立した。また、得られた血管内皮細胞をグリオーマ細胞である C6 細胞と共培養することで、脳血管内皮細胞へ誘導できた。結果として、ヒト iPS 細胞から脳血管内皮細胞を作製することに成功した。さらに、C6CM に脳血管内皮細胞への成熟化作用があることも見出し、本作製法を無血清・無フィーダー細胞条件下で行うことも可能となった。

これらの結果は、薬物毒性スクリーニングに応用可能な細胞を作製するため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.*, in press.
4. Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tatenos 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_L 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)
8. Yamaguchi T., Tashiro K., Tanaka S., Katayama S., Ishida W., Fukuda K., Fukushima A., Araki R., Abe M., Mizuguchi H., **Kawabata K**. Two-step differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 22, 726-734 (2013)
9. 山口朋子、**川端健二**、iPS細胞由来マスト細胞を用いた難治性疾患の新規治療薬開発へ向けて、*Biophilia 電子版*、2、21-25 (2013)

10. Tashiro K., Omori M., **Kawabata K.**, Hirata N., Yamaguchi T., Sakurai F., Takaki S., Mizuguchi H. Inhibition of Lnk in Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Promotes Hematopoietic Cell Generation. *Stem Cells Dev.*, 21, 3381-3390 (2012)
11. Tashiro K., **Kawabata K.**, Omori M., Yamaguchi T., Sakurai F., Katayama K., Hayakawa H., Mizuguchi H. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res.*, 8, 300-311 (2012)
12. Takayama K., **Kawabata K.**, Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*, 34, 1781-1789 (2013)
13. Takayama K., Inamura M., **Kawabata K.**, Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
14. Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., **Kawabata K.**, Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. The promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials*, 33, 4526-4534 (2012)
15. Takayama K., Inamura M., **Kawabata K.**, Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther.*, 20, 127-137 (2012)
16. **Kawabata K.**, Takayama K., Nagamoto Y., Saldon MM., Higuchi M., Mizuguchi H. Endodermal and hepatic differentiation from human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. (Review) *J. Stem Cell Res. Ther.*, S10, 002 (2012)
17. **Kawabata K.**, Inamura M., Mizuguchi H. Efficient hepatic differentiation from human iPS cells by gene transfer. (Review) *Methods Mol. Biol.*, 826, 115-124 (2012)
18. 水口裕之、高山和雄、長基康人、**川端健二**：ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導の現状と創薬応用；医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、43、982-987 (2012)
19. 高山和雄、**川端健二**、水口裕之：ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への高効率分化誘導法の開発とその創薬応用；最新医学、68、141-144 (2013)

20. 川端健二、高山和雄、水口裕之: ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた薬物毒性評価系の開発; バイオインダストリー、30、19-24 (2013)

2. 学会発表

【国内学会】

- 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 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
- 4 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
- 5 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: In vitro 血液脳関門モデルの構築を目的としたヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞から脳特異的血管内皮細胞への成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 6 平林玲子、山口朋子、田代克久、池田由美、水口裕之、川端健二: メチルセルロース法を用いたヒト ES/iPS 細胞由来血液前駆細胞からマスト細胞への分化誘導; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 7 山口朋子、田代克久、池田由美、田中智之、水口裕之、川端健二: Wnt シグナルによるマスト細胞の成熟化; 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月 27-30 日
- 8 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Maturation of bone marrow-derived mast cells by Wnt signaling; 第 42 回日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11-13 日
- 9 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: 血液脳関門モデルの構築を目指したヒト ES/iPS 細胞から血管内皮細胞への分化誘導法の確立; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 10 山口朋子、田代克久、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関する

- 新規因子の同定; 第 63 回日本薬学会近畿支部大会、京都、2013 年 10 月 12 日
- 11 南はるか、田代克久、山口朋子、水口裕之、川端健二: ヒト ES/iPS 細胞由来血管内皮細胞の作製に関する基礎的検討; 第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、東京、2013 年 6 月 1 日
- 12 Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata: Differentiation of mast cells from induced pluripotent stem cells: 第 11 回幹細胞シンポジウム、東京、2013 年 5 月 17-18 日
- 13 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二: マウス iPS 細胞から成熟したマスト細胞の分化誘導法の開発; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
- 14 田代克久、大森美幸、川端健二、平田信恵、山口朋子、櫻井文教、高木智、水口裕之: アダプター蛋白質 Lnk の抑制はマウス ES/iPS 細胞から血液前駆細胞への分化を促進する; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
- 15 森崎悠太、古川智久、樋口麻衣子、田代克久、高山和雄、大高真奈美、西村健、立花雅史、櫻井文教、川端健二、中西真人、水口裕之: 創薬応用を目指したヒト初代培養凍結肝細胞由来 iPS 細胞の樹立; 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 27-30 日
- 16 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: Nanopillar プレートを用いたヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用; 第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年 3 月 21-23 日
- 17 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之: 転写因子 HEX によるヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化機構の解明; 第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年 3 月 21-23 日
- 18 山口朋子、田代克久、田中智之、水口裕之、川端健二: マスト細胞の成熟化に関与する新規液性因子の同定; 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
- 19 田代克久、平田信恵、山口朋子、水口裕之、川端健二: タイトジャンクション蛋白質 CAR の発現を指標にしたマウス ES 細胞から血液細胞、心筋細胞の単離; 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
- 20 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、川端健二、水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞由来内胚葉から肝幹前駆細胞への分化過程における転写因子 HEX の機能解明; 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日

- 21 Takayama K., Inamura M., **Kawabata K.**, Sugawara M., Kikuchi K., Tashiro K., Sakurai F., Furue KM., Mizuguchi H.: GENERATION OF MATURE HEPATOCYTES FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS BY FOXA2 AND HNF1 α TRANSDUCTION; 第 27 回日本薬物動態学会年会、千葉、2012 年 11 月 20-22 日
- 22 山中靖貴、山口朋子、田代克久、水口裕之、**川端健二**: iPS 細胞から T 細胞への分化誘導法に開発; 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2012 年 10 月 20 日
- 23 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立花雅史、櫻井文教、古江一楠田美保、**川端健二**、水口裕之: ヒト ES/iPS 細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子 HEX の機能解明—HEX 標的遺伝子の同定および機能解析—; 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸、2012 年 10 月 20 日
- 24 高山和雄、稲村充、**川端健二**、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: FOXA2 および HNF1 α 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導; 第 39 回日本毒性学会学術年会、仙台、2012 年 7 月 17-19 日
- 25 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、**川端健二**、水口裕之: ES/iPS 細胞由来肝細胞の Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下における成熟化・促進 機構の解析; 第 19 回大会肝細胞研究会、札幌、2012 年 6 月 29-30 日
- 26 高山和雄、**川端健二**、稲村充、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: c/EBP α および c/EBP β 遺伝子による TGFBR2 遺伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定; 第 19 回大会肝細胞研究会、札幌、2012 年 6 月 29-30 日
- 27 高山和雄、稲村充、**川端健二**、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之: SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導; 第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012 年 5 月 17-18 日
- 28 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、**川端健二**、水口裕之: Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下におけるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の 肝細胞成熟化・促進機構の解析; 第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012 年 5 月 17-18 日

【国際学会】

1. 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 12th Annual Meeting, Vancouver, Canada, June, 2014

2. **Kenji Kawabata**, Hiroyuki Mizuguchi.
Differentiation of hepatocyte-like cells from human ES and iPS cells and its application in drug screening., 2012 World Stem Cell Summit, West Palm Beach, Florida, USA, Dec 2012,
3. Tomoko Yamaguchi, Katsuhisa Tashiro, Satoshi Tanaka, Hiroyuki Mizuguchi, **Kenji Kawabata**. Characterization of mast cells generated by differentiation from mouse induced pluripotent stem cells., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012
4. Katsuhisa Tashiro, Aki nonaka, Tomoko Yamaguchi, Mizuguchi Hiroyuki, **Kenji Kawabata**. Mobilization of mouse hematopoietic stem/progenitor cells by vascular endothelial growth factor is mediated by reduction of mesenchymal stromal cells in bone marrow., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012
5. Kazuo Takayama, Mitsuru Inamura, **Kenji Kawabata**, Michiko Sugawara, Kiyomi Kikuchi, Maiko Higuchi, Yasuhito Nagamoto, Hitoshi Watanabe, Katsuhisa Tashiro, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi.
GENERATION OF METABOLICALLY FUNCTIONING HEPATOCYTES FROM

HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BY TRANSDUCTION OF FOXA2 AND HNF1 α ., International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

6. Yasuhito Nagamoto, Katsuhisa Tashiro, Kazuo Takayama, Kazuo Ohashi, **Kenji Kawabata**, Masashi Tachibana, Fuminori Sakurai, Miho Kusuda Furue, Hiroyuki Mizuguchi. Type I collagen promotes hepatic maturation from human pluripotent stem cells in 3D co-culture with Swiss 3T3 cell sheet. , International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June, 2012

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

川寄敏祐、川寄伸子、古江美保、**川端健二**
標的細胞障害活性を有する iPS/ES 細胞特

異的抗体及びその用途

出願番号：特願 2012-280259

出願日：平成 24 年 12 月 21 日

2. 実用新案登録

3. その他

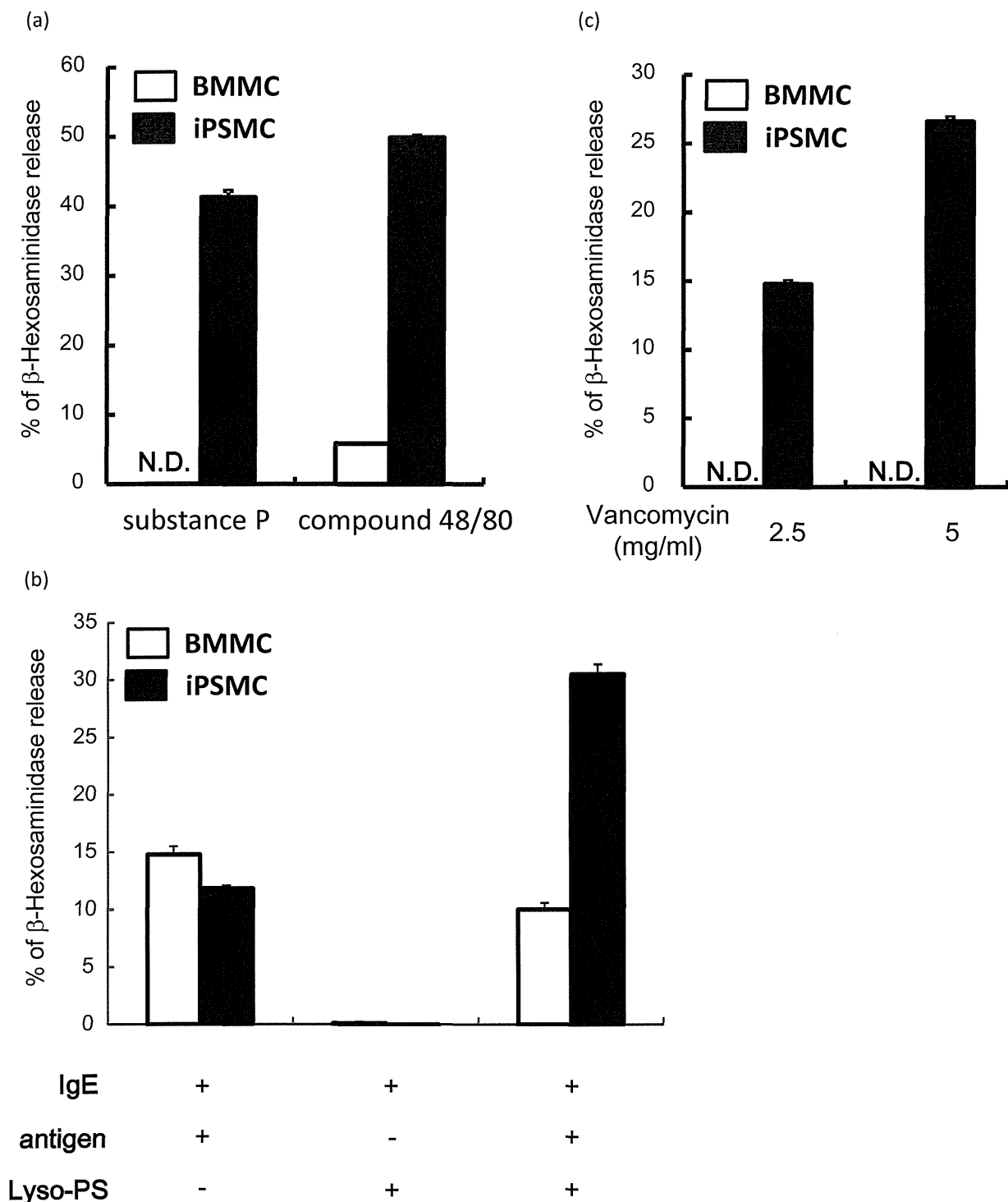


Figure 1 β -hexosaminidase release from iPSMCs after stimulation with IgE/antigen, compound 48/80, substance P, and vancomycin.

(a) The exocytotic response was determined by measuring the release of b-hexosaminidase. BMMCs (open bar) and the iPSMCs that were co-cultured with OP9 cells (closed bar) were sensitized with anti-DNP IgE and stimulated with DNP-HSA in the presence or absence of Lyso-PS as described in the Materials and Methods. b-hexosaminidase enzymatic activity was measured in supernatants and cell pellets solubilized with 0.5% Triton X-100 in HEPES buffer. (b) BMMCs (open bar) and the iPSMCs that were co-cultured with OP9 cells (closed bar) were stimulated with compound 48/80 or substance P. (c) BMMCs (open bar) and the iPSMCs that were co-cultured with OP9 cells (closed bar) were stimulated with vancomycin. All data represent the means $\pm$ S.D. (n=3).

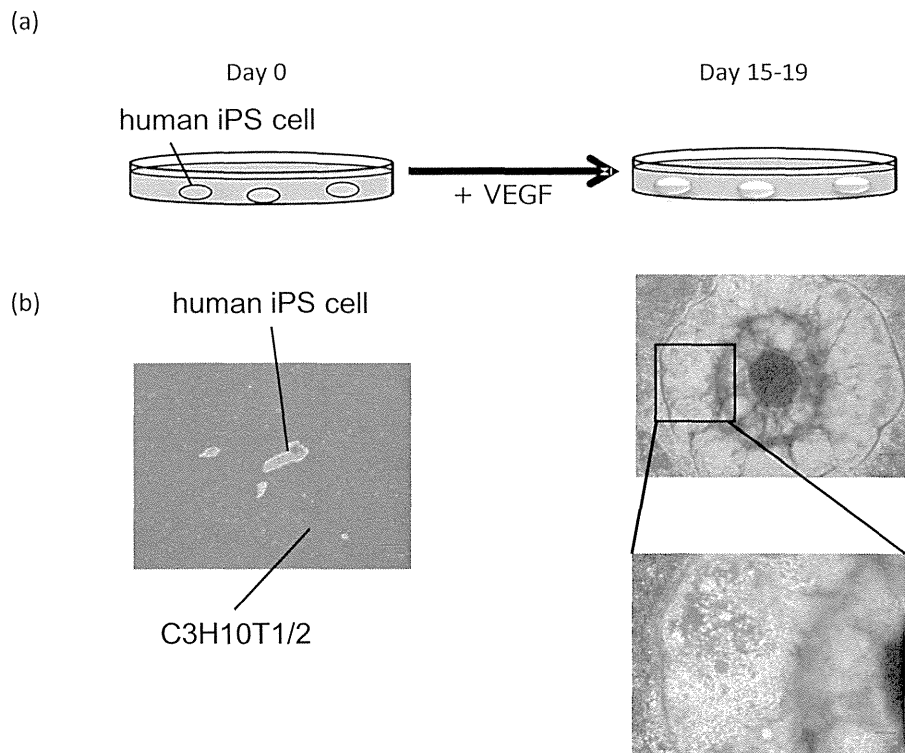


Figure 2 Human iPS cell (iPSCs)-derived sac-like structure.

(a) Experimental protocol. (b) Photomicrographs showing undifferentiated human iPSCs (day 0) and differentiated stages on C3H10T1/2 cells (days 16).

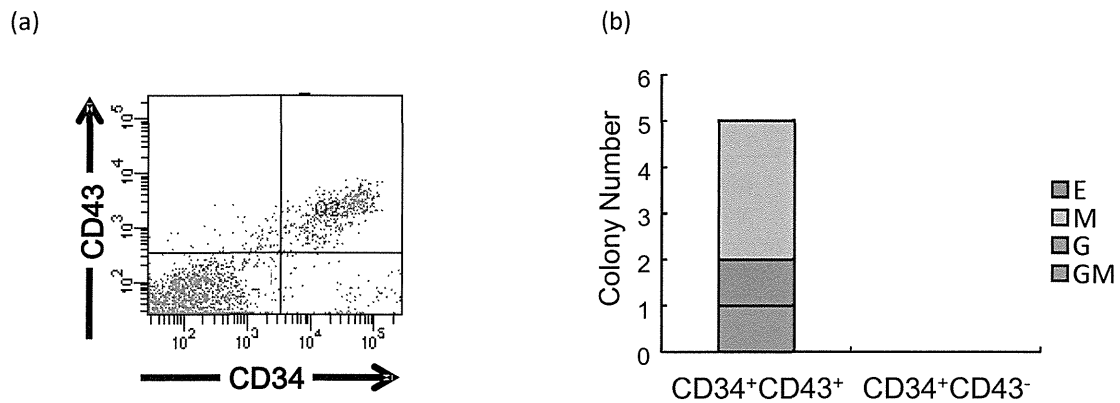


Figure 3 Hematopoietic progenitor differentiation of human iPSCs by co-culture method. (a) Flow cytometric analysis of human iPSC-derived cells on day 16. (b) Sorted CD34⁺CD43⁺ cells or CD34⁺CD43⁻ cells were subjected to CFU-C assay. E, M, G, and GM stand for colony containing erythroid cells, monocytes, granulocytes, and granulocytes and monocytes, respectively.

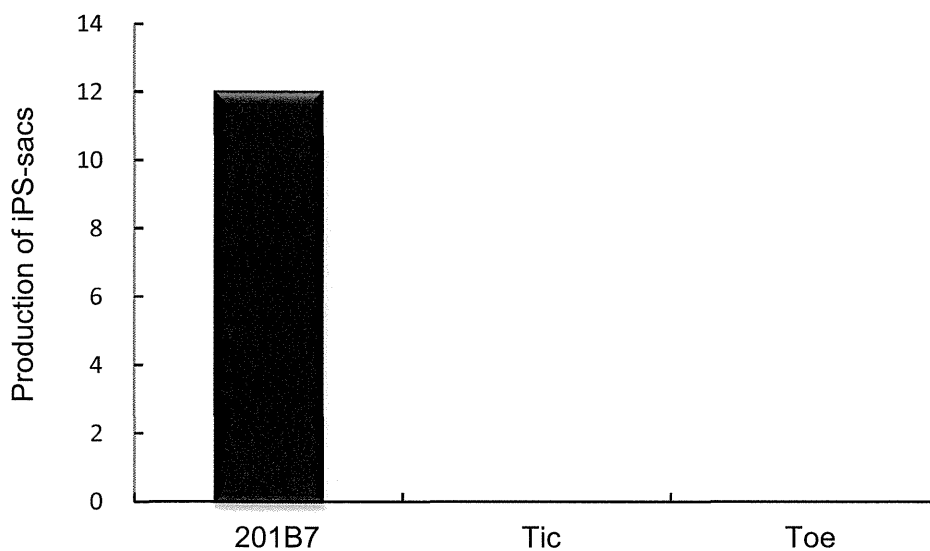


Figure 4 Human iPS cell-derived sac-like structure. (a) Experimental protocol. (b) Photomicro- graphs showing undifferentiated human iPS cells (day 0) and differentiated stages on C3H10T1/2 cells (days 16).

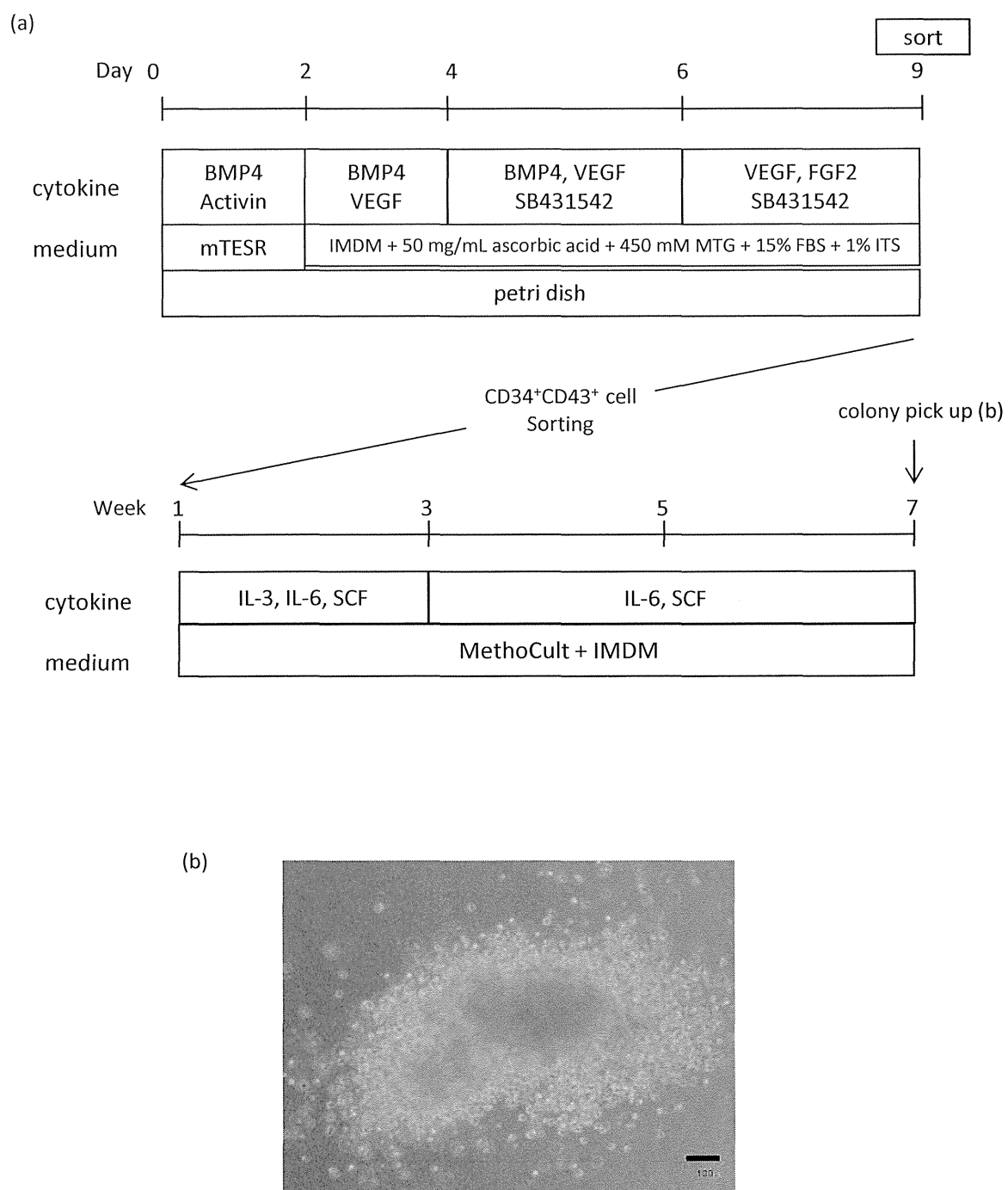


Figure 5 Differentiation of mast cell cells from human iPS cell-derived hematopoietic progenitors. (a) Schema of the culture protocol for generation of human iPS derived-mast cells. (b) A typical mast cell colony grown at 6 weeks of culture from iPS-derived CD34⁺CD43⁺ hematopoietic progenitor cells (week 7).

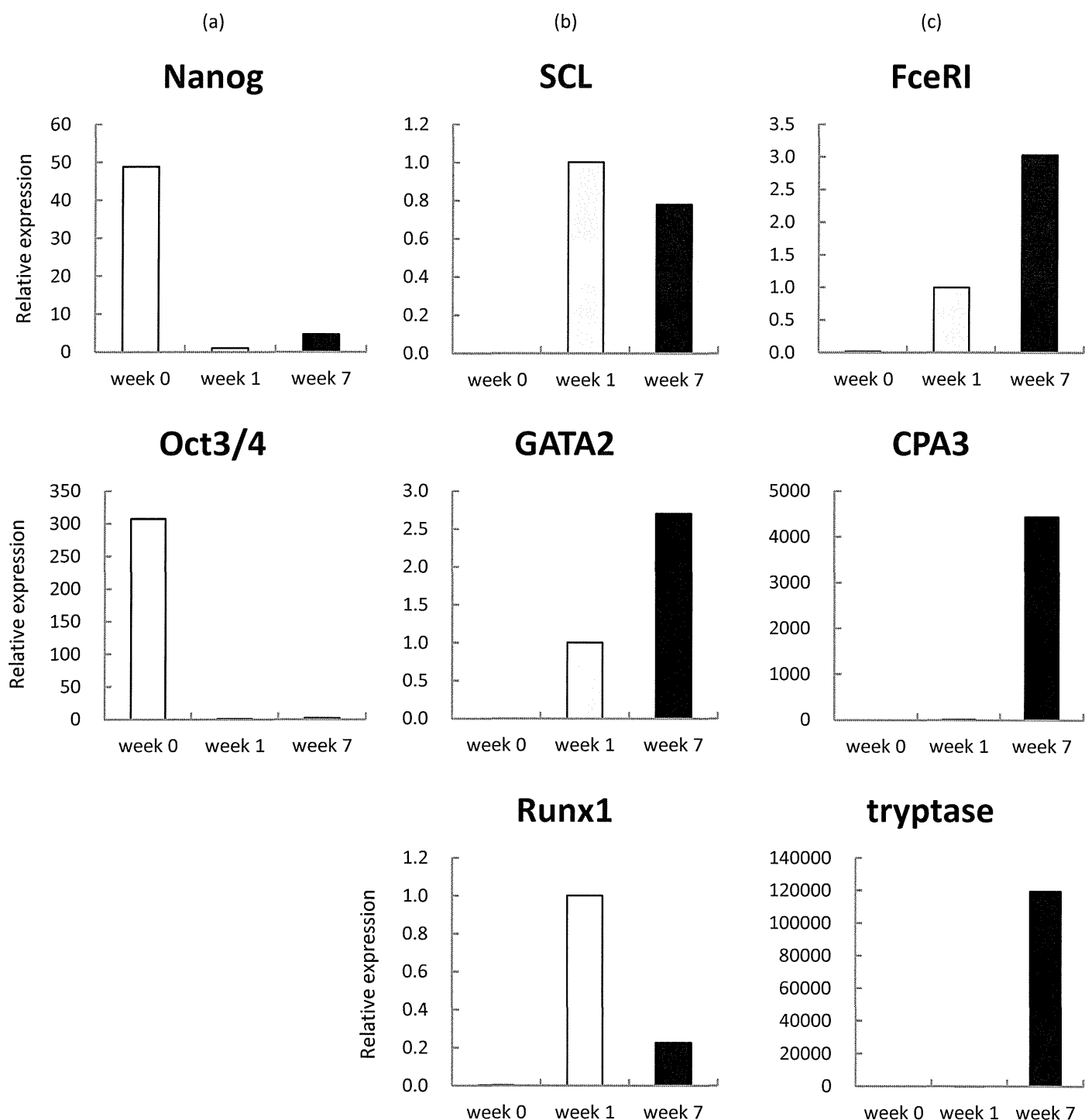


Figure 6 Characterization of human iPS-derived CD34⁺CD43⁺ cells and iPS-derived mast cell-like cells. The gene expression levels of (a) pluripotent marker genes (such as NANOG and Oct3/4), (b) hematopoietic marker genes (such as SCL, GATA2, and RUNX1), and (c) mast cell marker genes (such as FcεRI, CPA3, and tryptase) were examined by real-time PCR in undifferentiated iPS cells (week 0), iPS-derived CD34⁺CD43⁺ cells (week 1), and iPS-derived mast cell-like cells (week 7). Bars represent standard deviation of the mean of three independent experiments. The expression levels of iPS-derived CD34⁺CD43⁺ cells were defined 1.0.

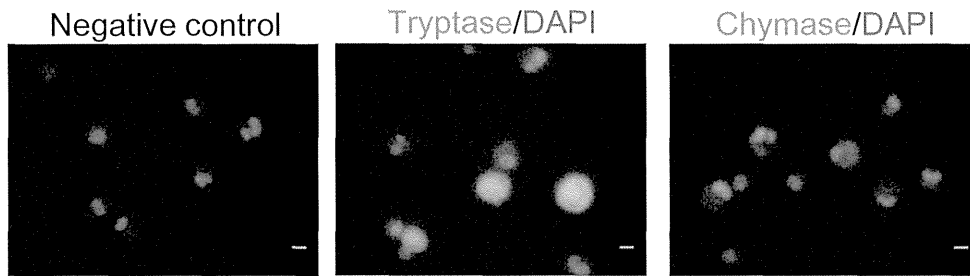


Figure 7 Phenotype of mast cell-like cells from human iPS cells by methylcellulose culture. Cytoentrifuged preparations of iPS-derived mast cells were stained with anti-tryptase antibody and anti-chymase antibody.

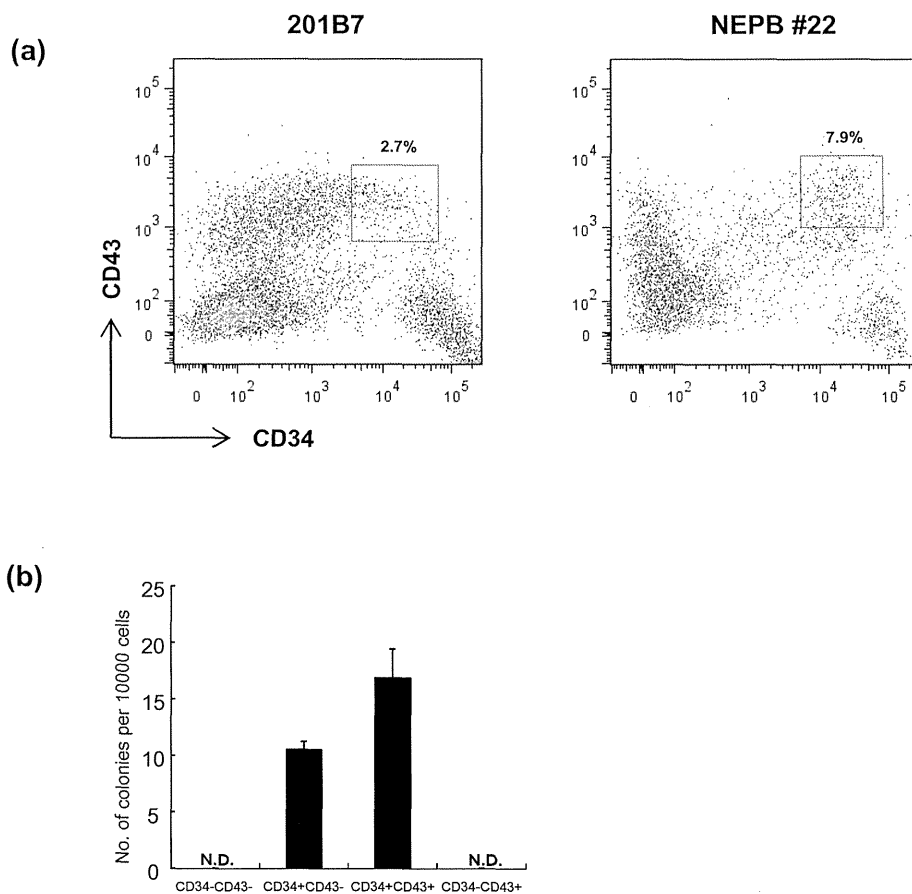


Figure 8 Differentiation of mast cell-like cells from human iPSCs.

(a) The proportion of CD34⁺CD43⁺ cells in human iPS cell-derived EB cells was examined by flow cytometry. (b) The number of mast cell-like colony from iPS cell-derived CD34⁻CD43⁻, CD34⁺CD43⁻, CD34⁺CD43⁺, and CD34⁻CD43⁺ cells.

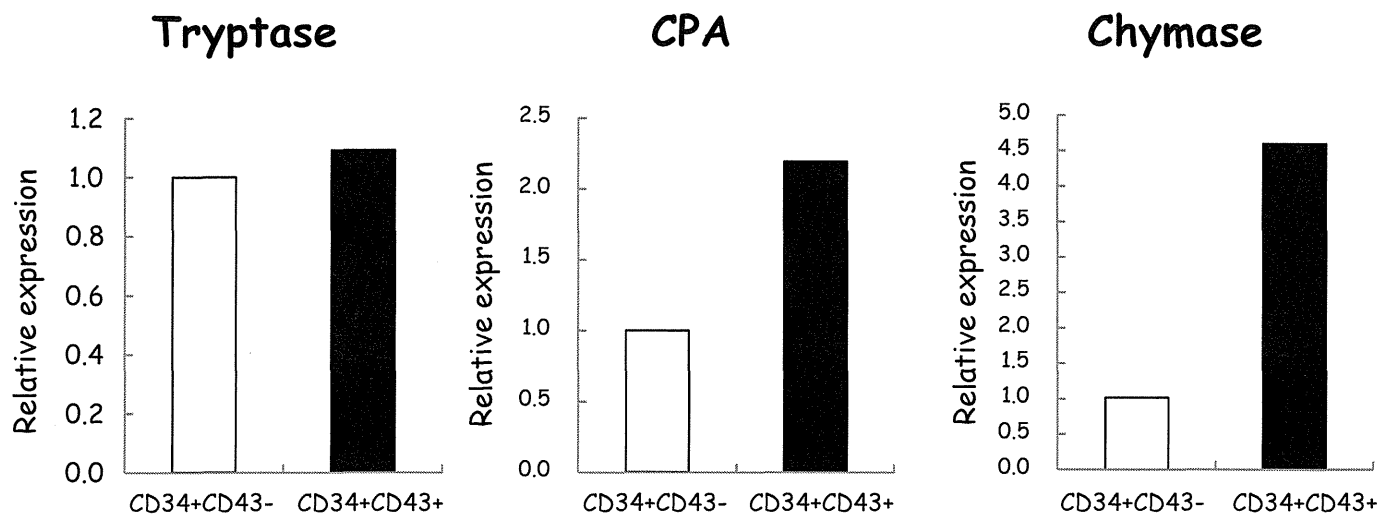


Figure 9 Characterization of CD34+-derived mast cells. The expression of tryptase, CPA and chymase mRNA was examined in CD34+CD43- -derived mast cells and CD34+CD43+ -derived mast cells by qRT-PCR analysis.

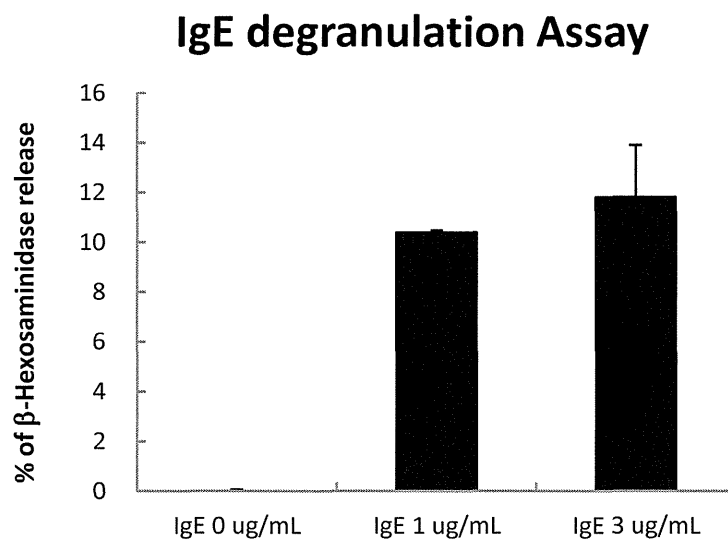


Figure 10 β-hexosaminidase release from iPS cell-derived mast cells after stimulation with IgE. The exocytotic response was determined by measuring the release of b-hexosaminidase. iPS cell-derived mast cells were sensitized with IgE and stimulation with anti-IgE antibody. B-hexosaminidase enzymatic activity was measured in supernatants and cell pellets solubilized with 0.5% Triton X-100 in HEPES buffer.

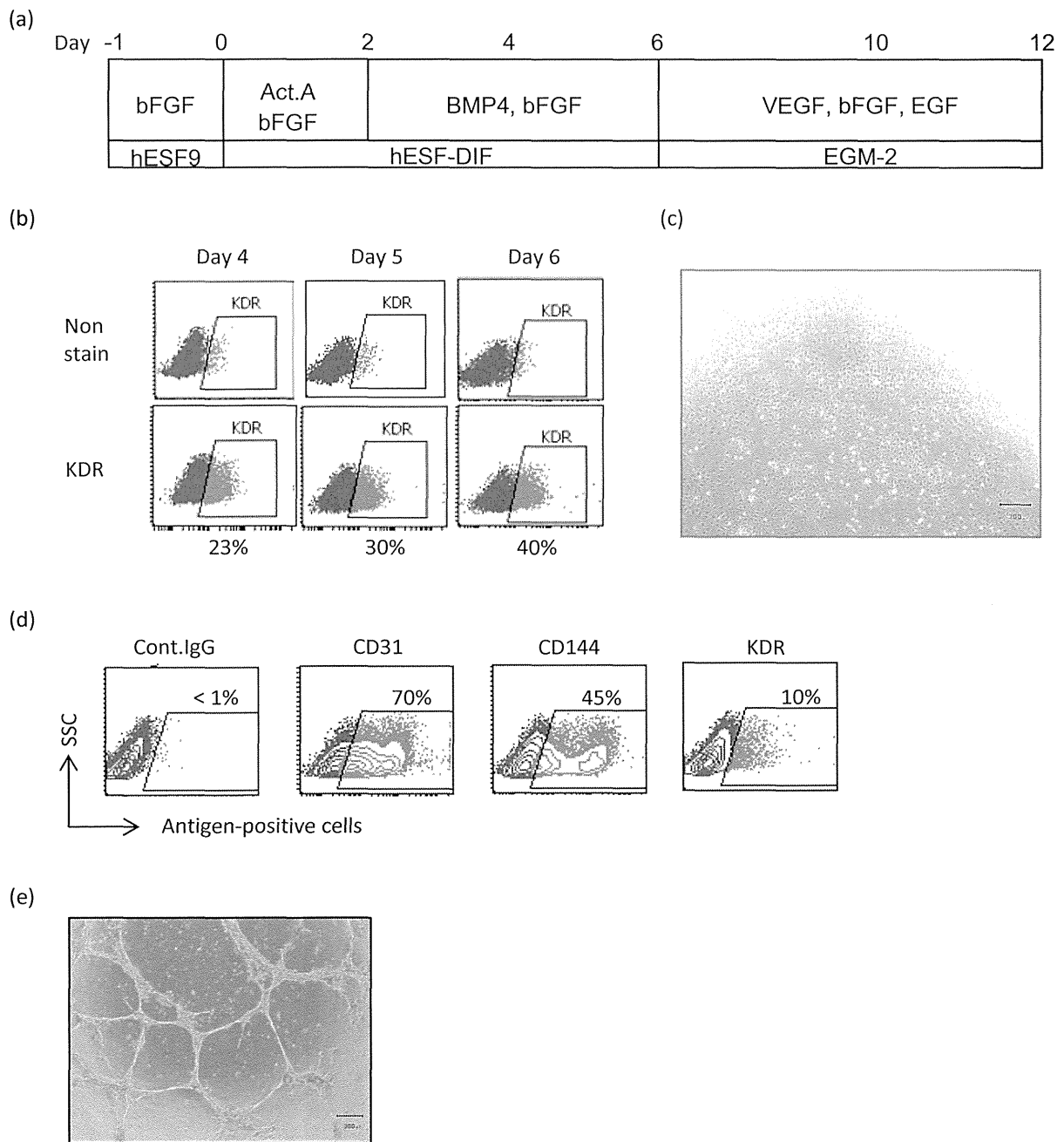


Figure 11 Endothelial differentiation of human iPSCs by monolayer culture. (a) Experimental protocol. (b) KDR-expressing cells in human iPSC (Tic)-derived cells were analyzed by flow cytometry. (c) Morphology of iPS cell-derived cells on day 8. Scale bar indicates 300 μm . (d) Flow cytometric analysis of human iPSC (Tic)-derived cells on day 12. (e) Tic-derived cells onto Matrigel led to vascular tube formation. Scale bar indicates 100 μm .

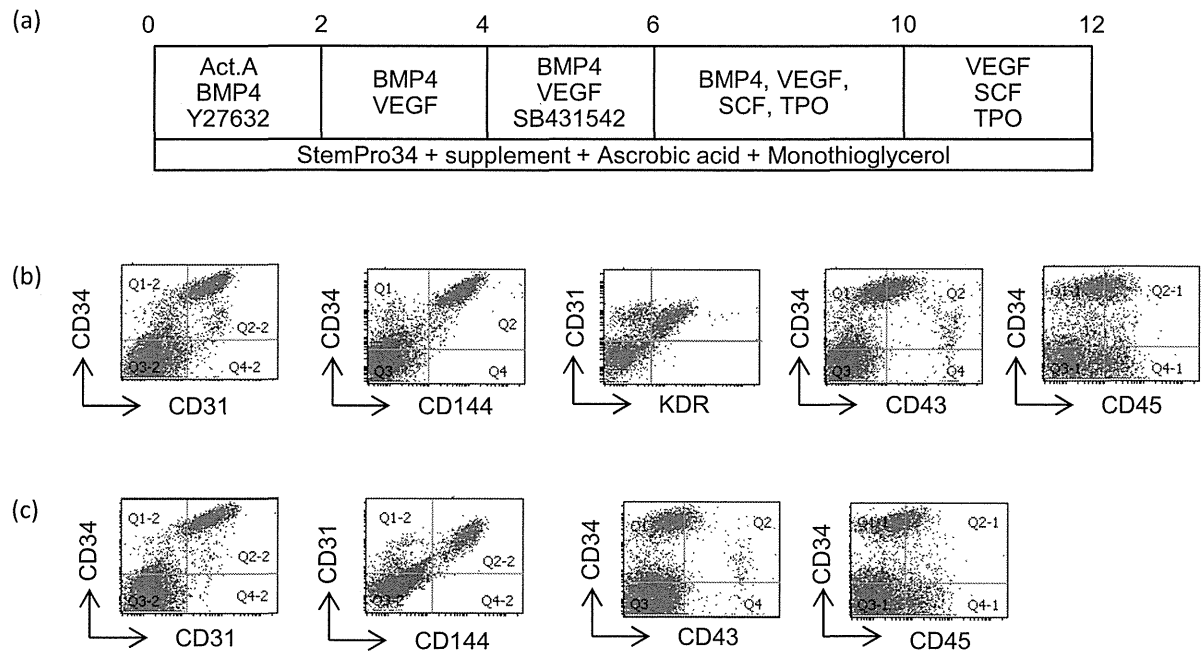


Figure 12 Endothelial differentiation of human iPSCs by EB formation.

(a) Experimental protocol. (b, c) Flow cytometric analysis of Tic (b)- or 201B7 (c)-derived cells on day 8.