

と共にヒト ES 細胞（KhES1）へ同時に遺伝子導入した。実際には分離回収した KhES1 の細胞浮遊液へ Lipofectamin3000（Invitrogen 社）でリポフェクションにより遺伝子導入した。この細胞を SNL 細胞（G418 耐性フィーダー細胞）上に播種し、G418 によるセレクションを行った。10 日目に生存しているコロニーをピックアップしてクローン化し、更に 10 日間 G418 存在下で培養した。その後、MEF 細胞上で維持培養を行い、ゲノム DNA を抽出した。

レポーター遺伝子が目的の場所である Tyrosine hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域 (hs\_TH\_T01) に安定導入されているかについて、Nested PCR により検討した。実際には、抽出したゲノム DNA に対して 5' arm 外側の配列で設計した TH-f1 primer と内側の配列で設計した pEGFP-r2 primer を用いて第一段階の PCR を実施した。TH-f1 primer および pEGFP-r2 primer それぞれの配列より 2 塩基内側にずらした配列で設計した TH-f1-2 primer および pEGFP-r2-2 primer を用いて、第一段階の PCR で得られた生成物を鋳型として第二段階の PCR を実施した。

#### （倫理面への配慮）

東京大学ライフサイエンス委員会倫理審査専門委員会で 2009 年 12 月機関承認、2010 年 1 月文部科学省より使用許可を得た。

#### C. 研究結果

トランスフェクション後の G418 を用いたセレクションにより最終的に 15 クローンの G418 耐性株が得られた。維持培養中に蛍光顕微鏡にて観察すると、これらのクローンのうち 14 クローンは EGFP 陰性であったが、1 クローン（クローン#2-13）のみ EGFP 陽性であった。この EGFP 陽性クローンは少なくとも本来の目的以外の場所にドナーベクターが挿入され、ES 細胞でも非特異的に転写が起こった結果であると考えられる。

Nested PCR を実施したところ、予想されるサイズ

1242 bp に近い 1.3 kbp 付近のバンドが 15 クローン中 14 クローンにおいて認められたものの、ネガティブコントロールとして用いた wild type の KhES1 の DNA においても同様のサイズのバンドが検出された。よって、Nested PCR の結果からは、目的の箇所にレポーター遺伝子が導入されているかについて明確に確認することが出来なかった。

#### D. 考察

今回 TALEN を用いて実施した KhES1 細胞へのレポーター遺伝子 5' arm-pEGFP-3' arm の導入では、G418 耐性の細胞株が 15 クローン得られたことから、レポーター遺伝子はゲノムに導入されたと考えられる。しかしながら、目的の場所である hydroxylase (TH) のエクソン 1 直後領域に導入されているかどうかは、明確に確認できなかった。

#### E. 結論

TALEN を用いたヒト ES 細胞への遺伝子編集は前年のヒト神経幹細胞を用いたい場合の結果と同じであり、今回の戦略では極めて困難であることがわかった。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Aida-Yasuoka K, Yoshioka W, Kawaguchi T, **Ohsako S**, Tohyama C. A mouse strain less responsive to dioxin-induced prostaglandin E2 synthesis is resistant to the onset of neonatal hydronephrosis. *Toxicol Sci*, 141(2), 465-474, (2014).
2. Shiizaki K, **Ohsako S**, Kawanishi M, and Yagi T. Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative

endogenous ligands. *Mol Pharmacol*, 85(2), 279-289, (2014).

3. Alam MS, **Ohsako S**, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochemical*, 116(3), 474-480, (2014).
4. Sugai E, Yoshioka W, Kakeyama M, **Ohsako S**, and Tohyama C. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet. *J Applied Toxicol*, 34(3), 296-306, (2014).

## 2. 学会発表

1. Sailendra Nath Sarma, Masanobu Kohda, **Seiichiroh Ohsako**. Dopaminergic neuronal differentiation visualized by human embryonic stem cell-line carrying rat tyrosine hydroxylase-EGFP transgene. 第42回日本毒性学会、神戸（2014）7月4日
2. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Reiko Nagano, Hideko Sone, **Seiichiroh Ohsako**, and Wataru Fujibuchi. Prediction of Developmental Neurotoxic Effects using Human Pluripotent Stem Cells. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences iPS Cells in Drug Discovery& Development. CiRA International Symposium. Kyoto (2014)

## 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

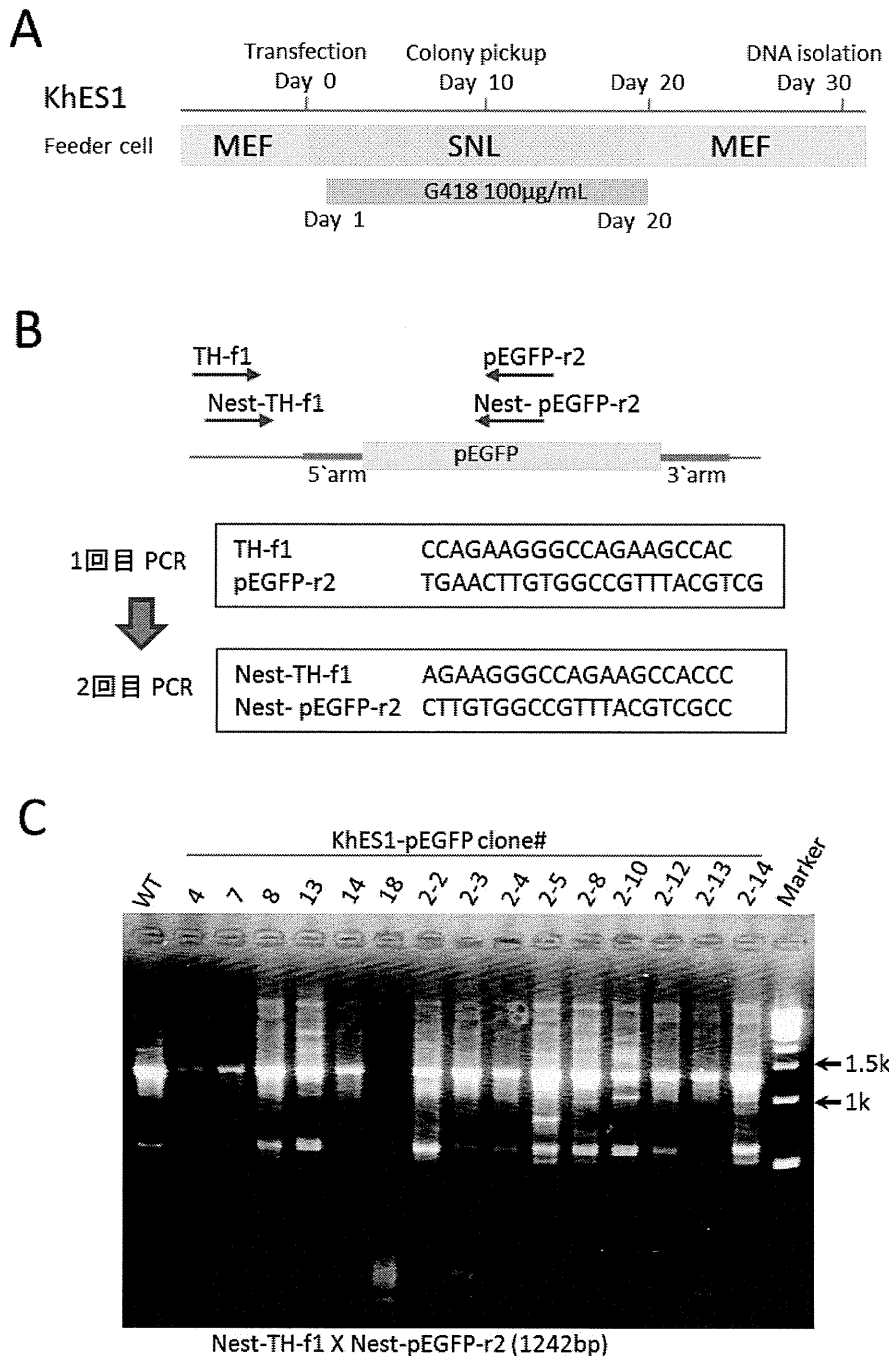


図 1. 安定導入 ES 細胞作製方法と Nested PCR によるレポーター遺伝子の確認。

PTAL-R, PTAL-L およびドナーベクターを、ヒト ES 細胞 (KhES1) へ Lipofectamine3000 (Invitrogen 社) でリポフェクションにより遺伝子導入、G418 によるセレクションを行った。作成したクローンについてレポーター遺伝子の導入を Nested PCR により検討した。(A) トランスフェクションおよびクローン化のプロトコル。(B) Nested PCR に用いた各 primer の配列と概略図。(C) Nested PCR による増幅産物の電気泳動。15 クローン中 14 クローンにおいて目的のサイズの 1.3 kbp 付近にバンドが認められたが、同じサイズのバンドが wild type でも認められた。

## ヒト多能性幹細胞バッテリー毒性試験フローにおける不足要素に関する研究

研究分担者

藤 淵 航

京都大学 iPS 細胞研究所 教授

### 研究要旨

複数の株種からなる ES 細胞並びに iPS 細胞に同一環境、同一曝露系を用いた一連の化合物毒性試験技術を実現化する上で、将来的に大きな壁となると考えられる種々の解析法に関して検討した。具体的には 1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法、及び、2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法について研究を行った。これらの基礎技術は次世代の高性能な大規模ヒト幹細胞毒性試験システムを構築するために大変重要な構成要素であり、特に従来の遺伝子ネットワーク解析で課題となっていた実験データ数を軽減可能であることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究は、平成 21 年度～平成 23 年度に実施した当研究グループのヒト毒性化学物質の機械学習による高精度な判別分析の結果を踏まえた後継プロジェクトであり、ハイスループットの毒性試験を実現するための多能性幹細胞バッテリーシステムを開発するものである。分担研究者である我々のグループは幹細胞や分化細胞からのマルチプロファイリングデータを受け取り、ベイズ統計に基づく多因子ネットワーク構造の推定を行うと共に、サポートベクター回帰を用いて毒性物質の晩発影響を予測するインフォマティクス手法を開発し、iPS 細胞研究所の利点を活かした新しい細胞解析技術を開発することを目標としている。特に今年度は残された重要課題である「シングルセルメチローム解析」の実現と、遺伝子数の約 4 倍の実験データが必要であったベイジアンネットワークのコスト削減のための情報解析手法について検討を行った。

### B. 研究方法

1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法の検討

化合物毒性試験技術をより高精度で実現化するには、トランスクリプトームだけでなく、メチロームによる測定も重要視されている。近年、特に毒性物質がエピゲノム状態の変化をもたらすことで毒性発現が観測されている可能性が示唆されている。より多種類の ES/iPS 細胞を、同一環境、同一曝露系による一連の毒性試験を実現するには、シングルセルレベルでのメチローム解析が重要である。しかしながら、バイサルファイト処理を行う段階でのランダムニックングが DNA を破壊し、十分な収量が得られないことが問題となっており、世界的にもシングルセルメチロームの論文が殆ど出版されていない状況にある。我々は、昨年度より、バイサルファイトロスを軽減する手法を設計し、従来、捨てられてしまう核酸配列の再利用に取り組んだ。

2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法の開発

RT-PCR やマイクロアレイ等遺伝子発現データを用いた遺伝子ネットワークを推定し、これを用いて毒性予測を行うことは従来に比べて予測の高性能化をもたらすことが我々の研究で確かめられたが、遺伝子ネットワークの推定には大量の実験データ

を必要とし、毒性試験システムの大規模化に大きな障壁となっていた。このため、各種細胞毎で得られた実験データが希少であっても、全細胞種では相当なデータ数が得られることを利用してコンセンサスネットワークを生成し、そこから逆に解析したい細胞種を除去することで生じる遺伝子ネットワークへの影響を測定する「サブトラクティブネットワーク」の手法を開発した。

### （倫理面への配慮）

京都大学医学研究科では「医の倫理委員会」を通してその倫理面の審査を行っている。共同研究者から得られる遺伝子発現データの情報解析については、倫理委員会で承認の必要がないと判断され、倫理面での問題はない。また、今回の ES 細胞及び iPS 細胞の実験利用についても、我々が所属する iPS 細胞研究所で提出している「ヒト ES 細胞からの血球・神経分化に関する研究」に内包され、また iPS 細胞の所内利用指針に基づいて研究を行っているため倫理面での問題はない。

また、今年度から開始された「倫理審査状況及び利益相反の管理について」の所属機関長からの書類を厚生労働大臣宛て提出している。

## C. 研究結果

### 1) シングルセルメチローム解析におけるバイサルファイトロス軽減法の検討

分担研究者らが 2 年前に開発した ES 細胞株 (WA09)、iPS 細胞株 (201B-7, 305A-1, 409B-2)、MSC 等を用いたマルチプレックスシングルセルトランスクリプトーム法に続き、マルチプレックスシングルセルメチローム法のプロトコル設計に取り組んだ。本プロトコルはマルチプレックスシングルセル解析のため、未だに関連する決定的な論文がなく独自に開発する必要がある、発表済みの「シングルセルメチローム解析」及びバイサルファイト処理とフラグメント化の順番を入れ替えた「RRBS 法」(Gu et al. 2012) と「PBAT 法」(Miura et al. 2012)

を基軸としてプロトコルの設計を行った。図 1a にその概略を示す（特許未申請のため完全記載は省略）。また、本手法により、従来の RRBS 法でバイサルファイト時に損失のあった核酸配列を回収できる系の確立を試みた。シングルセルメチロームに関しては収量獲得が非常にシビアな課題となる。各ステップ間の精製は細胞集団を対象とする場合はカラムを用いることが出来るが、シングルセルではビーズによる精製が主流である。本研究でもビーズによる精製の検討、また、バイサルファイト処理後のロス軽減を目指し特殊な酵素を用い検討を重ね、レスキューを行わない場合と比べ回収率の上昇が認められた（図 1b）。

### 2) 希少データによる多種細胞の遺伝子ネットワーク推定法の開発

現在マルチプレックスシングルセル RNA-seq では一度に 8 種の細胞からそれぞれ 12 データずつ、計 96 データの取得が可能である。従来のベイジアンネットワーク推定では、1 種の細胞で  $12/4=3$  遺伝子程度でのネットワークしか推定が可能でなかった。今回、全 96 データから、 $96/4=24$  であるため、26 の幹細胞維持や分化に必要な遺伝子について「コンセンサスネットワーク」推定を行った（図 2a）。さらに、そこから脂肪細胞 12 データを削除した場合の「サブトラクティブネットワーク」推定を行った（図 2b）。

## D. 考察

シングルセルトランスクリプトーム解析は前年度までに技術的にもほぼ確立し、同時に数種類の細胞株について解析できるようになった。シングルセルメチロームについては現時点ではまだマルチプレックスに対応出来る系は確立されておらず、また、ゲノムを対象とするため、バイサルファイト処理を行うことで生じる核酸配列の損失をいかに回復させられるかということが大きな課題となる。今年度行ったマルチプレックスシングルセルメチローム解析のプロトコルは、ある程度再現性良く回収出来

る系が確立されることが示唆され、今後更にこの技術を用いて細胞を対象とした重要な知見が得られると期待させる結果が得られた。

毒性試験において、従来、各化合物について遺伝子数の約4倍の実験データが必要であったが、この手法を用いると実験データが化合物の数だけ倍増するという利点がある。例えば、20化合物でそれぞれ40データしかない場合、これまで各化合物で10遺伝子しかネットワーク推定ができなかったが、本手法を用いると200遺伝子のコンセンサスネットワークを推定でき、1化合物を除去した場合190遺伝子のネットワークとなる。おそらく100遺伝子もあれば詳細な推定が可能であると考えられるため、半分の20データでも可能であり、マイクロアレイに換算すると、20化合物×20データ=400枚程度で十分テスト予測系の構築が可能であると示唆された。

## E. 結論

昨年度の報告書で重要と判明したシングルセルメチローム解析法のプロトコルの開発で、最も核心となる核酸配列の回収を可能とした。また、希少データでもES/iPS細胞を一度に遺伝子ネットワーク推定するサブトラクティブネットワーク手法の有効性が示唆された。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 山根順子、丸山徹、藤渕航、単細胞技術に基づくiPS細胞の標準化、生体の科学、65(2): 154-158 (2014).
2. Wong PS, Tanaka M, Sunaga Y, Tanaka M, Taniguchi T, Yoshino T, Tanaka T, Fujibuchi W, Aburatani S. Tracking difference in gene expression in a time-course experiment using gene set

enrichment analysis, *PLoS One*, 9(9): e107629 (2014).

3. Akiyama H, Ueda Y, Nobumasa H, Ooshima H, Ishizawa Y, Kitahiro K, Miyagawa I, Watanabe K, Nakamura T, Tanaka R, Yamamoto N, Nakae H, Kawase M, Gemma N, Sekiguchi Y, Fujibuchi W, Matoba R. A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms, *Analytical Biochemistry*, 472: 75-83 (2015).
4. 加藤有己、桜井都衣、藤渕航. 「ヒト細胞からのビッグデータの情報管理と情報解析技術」ビッグデータの収集、調査、分析と活用事例 pp.249-254 (2014). (書籍)
5. 藤渕航. 「iPS細胞からのビッグデータの情報セキュリティと創薬、医療への活用」、生命のビッグデータ利用の最前線、176-184 (2014). (書籍)

### 2. 学会発表

1. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Hiromi Akanuma, Reiko Nagano, Tsuyoshi Kato, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, and Wataru Fujibuchi. Prediction of Developmental Chemical Toxicity by Support Vector Machines with Gene Networks in Human Embryonic Stem Cell Validation System, The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Biocience, 2015, January, Osaka.
2. Kunie Sakurai, Junko Yamane, Kenta Kobayashi, Koji Yamanegi, Takeaki Taniguchi, Yuki Kato and Wataru Fujibuchi. Stem Cell Informatics Database: a framework for a new repository on single cell assay data and diverse knowledge of human cells. GIW/ISCB-Asia 2014, December, Tokyo.
3. Wataru Fujibuchi, SHOGoiN- Human omics database for the generation of iPS and normal cells, poster presentation at Systems Biology: Global

- Regulation of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory, 2014, March, New York.
4. Junko Yamane, Michihiro Tanaka, **Wataru Fujibuchi**, Standardization of human iPS and ES cells using single-cell transcriptome analysis, poster presentation at Systems Biology: Global Regulation of Gene Expression, Cold Spring Harbor Laboratory, 2014, March, New York.
5. Michihiro Tanaka, Junko Yamane, Kenichi Tanaka, Kenta Kobayashi, **Wataru Fujibuchi**. Bioinformatics resources for cell standardization at single-cell resolution, poster presentation at The 7<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.
6. Junko Yamane, Sachiyo Aburatani, Satoshi Imanishi, Reiko Nagano, Hideko Sone, Seiichiroh Ohsako, **Wataru Fujibuchi**. Prediction of Developmental Neurotoxic Effects using Human Pluripotent Stem Cells, poster presentation at The 7<sup>th</sup> Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, Center for Learning and Innovation (CLI) Takeda Pharmaceutical Company Ltd., 2014, January, Osaka.
7. 【依頼講演】 **藤渕航**、iPS 細胞と元素周期表の密接な関係、第 296 回京都化学者クラブ、京都大学楽友会館、2015 年、2 月、京都
8. 【招待講演】 **藤渕航**、幹細胞インフォマティクス、第 6 回平成 26 年度 HPCI セミナー「予測する生命科学・医療および創薬基盤」、産業技術総合研究所ゲノム情報研究センター、2014 年、11 月、東京
9. 【招待講演】 **Wataru Fujibuchi**, "SHOGoiN DB: Insights into the new generation of human omics databases", Workshop: Cell-focused data: Integration, organization, and applications, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Germany, Nov. 2014.
10. 【招待講演】 **藤渕航**、幹細胞と遺伝子ネットワークを活用した化学物質の毒性評価と細胞分化解析への応用、第 5 回ヒト ES 細胞使用研究倫理研修会、国立環境研究所、2014 年、3 月、茨城

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

無し

##### 2. 実用新案登録

無し

##### 3. その他

無し

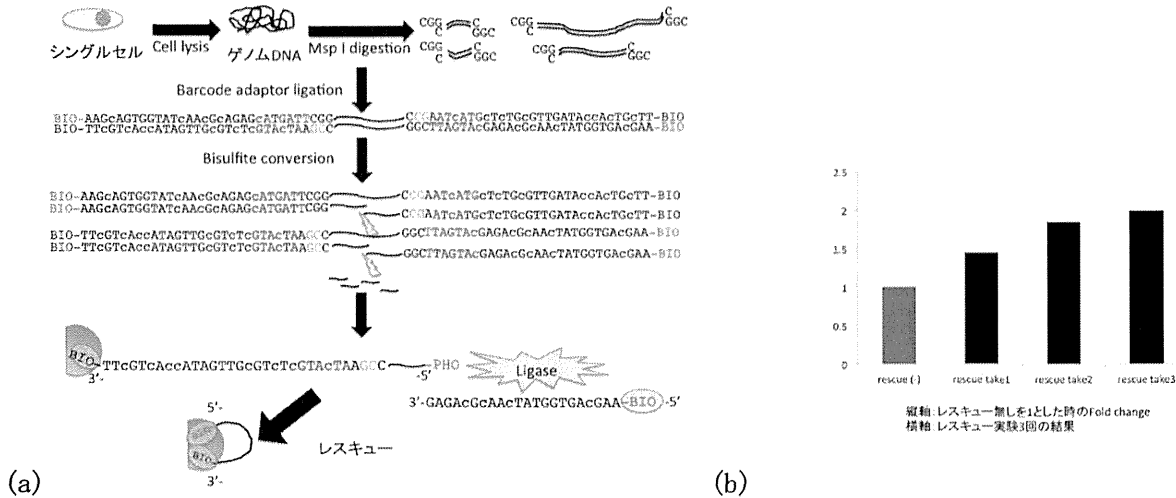


図1：マルチプレックスシングルセルメチローム法開発のための核酸配列回収

(a) プロトコルの概略、(b) 核酸配列回収結果。バイサルファイト処理により切断された DNA を ligase 処理して回収すること（詳細は特許未申請のため省略）により、処理しない時に比較して2倍量の DNA 収率が得られた。

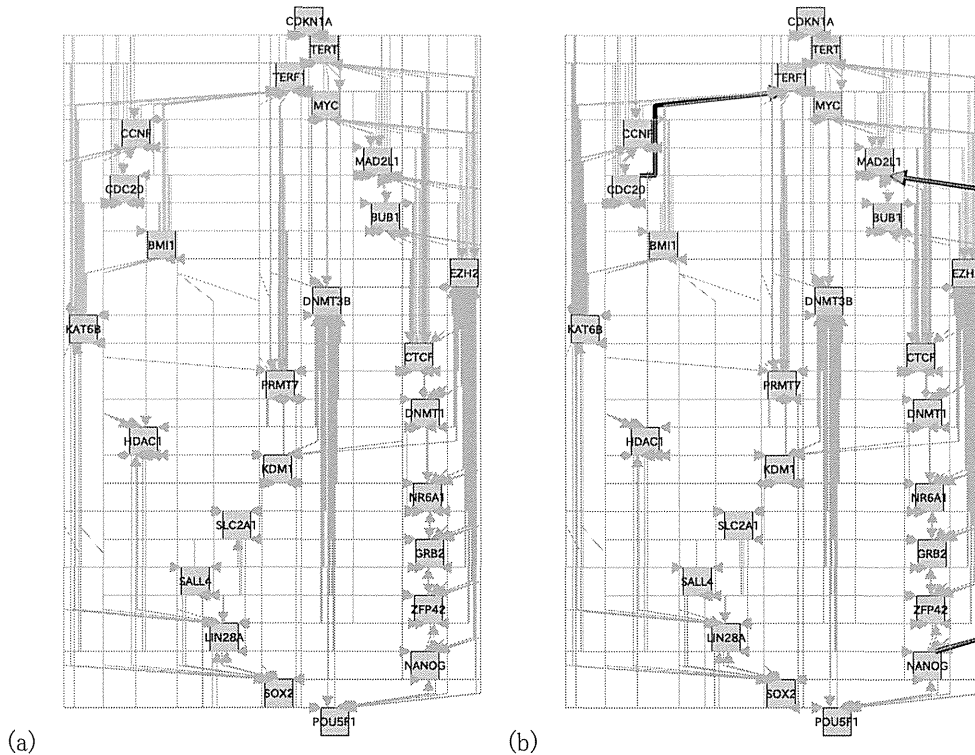


図2：サブラクティブネットワーク推定法による26遺伝子ネットワーク

(a) 8細胞それぞれ12データ、計96データを用いたベイジアンネットワーク推定法によるコンセンサスネットワーク、(b) 脂肪細胞12データを除去した場合のネットワーク。脂肪細胞を除去することにより、どのエッジも特徴がなかったコンセンサスネットワークから、2つのエッジに強い正の依存性があるネットワークが発見された。このエッジは脂肪細胞が加わることで攪乱されたことが示唆される。



# 研究成果の刊行一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Goodson III WH et al (Sone H, 54 of 139).	Assessing the Carcinogenic Potential of Low Dose Exposures to Chemical Mixtures in the Environment: The Challenge.	<i>Carcinogenesis</i>	in press		2015
Donai K, Inagaki A, So KH, Kuroda K, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T.	Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions.	<i>Cytotechnology</i>	67(2)	191-197	2015
Win-Shwe TT, Sone H, Kurokawa Y, Zeng Y, Zeng Q, Nitta H, Hirano S.	Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation.	<i>Toxicol Lett.</i>	228(3)	207-215	2014
Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, Nakajima T, Sone H.	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$ mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice.	<i>Toxicol Lett.</i>	228(3)	235-240	2014
Aida-Yasuoka K, Yoshioka W, Kawaguchi T, Ohsako S, Tohyama C.	A mouse strain less responsive to dioxin-induced prostaglandin E2 synthesis is resistant to the onset of neonatal hydronephrosis.	<i>Toxicol Sci</i>	141(2)	465-474	2014
Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, Yagi T.	Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands.	<i>Mol Pharmacol</i>	85(2)	279-289	2014

Alam MS, Ohsako S, Kanai Y, Kurohmaru M.	Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats.	<i>Acta Histochemical</i>	116(3)	474-480	2014
Sugai E, Yoshioka W, Kakeyama M, Ohsako S, Tohyama C.	In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet.	<i>J Applied Toxicol</i>	34(3)	296-306	2014
山根 順子 丸山 徹 藤渕 航	単細胞技術に基づく iPS 細胞の標準化	<i>生体の科学</i>	65(2)	154-158	2014
Wong PS, Tanaka M, Sunaga Y, Tanaka M, Taniguchi T, Yoshino T, Tanaka T, Fujibuchi W, Aburatani S.	Tracking difference in gene expression in a time-course experiment using gene set enrichment analysis	<i>PLoS One</i>	9(9)	e107629	2014
Akiyama H, Ueda Y, Nobumasa H, Ooshima H, Ishizawa Y, Kitahiro K, Miyagawa I, Watanabe K, Nakamura T, Tanaka R, Yamamoto N, Nakae H, Kawase M, Gemma N, Sekiguchi Y, Fujibuchi W, Matoba R	A set of external reference controls/probes that enable quality assurance between different microarray platforms	<i>Analytical Biochemistry</i>	472	75-83	2015

## 別紙 4

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤渕 航	iPS 細胞からのビッグデータの情報セキュリティと創薬、医療への活用	植田 充弘	生命のビッグデータ利用の最前線	CMC 出版	日本	2014	176-184
加藤 有己 桜井 都衣 藤渕 航	ヒト細胞からのビッグデータの情報管理と情報解析技術	なし	ビッグデータの収集、調査、分析と活用事例	(株) 技術情報協会	日本	2014	249-254

## 研究成果の刊行物・別刷り

## Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions

Kenichiro Donai · Akane Inagaki · Kyoung-Ha So · Kengo Kuroda · Hideko Sone · Masayuki Kobayashi · Katsuhiko Nishimori · Tomokazu Fukuda

Received: 23 July 2013 / Accepted: 25 December 2013 / Published online: 30 March 2014  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

**Abstract** Embryonic stem cells and induced pluripotent stem (iPS) cells are usually maintained on feeder cells derived from mouse embryonic fibroblasts (MEFs). In recent years, the cell culture of iPS cells under serum- and feeder-free conditions is gaining attention in overcoming the biosafety issues for clinical applications. In this study, we report on the use of multiple small-molecular inhibitors (i.e., CHIR99021, PD0325901, and Thiazovivin) to efficiently cultivate mouse iPS cells without feeder cells in a chemically-defined and serum-free condition. In this condition, we showed that mouse iPS cells are expressing the Nanog, Oct3/4, and SSEA-1 pluripo-

tent markers, indicating that the culture condition is optimized to maintain the pluripotent status of iPS cells. Without these small-molecular inhibitors, mouse iPS cells required the adaptation period to start the stable cell proliferation. The application of these inhibitors enabled us the shortcut culture method for the cellular adaptation. This study will be useful to efficiently establish mouse iPS cell lines without MEF-derived feeder cells.

**Keywords** Induced pluripotent stem cells · Cell culture condition · Serum-free · Feeder-free · Low-molecular-weight compounds

### Abbreviations

ES	Embryonic stem
iPS	Induced pluripotent stem
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts
SSEA	Stage specific embryonic antigen
HPV	Human papilloma virus
STEMCCA	Stem cell cassette
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
KSR	Knockout serum replacement
LIF	Leukemia inhibitory factor
2i	2 Inhibitors (CHIR99021 and PD0325901)
Tzv	Thiazovivin
GSK-3 $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 $\beta$
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ROCK	Rho-associated Kinase
PD	Population doubling

K. Donai · A. Inagaki · K.-H. So · K. Kuroda · K. Nishimori · T. Fukuda (✉)  
Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1 Tsutsumidori-amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai 981-8555, Japan  
e-mail: tomofukuda@bios.tohoku.ac.jp

H. Sone  
Environmental Exposure Research Section, Center for Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

M. Kobayashi  
Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, 241-438 Kaidobata-Nishi, Nakano, Shimoshinjo, Akita 010-0195, Japan

EBs	Embryoid bodies
AP	Alkaline phosphatase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
RT	Reverse transcription
PCR	Polymerase chain reaction
cDNA	Complementary DNA

## Introduction

The reprogramming of somatic cells to generate induced pluripotent stem (iPS) cells was achieved by expressing four defined transcription factors: Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc (Takahashi and Yamanaka 2006). Such iPS cells have major potential in the study and therapy of human diseases because they are capable of self-renewal and can generate all the three primary germ layers: ectoderm, mesoderm, and endoderm. iPS cells are usually maintained on feeder cells that are derived from mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007). However, several feeder-free conditions were developed recently especially for human embryonic stem (ES) cells and iPS cells to ensure biosafe human clinical applications (Xu et al. 2001; Amit et al. 2004; Rosler et al. 2004; Lu et al. 2006; Navarro-Alvarez et al. 2008; Miyazaki et al. 2008; Sun et al. 2009; Kitajima and Niwa 2010; Rodin et al. 2010; Hayashi et al. 2010; Fukusumi et al. 2013). Animal-derived components are relatively high risk for potential infections in clinical regenerative medicine. In addition to regenerative medicine, iPS cells are also expected to play an important role in drug screening. However, the mixed culture condition of iPS cells and the need of feeder cells make the evaluation of the effects of drugs difficult. Furthermore, the establishment of serum- and feeder-free culture conditions is significant to overcome the ethical issues related to animal experiments.

Furue et al. (2005) previously developed a serum-free, chemically defined medium called “ESF7” (now available as ESF-C), which maintains mouse ES cells on collagen-coated dishes. In this manuscript, we show that mouse iPS cells can be cultured in feeder-free conditions as well as on feeder cells using the ESF-C medium containing different kinds of low-molecular-weight cell differentiation inhibitors.

## Materials and methods

### Mouse iPS cell induction

A human papilloma virus-derived E6 gene was introduced to MEFs (E6-MEFs) to extend the cell proliferation until cellular senescence (Yamamoto et al. 2003). Then, STEMCCA-loxP lentiviral vector (STEMCCA means a “stem cell cassette”), which is composed of Yamanaka 4 factors and self-cleaving 2A peptides, was introduced into E6-MEFs to generate iPS cells (Sommer et al. 2009).

### Cell culture

MEFs and feeder cells were cultured in MEF medium consisting of Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; #08459-35, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS; #12483-020, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 100× antibiotic–antimycotic mixed solution (#02892-54, Nacalai Tesque). The experimental conditions for the established mouse iPS cells are as follows: (1) mouse iPS cells were cultured on MEF feeder cells in mouse iPS cell medium [DMEM with 15 % Knockout Serum Replacement (referred to as KSR, #10828-028, Invitrogen), 0.22 mM 2-mercaptoethanol (#21438-82, Nacalai Tesque), 100 × MEM Non-essential Amino Acids Solution (#139-15651, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 100× antibiotic–antimycotic mixed solution and 1,000× leukemia inhibitory factor (LIF, Human, recombinant, Culture Supernatant, #125-05603, Wako Pure Chemical Industries)]; (2) mouse iPS cells were cultured on collagen (Cellmatrix Type I-A, Nitta Gelatin, Osaka, Japan)-coated dishes in ESF-C medium (#2004-05, Cell Science and Technology Institute, Sendai, Japan) containing 1,000 × LIF; (3) the same cell culture of point (2) containing three low-molecular-weight inhibitors [1.5 μM CHIR99021 (#163-24001, Wako Pure Chemical Industries), 0.5 μM PD0325901 (hereinafter the combination of these two inhibitors are referred to as 2i for short, #13034, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), and 0.5 μM Thiazovivin (referred to as Tzv, #04-0017, Stemgent, Cambridge, MA, USA)]. The preparation of MEFs and feeder cells were described in our previous report (Donai et al. 2013).

### Population doubling (PD) assay

Mouse iPS cells were seeded at a density of  $5.0 \times 10^4$  cells per well in a 6-well plate. We evaluated three independent mouse iPS clones. The passages of the mouse iPS cells were carried out until one well of the 6-well plate became confluent. The cell number was counted using an automatic cell counter (Countess, Invitrogen), and the cell growth was evaluated with triplicated experiments. The passage process was repeated up to the 6th passage. Cell PD was obtained from the number of cells using the formula described in a previous report as follows:  $PD = \log_2(a/b)$ , where 'a' is the number of the cells counted in passage and 'b' represents the number of seeded cells (Qin et al. 2012). The results of PD assay are shown as means with standard deviations. Statistical significance was evaluated using Student's *t* test ( $P < 0.05$ ).

### Embryoid bodies (EBs) formation

To form EBs,  $2\text{--}3 \times 10^6$  iPS cells were seeded into a Petri dish (for bacterial culture). After 3–4 days, floating EBs were picked up and transferred to 0.1 % gelatin-coated 24-well plates and cultured for 3–4 additional days. EB medium contained DMEM with 15 % FBS, 100× antibiotic–antimycotic mixed solution, 0.22 mM 2-mercaptoethanol and 100× MEM non-essential amino acids solution.

### Alkaline phosphatase (AP) staining and Immunocytochemistry

Detailed method for detection of AP activity and pluripotent markers with immunocytochemistry was previously described in our publication (Donai et al. 2013). EBs on gelatin-coated dishes were stained with  $\beta$ III tubulin monoclonal antibody (1:600 dilution, #MAB1637, Millipore, Billerica, MA, USA), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (1:1,000 dilution, #340-07971, Wako Pure Chemical Industries) and Alexa Fluor 568 (1:500 dilution, #A21124, Invitrogen).

### Reverse transcription (RT) and quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA was extracted from cells confluent in a 6-well plate and a Petri dish using the TaKaRa

FastPure RNA Kit (#9190, TaKaRa Bio, Shiga, Japan) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) synthesis and PCR were performed in a similar way as in our previous report (Donai et al. 2013).

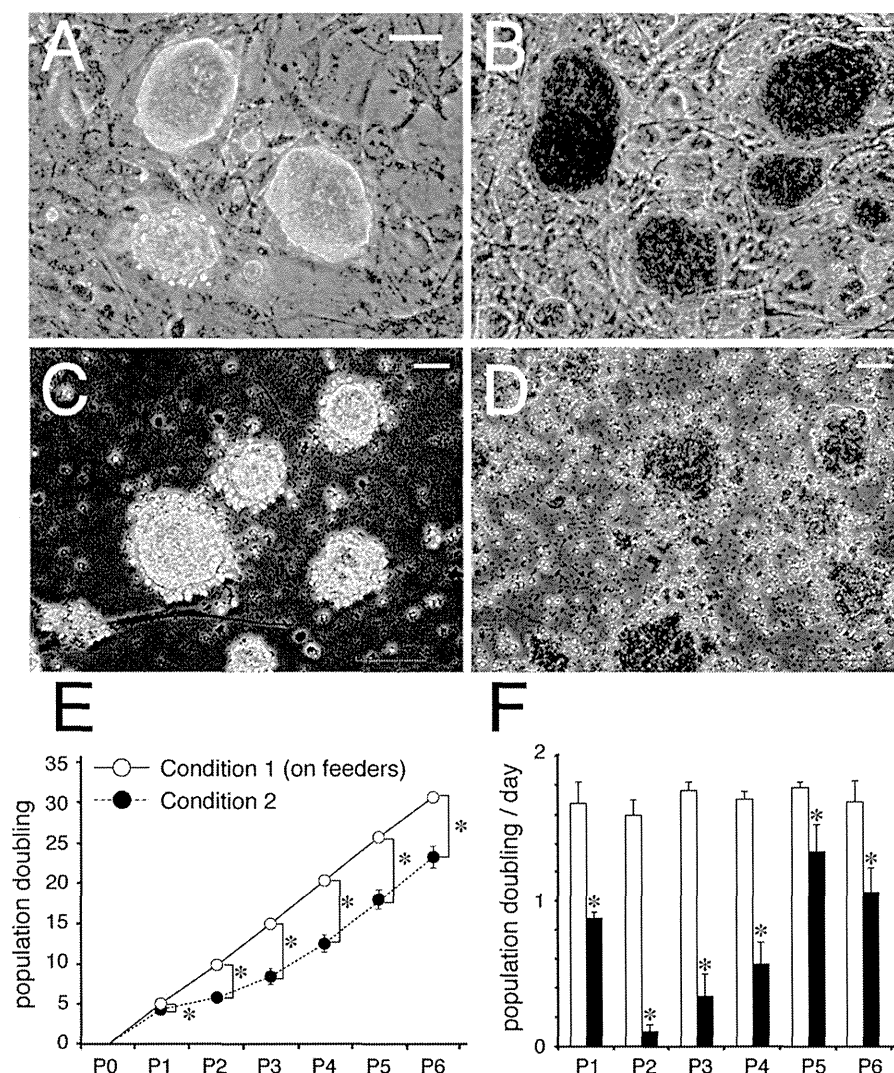
## Results and discussion

We initially investigated whether mouse iPS cells could maintain their specific morphologies in each culture condition. Figure 1 shows the cell morphology and alkaline phosphatase (AP) staining under the conditions 1 and 2. In condition 1, using feeder cells as control, the cells showed mouse ES cell-like morphology, characterized by larger nuclei, scant cytoplasm, dome-shaped colonies, and strong positive AP staining (Fig. 1a, b). In condition 2 (collagen coating + ESF-C), mouse iPS cells showed colonies with scattering morphologies (Fig. 1c), and relatively weak AP activity (Fig. 1d). Then, we compared the cell proliferation between condition 1 and 2 using the corresponding PD values. The cell numbers in condition 1 exponentially increased (Fig. 1e, white circle) and showed aggressive growth potential represented by  $>1.5$  population doubling per day (Fig. 1f, open bar). In condition 2, the cell growth of mouse iPS cells was remarkably delayed (Fig. 1e, black circle). The delayed iPS cell growth restored after passage three, suggesting that the cellular adaptation of mouse iPS cells to the feeder-free condition was necessary to ensure a stable cell growth. The delayed cell growth in the early passages of mouse iPS cells was apparent when the PD value was normalized by the culture day (PD per day, Fig. 1f). Furthermore, although we tried to maintain the three independent mouse iPS clones under feeder-free conditions, one of the mouse iPS clones did not show cell growth and was unable to survive in ESF-C medium (data not shown).

In condition 3, we added three inhibitors (CHIR99021, PD0325901 and Thiazovivin) to the ESF-C medium. CHIR99021 is reported as the inhibitor of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) signaling, which has a large impact to maintain pluripotency of ES and iPS cells effectively (Sato et al. 2004; Besser 2004; Polychronopoulos et al. 2004; Ying et al. 2008). PD0325901 targets mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK kinase) (Sebolt-Leopold and Herrera 2004; Bain et al. 2007). In combination with

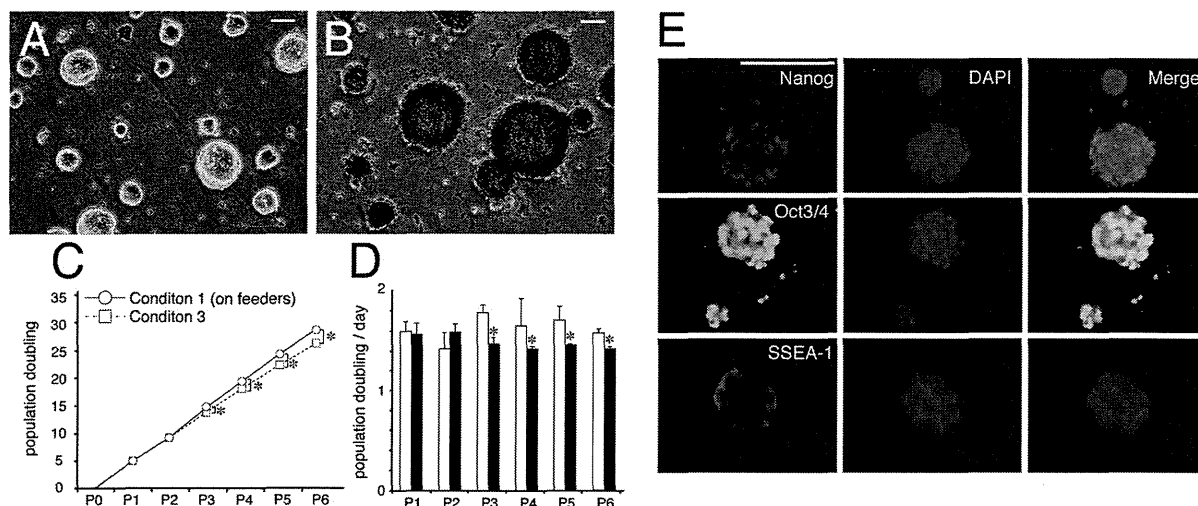


**Fig. 1** Morphology of mouse iPS cell colonies in condition 1 and condition 2. *Condition 1*, on feeders in mouse iPS cell medium with LIF; *Condition 2*, on collagen-coated dishes (feeder-independent) in ESF-C medium (serum-free) with LIF. *White bar* = 50  $\mu$ m. **a**, **b** Morphology of mouse iPS cell colonies (a) and AP staining (b), respectively, in condition 1, showing compact colonies and strong reactivity. **c**, **d** Morphology of mouse iPS cell colonies (c) and AP staining (d), respectively, in condition 2. Shape scattering of colonies and weak AP signals are evident. **e** The population doublings under condition 1 and condition 2.  $n = 3 \times 3$  **f** Population doubling per day. *Open and closed bars* correspond to condition 1 and 2, respectively. The cell growth was partly recovered at late passages in condition 2



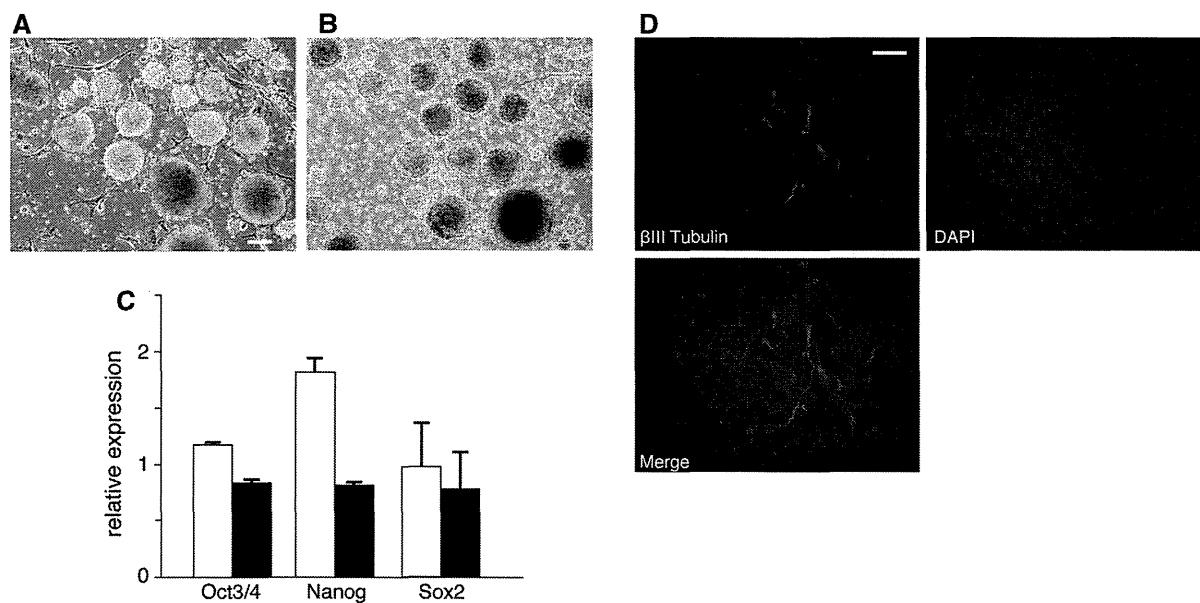
CHIR99021, PD0325901 affects the self-renewal of ES and iPS cells to prevent cell differentiation (Lin et al. 2009). Thiazovivin acts as a Rho-associated Kinase inhibitor, which can improve the survival of ES and iPS cells from single cell dissociation (Lin et al. 2009; Xu et al. 2010). The iPS cell colonies were more rounded with clearer boundaries than those obtained under condition 2 (Fig. 2a). In agreement with the improved morphology, the reactivity against AP of the cells in the ESF-C in the presence of these three inhibitors as well as on the feeder cells became strong (Fig. 2b). Furthermore, mouse iPS cells showed enhanced cell proliferation compared to those in condition 2 (Fig. 2c). Although the cell proliferation speed in condition 3 was significantly lower than that

in condition 1, the PD value of condition 3 was similar to that of condition 1. As shown in Fig. 2d, the effect of these low-molecular inhibitors (2i + Tzv) became more apparent with increasing PD per day. Based on these results, we concluded that 2i + Tzv enabled us to efficiently maintain mouse iPS cells in the chemically defined medium and in feeder-free conditions without requiring the cellular adaptation period. We evaluated the expression of pluripotent markers of mouse iPS cells under condition 3 by immunocytochemistry (Fig. 2e). The detection of the expression of markers in mouse iPS cells was in good agreement with that of mouse ES cells. Briefly, the mouse iPS cell colonies in condition 3 showed immunoreactivity against Nanog, Oct3/4, and SSEA-1 antibodies. From



**Fig. 2** The small-molecule inhibitors improve the morphology of mouse iPS cell colonies, their proliferation, and the expression of pluripotent markers. Condition 3, on collagen-coated dishes (feeder-independent) in ESF-C medium (serum-free) with LIF, 2i and Tzv. *White bar* = 50  $\mu$ m. **a, b** Morphology of mouse iPS cell colonies and AP staining, respectively, under condition 3. The cells formed dome-shaped colonies with clear edges and displayed strong AP activity. **c** The number of population doubling under condition 1 and condition 3. The growth speed

in condition 3 showed enhanced proliferation similar to that of condition 1. **d** Population doubling per day. Mouse iPS cells showed good cell proliferation starting from early passages. *Open and closed bars* represent condition 1 and 3, respectively. **e** Expression of pluripotent markers in mouse iPS cells. Nanog- and Oct 3/4-positive staining, which could be overlapped with DAPI blue counterstaining, was detected in the nuclei. Stage-specific embryonic antigen (SSEA)-1 protein localizes at the cell surface. *White bar* = 100  $\mu$ m. (Color figure online)



**Fig. 3** In vitro differentiation of iPS cells. **a, b** Morphology of EBs floating in a Petri dish after 4 days incubation. *Left panel (a)* EBs derived from iPS cells cultivated under condition 1; *Right panel (b)* EBs derived from iPS cells cultivated under condition 3. *White bar* 100  $\mu$ m. **c** Detection of stem cell-specific genes by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-

qPCR) between iPS cells and EBs in condition 3. *White column* iPS cells (undifferentiated state); *Black column* EBs (differentiated state). *n* = 3 **d** immunostaining of  $\beta$ III tubulin (ectoderm) marker in EBs cultivated 4 days on gelatin-coated dishes derived from condition 3. *White bar* 50  $\mu$ m

these data, we concluded that our mouse iPS cells maintained a pluripotent state even in the absence of serum and feeder cells.

To validate whether iPS cells have differentiation capacity in feeder-independent culture, we tried to form EBs after incubation in condition 1 and 3. We could not detect any difference in EBs formation between condition 1 and 3 (Fig. 3a, b). After EBs formation, we detected lower expression levels of stem cell-specific genes compared with pluripotent state (Fig. 3c). Furthermore, we also detected  $\beta$ III tubulin (ectoderm) marker by immunostaining (Fig. 3d). These findings indicate that differentiation capacity is still intact even in chemically-defined and serum-free condition.

In this study, we demonstrated the efficient expansion of mouse iPS cells on collagen-coated dishes under serum- and feeder-free conditions in combination with three small-molecule cell differentiation inhibitors. We could not observe any morphological or cell proliferation change until passage 10. We also confirmed the effect of the inhibitors on the cell growth of mouse ES cell line E14tg2a. They expectedly showed growth pattern similar to that of iPS cells under the presence of these inhibitors (data not shown). Collagen coating is a simple method and does not require special techniques. This method provides a useful means for using mouse iPS cells to assess novel drugs and animal-derived components without adaptation periods.

**Acknowledgments** We thank Dr. Gustavo Mostoslavsky (Boston University School of Medicine) for providing the STEMCCA-loxP lentiviral vector. We also thank the technical supports and suggestion from and Dr. Takehiro Ito and Ms. Yukiko Kitamura (Cell Science and Technology Institute). This work was supported by research grants from the Tojuro Iijima Foundation for Food Science and Technology, Asahi Group Foundation and a JSPS grant (KAKENHI, #23650587 and #25640117).

## References

- Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J (2004) Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 70:837–845. doi:10.1095/biolreprod.103.021147
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408:297–315. doi:10.1042/BJ20070797
- Besser D (2004) Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. *J Biol Chem* 279:45076–45084. doi:10.1074/jbc.M404979200
- Donai K, Kuroda K, Guo Y, So KH, Sone H, Kobayashi M, Nishimori K, Fukuda T (2013) Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. *Anal Biochem* 443:104–112. doi:10.1016/j.ab.2013.08.014
- Fukusumi H, Shofuda T, Kanematsu D, Yamamoto A, Suemizu H, Nakamura M, Yamasaki M, Ohgushi M, Sasai Y, Kanemura Y (2013) Feeder-free generation and long-term culture of human induced pluripotent stem cells using pericellular matrix of decidua derived mesenchymal cells. *PLoS ONE* 8:e55226. doi:10.1371/journal.pone.0055226
- Furue M, Okamoto T, Hayashi Y, Okochi H, Fujimoto M, Myoishi Y, Abe T, Ohnuma K, Sato GH, Asashima M, Sato JD (2005) Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 41:19–28. doi:10.1290/0502010.1
- Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M (2010) Reduction of N-glycolylneuraminic acid in human induced pluripotent stem cells generated or cultured under feeder- and serum-free defined conditions. *PLoS ONE* 5:e14099. doi:10.1371/journal.pone.0014099
- Kitajima H, Niwa H (2010) Clonal expansion of human pluripotent stem cells on gelatin-coated surface. *Biochem Biophys Res Commun* 396:933–938. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.026
- Lin T, Ambasadhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahm HS, Hao E, Hayek A, Ding S (2009) A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6:805–808. doi:10.1038/nmeth.1393
- Lu J, Hou R, Booth CJ, Yang SH, Snyder M (2006) Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:5688–5693. doi:10.1073/pnas.0601383103
- Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, Kawasaki M, Sanzen N, Hayashi M, Kawase E, Sekiguchi K, Nakatsuji N, Suemori H (2008) Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375:27–32. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.111
- Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Yuasa T, Yamatsuji T, Shirakawa Y, Nagasaka T, Sun SD, Javed MS, Tanaka N, Kobayashi N (2008) Long-term culture of Japanese human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Cell Transpl* 17:27–33
- Polychronopoulos P, Magiatis P, Skaltsounis AL, Myrianthopoulos V, Mikros E, Tarricone A, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Leost M, Greengard P, Meijer L (2004) Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J Med Chem* 47:935–946. doi:10.1021/jm031016d
- Qin XY, Fukuda T, Yang L, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Sone H (2012) Effects of bisphenol a exposure on the proliferation and senescence of normal human

- mammary epithelial cells. *Cancer Biol Ther* 13:296–306. doi:10.4161/cbt.18942
- Rodin S, Domogatskaya A, Strom S, Hansson EM, Chien KR, Inzunza J, Hovatta O, Tryggvason K (2010) Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol* 28:611–615. doi:10.1038/nbt.1620
- Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, Carpenter MK (2004) Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 229:259–274. doi:10.1002/dvdy.10430
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10:55–63. doi:10.1038/nm979
- Sebolt-Leopold JS, Herrera R (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 4:937–947. doi:10.1038/nrc1503
- Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G (2009) Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27:543–549. doi:10.1634/stemcells.2008-1075
- Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC (2009) Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15720–15725. doi:10.1073/pnas.0908450106
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872. doi:10.1016/J.Cell.11.019
- Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19:971–974. doi:10.1038/nbt1001-971
- Xu Y, Zhu X, Hahm HS, Wei W, Hao E, Hayek A, Ding S (2010) Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:8129–8134. doi:10.1073/pnas.1002024107
- Yamamoto A, Kumakura S, Uchida M, Barrett JC, Tsutsui T (2003) Immortalization of normal human embryonic fibroblasts by introduction of either the human papillomavirus type 16 E6 or E7 gene alone. *Int J Cancer* 106:301–309. doi:10.1002/ijc.11219
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453:519–523. doi:10.1038/nature06968
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920. doi:10.1126/science.1151526