

系統のみであった。ノックアウトマウスと異なり、過剰発現コンストラクトの場合には導入遺伝子がゲノム上に組み込まれても発現する確率は2-3割であるから、7分の1という確率は妥当であると言える。この系統のヘミ接合体はEGFP蛍光によって容易に遺伝子型判定が可能で、また、外見上正常に生育し、体外受精効率においても親系統のHHBと全く同様であるので、今後のヒト肝細胞移植研究に大いに貢献すると期待される。

また、SCCDコンストラクトのように、発現したものが細胞死を起こす系では、発現が失われた細胞が増殖する危険が常に存在する。今回、Fah欠損マウスの樹立にも成功したので、SCCDをFah欠損バックグラウンドにすることにより、より高率でヒト肝細胞置換ができるかどうかを検討する。

Hhex欠損マウスも予定通りに樹立に成功した。キメラマウス作製の際には、ヘテロ接合体同士の体外受精で得られた胚を用いる必要があり、しかもその中でホモ接合体である確率は4分の1であるから、かなり多くの胚を凍結する必要がある。今後、体外受精でヘテロ接合体の数を増やし、キメラマウス作製に用いるモルラ胚での凍結を行う予定である。

HHBマウスでは、低い繁殖効率が問題であったが、精子表面よりコレステロール分子を引き抜く活性の高い精子前培養液(FIRTIUP)と卵子の透明帯を薄くする効果のある体外受精用培地(CARD medium)を用いた体外受精により、高い受精率を得ることが出来た。本研究では、ヒト肝細胞のレシピエントマウス供給や、チンパンジーiPSとのキメラマウス作製のレシピエント胚供給のために、計画的かつ大量に胚を得る必要があり、市販されていないHHBマウスでそれを行うためには、体外受精と胚凍結による計画的マウス生産体制の構築が必須であった。今後は、樹立できた系統を用いて体外受精を繰り返し、保存凍結胚の数を増やし、移植やキメラマウス作製の実験計画に応じて、マウスや胚を供給できるようにする。

## E. 結論

HHBマウスから樹立したES細胞を用い、肝細胞を欠失させるためのコンストラクトであるSCCDを導入したトランスジェニックマウス系統の樹立、Fah遺伝子欠損マウスの樹立に成功した。また、肝細胞を欠損するマウスであるHhex遺伝子欠損マウスの作出にも成功した。さらに、これらのマウス系統を体外受精で計画的に増殖させる体制も確立した。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

(1) Nakagawa, Y., Yamamoto, T., Suzuki, K., Araki, K., Takeda, N., Ohmuraya, M. and Sakuma, T. Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice. *Exp. Anim.* 63: 79-84, 2014.

### 2. 学会発表

(1) 荒木喜美, 牟田真由美, 仙波 圭, 竹田直樹, 仁木大輔, 松本 健, 武田伊世, 山村研一, 大村谷昌樹, 荒木正健: CRISPR/Cas9による2本鎖切断・1本鎖切断を利用した場合のマウスES細胞における相同組換え効率の比較, 第37回日本分子生物学会年会, 2014. 11. 25-11. 27, 神奈川県(パシフィコ横浜)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

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

チンパンジー由来 iPS 細胞の樹立、解析とナイーブ化

研究分担者 江良 択実 熊本大学発生医学研究所 教授  
研究協力者 明里 宏文 京都大学霊長類研究所 教授

研究要旨

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚由来線維芽細胞や末梢血液細胞に 4 つの初期化因子 (Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc) を発現させることで容易に作製できる。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を作り出す能力を有する。加えて、マウス iPS 細胞の場合、胚への移植によってすべての組織に分化することができる。本研究では、キメラマウスの中で肝臓細胞をチンパンジー細胞へ置換し B 型肝炎モデルを樹立することを全体の目的とする。この全体の目的達成のために本分担研究では、チンパンジー由来 iPS (ciPS) 細胞を樹立する。樹立には、国内で開発されたセンダイウイルスベクターを用いる。この方法では、iPS 細胞作製に用いる初期化因子が染色体に組み込まれないために、外来因子に依存しない iPS 細胞を作製できる。平成 26 年度は、新型ベクターによりチンパンジーの血液細胞から ciPS 細胞を樹立するとともに、その起源や網羅的遺伝子発現について解析を行なった。さらに、ヒト HLA コンストラクトを導入する条件を検討して至適条件を確立し、このコンストラクトの導入を行った。キメラ化するには iPS 細胞のナイーブ化が必要である。その条件についても検討を行なった。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) 保有者は国内に 150 万人程度と言われ、5-10% が肝炎を発症し、肝硬変、肝臓に進行する。インターフェロンの投与での中和抗体獲得例が全例ではないこと、核酸アナログ製剤の長期投与後に薬剤耐性ウイルスの出現と肝炎の再燃が起こること、が問題となっている。かかる状況において、HBV 肝疾患の病態の解明と新規治療法の確立を目指すために、HBV 感染可能な小動物 (マウス等)、特に免疫応答が正常な感染マウスモデルの開発が必要である。

本研究では、HBV が感染可能で正常の免疫応答を持つマウスを作成することを全体の目的とする。HBV はヒト以外ではチンパンジーに感染する。そこで、マウスの中で肝臓細胞をチンパンジー細胞へ免疫状態が正常な状態で置換できれば、HBV 感染可能で正常な免疫応答を持つマウスを作成することができる。

一方、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、皮膚由

来線維芽細胞や末梢血液細胞に 4 つの初期化因子 (Sox2, KLF4, Oct3/4, cMyc) を発現させて作製する。この細胞は試験管内で容易に増幅可能であり、さまざまな細胞を誘導し作り出すことができる。加えて、マウス iPS 細胞の場合、胚への移植後、体内すべての組織へ分化することができる。そこでチンパンジーから iPS 細胞を樹立し、肝臓欠失マウスとのキメラマウスを作成すれば、肝臓細胞をチンパンジー細胞へ置換したマウスが作成可能であることが予想される。平成 26 年度は、チンパンジーの血液細胞から樹立した ciPS 細胞についてその起源や遺伝子発現についての解析を行なう。さらにヒト HLA コンストラクトを導入する条件を検討し、コンストラクトを導入する。また、ナイーブ化についても条件検討を行なう。

一方、チンパンジーの血液からの iPS 細胞の樹立では従来のセンダイウイルスベクターでは、著しく作成効率が悪く樹立が困難であったために新たなセンダイウイルスベクターについても開発を

行う。

## B. 研究方法

1. 新型センダイウイルスベクター (SeV) の開発  
体細胞から iPS 細胞の誘導効率を向上させ、樹立早期にウイルス除去を可能とする SeV を開発するために、Sox2、KLF4、Oct3/4 の初期化因子が1つのウイルスベクター上にタンデムに並んだベクターを作成する。このベクターを用いて、ヒト線維芽細胞や血液細胞からの iPS 細胞の誘導効率やウイルスの除去率等を調べる。さらにチンパンジー血液からの作成を行なう。

### 2. 樹立した ciPS 細胞の解析

#### (1) ciPS 細胞の起源の解析

樹立した ciPS 細胞を、試験管内にて増殖させゲノム DNA を抽出する。抽出した DNA を制限酵素にて処理した後、電気泳動を行なう。電気泳動後のゲルをナイロンメンブレンにトランスファー後、T リンパ球受容体 (TCR) のプローブにてサザンブロッティングを行い、TCR 遺伝子の再構成の解析を行なう。

#### (2) ciPS 細胞の網羅的発現遺伝子の解析

ciPS 細胞から RNA を抽出後、DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子の網羅的解析を行なう。

### 2. 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  $\alpha 1-\alpha 2$  と、マウス MHC H2-D<sup>b</sup> の  $\alpha 3$  domain を融合した遺伝子)を導入する。導入後ハイグロマイシンによるセレクションを行なうためのハイグロマイシン濃度決定を行うため様々な濃度で iPS 細胞の維持培養を行う。

### 3. 樹立した iPS 細胞のナイーブ化

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。この作業をナイーブ化と呼ぶ。平成 25, 26 年度に発表された方法(Nature, 504: 282-286, 2013; Cell, 158: 1254-1269, 2014)を参考にナイーブ化の条件を検討する。

(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錠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。

#### 4) 利益相反について

本研究での利益相反関連事項はない。

## C. 研究結果

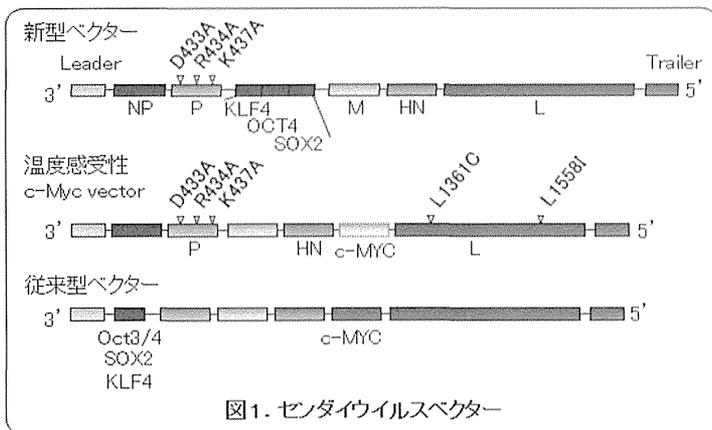


図1. センダイウイルスベクター

### 1. 新型ベクターの開発

Sox2、KLF4、Oct3/4 の3つの初期化因子をタンデムにつないだ新型センダイウイルスベクターを作成した (図1)。従来型ベクターと温度感受性

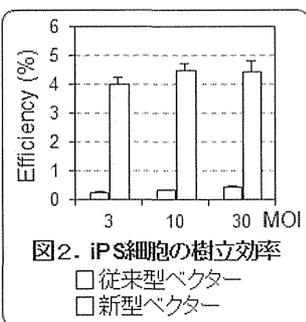


図2. iPS細胞の樹立効率  
□従来型ベクター  
■新型ベクター

c-MYCベクターおよびこの新型ベクターと温度感受性 c-MYCベクターのそれぞれの組合せで、正常ヒト線維芽細胞から iPS 細胞を作製すると、前者ではせいぜい0.5%程度であるが、後者では4%という高効率で iPS 細胞を作製することができた (図2)。このベクターは温度感受性があるミュータントで38度では増殖できない。そこでコロニーを分離後すぐに培養温度を37度から38度に変更し、5日間培養し、ウイルス除去率を調べた。これまでのベクターではほとんど除去できない場合でも、80%以上の高い割合でウイルスを除去することができた (表1)。

	Time of temperature shift	
	Passage 1	Passage 2
Conventional vector	0/22 (0%)	0/22 (0%)
TS12KOS vector	19/23 (84.7%)	15/23 (65.2%)

表1. SeVの除去率

### 2. 樹立した iPS 細胞の特徴

### (1) ciPS 細胞の起源

ciPS 細胞の由来細胞を明らかにするために T リンパ球レセプター (TCR) の再構成を調べた。TCR 遺伝子に特異なプローブを用いたサザンブロット解析では、樹立したすべての ciPS 細胞で再構成バンドが検出された (図3)。したがって樹立した ciPS 細胞はすべて末梢血液に存在する T リンパ球由来であることが明らかとなった。

### (2) ciPS 細胞の網羅的発現遺伝子解析

ciPS 細胞の細胞生物学的特徴をより深く解析するために、DNA マイクロアレイを使って網羅的な発現遺伝子の解析を行った。ciPS 細胞は、Principle Component Analysis (PCA) において、ヒトの ES 細胞、ヒト iPS 細胞のデータの近傍にマッピングされた。クラスター解析においてもヒトの ES 細胞、iPS 細胞と同じクラスターに分けられた。以上のことから、ciPS 細胞株の遺伝子発現パターンはヒトの ES 細胞や iPS 細胞株のパターンと類似していることが示唆された。これは、作成した細胞がヒトの ES 細胞や iPS 細胞に近い、すなわちプライムタイプの多能性幹細胞 (胚の epiblast に類似する細胞) であることを示唆している。

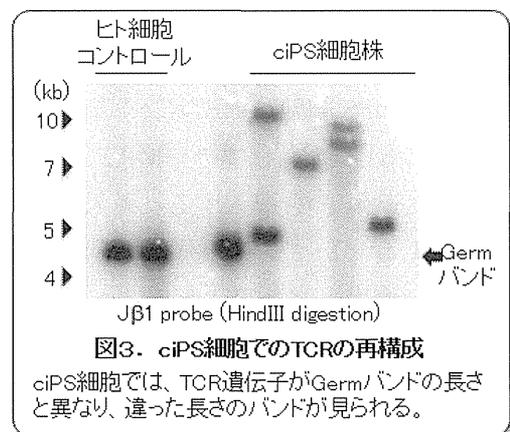


図3. ciPS細胞でのTCRの再構成

ciPS細胞では、TCR遺伝子がGermバンドの長さとは異なり、違った長さのバンドが見られる。

### 3. 樹立した ciPS 細胞への遺伝子導入

平成25年度にヒト HHD 遺伝子導入のために決定したハイグロマイシン濃度は1μg/ml以上の濃度であった。そこでエレクトロポレーション法にて、ヒト HHD 遺伝子を導入した ciPS 細胞をハイグロマイシン10μg/mlにて培養し、20個以上の ciPS

細胞コロニーをピックアップした。ピックアップした ciPS 細胞を増幅後、ゲノム DNA を抽出し、導入した遺伝子を特異的に認識するプライマーを用いて PCR を行った。その結果、6 個のクローンにおいて HHD 遺伝子が導入されていることが確認された。

#### 4. ciPS 細胞のナイーブ化

効率よくキメラマウスを作製するためには、ciPS 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。平成 25 年度に発表された方法(Nature, 504:282-286, 2013)を数回施行したが、全く ciPS 細胞コロニーを得ることができなかった。そこで、この方法によるナイーブ化をあきらめて、平成 26 年度 Cell 誌に報告された Takashima らの方法(Cell, 158: 1254-1269, 2014) の追試を行なっている。現在、Nanog と Klf2 の cDNA を ciPS 細胞に導入してコロニーの形態を観察中であるが、通常のプライム型のコロニー形態がこれらの遺伝子導入によってより未分化なコロニータイプに変化しているのが観察された (図 4)。この方法によるナイーブ化を引き続き行なっていく予定である。

#### D. 考察

線維芽細胞樹立のためには生検が必要であり、コロニーが肉眼で確認でき、ピックアップできるまでに約 1 ヶ月かかる。従来型の SeV では、そこからウイルス除去までさらに 3 か月程度を要していたが、新型ではコロニーピックアップ直後に 80%以上のコロニーでウイルスが除去される。これは、従来型は Myc のみが温度感受性ウイルスであったが、新型では 1 つの温度感受性ウイルスに 3 つの初期化因子を挿入したためと考えられる。さらにこのベクターを用いると血液細胞からも容易に iPS 細胞の樹立が可能である。血液細胞由来の細胞を iPS 細胞作製のソースとすることで、ヒトの場合、皮膚生検を行わずに末梢血液で iPS 細胞作製が可能となるために安全かつ容易に行える。

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 細胞樹立を樹立した。この ciPS 細胞は、予想通り末梢 T リンパ球由来であることがサザンブロット法にて確認できた。また網羅的な発現遺伝子の結果から、ciPS 細胞はヒトの ES/iPS 細胞らと同じく、プライムタイプの多能性幹細胞であった。そのためによりキメラ作成能力を獲得させるために、ナイーブ化を行なっている。しかしながら、平成 25 年度に発表された方法では全くナイーブ化させることはできなかった。現在、平成 26 年度に発表された方法を試している。

新しく作成したセンダイウイルス・ベクターは、ヒトあるいはヒト類縁の霊長類の末梢血液細胞より 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ケースの iPS 細胞樹立には非常に有用であると考えられる。

#### E. 結論

ヒトあるいはチンパンジーの末梢 T リンパ球から簡単に iPS 細胞を樹立できる新型ベクターを開発した。このベクターを使って樹立した iPS 細胞は末梢 T リンパ球由来で、網羅的遺伝子発現パターンよりプライムタイプの iPS 細胞であった。ナイーブ化は発表された方法どれもが容易に追試できる技術ではなく、その技術の実行に様々なノウハウがあると考えられる。

#### 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

- (1) Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H and Era T. New type of Sendai virusvector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood. PLoS One. 9 :e113052, 2014.

## 2. 学会発表

- (1) Soga M, Hamasaki M, Yoneda K, Nakamura K, Matsuo M, Irie T, Endo F and Era T. Establishment of disease model using induced pluripotent stem cells derived from Niemann-Pick disease type C INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEM CELL RESERCH 12th annual meeting. Vancouver, June 18th, 2014.
- (2) 江良択実 骨・代謝性疾患由来 iPS 細胞を使った疾患モデルと治療薬開発 第 35 回日本炎症・再生医学会年会 教育講演 2014 年 7 月 2 日 沖縄
- (3) 江良択実 iPS 細胞研究の進展 難治性疾患由来 iPS 細胞の樹立、解析とそのバンク化. 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム 疾患 iPS 細胞 2014 年 10 月 15 日京都
- (4) 江良択実 iPS 細胞を使った難病研究 第 27

回日本動物実験代替法学会大会シンポジウム ヒト iPS 細胞を用いた創薬研究の新たな展開 2014 年 12 月 7 日横浜

- (5) 藤江康光、房木ノエミ、片山朋彦、浜崎誠、副島由美、曾我美南、伴浩志、長谷川護、山下賢、木村重美、鈴木沙織、松沢哲郎、明里宏文、江良択実 新型センダイウイルスを用いたチンパンジー血液由来 iPS 細胞の作製 第 14 回日本再生医療学会総会 一般口演 2015 年 3 月 21 日 横浜

## 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

HBV 感染・肝炎モデルの樹立

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  
研究協力者 藤江里美 熊本大学大学院生命科学研究部消化器内科学分野 大学院1年

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。マウス開発に先行してiPS由来肝芽様細胞がHBV感染能を備えていることを確認した。また、キメラマウスを用いたHBV感染実験に必要なHBV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た感染成立および肝炎発症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。なかでもキャリア患者からのHBV再活性化やHBV感染既往患者から免疫抑制時に発症する*de novo* B型肝炎については研究が進んでいない。HBV再活性化の解析には免疫機能は破綻していないことが必要であるが、その解析に適した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るHBV-cccDNAの再活性化の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、転写活性の調節にはエピジェネティクスの関与が考えられる。

その中でCCCTC-binding factor (CTCF)はエピジェネティックな要因の1つであるクロマチン

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)。また、HBV と同様に逆転写酵素を用いる他のウイルスにおいても CTCF がヒトへの感染様式に関与することを現在報告中であり (佐藤らと共同研究、in revise)、HBV においてもその生活環に CTCF が関与する可能性は十分にある。加えて、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、その形態からも転写活性の調節に 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 感染による急性肝炎、慢性肝炎のみならず、キャリア再活性化、*de novo* B 型肝炎など、想定するすべての病態を再現しうるマウスが開発される予定である。これにより慢性肝炎の再活性化、*de novo* B 型肝炎発症などの、免疫不全マウスや培養細胞系のみでは解析しえなかったメカニズムの解析が可能となる。得られた結果に基づき HBV-cccDNA の排除を目指す新たな創薬に寄与する。

こ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、並びにそれを用い 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 26 年度は (1) 報告例を基に、作製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の検討、(2) キメラマウス完成後に HBV 解析に必要となる実験系の確立、(3) キメラマウス作製に先行し、iPS 細胞から分化させた肝細胞に HBV が感染可能かどうかの検証、(4) 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う。

## C. 研究結果

### (1) 完成したキメラマウスに対する感染のシミュレーション

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 $\mu$ 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マウス 1 体当たり  $1 \times 10^5 \sim 10^6$  copy の投与で感染が成立しうると考えられる。

### (2) HBV 感染の確認法、慢性肝炎等各肝炎モデルの診断

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する。具体的には、マウス血清を用いて、ELISA 法による HBs の定量、qPCR 法による HBV-DNA の定量によりその判定を行う。なお、肝炎の各病態の判断は血清学的検査に基づき、実臨床で実際に行っているため、十分に習熟している。

### (3) 感染実験を行うための HBV および感染細胞の準備

本研究課題のマウス作製に先行して、実際に肝臓置換に用いる予定の iPS 由来肝芽様細胞に HBV が感染しうるか解析した。これには HBV に luciferase 遺伝子を組み込んだ HBV-NL 株 (下遠野先生より供与) を用いた。その結果、iPS 由来肝芽様細胞は HBV 感染能を備えていることが確認された (図 1)。

さらに iPS 由来肝芽様細胞には HBV の感染に必要な taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) が発現することが確認された。

### (4) HBV 転写制御に関与するエピジェネティックメカニズムの解析

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 の結合配列が存在する

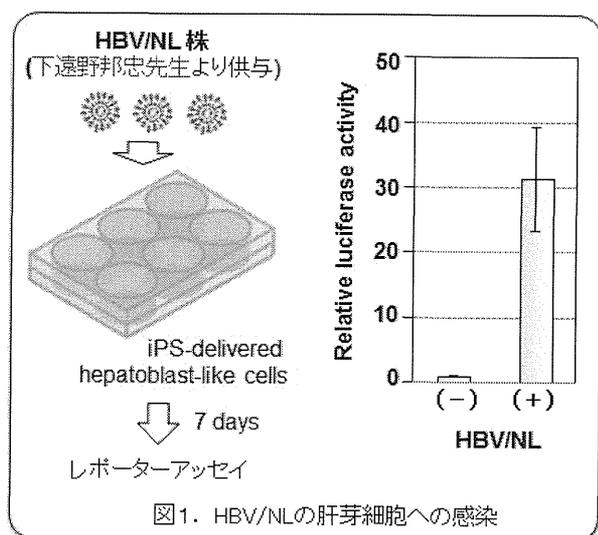


図1. HBV/NLの肝芽細胞への感染

こと、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 CTCF 以外のエピジェネティクス因子の関連を調べるため、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) 感染実験のための HBV 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、プロファイルが十分に解析された HBV 株を用いる。

(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) iPS 由来肝芽様細胞に HBV が感染することを確認した。これは本研究のキメラマウスが完成し

た際のヒト由来肝臓に HBV が感染しうることを担保するものであり、本研究における意義は大きい。

(4) 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検討している。

#### 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。iPS由来肝芽細胞に HBV が感染することを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Nagaoka, K., Hino, S., Sakamoto, A., Anan, K., Takase, R., Umehara, T., Yokoyama, S., Sasaki, Y. and Nakao, M. Lysine-Specific Demethylase 2 Suppresses Lipid Influx and Metabolism in Hepatic Cells. *Mol. Cell Biol.* 35: 1068-1080, 2015.

##### 2. 学会発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

### III. 研究成果の刊行一覧

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
Yamazoe, T., <u>Shiraki, N.</u> and Kume, S.	Hepatic differentiation from murine and human iPS cells using nanofiber scaffolds	Methods Mol. Biol.	Nov. 20		2014
<u>Shiraki, N.</u> , Shiraki, Y., Tsuyama, T., Obata, F., Miura, M., Nagae, G., Aburatani, H., Kume, K., Endo, F. and Kume, S.	Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells.	Cell Metab.	19	780-794	2014
Mu, Y., Jin, S., Shen, J., Sugano, A., Takaoka, Y., Qiang, L., Imbimbo, B. P., <u>Yamamura, K.</u> and Li, Z.	CHF5074 (CSP-1103) stabilizes human transthyretin in mice humanized at the transthyretin and retinol-binding protein loci.	FEBS letters	589	849-856	2015
Nakagawa, Y., Yamamoto, T., Suzuki, K., <u>Araki, K.</u> , Takeda, N., Ohmuraya, M. and Sakuma, T.	Screening methods to identify TALEN-mediated knockout mice	Exp. Anim	63	79-84	2014
Fujie Y, Fusaki N, Katayama T, Hamasaki M, Soejima Y, Soga M, Ban H, Hasegawa M, Yamashita S, Kimura S, Suzuki S, Matsuzawa T, Akari H and <u>Era T.</u>	New type of Sendai virusvector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood.	PLoS One	9	e113052	2014
Nagaoka, K., Hino, S., Sakamoto, A., Anan, K., Takase, R., Umehara, T., Yokoyama, S., <u>Sasaki, Y.</u> and Nakao, M.	Lysine-specific demethylase 2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic Cells.	Mol. Cell. Biol.	35	1068-1080	2015

IV. 研究成果の刊行物・別冊

# Methionine Metabolism Regulates Maintenance and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells

Nobuaki Shiraki,<sup>1,8</sup> Yasuko Shiraki,<sup>2,8</sup> Tomonori Tsuyama,<sup>1,3</sup> Fumiaki Obata,<sup>4,5</sup> Masayuki Miura,<sup>4,5</sup> Genta Nagae,<sup>6</sup> Hiroyuki Aburatani,<sup>6</sup> Kazuhiko Kume,<sup>1,7</sup> Fumio Endo,<sup>2,\*</sup> and Shoens Kume<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Stem Cell Biology, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Honjo 2-2-1, Kumamoto 860-0811, Japan

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, Honjo 1-1-1, Kumamoto 860-8556, Japan

<sup>3</sup>Program for Leading Graduate Schools "HIGO," Kumamoto University, Honjo 2-2-1, Kumamoto 860-0811, Japan

<sup>4</sup>Department of Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>5</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075, Japan

<sup>6</sup>Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Komaba 4-6-1, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan

<sup>7</sup>Department of Neuropharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan

<sup>8</sup>Co-first authors

\*Correspondence: fendo@kumamoto-u.ac.jp (F.E.), skume@kumamoto-u.ac.jp (S.K.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.017>

## SUMMARY

Mouse embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) are in a high-flux metabolic state, with a high dependence on threonine catabolism. However, little is known regarding amino acid metabolism in human ESCs/iPSCs. We show that human ESCs/iPSCs require high amounts of methionine (Met) and express high levels of enzymes involved in Met metabolism. Met deprivation results in a rapid decrease in intracellular S-adenosylmethionine (SAM), triggering the activation of p53-p38 signaling, reducing NANOG expression, and poisoning human iPSC/ESCs for differentiation, follow by potentiated differentiation into all three germ layers. However, when exposed to prolonged Met deprivation, the cells undergo apoptosis. We also show that human ESCs/iPSCs have regulatory systems to maintain constant intracellular Met and SAM levels. Our findings show that SAM is a key regulator for maintaining undifferentiated pluripotent stem cells and regulating their differentiation.

## INTRODUCTION

Embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) have an unlimited ability to replicate; they are pluripotent and can give rise to all cell types. ESCs/iPSCs possess a unique transcriptional circuit that sustains the pluripotent state. These cells are in a specific epigenetic state that is ready for rapid cell-fate decisions. Furthermore, various forms of histone methylation allow dynamic regulation of ESC/iPSC pluripotency

and plasticity. ESCs/iPSCs also possess a characteristically high rate of proliferation as well as an abbreviated G1 phase. These unique molecular properties distinguish ESCs and iPSCs from somatic cells (Boheler, 2009).

These unusual features signify that ESCs/iPSCs exist in a specialized metabolic state. ESCs and iPSCs rely specifically on glycolysis (Armstrong et al., 2010; Facucho-Oliveira and St John, 2009), whereas somatic cells utilize mitochondrial oxidative phosphorylation for energy production. This metabolic requirement appears to play a causative role rather than being a consequence of pluripotency acquisition (Folmes et al., 2011). Recent reports have shown that metabolism is tightly linked to cellular signaling, and these two processes reciprocally regulate each other and modulate cell activities such as cell survival, proliferation, and stem cell function (Takubo et al., 2013; Wellen and Thompson, 2012).

Mouse ESCs are in a high-flux metabolic state, with a high dependence on threonine (Thr) catabolism (Alexander et al., 2011; Wang et al., 2009). It was recently reported that Thr metabolism regulates intracellular S-adenosylmethionine (SAM) and histone methylation such that depletion of Thr from the culture medium or knockdown of threonine dehydrogenase (*Tdh*) in mouse ESCs decreases SAM accumulation and trimethylation of histone H3 lysine 4 (H3K4me3), leading to slowed growth and increased differentiation (Shyh-Chang et al., 2013). However, in human cells, *Tdh* is expressed as a nonfunctional pseudogene. Furthermore, little is known regarding amino acid metabolism and its role in human ESCs/iPSCs. These reports highlight the importance of examining the metabolic state of human ESCs/iPSCs, which may improve our understanding of the signaling pathways regulating cell survival, pluripotency maintenance, and differentiation.

Methionine (Met) is an essential amino acid (Finkelstein, 1990). An important metabolite of Met is SAM, which is produced through an intermediate reaction catalyzed by methionine

adenosyltransferase (MAT). There are three major multimeric MAT enzymes: MATI, MATII, and MATIII (Halim et al., 1999). MATI is a tetramer and MATIII is a dimer of the protein encoded by *MAT1A*, whereas MATII is a dimer of the protein encoded by *MAT2A*. SAM is a methyl donor crucial for gene regulation (Lu and Mato, 2008). DNA methylation and protein methylation, including histone methylation, are catalyzed by methyltransferases by using SAM as a methyl donor (Goll and Bestor, 2005; Shi, 2007). S-adenosylhomocysteine (SAH) is generated as a product of transmethylation by methyltransferases such as DNA methyltransferases (DNMTs) and is then converted to homocysteine (Hcy) by SAH hydrolase (AHCY). Hcy is remethylated and converted to Met by 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase (MTR), which requires folate and vitamin B12 or betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) as a methyl donor. Alternatively, Hcy is converted to cystathionine by cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) and then further metabolized to cysteine by cystathionase (CTH). The Met salvage pathway, in which S-methyl-5'-thioadenosine (MTA), a byproduct of polyamine biosynthesis, is enzymatically converted to Met through several enzymatic steps, is also involved in Met metabolism. However, no study yet has focused on the Met salvage pathway in human ESCs/iPSCs.

Here, we show that undifferentiated pluripotent human ESCs/iPSCs are in a high-Met metabolic state that decreased with differentiation. We examined the underlying mechanisms and measured metabolites.

## RESULTS

### Met Deprivation Causes Cell-Cycle Arrest and Impairment of Survival in Pluripotent Human ESCs/iPSCs

We first deprived single amino acids from the culture medium for 48 hr during culture of the undifferentiated human ESC line khES3 (Suemori et al., 2006) and the human iPSC line 201B7 (Takahashi et al., 2007), and we examined their impact on cell survival (Figure 1A). Deprivation of leucine (Leu), lysine (Lys), tryptophan (Trp), or Met resulted in inhibition of cell growth and decreased cell number (Figure 1A). Bright-field microscopy showed cell death when cells were grown in Leu-, Lys-, or Met-deprived conditions (Figure S1 available online). Met deprivation was the most effective growth inhibitor of human pluripotent stem cells; we therefore focused on Met.

When Met concentration in the media was reduced from 120  $\mu$ M to 12  $\mu$ M, self-renewal was reduced in both khES3 and 201B7 cells (Figure 1B). Similar results were observed with other human ESC (khES1) or iPSC (253G1) lines (Figure S1B). Time-dependent studies revealed a significant reduction in cell number (Figure 1C) and self-renewal (Figure 1D) as early as 5 hr after Met deprivation. Apoptosis significantly increased after 24 hr of Met deprivation (Figure 1E), and at 48 hr more than half of the cells were TUNEL-positive (Figure 1E). Apoptosis was also observed with Leu or Lys deprivation in khES3 cells (Figure S1C).

G0/G1 phase arrest, as well as a reduction in the cell population in S and G2/M phases, was observed following prolonged Met deprivation for 24 hr in both khES3 and 201B7 cells (Figure 1F). G0/G1 phase arrest was also observed after Leu and Lys deprivation for 48 hr (Figure S1D).

These results indicate that undifferentiated human ESCs/iPSCs require greater than 25  $\mu$ M Met for maintenance and that deprivation of Met results in growth inhibition, followed by cell-cycle arrest and cell death.

### Rapid Decrease in Intracellular SAM and MTA Levels and Cessation of Hcy Excretion after Met Deprivation

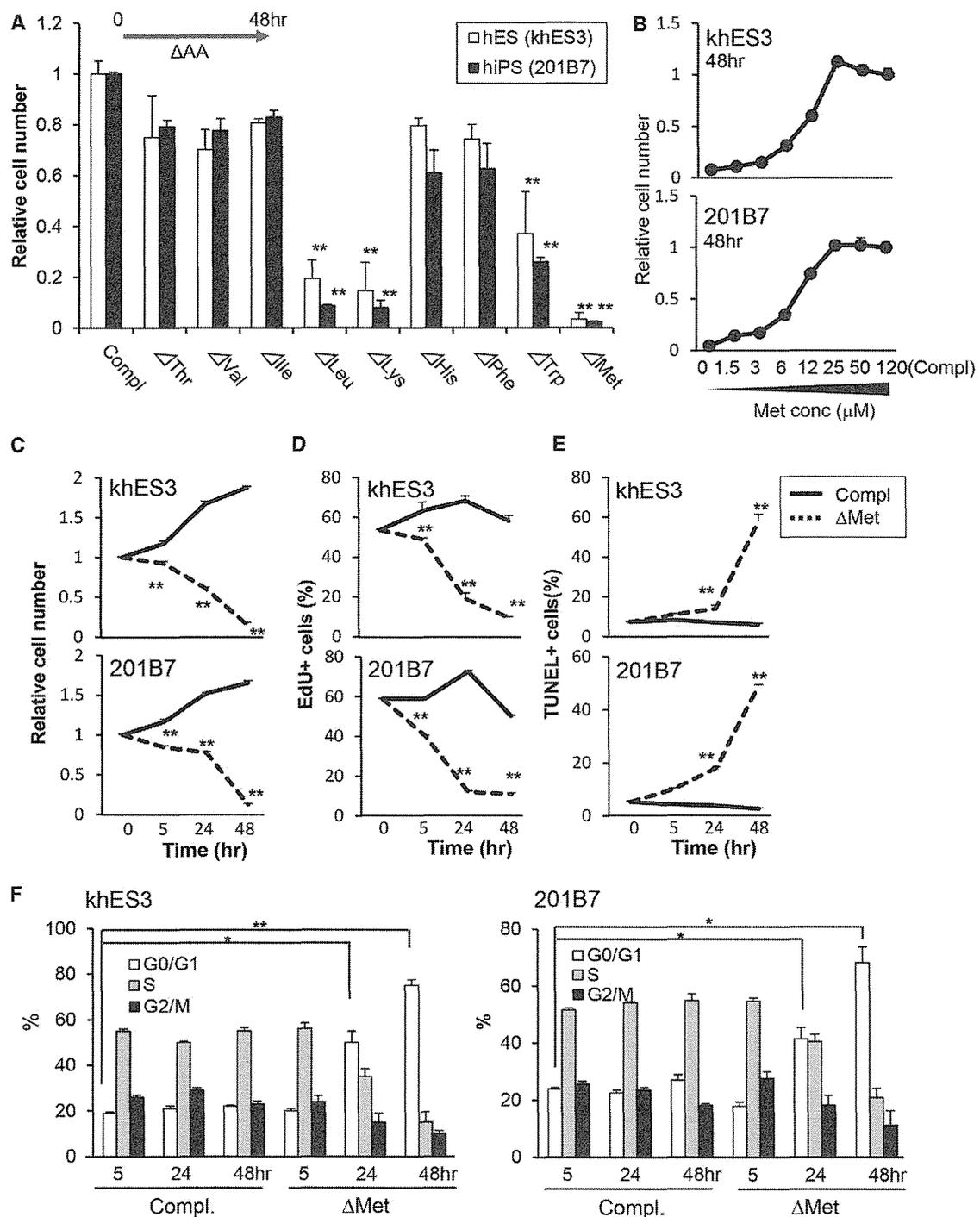
In mouse ESCs, Thr is essential for cell growth, and deprivation of Thr reduces intracellular SAM ([SAM]<sub>i</sub>) levels (Shyh-Chang et al., 2013). To determine the intracellular level of Met ([Met]<sub>i</sub>) and its metabolites in human ESCs/iPSCs cultured in complete (control) or Met-deprived conditions, we analyzed and quantified intracellular Met-cycle metabolites (Met, SAM, SAH, and MTA) and excreted Hcy in khES3 and 201B7 cells. The [Met]<sub>i</sub> level decreased 5 and 24 hr after Met deprivation (Figure 2A, Met). We observed a decrease in [SAM]<sub>i</sub> and [MTA]<sub>i</sub> at 5 hr, which increased 24 hr after Met deprivation, with [SAM]<sub>i</sub> returning to a level similar to that of the control (Figure 2A, SAM). MTA supplementation increased [Met]<sub>i</sub> in both control and Met-deprived conditions (Figure 2A, Met). This result suggests that human ESCs actively convert MTA into Met, and then into SAM, even in complete media. This preference of SAM and MTA utilization explains the early decrease in [SAM]<sub>i</sub> and [MTA]<sub>i</sub> at 5 hr after Met deprivation. Interestingly, a rapid release of intracellular Hcy into the media was observed in complete media (Figure 2B). Hcy excretion was not seen under Met deprivation conditions, which reoccurred when supplemented with MTA. We interpreted this result to indicate conversion of MTA into Met, which then entered the Met cycle with subsequent metabolization into Hcy. Decreased SAM and cessation of Hcy excretion were also observed in 201B7 cells (Figures 2C and 2D).

Expression profile analysis revealed that Met depletion triggered a marked downregulation of Met metabolic enzymes, including *DNMT3B* (Figures 2E and 2F). While *MAT2A*, which catalyzes the conversion of Met into SAM in pluripotent stem cells, significantly increased under Met deprivation, *MAT2B* expression was attenuated under Met deprivation, showing a rapid decrease and a later increase after 10 hr. It is possible that *MAT2A/MAT2B* upregulation may then lead to an increase in [SAM]<sub>i</sub> (Figure 2A, SAM).

### SAM Is Crucial for Self-Renewal and Survival of Human ESCs/iPSCs

To examine the role of Met metabolism in self-renewal of human ESCs/iPSCs, we performed Met deprivation and rescue by supplementation with Met metabolites such as Met itself, SAM, Hcy, or MTA. In both khES3 and 201B7 cells, cell death induced by Met deprivation was rescued by supplementation with Met, SAM, Hcy, or MTA (Figure 3A). Met supplementation was the most effective, followed by SAM and MTA supplementation. Hcy supplementation showed limited rescue effects compared to Met. MTA supplementation also rescued cell depletion, confirming the conversion of MTA to Met through the salvage cycle (Figure 2).

These results suggest the importance of Met and SAM for maintaining ESC/iPSC self-renewal. To examine whether Met or SAM is essential for the maintenance of pluripotent stem cells, we performed knockdown of *MAT2A*, *MAT2B*, and spermine synthase (*SMS*) (Figures 3B and 3C). Knockdown of *MAT2A* or



**Figure 1. Impact of Met Deprivation on Undifferentiated Human ESCs/iPSCs**

(A) Total number of undifferentiated khES3 (open bars) and 201B7 (black bars) cells after 48 hr amino acid deprivation.

(B–F) Shown are graded Met concentration (B) and time-dependent effects on total cell number (C), proliferation (D), apoptosis (E), and G0/G1 arrest (F). Error bars, SEM (n = 3). Significant differences were determined by Student's t test; \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01.

*MAT2B*, but not *SMS*, decreased self-renewal (Figures 3B, 3C, and S2). Rescue of self-renewal by SAM addition was not affected by *SMS* knockdown (Figure 3C). The above results indicate that SAM, rather than Met itself, is essential for self-renewal and survival (Figures 3B and 3C).

Next, the effect of cycloleucine, an analog of Met that acts as a specific inhibitor of MAT (Sufrin et al., 1979), was tested. khES3 and 201B7 cells treated with increasing cycloleucine for 48 hr showed a significant decrease in cell number at 100 mM cycloleucine (Figure 3D). Cycloleucine treatment for 24 hr significantly

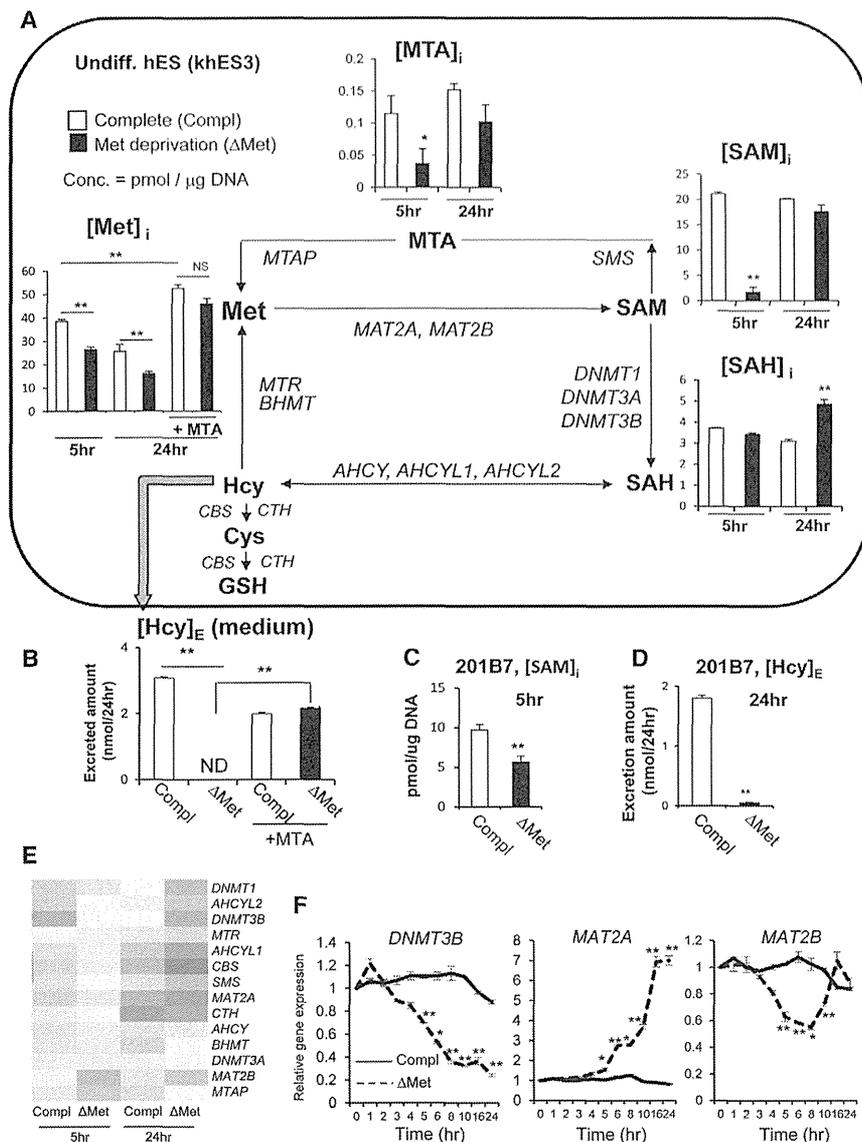


Figure 2. Measurement of Met-Cycle Metabolites

(A) Intracellular concentration of Met ([Met]<sub>i</sub>), MTA ([MTA]<sub>i</sub>), SAM ([SAM]<sub>i</sub>), and SAH ([SAH]<sub>i</sub>) in undifferentiated khES3 cells 5 and 24 hr after culture in complete (open bars) or Met-deprived (black bars) media, normalized to DNA. (B) Hcy excretion ([Hcy]<sub>E</sub>) in khES3 cells 24 hr after Met deprivation. ND, not detected. (C) [SAM]<sub>i</sub> of undifferentiated 201B7 cells after 5 hr culture in complete (open bars) or Met-deprived (black bars) media. (D) [Hcy]<sub>E</sub> in 201B7 cells after 24 hr culture. (E) Expression profiles of Met-Cys metabolic enzymes in undifferentiated khES3 cells cultured in complete or Met-deprived (ΔMet) media for 5 or 24 hr. (F) Time-dependent changes in levels of *DNMT3B*, *MAT2A*, and *MAT2B* by real-time PCR. Error bars represent SEM (n = 3). Significant differences were determined by Student's t test; NS, no significance, \*p < 0.05, and \*\*p < 0.01.

**Met Deprivation in Undifferentiated Human ESCs/iPSCs Induced Upregulation of the p53-p38 Signaling Pathway, which Is Critical for Cell-Cycle Arrest and Apoptosis**

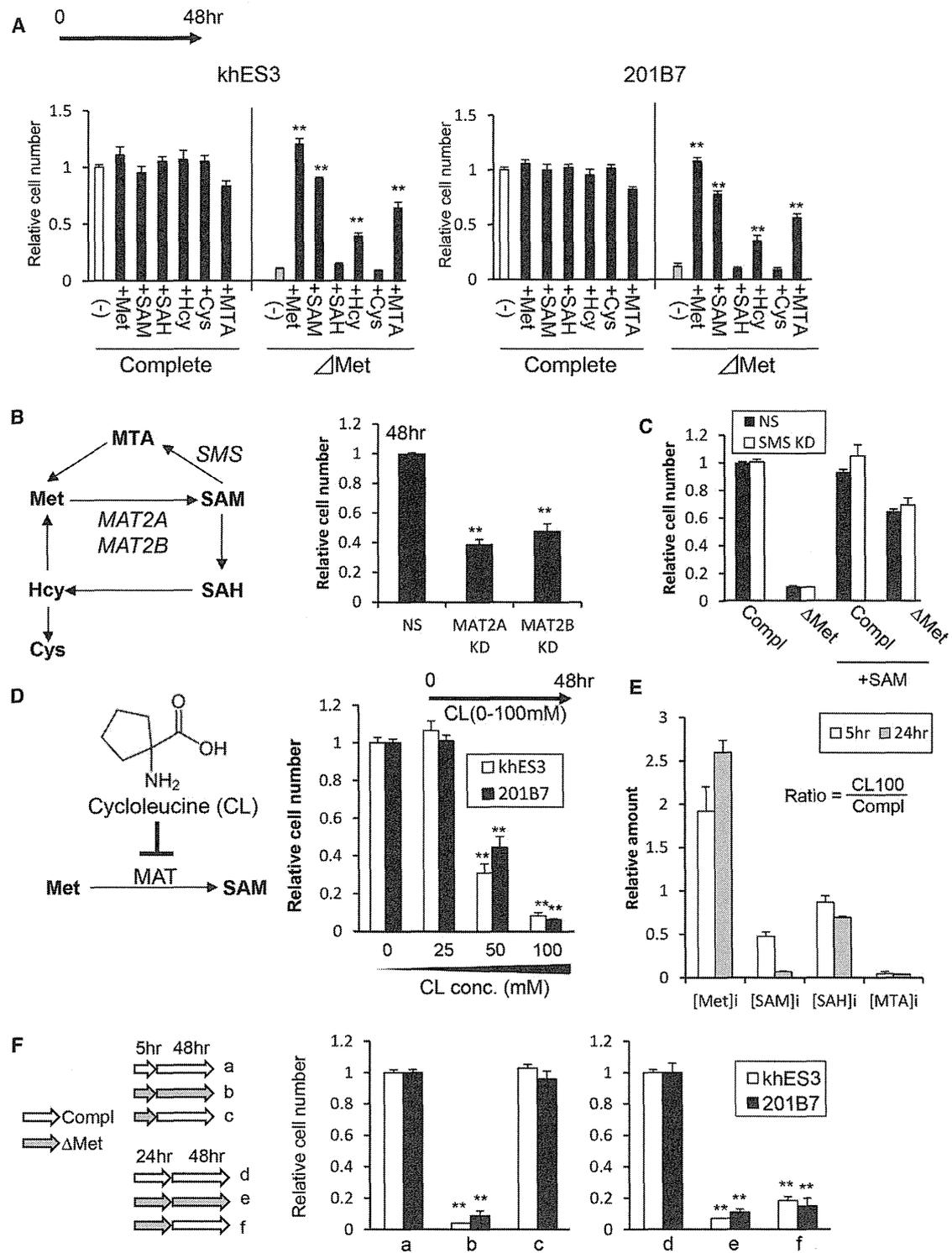
We next attempted to identify the signaling pathway responsible for the impaired cell survival. We performed gene expression profiles of undifferentiated khES3 cells cultured in complete or Met-deprived conditions for 5 or 24 hr. Cell-cycle- and apoptosis-related genes increased by >3-fold (Figure 4A) and >2-fold (Table S1A), respectively, in the Met-deprived group compared to the complete control. Significant increases were observed in levels of p53-dependent genes involved in apoptosis, such as *ATM*, *ATR*, *MDM2*, *CDKN1A*, *FAS*,

lowered [SAM]<sub>i</sub>, without affecting [Met]<sub>i</sub> or [SAH]<sub>i</sub> (Figure 3E), demonstrating that SAM, but not Met, is essential for the self-renewal and survival of human ESCs/iPSCs.

Next, to examine how prolonged Met deprivation affects cell survival, we performed 5 hr and 24 hr Met deprivation studies (Figure 3F) followed by 48 hr of culture in complete or Met-deprived media in khES3 and 201B7 cells. Deprivation of Met for 5 hr was reversible, and cells proliferated after switching to complete media (Figure 3F, c). However, under prolonged (24 hr) Met deprivation, cell proliferation did not recover even when cells were switched to complete media (Figure 3F, f). This result suggests that a short Met deprivation is reversible, but prolonged Met deprivation is vital for cell survival. Considering that intracellular Met metabolite concentrations change with time (Figure 2), our results suggest that SAM may act as an early sensor. Met deprivation led to SAM reduction and decreased proliferation, and prolonged Met deprivation resulted in G0/G1 phase cell-cycle arrest (Figure 1F), which then led to apoptosis.

*TNFRSF10A*, and *TNFRSF10D*. Additionally, Met deprivation for 24 hr increased *CASP3* and *CASP8*, which are critical mediators of apoptosis (Figure 4A). Enrichment analysis identified signaling pathways, the expression levels of which increased by >3-fold at 5 or 24 hr Met deprivation, are shown in Table S1B.

Because transcript levels of *p53* were unchanged under Met deprivation conditions, we next examined *p53* at the protein level. Total *p53* protein increased within 5 hr of Met deprivation in both khES3 and 201B7 cells, detected by western blot (Figure 4B) and immunocytochemical analyses (Figure 4C). Supplementation of Met decreased the proportion of *p53*<sup>+</sup> cells in a concentration-dependent manner (Figure 4D). Interestingly, the increase in *p53*<sup>+</sup> cells was observed specifically under Met deprivation, but not under deprivation of other amino acids (Figure 4E). Moreover, *p53* upregulation was completely abolished by SAM supplementation (Figure 4E, ΔMet+SAM) and triggered by cyclo-leucine (Figure 4F). To determine the effect of ΔMet-induced *p53* on cell death in khES3 cells, we performed knockdown of *p53*



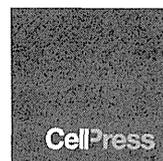
**Figure 3. Met Metabolism Is Crucial for Human ESC/iPSC Proliferation**

(A) Quantitative analyses of relative khES3 (left panels) and 201B7 (right panels) cell numbers after culture for 48 hr in complete or Met-depleted ( $\Delta$ Met) media. Cells were supplemented with 100  $\mu$ M Met, SAM, SAH, Hcy, Cys, or MTA (black bars), and cell numbers were compared with the control complete media (white bars).

(B) Relative cell numbers of nonsilenced (NS), *MAT2A*, or *MAT2B* KD khES3 cells 48 hr after knockdown.

(C) Quantitative analyses of relative cell numbers of NS or *SMS* KD khES3 cells after 48 hr culture in complete or Met-depleted ( $\Delta$ Met) media. Supplementation of 100  $\mu$ M SAM (+SAM).

(legend continued on next page)



(p53 KD) in khES3 cells. Upregulation of p53 and phosphorylated p38 (p-p38), a downstream target of p53, were not observed in p53 KD cells 5 hr after Met deprivation (Figure 4G). p53 KD cells showed a partial rescue of the cell death induced by 48 hr Met deprivation (Figure 4H). Moreover, khES3 cells treated with a p38 inhibitor, SB239063 (SB), also showed a partial rescue of the cell death caused by Met deprivation (Figure 4I).

Our results indicate that activation of the p53-p38 signaling pathway is an early response at 5 hr, induced by Met deprivation. p38 activation partially accounts for the cell-cycle arrest, which leads to apoptosis of undifferentiated human ESCs/iPSCs upon prolonged Met deprivation.

Genes that were upregulated after Leu and Lys deprivation for 5 hr, but not after Met deprivation, were also identified (Figure S3A, Table S1C). Among these, DNA damage-inducible transcript 3 (*DDIT3*) increased significantly by real-time PCR analysis (Figure S3B). *DDIT3*, also known as C/EBP homologous protein (CHOP) and growth arrest and DNA damage-inducible gene 153 (*GADD153*), is an important component of the endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis pathway (Oyadomari and Mori, 2004). *DDIT3* is induced by Leu depletion in human cell lines (Bruhat et al., 1997). These results, therefore, suggest that Leu and Lys deprivation induced apoptosis (Figure 1) through a mechanism different from that of Met deprivation.

#### Met Deprivation Reduced Histone and DNA Methylation, Decreased NANOG Expression, and Increased Overall Differentiation Potency

Our results showed that  $[SAM]_i$  decreased rapidly within 5 hr of Met deprivation (Figure 2) and that treatment with SAM rescued Met deprivation-induced cell death (Figure 3A) and abolished upregulation of p53 (Figure 4E). SAM functions as a major methyl donor in methyl transfer reactions, such as methylation of histone H3 K4, K9, K27, and K36 and DNA methylation. A study in mouse ESCs demonstrated that SAM reduction decreased H3K4me3 (Shyh-Chang et al., 2013), but the effect of SAM reduction on epigenetic modifications of human ESCs/iPSCs is unknown. We thus examined the impact of Met deprivation on histone (Figures 5A and 5B) and DNA methylation (Figure 5C). After short-term (5 hr) Met deprivation in undifferentiated 201B7 cells, a rapid decrease in H3K4me3 was observed, which was reversed by the addition of SAM. Cycloleucine (100 mM) also decreased trimethylation of H3K4me3 levels (Figure 5A). Decreased H3K4me3 was also observed in khES3 cells (Figure 5B) and persisted under long-term (24 hr) Met deprivation (Figures 5A and 5B). Therefore, H3K4me3 demethylation occurred as a rapid response to decreased  $[SAM]_i$  in human ESCs/iPSCs, similar to mouse ESCs. We also compared the extent of DNA methylation in undifferentiated 201B7 cells cultured for 5 hr in Met-deprived and complete media. A modest reduction in global DNA methylation was observed (Figure 5C), with 1,864 probes showing a decrease in Met-deprived cells

greater than 15%, compared to those cultured in complete medium. Affected regions were not located at transcriptional start sites (TSSs) but were primarily in the vicinities of TSSs or gene body regions (Figure 5C). However, we could not identify specific genes regulated by Met deprivation (N.S., unpublished data). Taken together, our results indicate that Met deprivation results in a decrease in  $[SAM]_i$ , leading to a reduction in H3K4me3 and a global reduction in DNA methylation in human ESCs/iPSCs.

Decreased  $[SAM]_i$  occurred 5 hr after Met deprivation and triggered p53-p38 activation (Figure 4). As p53 has been reported to induce differentiation of mouse ESCs by suppressing Nanog expression (Lin et al., 2005), we examined whether expression of pluripotent markers was affected. We found that NANOG expression decreased in undifferentiated 201B7 and khES3 cells after Met deprivation, while OCT3/4 expression was unaffected (Figures 5D and 5E). We next examined whether deprivation of other amino acids had an effect on NANOG and OCT3/4 expression, and we found that Leu deprivation also triggered a decrease in NANOG expression, although to a level lower than that of Met deprivation. The decrease in NANOG expression was rescued by supplementation with Met or SAM in a concentration-dependent manner (Figures 5G and 5H).

We then tested whether a short period of Met deprivation increased the differentiation potency of human iPSCs (Figures 5I–5K). Pluripotent 201B7 cells were cultured in Met-deprived maintenance media for 10 hr and then subjected to differentiation into the definitive endoderm. The proportion and total number of SOX17<sup>+</sup> definitive endoderm cells increased in the Met-deprived group compared to the control group at differentiation day 4 (D4), indicating that Met deprivation potentiated differentiation into definitive endoderm (Figure 5I). However, gene expression profiling did not show marked induction of differentiation markers after Met deprivation at 5 or 24 hr (Figure S4A), suggesting that exposure to induction signals is required for triggering differentiation. Similar results were observed in khES1, khES3, and 253G1 iPSCs, indicating that potentiation of differentiation was commonly observed across different human ESC/iPSC lines (Figures S4B–S4D).

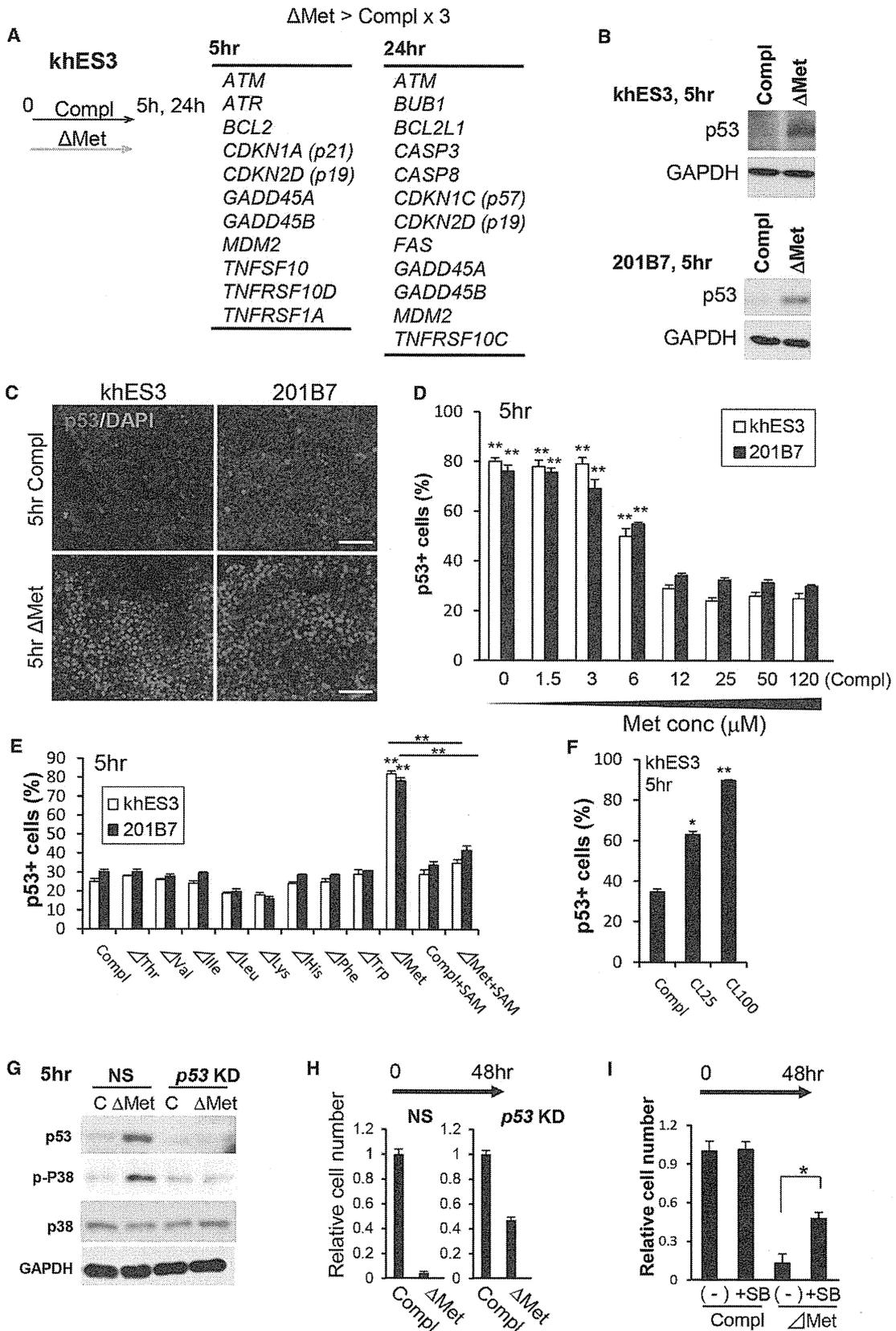
We then examined whether potentiation of differentiation occurs with differentiation into other germ layers. Undifferentiated 201B7 cells were cultured under Met-deprived conditions and then directed toward mesoderm differentiation. We observed a higher proportion of cells expressing the early mesoderm marker T protein (Figure 5J). Similarly, when deprived of Met and then directed to differentiate into ectodermal and neuronal lineages, expression levels of *PAX6* or *MAP2* increased compared to those cultured in complete media (Figure 5K).

Taken together, our results indicate that a short exposure to Met deprivation of undifferentiated human iPSCs decreased NANOG expression and increased the overall differentiation potency into the three germ layers.

(D) Relative khES3 (open bars) and 201B7 (black bars) cell numbers after culture for 48 hr in complete media with 0, 25, 50, or 100 mM cycloleucine (CL).

(E) Intracellular Met ( $[Met]_i$ ), SAM ( $[SAM]_i$ ), SAH ( $[SAH]_i$ ), and MTA ( $[MTA]_i$ ) levels in undifferentiated khES3 cells 5 hr (open bars) or 24 hr (gray bars) after culture in complete or 100 mM cycloleucine (CL100) media are shown. Data are normalized to DNA, and relative metabolite amounts are shown as a ratio of values at CL100 versus complete media.

(F) Relative cell numbers of cells treated for different time periods under control complete and Met-deprived conditions as shown in conditions a–c and d–f. Error bars represent SEM (n = 3). Significant differences compared to nonsupplemented cells (a and d) were determined by Student's t test; \*\*p < 0.01.



(legend on next page)

### Undifferentiated Human ESCs Are in a High-Met Metabolic State Compared to Differentiated Cells

We previously established a procedure for inducing ESCs sequentially into the definitive endoderm as well as specific digestive organs, such as the pancreas, liver, and intestines (Ogaki et al., 2013; Shiraki et al., 2008a, 2008b, 2011). Marked differences exist in the differentiation potencies of human ESC/iPSC lines, which is an issue for efficient directed differentiation of human ESCs/iPSCs in vitro (Kajiwara et al., 2012; Osafune et al., 2008). We thus investigated differences in Met metabolism upon human ESC differentiation by focusing differentiation into the endoderm lineages.

We examined gene expression profiles, Met consumption, and Hcy excretion using undifferentiated khES3 cells, and the derived definitive endoderm cells differentiated under feeder-free conditions (Iwashita et al., 2013) (Figure 6A). Microarray analysis indicated that expression of essential Met and Cys metabolic enzymes, such as *DNMT*, was high in undifferentiated khES3 cells (Figure 6B). *MAT2A* expression was also elevated in undifferentiated khES3 cells, but downregulated in the definitive endoderm, whereas *MAT2B* levels were unchanged (Figure 6B).

The concentration of Met in the media rapidly decreased during maintenance culture, due to cellular uptake (Figure 6C). Total consumption of Met was significantly lower when cells adopted definitive endoderm differentiation compared to undifferentiated human ESCs. Furthermore, Hcy excretion from the endoderm was low and unaffected by Met deprivation (Figure 6D).

These results indicate that undifferentiated khES3 cells are in a high-flux Met metabolic state. In contrast, endoderm cells require a low amount of Met for cell growth and therefore are not affected by Met deprivation. This metabolic difference between undifferentiated cells and endoderm cells prompted us to test the effects of Met deprivation on eliminating remaining undifferentiated cells during differentiation.

### Long-Term Met Deprivation Leads to Apoptosis, Specifically in Undifferentiated Cells, and Potentiates Endoderm and Hepatic Differentiation

Definitive endoderm differentiations of human ESC lines khES1 and khES3, and human iPSC lines 201B7 and 253G1 on day 10 (D10), are shown in Figure 7 (Shiraki et al., 2008a; Umeda et al., 2013). When khES3 or 253G1 cells were differentiated into definitive endoderm, OCT3/4 expression was rapidly downregulated. In contrast, in khES1 or 201B7 cells, a higher proportion of OCT3/4-expressing undifferentiated cells remained at D10 (Figure 7A). For hepatic differentiation, media was changed to hepatocyte differentiation media at D10 (Shiraki et al., 2008a;

Umeda et al., 2013). The remaining undifferentiated cells were an obstacle for further differentiation, and expression of the early liver marker *AFP* and the hepatocyte marker albumin (*ALB*) in 201B7 cells was lower than that in khES3-derived differentiated cells (Figure 7B). Because Met deprivation triggered cell death in undifferentiated cells (Figure 1) without affecting Met metabolism in the definitive endoderm (Figure 6D), we deprived Met during mid-stage endoderm differentiation from day 8 (D8) to D10 in 201B7 cells. Met deprivation eliminated the undifferentiated OCT3/4 cells without affecting SOX17<sup>+</sup> cells (Figure 7C). We also tested khES1 cells, which are resistant to endoderm differentiation. Met deprivation also improved the differentiation efficiency of khES1 cells by eliminating undifferentiated cells (Figure 7D). Next, we analyzed the impact of Met deprivation on apoptosis. TUNEL-positive cells significantly increased with Met deprivation, which was observed in OCT3/4<sup>+</sup> cells, but not in SOX17<sup>+</sup> cells (Figure 7E). Quantitative measurements revealed that a high percentage of OCT3/4<sup>+</sup> cells (60%), but not SOX17<sup>+</sup> cells, rapidly became apoptotic upon Met deprivation (Figure 7F). As Met deprivation promoted cell death only in undifferentiated cells, we next examined its impact on hepatic differentiation. Met deprivation during D8–10 (Figures 7G–7I) potentiated the differentiation of 201B7 cells into the hepatic lineage, resulting in a remarkable increase in the proportion of AFP<sup>+</sup> cells and a reduction in OCT3/4<sup>+</sup> cells (Figure 7G). Met deprivation in 201B7 cells resulted in increased expression of *ALB* to a level even higher than that in primary hepatocytes (pHep) (Figure 7H), and secretion of ALB was higher than that in pHep as well (Figure 7I).

These data indicate that prolonged Met deprivation eliminates residual undifferentiated cells and leads to an increased overall differentiation efficiency in resistant cell lines, with respect to differentiation into endoderm and hepatic lineages.

## DISCUSSION

In contrast to mouse ESCs, which are highly dependent on Thr metabolism, Tdh is nonfunctional in humans; moreover, we observed that undifferentiated pluripotent ESCs/iPSCs were in a high-Met metabolic state. We also found that SAM is required for the self-renewal of human ESCs/iPSCs and maintenance of an undifferentiated state. Short-term depletion of SAM triggered the following: (i) demethylation of H3K4me3, (ii) global DNA demethylation, (iii) p53 signaling activation, and (iv) decreased expression of the pluripotent marker NANOG. This then poised the cells in a potentiated state for differentiation into the three germ layers. In this state, *MAT2A* is upregulated, and the MTA

### Figure 4. Met Deprivation Triggered Rapid Activation of p53-p38 Signaling in Pluripotent Human ESCs/iPSCs

- (A) Gene expression profile analyses with undifferentiated khES3 cells showed that genes (signal intensity > 50) involved in the cell cycle or apoptosis are upregulated >3-fold in Met-deprived cells compared to cells cultured in control complete media.  
 (B and C) p53 expression in khES3 and 201B7 cells by western blot (B) or immunocytochemical analysis (C).  
 (D) The proportion of cells expressing p53 decreased with increasing Met concentration.  
 (E) Met deprivation, but not other amino acids, specifically increased p53<sup>+</sup> cells. SAM (100 μM) inhibited p53 accumulation in ΔMet conditions.  
 (F) Supplementation of 25 and 100 mM cycloleucine (CL25 and CL100) increased the number of p53<sup>+</sup> khES3 cells.  
 (G) p53 and phosphorylated p38 (p-p38) were upregulated 5 hr after Met deprivation in nonsilenced (NS) siRNA-treated ESCs, but neither p53 nor p-p38 increased in p53 knockdown (KD) human ESCs.  
 (H) Decreased cell death in p53 KD human ESCs after 48 hr Met deprivation.  
 (I) The p38 inhibitor, SB239063 (SB, 10 μM), rescued apoptosis. Error bars represent SEM (n = 3). Significant differences were determined by Student's t test; \*p < 0.05 and \*\*p < 0.01. Scale bar, 100 μm.