

GSK-3 阻害剤（CHIR99021）がヒト iPS 細胞に及ぼす影響の  
解明と増殖分化制御のための同剤の適用条件の最適化

山梨大学大学院  
医工農学総合教育部  
博士課程学位論文

2021 年 3 月

依田 聖未

## 目次

緒論	1
既往の研究	
第1節 再生医療と幹細胞	
1. 再生医療	3
2. 多能性幹細胞	
(1) 胚性がん細胞 (embryonal carcinoma cells ; EC 細胞)	4
(2) 胚性幹細胞 (embryonic stem cells ; ES 細胞)	4
(3) 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞)	5
第2節 多能性幹細胞の培養における化合物の役割	
1. 多能性幹細胞の培養における課題	7
2. 多能性幹細胞の培養における化合物によるシグナル制御	8
第3節 Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の制御	
1. Wnt シグナル	10
2. $\beta$ -Catenin の分解を抑制する GSK-3 阻害剤	10
第4節 ヒト iPS 細胞の培養における Wnt シグナル制御の重要性	13
参考文献	14
第1章 接着培養条件下での CHIR99021 処理がヒト iPS 細胞の増殖と分化へ及ぼす影響	
第1節 ヒト iPS 細胞の未分化性を維持しつつ増殖を促進する CHIR99021 処理条件の最適化	
1. 序	27
2. 実験材料及び方法	
(1) フィーダー存在下 (on feeder) でのヒト iPS 細胞の培養	29
(2) フィーダー非存在下 (feeder-free) でのヒト iPS 細胞の培養	29
(3) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理	30
(4) 生細胞のカウントと比増殖速度・倍加時間の算出	30
(5) Total RNA 抽出及び cDNA 合成、リアルタイム RT-qPCR 解析	31
(6) CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の連続継代培養と倍加力の算出	32
(7) 統計解析	33

3. 結果	
(1) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞に対する CHIR99021 処理期間の最適化	
i) 様々な期間で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞のコロニー様相	36
ii) 様々な期間で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の増殖と未分化性	36
(2) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞に対する 4 日間培養のうちの後半 2 日間の CHIR99021 処理における同剤添加濃度の最適化	
i) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞のコロニー様相	37
ii) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の増殖	37
iii) CHIR99021 処理条件下で連続継代培養したヒト iPS 細胞のコロニー様相と増殖	38
iv) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の未分化性	38
4. 考察	47
第 2 節 接着培養をベースとしたヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導における CHIR99021 処理条件の最適化	
1. 序	49
2. 実験材料及び方法	
(1) フィーダー存在下 (on feeder) でのヒト iPS 細胞の培養	50
(2) フィーダー非存在下 (feeder-free) でのヒト iPS 細胞の培養	50
(3) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理	51
(4) 接着培養をベースとした心筋細胞への段階的分化誘導	51
(5) Total RNA 抽出及び cDNA 合成、リアルタイム RT-qPCR 解析	51
(6) 統計解析	52
3. 結果	
(1) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導後の様相と収縮	55
(2) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞が心筋細胞への分化誘導後の心筋成熟	55
4. 考察	58
第 3 節 要約	59
参考文献	60
第 2 章 浮遊培養をベースとしたヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導における胚様体形成期間中の CHIR99021 処理条件の最適化	
第 1 節 序	66

第2節 実験材料及び方法	
1. フィーダー存在下 (on feeder) でのヒト iPS 細胞の培養	68
2. フィーダー非存在下 (feeder-free) でのヒト iPS 細胞の培養	68
3. 胚様体形成期間中のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理	69
4. 胚様体形成後のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理	69
5. 胚様体の直径計測	69
6. 浮遊培養をベースとした心筋細胞への段階的分化誘導	70
7. Total RNA 抽出及び cDNA 合成、リアルタイム RT-qPCR 解析	70
8. 統計解析	71
第3節 結果	
1. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の生育	74
2. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の中胚葉分化	74
3. 胚様体形成後に CHIR99021 処理した胚様体の中胚葉分化	75
4. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の心筋細胞への分化誘導後の様相と収縮	75
5. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の心筋細胞への分化誘導後の心筋成熟	76
第4節 考察	83
第5節 要約	85
参考文献	86
総括	92
謝辞	95

## 緒 論

2018 年現在、事故や疾病により臓器機能が低下し、臓器移植を希望している患者数は約 14,000 人（心臓：669 人、肺：329 人、肝臓：320 人、腎臓：12,524 人、膵臓：209 人、小腸：3 人）であるが、死後の臓器提供による移植を受ける患者数は約 400 名である。つまり、臓器移植は慢性的なドナー不足という課題を抱えている<sup>(1)</sup>。加えて、移植後の免疫拒絶反応を抑えるために、副作用の強い免疫抑制剤を服用し続けなければならないという医学的課題がある。これらの課題を解決する新しい技術として、再生医療が注目を集めている。

再生医療とは、細胞や組織を補充することによって、事故や疾病により機能が低下した臓器の機能回復を図る治療法である。1998 年に Thomson JA らによって、不妊治療（体外受精）で余った受精卵を用いたヒト ES 細胞（embryonic stem cells；ES 細胞）が樹立された<sup>(8)</sup>。無限の増殖能とすべての組織細胞へ分化できる多能性を有したヒト多能性幹細胞が誕生したことで、再生医療研究が加速することになった。しかし、ヒト ES 細胞の樹立には、ヒト胚の使用という倫理的課題が伴っていた。そのような状況下で、2007 年に Yamanaka S らは、生体から採取した線維芽細胞へ山中 4 因子を導入し、ヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells；iPS 細胞）を作製することに成功した<sup>(9)</sup>。iPS 細胞の誕生により ES 細胞が抱えていた倫理的課題の克服が可能となり、再生医療が臨床応用に向けてますます注目されるようになった。

実際、2014 年の滲出型加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植<sup>(24, 25)</sup>、2018 年のパーキンソン病・脳血管障害に対する iPS 細胞由来神経細胞移植<sup>(26, 27)</sup>や 2020 年の重症心不全に対する iPS 細胞由来心筋細胞シート移植<sup>(28, 29)</sup>などの自家・他家 iPS 細胞を用いた再生医療の臨床研究が進んでいる。また、創薬研究において、ヒト iPS 細胞は薬剤毒性評価系<sup>(30-33)</sup>、難治性疾患の病態解明や治療薬開発<sup>(34-36)</sup>などへの応用が期待されている。こうした再生医療や創薬研究などへの応用という観点から、動物由来の因子を使用せず動物培養細胞との共培養を行わない（xeno-free）培養法の確立および不明な因子を含まない培地（defined medium）の開発が求められている。そのため、生理活性を持つ化合物によるヒト iPS 細胞のシグナル制御が注目を集めている。

既に、化合物によるシグナル制御を用いた多能性幹細胞の培養方法を確立する試みは始まっている。研究が先行しているマウス多能性幹細胞の未分化維持培養では、2008 年に Ying QL らによって、Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) 阻害剤である CHIR99021<sup>(64)</sup>と強力な MAPK/ERK 阻害剤である PD0325901<sup>(65)</sup>との共添加による 2i 無血清培地が様々な系統のマウスから均一な ES 細胞の樹立と長期的な未分化維持を可能にすると示された<sup>(60)</sup>。ヒト多能性幹細胞においても、複数の化合物カクテルにより血清や増殖因子を代替する未分化維持培養<sup>(59, 69, 70)</sup>や化合物スクリーニングによる未分化維持に効果がある化合物の探索<sup>(71, 72)</sup>が行われており、化合物を利用した培養方法の確立が進められている。特に、GSK-3 阻害剤は、Wnt シグナルの活性化がヒト多能性幹細胞の未分化維持に有用であると示唆されてい

ることから<sup>(73-75)</sup>、PD0325901 と Y-27632 との共添加で血清・フィーダー非存在下での未分化維持<sup>(69)</sup>や Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK)阻害剤である ID-8<sup>(76)</sup>と Calcineurin/NFAT 阻害剤である Tacrolimus (FK506)<sup>(77)</sup>との共添加による TGF- $\beta$  と FGF2 の代替<sup>(59,70)</sup>として用いられている。一方で、Wnt シグナルの活性化は、ヒト多能性幹細胞の分化を促進することでも知られている<sup>(78,79)</sup>。特に、心筋細胞分化誘導において、Wnt は BMP とともに重要なシグナルであるとされ、これらのシグナルの時間特異的制御による効率的な心筋細胞への分化誘導方法が開発されてきた<sup>(80-83)</sup>。BMP や Wnt シグナルを制御する化合物による心筋細胞への分化誘導方法の開発は進んでおり<sup>(84-89)</sup>、2012 年に Minami I らは化合物による Wnt シグナル活性制御のみでヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導を成功させている<sup>(58)</sup>。このように、Wnt シグナルの活性化は多能性幹細胞の未分化維持と特定組織細胞への分化誘導の両方で重要な役割を果たしている。そのため、ヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、Wnt シグナルの活性を制御する必要がある。

化合物による Wnt シグナルの活性化は GSK-3 阻害剤によって行われる。GSK-3 阻害剤は、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路内の GSK-3 を阻害し、 $\beta$ -Catenin の分解を防ぐことで、 $\beta$ -Catenin の核内への移行を促進する働きを持つ<sup>(100)</sup>。2004 年に Sato N らによって、GSK-3 阻害による Wnt シグナルの活性化がマウス・ヒト ES 細胞の多能性に寄与すると明らかにされてから<sup>(73)</sup>、この経路の阻害剤・活性化剤の需要が大きく拡大し、多数の薬剤が開発されてきた。代表的な GSK-3 阻害剤として、SB-216763<sup>(101)</sup>、BIO<sup>(102)</sup>、CHIR98014<sup>(64)</sup>や CHIR99021 があげられるが、その中で最も細胞毒性が低く、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の活性化能が高いのは CHIR99021 である<sup>(136)</sup>。CHIR99021 は、体細胞の初期化<sup>(119-124)</sup>、多能性維持<sup>(60, 125, 126)</sup>、細胞増殖促進<sup>(127-131)</sup>や特定組織細胞への分化誘導<sup>(118, 132-135)</sup>など様々な用途で用いられている。このように、CHIR99021 は体細胞の初期化から特定組織細胞への分化誘導に至るまで様々な用途で使用されている。CHIR99021 が多能性幹細胞へ及ぼす影響は、細胞増殖や分化といった発生段階<sup>(118, 121, 129, 134)</sup>や浮遊培養か接着培養かといった細胞形態<sup>(89, 138, 139)</sup>によって異なる。また、細胞増殖や分化といったヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR99021 処理条件を最適化する試みはなされていない。

以上のことから、本研究では、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR99021 処理がヒト iPS 細胞の増殖や分化へ及ぼす影響を明らかにし、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養、接着培養または浮遊培養をベースとした心筋細胞分化誘導における同剤の適用条件の最適化を行った。

## 既往の研究

### 第1節 再生医療と幹細胞

#### 1. 再生医療

従来の医療は、事故や疾病による臓器機能の低下を早期に発見し、その原因の除去や生体防御反応を用いて、機能が低下した臓器の自然回復を待つものであった。しかし、臓器機能の低下も一定の限度を超えると不可逆的となり、その回復は困難となる。そのため、他者の健康な臓器を移植し、機能を回復させる臓器移植を必要とする人は多い。2018年現在、臓器移植を希望している患者数は約14,000人（心臓：669人、肺：329人、肝臓：320人、腎臓：12,524人、膵臓：209人、小腸：3人）であるが、死後の臓器提供による移植を受ける患者数は約400名である。つまり、臓器移植は慢性的なドナー不足という課題を抱えている<sup>(1)</sup>。加えて、移植後の免疫拒絶反応を抑えるために、副作用の強い免疫抑制剤を服用し続けなければならないという医学的課題がある。また、臓器移植の代替医療である人工臓器においても、体内埋め込み型では動力の確保が難しく永続的に使用できない他、効果が一過性であるため、根治治療とまで至らない。人工臓器の中で最も一般的な人工透析でさえ、週数回の継続的な治療と多額の医療費が必要である。これらの課題を解決する新しい技術として、再生医療が注目を集めている。

再生医療とは、細胞や組織を補充することによって、事故や疾病により機能が低下した臓器の機能回復を図る治療法である。体性幹細胞の一つである骨髄、末梢血や臍帯血中の造血幹細胞を用いた移植は盛んに行われており<sup>(2)</sup>、様々な難治性疾患に対する根治を目指す治療法として確立されている。造血幹細胞とは、赤血球、白血球や血小板など体が必要とする多様な種類の血液細胞へ分化する細胞である<sup>(3,4)</sup>。つまり、造血幹細胞移植は、移植された造血幹細胞が体内で自己増殖し血液細胞へと分化することで、恒常的な造血システムの維持を可能にする。このように、幹細胞には体内で持続的に機能できるという特徴があり、それが治療上の大きな効果を発揮する。

その後、様々な臓器や組織から造血幹細胞以外の幹細胞の存在が次々報告されるようになった<sup>(5-7)</sup>。そして、1998年に Thomson JA らによって、不妊治療（体外受精）で余った受精卵を用いたヒト ES 細胞（embryonic stem cells；ES 細胞）が樹立された<sup>(8)</sup>。無限の増殖能とすべての組織細胞へ分化できる多能性を有したヒト多能性幹細胞の誕生によって、再生医療研究が加速することになった。しかし、ヒト ES 細胞の樹立には、ヒト胚の使用という倫理的課題が伴っていた。そのような状況下で、2007年に Yamanaka S らは、生体から採取した線維芽細胞へ山中 4 因子を導入し、ヒト人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells；iPS 細胞）を作製することに成功した<sup>(9)</sup>。iPS 細胞の誕生により ES 細胞が抱えていた倫理的課題の克服が可能となり、再生医療が臨床応用に向けてますます注目されるようになった。

## 2. 多能性幹細胞

### (1) 胚性がん細胞 (embryonal carcinoma cells ; EC 細胞)

細胞分化や発生過程の研究における非常に重要な実験材料として、初期胚内に存在する多分化能を持つ未分化幹細胞の性質を保持した細胞株の獲得が求められていた。しかし、子宮の中にある哺乳類の初期胚はとても小さく見つけにくく、ヒトに至っては倫理的な問題もあり、初期発生を研究するのは極めて困難であった。

1950年代、マウスの精巣や卵巣で自然発生した奇形がん腫 (teratocarcinoma) の中に活発な増殖能を持つ未分化な細胞が存在することが明らかになった<sup>(10)</sup>。その後、Lewis Jらによって、Teratocarcinoma から活発に増殖する未分化な細胞株が樹立され、胚性がん細胞 (embryonal carcinoma cells ; EC 細胞) と名付けられた<sup>(11)</sup>。この時、歴史的に初めて体外で培養された多能性幹細胞が誕生した。

EC 細胞が初期発生と同様の性質を有する細胞であると考えた Brinster RL と Mintz Bらは、マウス EC 細胞をマウス胚盤胞へ注入しキメラマウスを誕生させた<sup>(12, 13)</sup>。このキメラマウスは EC 細胞由来の生殖細胞を持ち、EC 細胞由来の遺伝子を子孫へ伝えた。このことから、何らかの遺伝子操作が施された EC 細胞を初期胚へ戻すことで、人為的に遺伝子操作されたマウスの作製が可能となった。

EC 細胞とのキメラマウスの誕生は、その後の発生生物学へ大きな影響を与え、様々な研究者により EC 細胞を用いたキメラマウスが作製された。しかし、EC 細胞を用いたキメラマウスの作製は高頻度で腫瘍を誘発するため、正常な個体を獲得することが難しい。仮に作製できても、生殖細胞への分化を再現できず、EC 細胞由来の遺伝子をもった子孫を残せないなどの問題があった。腫瘍組織由来の EC 細胞では、染色体数や遺伝子発現の異常が高頻度に存在するため、正常細胞に分化できないと考えられている。そこで、多くの研究者たちは、マウスの遺伝子操作を意図して「正常な」幹細胞を採取しようと試みた。

### (2) 胚性幹細胞 (embryonic stem cells ; ES 細胞)

EC 細胞で培った経験をもとに、1981年に Evans MJ らと Martin GR らは、マウス初期胚の胚盤胞内にある内部細胞塊から胚性幹細胞 (embryonic stem cells ; ES 細胞) を樹立した<sup>(14, 15)</sup>。「正常な」幹細胞である ES 細胞は、キメラマウスの作製の際に腫瘍を形成せず生殖細胞へも効率よく分化し、ES 細胞由来の遺伝子を持った子孫を残すことが可能であった。さらに、1989年に Thomas KR と Capecchi MR は、1985年に Smithies Oらにより開発された遺伝子ターゲティング法を利用して<sup>(16)</sup>、特定の遺伝子をノックアウトした ES 細胞を胚盤胞に戻すことにより「ノックアウトマウス」を作製した<sup>(17)</sup>。この手法によって、疾患や発生に関係した遺伝子の機能を一つずつ確実に調べることが出来るようになり、マウス ES 細胞は今や医学・生物学全体に欠かせないツールとなっている。

その後、再生医療を意図していた Thomson JA らは、1995年に初の霊長類 ES 細胞を樹立し<sup>(18)</sup>、1998年にヒト胚からヒト ES 細胞の樹立に成功した<sup>(8)</sup>。無限の増殖能とすべての

組織細胞へ分化できる多能性を有したヒト多能性幹細胞の誕生によって、再生医療研究が加速することになった。また、核移植技術と組み合わせることで、患者専用の ES 細胞を樹立し、免疫拒絶反応を回避できる可能性もある<sup>(19)</sup>。しかし、ヒト胚の使用という倫理的課題を伴うことから、倫理的課題の少ない「真に臨床応用できる多能性幹細胞」が求められた。

### (3) 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞)

「真に臨床応用できる多能性幹細胞」の樹立を目指した Yamanaka S らは、体細胞クローニング<sup>(20)</sup>や ES 細胞との融合<sup>(21, 22)</sup>による体細胞ゲノムの初期化の知見から、未受精卵や ES 細胞に存在する初期化誘導因子に着目した。それらの初期化誘導因子を体細胞へ導入することで、胚を使用せず多能性幹細胞を樹立できると考えたのである。Yamanaka S らは、2006 年に同定された 4 つの転写因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) を生体から採取したマウス線維芽細胞へ導入することで、ES 細胞に形態学的にも機能的にも類似した人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells ; iPS 細胞) を樹立し<sup>(23)</sup>、2007 年にはヒト iPS 細胞の樹立に成功した<sup>(9)</sup>。

iPS 細胞の誕生により ES 細胞が抱えていた倫理的課題の克服が可能となり、再生医療が臨床応用に向けてますます注目されるようになった。従来のドナー由来の臓器や組織を用いた移植では、免疫拒絶反応によるドナー臓器の機能不全を抑えるために、副作用の強い免疫抑制剤を服用が必要であった。患者由来の体細胞から ES 細胞とほぼ同様の性質を有する iPS 細胞を樹立することで、患者由来の iPS 細胞から作製した臓器や組織を用いた移植が可能になる。iPS 細胞由来の臓器や組織を用いた移植によって、免疫拒絶反応に関する医学的課題の解決が期待される。2014 年には滲出型加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植の臨床研究が開始され<sup>(24, 25)</sup>、多能性幹細胞を利用した再生医療が現実のものとなってきた。

実際の臨床応用を考えた際、自家 iPS 細胞による移植治療には 1 症例につき数百万から一千万円程度のコストがかかると考えられる。さらに、iPS 細胞の樹立から移植用の組織細胞の作製には数か月以上かかることから、急性期の疾患の治療は困難である。そのため、日本人に多い HLA 型の iPS 細胞を保存する再生医療用 iPS 細胞ストックプロジェクトも進められている。実際、このプロジェクトから提供された他家 iPS 細胞を用いた臨床研究が開始されている。2018 年のパーキンソン病・脳血管障害に対する iPS 細胞由来神経細胞移植<sup>(26, 27)</sup>や 2020 年の重症心不全に対する iPS 細胞由来心筋細胞シート移植<sup>(28, 29)</sup>などである。

創薬研究において、ヒト iPS 細胞は薬剤毒性評価系、難治性疾患の病態解明や治療薬開発などへの応用が期待されている。薬剤毒性評価系として、ヒト iPS 由来の心筋細胞、肝細胞、アストロサイトや神経細胞などがすでに販売されている。従来の薬剤毒性評価は、モデル動物、非ヒト初代培養細胞やヒト初代培養細胞などが使用されてきた。動物モデルや非ヒト初代培養細胞ではヒトと種間差があるため、ヒト特異的に発生しうる毒性を予測することは難しい。また、ヒト初代培養細胞は *in vitro* で増殖しないため、同一ロットでの試験は

不可能であり、ロット間差が極めて大きく安定した毒性評価が難しい。種間差がなく、無限に供給可能なヒト iPS 細胞由来の組織細胞は、従来の薬剤毒性評価系における課題の克服が期待される<sup>(30-33)</sup>。

また、難治性疾患の患者由来の体細胞から疾患を発症する遺伝情報を有する iPS 細胞 (疾患特異的 iPS 細胞) の作製が可能になったことで、難治性疾患の病態解明や治療薬開発が可能になった。2008 年に Eggan K らは、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の患者皮膚細胞から iPS 細胞を樹立し、その罹患組織細胞である運動ニューロンへの分化誘導が可能であることを示した<sup>(34)</sup>。それに続いて、2009 年には Daley GQ らによって、筋ジストロフィー症やパーキンソン病などの 10 種類の遺伝子疾患から疾患特異的 iPS 細胞が樹立された<sup>(35)</sup>。そして、同年 Ebert AD らによって、脊髄性筋萎縮症 (SMA) 由来の疾患特異的 iPS 細胞を用いた *in vitro* モデルが疾患の病態を模倣しその解析や治療薬の探索に使用できることが示された<sup>(36)</sup>。その後、現在に至るまで非常に多くの難治性疾患から iPS 細胞が樹立され、疾患モデルの作製が進められている。

## 第2節 多能性幹細胞の培養における化合物の役割

### 1. 多能性幹細胞の培養における課題

未分化状態での多能性幹細胞の効率的な増殖は、その後の特定組織細胞への分化誘導効率は勿論、再生医療や創薬研究などへの応用においても重要である。そのため、多能性幹細胞の未分化維持メカニズムの解明に関する研究が多くなされてきた。マウス多能性幹細胞は、マウス胎仔由来線維芽細胞 (murine embryonic fibroblasts; MEF) などのフィーダー存在下 (on feeder) で、血清と白血病阻止因子 (leukemia inhibitory factor ; LIF) を添加した培地で維持されている<sup>(15, 23)</sup>。さらに、LIF と骨形成因子 (bone morphogenetic protein; BMP) を培地に添加することで、フィーダー非存在下 (feeder-free) かつ血清フリーでの未分化維持が可能であることが示唆された<sup>(37, 38)</sup>。一方、ヒト多能性幹細胞はマウスとは異なり、フィーダー存在下で、代替血清 (knockout serum replacement; KSR) とマウス線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factors 2; FGF2) を添加した培地で維持されている<sup>(9, 39)</sup>。また、トランスフォーミング増殖因子ベータ (transforming growth factor- $\beta$  ; TGF- $\beta$ ) と FGF2 を培地へ添加し<sup>(40, 41)</sup>、コート剤として細胞外マトリックスを用いることで、フィーダーフリーかつ血清フリーでの未分化維持が可能となっている。

しかし、これらの培養方法は生物由来の成分に大きく依存しており、培養細胞の品質が安定しないという課題がある。LIF や FGF2 などの増殖因子はロット間差が大きいため、安定した培養成果を得ることが難しく、臨床応用に適した GMP (good manufacturing practice) グレードのヒト組換えタンパク質は非常に高価であるため、培養コストが上がる。また、フィーダーから分泌された液性因子や血清中の成分が特定系譜の細胞への分化傾向を与えたり、なんらかの処理をした際にその結果を修飾したりする可能性が考えられる。特に、ヒト多能性幹細胞と MEF との共培養は異種細胞の混入の危険性があり、ヒト細胞には通常存在しない N-グリコシルノイラミン酸を含む糖鎖構造がヒト細胞表面にみられる<sup>(42)</sup>など、臨床応用における安全性が問題視されている。

これは、特定組織細胞への分化誘導方法の開発においても同様である。これまで、再生医療や創薬研究などへの応用を目的として、様々な特定組織細胞への分化誘導方法の開発が行われてきた。それらの分化誘導方法の多くは、培養細胞との共培養<sup>(43-45)</sup>、血清<sup>(46, 47)</sup>、様々な増殖因子の添加<sup>(48, 49)</sup>、cDNA、RNAi などの強制発現による遺伝子操作<sup>(50)</sup>や細胞外マトリックスによる誘導<sup>(51)</sup>などを用いるため、複雑なものとなっている。特に、心筋細胞分化誘導においては、1985年に Doetschman TC らによって、マウス ES 細胞が心筋細胞、内臓卵黄嚢や血島への分化が報告されて以降<sup>(52)</sup>、心筋細胞への分化誘導後に細胞移植を行うことを念頭に研究が進められるようになった<sup>(53)</sup>。その後、2001年に Kehat I らによって、ヒト ES 細胞が 20% FBS を含んだ培地で自然発生的に心筋細胞へ分化することが報告され<sup>(54)</sup>、ヒト多能性幹細胞の心筋細胞への分化誘導方法の開発が盛んに行われるようになった<sup>(55, 56)</sup>。具体的には、内胚葉様の支持細胞であるマウス END-2 細胞との共培養<sup>(42, 43)</sup>、BMP4, FGF2, Activin A, DKK1 や VEGF などの心臓発生・心筋細胞分化に重要な増殖因子の添加<sup>(48, 49)</sup>や

細胞外マトリックスであるマトリゲルの添加による誘導<sup>(51)</sup>などである。

このように、特定組織細胞への分化誘導方法も生物由来の成分に大きく依存しており、動物培養細胞の品質、血清、増殖因子や細胞外マトリックスのロット間差などの影響を受けやすく分化誘導の再現性が低い。さらに、特定組織細胞への分化誘導では、複数の増殖因子を組み合わせて使用するため、未分化維持培養と比較して培養コストがさらに上がる傾向にある。

いずれの場合においても、再生医療や創薬研究などへの応用という観点から、動物由来の因子を使用せず動物培養細胞との共培養を行わない培養法 (xeno-free) の確立および不明な因子を含まない培地 (defined medium) の開発が求められている。そのため、生理活性を持つ化合物によるヒト iPS 細胞のシグナル制御が注目を集めている。

化合物は工業的に大量合成可能であることから、より安価でロット間差が少ない。また、複数の化合物を組み合わせることで、複数の細胞内器官を同時に活性化または抑制するため、多様なシグナルを与えることができ、標的分子の情報により様々な生命現象における分子メカニズムの解明につながる<sup>(57)</sup>。加えて、医薬品として使用されている化合物は、人体投与への安全性が確認されているため、臨床応用に移行しやすい。つまり、化合物を血清や増殖因子などの代替として用いることで、既知の因子のみで培地調製が可能になり、培養コストが削減され、安価で安全なヒト iPS 細胞とヒト iPS 細胞由来組織細胞の安定供給が可能になる<sup>(58, 59)</sup>。

## 2. 多能性幹細胞の培養における化合物によるシグナル制御

既に、化合物によるシグナル制御を用いた多能性幹細胞の培養方法を確立する試みは始まっている。研究が先行しているマウス多能性幹細胞の未分化維持培養では、2008年に Ying QL らが、Protein kinase の特異的阻害剤の組み合わせが、様々な系統のマウスから均一な ES 細胞の樹立と長期的な未分化維持を可能にすることを明らかにした<sup>(60)</sup>。まず、Ying QL らは、マウス ES 細胞の分化には FGF4 の自己分泌による MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase ; MAPK) /ERK 経路の活性化が関わっていることから<sup>(61)</sup>、MAPK/ERK 経路の上流に位置する FGF 受容体チロシンキナーゼ (FGF receptor tyrosine kinase) 阻害剤である SU5402<sup>(62)</sup>と MAPK/ERK 阻害剤である PD184352<sup>(63)</sup>を添加することによって、ES 細胞の分化抑制を行った。しかし、アポトーシスが高確率で発生し、低密度での培養が困難であった。そのため、Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)阻害剤である CHIR99021<sup>(64)</sup>をともに加え、Wnt シグナルを活性化させることにより細胞増殖を促進し、安定的な培養を可能にした。さらに、より強力な MAPK/ERK 阻害剤で PD0325901<sup>(65)</sup>と CHIR99021 の共添加による 2i 無血清培地でのマウス ES 細胞の未分化維持が可能であることも明らかにされ、マウス iPS 細胞の樹立などにも応用されている<sup>(66, 67)</sup>。

ヒト多能性幹細胞においても、Rho-associated kinase (ROCK) 阻害剤である Y-27632 による解離後のヒト ES 細胞の生存率向上<sup>(68)</sup>、複数の化合物カクテルにより血清や増殖因子を

代替する未分化維持培養<sup>(59, 69, 70)</sup>や化合物スクリーニングによる未分化維持に効果がある化合物の探索<sup>(71, 72)</sup>が行われており、化合物を利用した培養方法の確立が進められている。特に、GSK-3 阻害剤は、Wnt シグナルの活性化がヒト多能性幹細胞の未分化維持に有用であると示唆されていることから<sup>(73-75)</sup>、PD0325901 と Y-27632 との共添加で血清・フィーダー非存在下での未分化維持<sup>(69)</sup>や Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK)阻害剤である ID-8<sup>(76)</sup>と Calcineurin/NFAT 阻害剤である Tacrolimus (FK506)<sup>(77)</sup>との共添加による TGF- $\beta$  と FGF2 の代替<sup>(59, 70)</sup>として用いられている。

一方で、Wnt シグナルの活性化は、ヒト多能性幹細胞の分化を促進することでも知られている<sup>(78, 79)</sup>。特に、心筋細胞分化誘導において、Wnt は BMP とともに重要なシグナルであるとされている。一般的に、心筋細胞分化誘導は、ES 細胞の分化が正常の発生を模倣していることから、ES 細胞の分化時に心臓発生・心筋細胞分化において重要な増殖因子を添加する方法が用いられてきた。なかでも、BMP や Wnt シグナルに関する知見は数多く存在し、これらのシグナルを時間特異的に制御することで、効率的な心筋細胞への分化誘導方法が開発されてきた<sup>(80-83)</sup>。BMP や Wnt シグナルを制御する化合物による心筋細胞への分化誘導方法の開発は進んでおり<sup>(84-89)</sup>、2012 年に Minami I らは化合物による Wnt シグナル活性制御のみでヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導を成功させている<sup>(58)</sup>。このように、Wnt シグナルの活性化は、多能性幹細胞の未分化維持と特定組織細胞への分化誘導の両方で重要な役割を果たしている。そのため、ヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、Wnt シグナルの活性を制御する必要がある。

### 第3節 Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の制御

#### 1. Wnt シグナル

Wnt シグナルは進化上広く保存されており、発生、形態形成など様々な生命現象に重要な役割を果たしている。Wnt シグナルを伝達する経路には、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路、PCP 経路、Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路の3種類が存在する。このうち、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路は、がん・糖尿病・肥満・線維化疾患・骨粗鬆症などの発症に大きく寄与し<sup>(90)</sup>、幹細胞の Stemness と密接に関係することが明らかになっている<sup>(73, 91, 92)</sup>。

Wnt は、小胞体でアシル基転移酵素 Porcupine によりパルミチン酸・パルミトレイン酸付加を受けた後、Wnt 分泌細胞から細胞外へ分泌される。標的細胞表面の受容体である7回膜貫通受容体 Frizzled と Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) と分泌された Wnt が結合することで、Disheveled (Dsh) が活性化され、Adenomatous polyposis coli (APC), Axin, Casein kinase I (CKI) と GSK-3 からなる  $\beta$ -Catenin 分解複合体を不活化させる。CKI と GSK-3 によるリン酸化をまぬがれた  $\beta$ -Catenin が核内へ移行し、転写制御因子群である T cell factor/Lymphocyte enhancing factor (TCF/LEF) との相互作用により標的遺伝子の発現を調整し、細胞の増殖や分化を制御している<sup>(93)</sup>。Wnt が細胞に作用していない状態では、 $\beta$ -Catenin は、 $\beta$ -Catenin 分解複合体により N 末端領域がリン酸化され、ユビジン化を受け、プロテアソームにより分解される。

ヒト結腸癌細胞や多能性幹細胞においては、*c-MYC*, *c-JUN*, *FRA-1* と *CYCLIN D1* といった細胞増殖と細胞周期に関連する遺伝子<sup>(94-96)</sup>、*NANOG* などの多能性に関連する遺伝子<sup>(73, 97)</sup> が Wnt 標的遺伝子であるとされている。また、マウス ES 細胞においては、*Oct3/4* などの多能性に関連する遺伝子<sup>(73, 92, 98)</sup>、*Axin2* といった Wnt シグナルの制御に関連する遺伝子や *T* と *Cdx1* といった内中胚葉分化に関連する遺伝子<sup>(99)</sup> が Wnt 標的遺伝子であるとされている。

以上のことから、 $\beta$ -Catenin の核内移行のバランスが多能性幹細胞の未分化維持と特定組織細胞への分化誘導に重要であるといえる。つまり、ヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、Wnt シグナルを活性化させ、核内へ移行する  $\beta$ -Catenin の量を調節し、Wnt 標的遺伝子の転写活性を制御する必要がある。

#### 2. $\beta$ -Catenin の分解を抑制する GSK-3 阻害剤

化合物による Wnt シグナルの活性化は GSK-3 阻害剤によって行われる。GSK-3 阻害剤は、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路内の GSK-3 を阻害し、 $\beta$ -Catenin の分解を防ぐことで、 $\beta$ -Catenin の核内への移行を促進する働きを持つ<sup>(100)</sup>。2004 年に Sato N らによって、GSK-3 阻害による Wnt シグナルの活性化がマウス・ヒト ES 細胞の多能性に寄与すると明らかにされてから<sup>(73)</sup>、この経路の阻害剤・活性化剤の需要が大きく拡大し、多数の薬剤が開発されてきた。代表的な GSK-3 阻害剤として、SB-216763<sup>(101)</sup>、BIO<sup>(102)</sup>、CHIR98014<sup>(64)</sup> や CHIR99021 があげられる。

SB-216763 は、アポトーシスの抑制、多能性維持、細胞増殖促進や特定組織細胞への分化制御などに用いられている。アポトーシスの抑制では、5  $\mu\text{M}$  SB-216763 と LiCl によるラット間葉系幹細胞のアスピリン誘発アポトーシスの抑制<sup>(103)</sup>、10  $\mu\text{M}$  SB-216763 によるヒト神経前駆細胞のアポトーシス抑制<sup>(104)</sup>が報告されている。多能性維持では、MEF 存在下・LIF 非存在下での 10  $\mu\text{M}$  SB-216763 によるマウス ES 細胞の多能性維持<sup>(105)</sup>、SB-216763 の処理期間と添加濃度に依存した HEK939 細胞の *NANOG* の発現促進<sup>(97)</sup>が報告されている。細胞増殖促進では、2.5  $\mu\text{M}$  SB-216763, Wnt3a と FGF2 によるマウス網膜幹細胞の増殖促進<sup>(106)</sup>や 5  $\mu\text{M}$  SB-216763 添加によるマウス神経前駆細胞の増殖促進<sup>(107)</sup>が報告されている。特定組織細胞への分化制御では、10~20  $\mu\text{M}$  SB-216763 によるヒトグリオブラストーマの分化促進<sup>(108)</sup>、3  $\mu\text{M}$  SB-216763 によるヒト神経前駆細胞から新生神経分化の促進<sup>(109)</sup>、5  $\mu\text{M}$  SB-216763 によるヒト間葉系幹細胞の脂肪分化抑制<sup>(110)</sup>、1  $\mu\text{M}$  SB-216763 によるヒト骨髄幹細胞から軟骨形成の促進<sup>(111)</sup>が報告されている。

BIO は、体細胞の初期化、多能性維持、細胞増殖制御や特定組織細胞への分化制御などに用いられている。体細胞の初期化では、1  $\mu\text{M}$  BIO 処理したマウス ES 細胞との融合によるマウス線維芽細胞、神経幹細胞や胸腺細胞の初期化<sup>(112)</sup>が報告されている。多能性維持では、フィーダー非存在下で 2  $\mu\text{M}$  BIO によるマウス・ヒト ES 細胞の多能性維持<sup>(73)</sup>が報告されている。細胞増殖制御では、5  $\mu\text{M}$  BIO による成体ラット心筋細胞の増殖促進<sup>(113)</sup>、0.5  $\mu\text{M}$  BIO によるヒト脂肪由来幹細胞の増殖抑制<sup>(114)</sup>、0.2  $\mu\text{M}$  BIO によるヒト臍帯血原始造血細胞の増殖促進<sup>(115)</sup>が報告されている。特定組織細胞への分化制御では、0.5  $\mu\text{M}$  BIO によるヒト脂肪由来幹細胞の脂肪・骨形成抑制<sup>(114)</sup>が報告されている。

CHIR98014 は、体細胞の初期化や特定組織細胞への分化誘導などに用いられている。体細胞の初期化では、3  $\mu\text{M}$  CHIR98014 を含めた 5 種類の化合物によるマウス胚性線維芽細胞から線維軟骨細胞への化学的初期化<sup>(116)</sup>が報告されている。特定組織細胞への分化誘導では、0.4  $\mu\text{M}$  CHIR98014 によるラット間葉系幹細胞の骨形成促進<sup>(117)</sup>、VEGF 非存在下で 0.6  $\mu\text{M}$  CHIR98014 によるヒト iPS 細胞の内皮前駆細胞への分化促進<sup>(118)</sup>などが報告されている。

CHIR99021 は、体細胞の初期化、多能性維持、細胞増殖促進や特定組織細胞への分化誘導など様々な用途で用いられている。体細胞の初期化では、3  $\mu\text{M}$  CHIR99021 を含めた 3 種類の化合物と遺伝子導入によるラット・ヒト iPS 細胞の樹立<sup>(119, 120)</sup>、*SOX2* の代替として 10  $\mu\text{M}$  CHIR99021 によるヒト iPS 細胞の樹立<sup>(121)</sup>、0.3~3  $\mu\text{M}$  CHIR99021 を含めた 5 種類の化合物と LIF, Activin A によるヒト naïve-ES 細胞の誘導<sup>(122)</sup>、3  $\mu\text{M}$  CHIR99021 を含めた 4 種類の化合物と *Oct3/4* の遺伝子導入によるマウス iPS 細胞の樹立<sup>(123)</sup>、遺伝子導入を用いず 10~20  $\mu\text{M}$  CHIR99021 を含めた 6 種類の化合物のみによるマウス iPS 細胞の樹立<sup>(124)</sup>が報告されている。多能性維持では、3  $\mu\text{M}$  CHIR99021 を含めた 2, 3 種類の化合物によるマウス ES 細胞の未分化維持培養<sup>(60, 125)</sup>、10  $\mu\text{M}$  CHIR99021 によるヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の分化能強化<sup>(126)</sup>が報告されている。細胞増殖促進では、10  $\mu\text{M}$  CHIR99021 による

3 種類の化合物によるヒト造血幹細胞と前駆細胞の維持培養<sup>(127)</sup>、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の増殖促進<sup>(128)</sup>、フィーダー非存在下での 3  $\mu$ M CHIR99021 によるマウス ES 細胞の増殖促進<sup>(129)</sup>、フィーダー非存在下での 1.5  $\mu$ M CHIR99021 を含めた 3 種類の化合物によるマウス iPS 細胞の増殖促進<sup>(130)</sup>、1  $\mu$ M CHIR99021 によるマウス・ヒト成熟心筋細胞の増殖促進<sup>(131)</sup>が報告されている。特定組織細胞への分化誘導では、3~12  $\mu$ M CHIR99021 で処理したヒト多能性幹細胞から腎性中間中胚葉<sup>(132)</sup>、胚性内胚葉<sup>(133)</sup>、内皮前駆細胞<sup>(118)</sup>や心筋細胞<sup>(134, 135)</sup>への分化誘導が報告されている。

紹介した 4 つの代表的な GSK-3 阻害剤のマウス ES 細胞に対する細胞毒性と Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の活性化を比較した報告によると、最も細胞毒性が低く、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路を活性化したのは CHIR99021 であった<sup>(136)</sup>。また、当研究室でも、ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導において、BIO と CHIR99021 の細胞毒性と中胚葉分化促進効果を比較しており、同様の結果が得られている<sup>(137)</sup>。つまり、ヒト iPS 細胞の培養に最適な GSK-3 阻害剤は CHIR99021 であるといえる。

CHIR99021 が多能性幹細胞へ及ぼす影響は、細胞増殖や分化といった発生段階<sup>(118, 121, 129, 134)</sup>や浮遊培養か接着培養かといった細胞形態<sup>(89, 138, 139)</sup>によって異なる。また、ヒト iPS 細胞の増殖や分化といった培養目的に応じて、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR99021 処理条件を最適化する試みはなされていない。そのため、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR99021 処理がヒト iPS 細胞の増殖や分化へ及ぼす影響を明らかにし、ヒト iPS 細胞の培養目的に応じた同剤の適用条件の最適化が必要である。

#### 第4節 ヒト iPS 細胞の培養における Wnt シグナル制御の重要性

近年、再生医療や創薬研究などへの応用という観点から、動物由来の因子を使用せず動物培養細胞との共培養を行わない培養法 (xeno-free) の確立および不明な因子を含まない培地 (defined medium) の開発が求められている。そのため、生理活性を持つ化合物によるヒト iPS 細胞のシグナル制御が注目を集めている。既に、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養や特定組織細胞への分化誘導において、化合物によるシグナル制御を用いた多能性幹細胞の培養方法を確立する試みは始まっている。特に、化合物による Wnt シグナルの活性化は、ヒト iPS 細胞の未分化維持と特定組織細胞への分化誘導の両方で重要な役割を果たしている。

Wnt シグナルの活性化による  $\beta$ -Catenin の核内移行は、多能性維持、細胞増殖と細胞周期、Wnt シグナルの制御や内中胚葉分化に関連する遺伝子の転写活性を促進する。そのため、 $\beta$ -Catenin の核内移行のバランスが多能性幹細胞の未分化維持と特定組織細胞への分化誘導に重要であると考えられる。つまり、ヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、Wnt シグナルを活性化させ、核内へ移行する  $\beta$ -Catenin の量を調節し、Wnt 標的遺伝子の転写活性を制御する必要がある。

化合物による Wnt シグナルの活性化は GSK-3 阻害剤によって行われる。GSK-3 阻害剤の1つである CHIR99021 は、体細胞の初期化、多能性維持、細胞増殖促進や特定組織細胞への分化誘導など様々な用途で用いられている。CHIR99021 が多能性幹細胞へ及ぼす影響は、細胞増殖や分化といった発生段階や浮遊培養か接着培養かといった細胞形態によって異なる。また、細胞増殖や分化といったヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR99021 処理条件を最適化する試みはなされていない。

以上のことから、本研究では、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR99021 処理がヒト iPS 細胞の増殖や分化へ及ぼす影響を明らかにし、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養、接着培養または浮遊培養をベースとした心筋細胞分化誘導における同剤の適用条件の最適化を行った。

## 参考文献

1. 平成 30 年度版厚生労働白書, 86-87(2018)
2. Thomas ED, Lochte HL Jr, Lu WC, Ferrebee JW, Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy, **N Engl J Med**, 1957 Sep; **257**(11): 491-6.
3. McCulloch EA, Till JE, The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice, **Radiat Res**, 1960 Jul; **13**: 115-25.
4. Worton RG, McCulloch EA, Till JE, Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture, **J Cell Physiol**, 1969 Oct; **74**(2): 171-82.
5. Reynolds BA, Weiss S, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, **Science**, 1992 Mar; **255**(5052): 1707-10.
6. Caplan AI, Mesenchymal stem cells, **J Orthop Res**, 1991 Sep; **9**(5): 641-50.
7. Cheng H, Leblond CP, Origin, Differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types, **Am J Anat**, 1974 Dec; **141**(4): 537-61.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, **Science**, 1998 Nov 6; **282**(5391): 1145-7.
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, **Cell**, 2007 Nov; **131**(5): 861-72.
10. Stevens LC, Little CC, Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1954; **40**(11): 1080-7.
11. Kleinsmith LJ, Pierce GB Jr, Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells, **Cancer Res**, 1964 Oct; **24**: 1544-51.
12. Brinster RL, The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development, **J Exp Med**, 1974 Oct; **140**(4): 1049-56.
13. Mintz B, Illmensee K, Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1975 Sep; **72**(9): 3585-9.
14. Evans MJ, Kaufman MH, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, **Nature**, 1981 Jul; **292**(5819): 154-6.
15. Martin GR, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1981; **78**(12): 7634-8.
16. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS, Insertion of DNA

- sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination, **Nature**, 1985 Sep; **317**(6034): 230-4.
17. Thomas KR, Capecchi MR, Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, **Cell**, 1987 Nov; **51**(3): 503-12.
  18. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP, Isolation of a primate embryonic stem cell line, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1995 Aug; **92**(17): 7844-8.
  19. Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S, Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer, **Cell**, 2013 Jun; **153**(6): 1228-38.
  20. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH, Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, **Nature**, 1997 Feb; **385**(6619): 810-3.
  21. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K, Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells, **Science**, 2005 Aug; **309**(5739): 1369-73.
  22. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T, Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, **Curr Biol**, 2001 Oct; **11**(19): 1553-8.
  23. Takahashi K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, **Cell**, 2006 Aug; **126**(4): 663-76.
  24. Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M, Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells, **Nat Protoc**, 2009; **4**(6) :811-24.
  25. Osakada F, Jin ZB, Hiramami Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takahashi M, In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction, **J Cell Sci**, 2009 Sep; **122**(Pt 17): 3169-79.
  26. Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, Amano N, Nomura M, Umekage M, Morizane A, Takahashi J, Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease, **Nat Commun**, 2020 Jul; **11**(1) :3369.
  27. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, Mizuma H, Takara S, Takahashi R, Inoue H, Morita S, Yamamoto M, Okita K, Nakagawa M, Parmar M, Takahashi J, Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model, **Nature**, 2017 Aug; **548**(7669): 592-6.
  28. Ishida M, Miyagawa S, Saito A, Fukushima S, Harada A, Ito E, Ohashi F, Watabe T, Hatazawa J, Matsuura K, Sawa Y, Transplantation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes is superior to somatic stem cell therapy for restoring cardiac

- function and oxygen consumption in a porcine model of myocardial infarction, **Transplantation**, 2019 Feb; **103**(2): 291-8.
29. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T, Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells, **Biochem Biophys Res Commun**, 2012 Aug; **425**(2): 321-7.
  30. 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 interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2014; **111**(47):16772-7.
  31. Blinova K, Dang Q, Millard D, Smith G, Pierson J, Guo L, Brock M, Lu HR, Kraushaar U, Zeng H, Shi H, Zhang X, Sawada K, Osada T, Kanda Y, Sekino Y, Pang L, Feaster TK, Kettenhofen R, Stockbridge N, Strauss DG, Gintant G, International multisite study of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug proarrhythmic potential assessment, **Cell Rep**, 2018 Sep; **24**(13): 3582-92.
  32. Takasuna K, Kazusa K, Hayakawa T, Comprehensive cardiac safety assessment using hiPS-cardiomyocytes (consortium for safety assessment using human iPS cells: CSAHi), **Curr Pharm Biotechnol**, 2020; **21**(9): 829-41.
  33. Iwao T, Development of an in vitro system for evaluating intestinal drug disposition using human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells, **Yakugaku Zasshi**, 2018; **138**(10): 1241-7.
  34. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K, Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons, **Science**, 2008 Aug; **321**(5893): 1218-21.
  35. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ, Disease-specific induced pluripotent stem cells, **Cell**, 2008 Sep; **134**(5): 877-86.
  36. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN, Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient, **Nature**, 2009 Jan; **457**(7227): 277-80.
  37. Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A, BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3, **Cell**, 2003 Oct; **115**(3): 281-92.
  38. Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A, Kawasaki N, Holmborn K, Sundqvist A, Tsutsumi

- S, Watabe T, Aburatani H, Heldin CH, Miyazono K, BMP sustains embryonic stem cell self-renewal through distinct functions of different krüppel-like factors, **Stem Cell Reports**, 2016 Jan; **6**(1): 64-73.
39. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA, Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture, **Dev Biol**, 2000 Nov; **227**(2): 271-8.
  40. Amit M, Itskovitz-Eldor J, Feeder-free culture of human embryonic stem cells, **Methods Enzymol**, 2006; **420**: 37-49.
  41. Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourget J, Teng JM, Thomson JA, Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture, **Nat Methods**, 2011; **8**(5): 424-9.
  42. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A, Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid, **Nat Med**, 2005 Feb; **11**(2): 228-32.
  43. Vizcardo R, Masuda K, Yamada D, Ikawa T, Shimizu K, Fujii S, Koseki H, Kawamoto H, Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells, **Cell Stem Cell**, 2013 Jan; **12**(1): 31-6.
  44. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L, Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells, **Circulation**, 2003 Jun; **107**(21): 2733-40.
  45. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK, Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A, **PLoS One**, 2011 Feb; **6**(2): e16734.
  46. Zou L, Luo Y, Chen M, Wang G, Ding M, Petersen CC, Kang R, Dagnaes-Hansen F, Zeng Y, Lv N, Ma Q, Le DQ, Besenbacher F, Bolund L, Jensen TG, Kjems J, Pu WT, Büniger C, A simple method for deriving functional MSCs and applied for osteogenesis in 3D scaffolds, **Sci Rep**, 2013; **3**: 2243.
  47. Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao X, Ma Y, Qin L, Kang J, Wei B, Wang L, Jin Y, Yang HT, Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells, **Cell Res**, 2012 Jan; **22**(1): 219-36.
  48. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E,

- Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM, Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population, **Nature**, 2008 May; **453**(7194): 524-8.
49. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G, Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines, **Cell Stem Cell**, 2011 Feb; **8**(2): 228-40.
  50. Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H, Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro, **PLoS One**, 2013 Apr; **8**(4): e61540.
  51. Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR, Hou L, Soerens AG, Yu J, Palecek SP, Lyons GE, Thomson JA, Herron TJ, Jalife J, Kamp TJ, Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method, **Circ Res**, 2012; **111**(9): 1125-36.
  52. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R, The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium, **J Embryol Exp Morphol**, 1985 Jun; **87**: 27-45.
  53. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ, Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, **J Clin Invest**, 1996 Jul; **98**(1): 216-24.
  54. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L, Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, **J Clin Invest**, 2001; **108**(3): 407-14.
  55. Talkhabi M, Aghdami N, Baharvand H, Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art, **Life Sci**, 2016 Jan; **145**: 98-113.
  56. Devalla HD, Passier R, Cardiac differentiation of pluripotent stem cells and implications for modeling the heart in health and disease, **Sci Transl Med**, 2018 Apr; **10**(435): eaah5457.
  57. Li W, Li K, Wei W, Ding S, Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics, **Cell Stem Cell**, 2013 Sep; **13**(3): 270-83.
  58. Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N, A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions, **Cell Rep**, 2012 Nov; **2**(5): 1448-60.

59. Yasuda SY, Ikeda T, Shahsavarani H, Yoshida N, Nayer B, Hino M, Vartak-Sharma N, Suemori H, Hasegawa K, Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells, **Nat Biomed Eng**, 2018 Mar; **2**(3): 173-82.
60. Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A, The ground state of embryonic stem cell self-renewal, **Nature**, 2008 May; **453**(7194): 519-23.
61. Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousaillekh M, Wray J, Meloche S, Smith A, FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment, **Development**, 2007 Aug; **134**(16): 2895-902.
62. Mohammadi M, McMahon G, Sun L, Tang C, Hirth P, Yeh BK, Hubbard SR, Schlessinger J, Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors, **Science**, 1997 May; **276**(5314): 955-60.
63. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P, Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors, **Biochem J**, 2000 Oct; **351**(Pt 1): 95-105.
64. Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, Harrison SD, Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo, **Diabetes**, 2003 Mar; **52**(3): 588-95.
65. Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P, The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update, **Biochem J**, 2007 Dec; **408**(3): 297-315.
66. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A, Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition, **PLoS Biol**, 2008 Oct; **6**(10): e253.
67. Theunissen TW, van Oosten AL, Castelo-Branco G, Hall J, Smith A, Silva JC, Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions, **Curr Biol**, 2011 Jan; **21**(1): 65-71.
68. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y, A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells, **Nat Biotechnol**, 2007 Jun; **25**(6): 681-6.
69. Tsutsui H, Valamehr B, Hindoyan A, Qiao R, Ding X, Guo S, Witte ON, Liu X, Ho CM, Wu H, An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells, **Nat Commun**, 2011; **2**: 167.
70. Hasegawa K, Yasuda SY, Teo JL, Nguyen C, McMillan M, Hsieh CL, Suemori H,

- Nakatsuji N, Yamamoto M, Miyabayashi T, Lutzko C, Pera MF, Kahn M, Wnt signaling orchestration with a small molecule DYRK inhibitor provides long-term xeno-free human pluripotent cell expansion, **Stem Cells Transl Med**, 2012 Jan; **1**(1): 18-28.
71. Desbordes SC, Placantonakis DG, Ciro A, Socci ND, Lee G, Djaballah H, Studer L, High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells, **Cell Stem Cell**, 2008; **2**(6): 602-12.
  72. Kumagai H, Suemori H, Uesugi M, Nakatsuji N, Kawase E, Identification of small molecules that promote human embryonic stem cell self-renewal, **Biochem Biophys Res Commun**, 2013 May; **434**(4): 710-6.
  73. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH, Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor, **Nat Med**, 2004 Jan; **10**(1): 55-63.
  74. Cai L, Ye Z, Zhou BY, Mali P, Zhou C, Cheng L, Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions, **Cell Res**, 2007 Jan; **17**(1): 62-72.
  75. Melchior K, Weiss J, Zaehres H, Kim YM, Lutzko C, Roosta N, Hescheler J, Müschen M, The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells, **Biol Chem**, 2008 Jul; **389**(7): 897-903.
  76. Miyabayashi T, Yamamoto M, Sato A, Sakano S, Takahashi Y, Indole derivatives sustain embryonic stem cell self-renewal in long-term culture, **Biosci Biotechnol Biochem**, 2008 May; **72**(5): 1242-8.
  77. Martínez-Martínez S, Redondo JM, Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway, **Curr Med Chem**, 2004 Apr; **11**(8): 997-1007.
  78. Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, Suemori H, Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling, **Development**, 2008 Sep; **135**(17): 2969-79.
  79. Otero JJ, Fu W, Kan L, Cuadra AE, Kessler JA, Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells, **Development**, 2004 Aug; **131**(15): 3545-57.
  80. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K, Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells, **Nat Biotechnol**, 2005 May; **23**(5): 607-11.
  81. Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD, A Wnt- and beta -catenin-dependent

- pathway for mammalian cardiac myogenesis, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2003 May; **100** (10): 5834-9.
82. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J, Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells, **Cardiovasc Res**, 2003 May; **58**(2): 278-91.
  83. Paige SL, Osugi T, Afanasiev OK, Pabon L, Reinecke H, Murry CE, Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells, **PLoS One**, 2010 Jun; **5**(6): e11134.
  84. Hao J, Daleo MA, Murphy CK, Yu PB, Ho JN, Hu J, Peterson RT, Hatzopoulos AK, Hong CC, Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells, **PLoS One**, 2008 Aug; **3**(8): e2904.
  85. Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I, Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2006 Dec; **103**(52): 19812-7.
  86. Ren Y, Lee MY, Schliffke S, Paavola J, Amos PJ, Ge X, Ye M, Zhu S, Senyei G, Lum L, Ehrlich BE, Qyang Y, Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells, **J Mol Cell Cardiol**, 2011 Sep; **51**(3): 280-7.
  87. Wang H, Hao J, Hong CC, Cardiac induction of embryonic stem cells by a small molecule inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, **ACS Chem Biol**, 2011 Feb 18; **6**(2): 192-7.
  88. Willems E, Spiering S, Davidovics H, Lanier M, Xia Z, Dawson M, Cashman J, Mercola M, Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potently promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm, **Circ Res**, 2011 Aug; **109**(4): 360-4.
  89. Kadari A, Mekala S, Wagner N, Malan D, Köth J, Doll K, Stappert L, Eckert D, Peitz M, Matthes J, Sasse P, Herzig S, Brüstle O, Ergün S, Edenhofer F, Robust generation of cardiomyocytes from human iPS cells requires precise modulation of BMP and WNT signaling, **Stem Cell Rev Rep**, 2015 Aug; **11**(4): 560-9.
  90. Johnson ML, Rajamannan N, Diseases of Wnt signaling, **Rev Endocr Metab Disord**, 2006; **7**(1-2): 41-9.
  91. Niwa H, Wnt: what's needed to maintain pluripotency?, **Nat Cell Biol**, 2011 Sep 2; **13**(9): 1024-6.
  92. Kelly KF, Ng DY, Jayakumaran G, Wood GA, Koide H, Doble BW,  $\beta$ -Catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism, **Cell Stem Cell**, 2011; **8**(2): 214-27.
  93. Sokol SY, Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling,

- Development**, 2011; **138**(20): 4341-50.
94. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, **Science**, 1998 Sep; **281**(5382): 1509-12.
  95. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C, Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1999 Feb; **96**(4): 1603-8.
  96. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A, The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1999 May; **96**(10): 5522-7.
  97. Takao Y, Yokota T, Koide H, Beta-catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells, **Biochem Biophys Res Commun**, 2007 Feb; **353**(3): 699-705.
  98. Kim CG, Chung IY, Lim Y, Lee YH, Shin SY, A Tcf/Lef element within the enhancer region of the human NANOG gene plays a role in promoter activation, **Biochem Biophys Res Commun**, 2011 Jul; **410**(3): 637-42.
  99. Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR, Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines, **Dev Cell**, 2007; **12**(6): 957-71.
  100. 丹羽 仁史: 幹細胞の多能性を規定する分子機構. 領域融合レビュー, 1, e008 (2012)
  101. Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Roxbee Cox L, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC, Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription, **Chem Biol**, 2000 Oct; **7**(10): 793-803.
  102. Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P, GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins, **Chem Biol**, 2003 Dec; **10**(12): 1255-66.
  103. Deng L, Hu S, Baydoun AR, Chen J, Chen X, Cong X, Aspirin induces apoptosis in mesenchymal stem cells requiring Wnt/beta-catenin pathway, **Cell Prolif**, 2009 Dec; **42** (6): 721-30.
  104. Jaeger A, Baake J, Weiss DG, Kriehuber R. Glycogen synthase kinase-3beta regulates differentiation-induced apoptosis of human neural progenitor cells, **Int J Dev Neurosci**, 2013 Feb; **31**(1): 61-8.

105. Kirby LA, Schott JT, Noble BL, Mendez DC, Caseley PS, Peterson SC, Routledge TJ, Patel NV, Glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor, SB-216763, promotes pluripotency in mouse embryonic stem cells, **PLoS One**, 2012; **7**(6): e39329.
106. Inoue T, Kagawa T, Fukushima M, Shimizu T, Yoshinaga Y, Takada S, Tanihara H, Taga T, Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin, **Stem Cells**, 2006 Jan; **24**(1): 95-104.
107. Shimizu T, Kagawa T, Inoue T, Nonaka A, Takada S, Aburatani H, Taga T, Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells, **Mol Cell Biol**, 2008; **28**(24): 7427-41.
108. Korur S, Huber RM, Sivasankaran B, Petrich M, Morin P Jr, Hemmings BA, Merlo A, Lino MM, GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma, **PLoS One**, 2009 Oct; **4**(10): e7443.
109. Lange C, Mix E, Frahm J, Glass A, Müller J, Schmitt O, Schmöle AC, Klemm K, Ortinau S, Hübner R, Frech MJ, Wree A, Rolfs A, Small molecule GSK-3 inhibitors increase neurogenesis of human neural progenitor cells, **Neurosci Lett**, 2011 Jan; **488**(1): 36-40.
110. Shen L, Glowacki J, Zhou S, Inhibition of adipocytogenesis by canonical WNT signaling in human mesenchymal stem cells, **Exp Cell Res**, 2011 Aug; **317**(13): 1796-803.
111. Eslaminejad MB, Karimi N, Shahhoseini M, Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated by GSK-3 inhibitors, **Histochem Cell Biol**, 2013 Dec; **140**(6): 623-33.
112. Lluís F, Pedone E, Pepe S, Cosma MP, Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion, **Cell Stem Cell**, 2008 Nov; **3**(5): 493-507.
113. Tseng AS, Engel FB, Keating MT, The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes, **Chem Biol**, 2006 Sep; **13**(9): 957-63.
114. Zaragosi LE, Wdziekonski B, Fontaine C, Villageois P, Peraldi P, Dani C, Effects of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes, **BMC Cell Biol**, 2008 Feb; **9**:11.
115. Jiang J, Zhao M, Zhang A, Yu M, Lin X, Wu M, Wang X, Lu H, Zhu S, Yu Y, Mao Z, Han W, Characterization of a GSK-3 inhibitor in culture of human cord blood primitive hematopoietic cells, **Biomed Pharmacother**, 2010 Sep; **64**(7): 482-6.
116. Chen Y, Wu B, Lin J, Yu D, Du X, Sheng Z, Yu Y, An C, Zhang X, Li Q, Zhu S, Sun H, Zhang X, Zhang S, Zhou J, Bunpetch V, El-Hashash A, Ji J, Ouyang H, High-resolution dissection of chemical reprogramming from mouse embryonic fibroblasts into fibrocartilaginous Cells, **Stem Cell Reports**, 2020; **14**(3): 478-92.

117. Guerrero F, Herencia C, Almadén Y, Martínez-Moreno JM, Montes de Oca A, Rodriguez-Ortiz ME, Diaz-Tocados JM, Canalejo A, Florio M, López I, Richards WG, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E, Muñoz-Castañeda JR, TGF- $\beta$  prevents phosphate-induced osteogenesis through inhibition of BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways, **PLoS One**, 2014 Feb; **9**(2): e89179.
118. Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, Liu J, Wu Y, Dong W, Dunn KK, Shusta EV, Palecek SP, Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling, **Stem Cell Reports**, 2014 Nov; **3**(5): 804-16.
119. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S, Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors, **Cell Stem Cell**, 2009 Jan; **4**(1): 16-9.
120. Brouwer M, Zhou H, Nadif Kasri N, Choices for induction of pluripotency: recent developments in human induced pluripotent stem cell reprogramming strategies, **Stem Cell Rev Rep**, 2016; **12**(1): 54-72.
121. Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, Hao E, Schöler HR, Hayek A, Ding S, Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2, **Stem Cells**, 2009; **27**(12): 2992-3000.
122. Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornruksa S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R, Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency, **Cell Stem Cell**, 2014 Oct; **15**(4): 471-87.
123. Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, Wu Y, Li H, Liu K, Wu C, Song Z, Zhao Y, Shi Y, Deng H, Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules, **Cell Res**, 2011; **21**(1): 196-204.
124. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H, Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds, **Science**, 2013 Aug; **341**(6146): 651-4.
125. Kiyonari H, Kaneko M, Abe S, Aizawa S, Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability, **Genesis**, 2010 May; **48**(5): 317-27.
126. Govarthanan K, Vidyasekar P, Gupta PK, Lenka N, Verma RS, Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitor- CHIR 99021 augments the differentiation potential of mesenchymal stem cells, **Cytotherapy**, 2020 Feb; **22**(2): 91-105.
127. Jiang M, Chen H, Lai S, Wang R, Qiu Y, Ye F, Fei L, Sun H, Xu Y, Jiang X, Zhou Z, Zhang T, Li Y, Xie J, Fang Q, Gale RP, Han X, Huang H, Guo G, Maintenance of human

- haematopoietic stem and progenitor cells in vitro using a chemical cocktail, **Cell Discov**, 2018 Oct; **4**: 59.
128. Narcisi R, Arikian OH, Lehmann J, Ten Berge D, van Osch GJ, Differential effects of small molecule WNT agonists on the multilineage differentiation capacity of human mesenchymal stem cells, **Tissue Eng Part A**, 2016 Nov; **22**(21-22): 1264-73.
129. Ye S, Tan L, Yang R, Fang B, Qu S, Schulze EN, Song H, Ying Q, Li P, Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains, **PLoS One**, 2012; **7**(4): e35892.
130. 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, **Cytotechnology**, 2015; **67**(2): 191-7.
131. Fan Y, Ho BX, Pang JKS, Pek NMQ, Hor JH, Ng SY, Soh BS, Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated signaling re-activates proliferation of matured cardiomyocytes, **Stem Cell Res Ther**, 2018 Dec; **9**(1): 338.
132. Mae SI, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K, Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells, **Nat Commun**, 2013; **4**: 1367.
133. Naujok O, Diekmann U, Lenzen S, The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling, **Stem Cell Rev Rep**, 2014 Aug; **10**(4): 480-93.
134. Gonzalez R, Lee JW, Schultz PG, Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells, **Angew Chem Int Ed Engl**, 2011 Nov; **50**(47): 11181-5.
135. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP, Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2012 Jul; **109**(27): E1848-57.
136. Naujok O, Lentjes J, Diekmann U, Davenport C, Lenzen S, Cytotoxicity and activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors, **BMC Res Notes**, 2014 Apr; **7**: 273.
137. 澤登美空: ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導における低分子化合物の最適化, 山梨大学大学院生命環境学専攻 修士論文(2018)
138. Fonoudi H, Ansari H, Abbasalizadeh S, Larijani MR, Kiani S, Hashemizadeh S, Zarchi AS, Bosman A, Blue GM, Pahlavan S, Perry M, Orr Y, Mayorchak Y, Vandenberg J, Talkhabi M, Winlaw DS, Harvey RP, Aghdami N, Baharvand H, A universal and robust

integrated platform for the scalable production of human cardiomyocytes from pluripotent stem cells, **Stem Cells Transl Med**, 2015 Dec; **4**(12): 1482-94.

139. Kempf H, Olmer R, Kropp C, Rückert M, Jara-Avaca M, Robles-Diaz D, Franke A, Elliott DA, Wojciechowski D, Fischer M, Roa Lara A, Kensah G, Gruh I, Haverich A, Martin U, Zweigerdt R, Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture, **Stem Cell Reports**, 2014; **3**(6): 1132-46.

## 第1章 接着培養条件下での CHIR99021 処理がヒト iPS 細胞の増殖と分化へ及ぼす影響

### 第1節 ヒト iPS 細胞の未分化性を維持しつつ増殖を促進する CHIR99021 処理条件の最適化

#### 1. 序

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) は 2006 年に京都大学の山中らによってマウス線維芽細胞から樹立され<sup>(1)</sup>、2007 年にはヒト線維芽細胞からもその作製が報告された<sup>(2)</sup>。iPS 細胞は、1981 年に Evans MJ らと Martin GR らによって樹立された胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞)<sup>(3,4)</sup>と同様に、無限の増殖能とすべての組織細胞へ分化できる多能性を有している。さらに、初期胚から樹立される ES 細胞と異なり、iPS 細胞は生体の体細胞から樹立できることから<sup>(5,6)</sup>、倫理的課題の克服が可能となった。そのため、ヒト iPS 細胞は、再生医療や創薬研究などの様々な分野への応用が期待されている。実際、2014 年の滲出型加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植<sup>(7,8)</sup>、2018 年のパーキンソン病・脳血管障害に対する iPS 細胞由来神経細胞移植<sup>(9,10)</sup>や 2020 年の重症心不全に対する iPS 細胞由来心筋細胞シート移植<sup>(11,12)</sup>などの自家・他家 iPS 細胞を用いた再生医療の臨床研究が進んでいる。また、創薬研究においても、ヒト iPS 細胞は薬剤毒性評価系<sup>(13-16)</sup>、難治性疾患の病態解明や治療薬開発<sup>(17-19)</sup>などへの応用が期待されている。

iPS 細胞由来の再生医療の産業化には、iPS 細胞を大量生産し、対象の組織細胞に分化・組織化して患者に移植するシステムの設計が必要である。細胞移植によって、心疾患を治療するには患者 1 人当たり 10~30 億個の心筋細胞、1 型糖尿病の治療には患者 1 人当たり 10 億個のインスリン産生  $\beta$  細胞が必要であると言われている<sup>(20-23)</sup>。一般的な接着培養システムにおいて、10 cm dish 1 枚あたり約数百万個の細胞を獲得できると考えた場合、10 cm dish 1,000 枚以上のスケールでの培養が必要となる。また、iPS 細胞の樹立から移植用の組織細胞の作製には数か月以上かかることから、必要量の目的細胞を短期間で獲得することが望ましい。

現在、ヒト iPS 細胞の培養方法は浮遊培養と接着培養に分けられる。浮遊培養には、細胞塊による分化細胞の大量生産や容易なスケールアップ、簡易な培地交換という利点がある<sup>(24)</sup>。一方で、細胞塊の大きさコントロールの難しさ<sup>(25)</sup>や攪拌時のストレス<sup>(26-28)</sup>、未分化細胞の残留といった分化誘導効率の不安<sup>(29)</sup>、外部からのシグナル制御が効きにくいなどの解決すべき課題が多い。接着培養には、未分化維持や細胞増殖に優れ、培地に細胞が均一に曝露されるため純度の高い分化細胞の獲得が可能<sup>(30,31)</sup>という利点があるが、通常単層で維持されるため大量培養に向かない。よって本研究では、1 培養器あたりの細胞収量を上げることで、ヒト iPS 細胞の接着培養における細胞収量を増大させたいと考えた。

本研究では、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路において、Wnt シグナル活性化の役割を果たす Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) 阻害剤である CHIR99021 (CHIR) に着目した。CHIR

は現在最も選択的な GSK-3 阻害剤である<sup>(32)</sup>。CHIR は、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路内の GSK-3 を阻害することで  $\beta$ -Catenin の分解を防ぎ、 $\beta$ -Catenin の核内への移行を促進する働きを持つ<sup>(33)</sup>。CHIR は、体細胞の初期化、多能性維持、細胞増殖促進や特定組織細胞への分化誘導など様々な用途で用いられている。体細胞の初期化では、3  $\mu$ M CHIR を含めた 3 種類の化合物と遺伝子導入によるラット・ヒト iPS 細胞の樹立<sup>(34, 35)</sup>、SOX2 の代替として 10  $\mu$ M CHIR によるヒト iPS 細胞の樹立<sup>(36)</sup>、0.3~3  $\mu$ M CHIR を含めた 5 種類の化合物と LIF, Activin A によるヒト naïve-ES 細胞の誘導<sup>(37)</sup>、3  $\mu$ M CHIR を含めた 4 種類の化合物と Oct3/4 の遺伝子導入によるマウス iPS 細胞の樹立<sup>(38)</sup>、遺伝子導入を用いず 10~20  $\mu$ M CHIR を含めた 6 種類の化合物のみによるマウス iPS 細胞の樹立<sup>(39)</sup>が報告されている。多能性維持では、3  $\mu$ M CHIR を含めた 2, 3 種類の化合物によるマウス ES 細胞の未分化維持培養<sup>(40, 41)</sup>、10  $\mu$ M CHIR によるヒト臍帯血由来間葉系幹細胞の分化能強化<sup>(42)</sup>が報告されている。細胞増殖促進では、10  $\mu$ M CHIR による 3 種類の化合物によるヒト造血幹細胞と前駆細胞の維持培養<sup>(43)</sup>、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の増殖促進<sup>(44)</sup>、フィーダー非存在下での 3  $\mu$ M CHIR によるマウス ES 細胞の増殖促進<sup>(45)</sup>、フィーダー非存在下での 1.5  $\mu$ M CHIR を含めた 3 種類の化合物によるマウス iPS 細胞の増殖促進<sup>(46)</sup>、1  $\mu$ M CHIR によるマウス・ヒト成熟心筋細胞の増殖促進<sup>(47)</sup>が報告されている。特定組織細胞への分化誘導では、3~12  $\mu$ M CHIR で処理したヒト多能性幹細胞から腎性中間中胚葉<sup>(48)</sup>、胚性内胚葉<sup>(49)</sup>、内皮前駆細胞<sup>(50)</sup>や心筋細胞<sup>(51, 52)</sup>への分化誘導が報告されている。このように、CHIR は体細胞の初期化から特定組織細胞への分化誘導に至るまで様々な用途に使用されているが、ヒト iPS 細胞の未分化維持培養における詳細な検討はなされていない。

以上のことから、本研究では、ヒト iPS 細胞の維持培養における CHIR 処理条件がヒト iPS 細胞の多能性と増殖性にどのように影響を及ぼすのかを検討した。すなわち、様々な CHIR 処理条件下でのヒト iPS 細胞の多能性と増殖性を評価し、未分化維持と細胞増殖促進が両立する CHIR 処理条件の最適化を行った。

## 2. 実験材料及び方法

### (1) フィーダー存在下 (on feeder) でのヒト iPS 細胞の培養

本研究ではヒト iPS 細胞の標準細胞株である 201B7 株<sup>(2)</sup>、253G1 株<sup>(5)</sup>を使用した。これらの細胞株は文部科学省に承認されたナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) を通じて理研バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) より提供された。

Feeder layer 上で培養したヒト iPS 細胞へ Collagenase-trypsin-KSR (CTK) 溶液を添加し、Feeder layer を取り除いた。残ったヒト iPS 細胞をセルスクレーパーで物理的に剥がした。剥がしたヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ 20% Knockout serum replacement (KSR, Gibco, Grand Island, NY, USA)、1% GlutaMAX supplement (Gibco)、0.1 mM Non-essential amino acids (NEAA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、0.1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)、25 units/mL Penicillin、25  $\mu$ g/mL Streptomycin (Gibco)、4 ng/mL Recombinant human fibroblast growth factor 2 (FGF2, Oriental Yeast Co., Ltd. Tokyo, Japan) を含む DMEM-Ham's F-12 basal medium (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を適量 Feeder layer 上に播種した。播種後、6 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。培地交換は毎日行った。

Feeder layer を作製するために、ネオマイシン抵抗性 (neor) 発現ベクターと LIF 発現ベクターを安定的に組み込んだ STO 細胞である SNL76/7 (ECACC 07032801, DS Pharma Biomedical Co., Osaka, Japan) を使用した<sup>(53)</sup>。STO 細胞を、7.7% Fetal bovine serum (FBS, Gibco)、25 units/mL Penicillin、25  $\mu$ g/mL Streptomycin (Gibco) を含む DMEM basal medium (Nacalai Tesque) を用いて、0.1% Gelatin (Sigma) コート上で 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。STO 細胞を 10  $\mu$ g/L の Mitomycin C (Sigma) を用いて 2 時間 15 分処理し、増殖能を不活化させた。不活化した STO 細胞を 0.1% Trypsin-EDTA (Nacalai Tesque) を用いて分散し、 $3.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.1% gelatin コート上に播種した。播種後、2 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養し、Feeder layer として使用した。

### (2) フィーダー非存在下 (feeder-free) でのヒト iPS 細胞の培養

Feeder layer 上で培養したヒト iPS 細胞へ Collagenase-trypsin-KSR (CTK) 溶液を添加し、Feeder layer を取り除いた。残ったヒト iPS 細胞を、Accutase™ (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem® hPSC XF (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.5 mg/cm<sup>2</sup> Vitronectin (Life Technologies) コート上に播種した。播種後、4 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。細胞分散時から播種後 24 時間はヒト iPS 細胞の

アポトーシスを抑制するために、10  $\mu\text{M}$  Y-27632 (ROCK inhibitor, Nacalai Tesque) を NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF へ添加した。培地交換は Y-27632 を含まない NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を用いて毎日行った。Feeder-free でヒト iPS 細胞を 3 継代し、残存した Feeder layer を除去して実験を行った。以下の実験には、3~20 継代した iPS 細胞を用いた。

### (3) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理

Feeder-free で培養したヒト iPS 細胞を、Accutase<sup>™</sup> を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.5 mg/cm<sup>2</sup> Vitronectin コート上に播種した。播種後、4 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。細胞分散時から播種後 24 時間はヒト iPS 細胞のアポトーシスを抑制するために、10  $\mu\text{M}$  Y-27632 を NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF へ添加した。培地交換の際に、様々な濃度の CHIR99021 (CHIR, Fujifilm Wako, Osaka, Japan) を含む NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を用いて、CHIR 処理を行った。

Fig. 1 で示したように CHIR 処理を様々な期間と濃度で行った。4 日間培養のうちの 0 日目から 4 日目 (全期間)、0 日目から 2 日目 (前半 2 日間)、2 日目から 4 日目 (後半 2 日間) の 3 つの異なる期間に 3  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した。また、4 日間培養のうちの後半 2 日間に 1, 3, 10  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した。対照として、CHIR 処理せず培養したヒト iPS 細胞 (control) を用意した。定期的に顕微鏡観察を行い、コロニー様相の変化を観察した。

### (4) 生細胞数のカウントと比増殖速度・倍加時間の算出

24 時間ごとにヒト iPS 細胞の生細胞数をカウントした。CHIR 処理を行ったヒト iPS 細胞を、Accutase<sup>™</sup> を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を加えて再懸濁した。細胞懸濁液と同量の 0.4% Trypan blue 溶液 (Nacalai Tesque) を加えて死細胞を染色した。Trypan blue 染色によって染色されていない (Trypan blue 排出能を持つ) 細胞を生細胞として、血球計算盤を用いて、細胞数をカウントした。それぞれの CHIR 処理条件の比増殖速度と倍加時間を生細胞数の変動からの次のように計算した。

比増殖速度と生細胞数が比例関係にあることから、生細胞数を  $X$ 、比増殖速度を  $\mu$ 、時間を  $t$  として以下の微分方程式を導いた。

$$\frac{1}{X} dX = \mu dt$$
$$\int \frac{1}{X} dX = \int \mu dt$$

時間  $t_1$  のときの生細胞数を  $X_1$ 、時間  $t_2$  のときの生細胞数を  $X_2$  として定積分を行い ( $t_1 > t_2$ )、

比増殖速度である  $\mu$  を算出した。

$$\int_{X_1}^{X_2} \frac{1}{X} dX = \int_{t_1}^{t_2} \mu t dt$$

$$\ln X_2 - \ln X_1 = \mu t_1 - \mu t_2$$

$$\mu = \frac{\ln (X_2/X_1)}{t_2 - t_1} \dots\dots①$$

倍加時間である  $t_d$  は  $X_2=2X_1$  となるまでにかかる時間であることから、時間  $t_1$  のときの生細胞数を  $X_1$ 、時間  $t_1+t_d$  のときの生細胞数を  $2X_1$  として、①式から  $t_d$  を算出した。

$$\mu = \frac{\ln (2X_1/X_1)}{(t_1 + t_d) - t_1}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots②$$

#### (5) Total RNA 抽出及び cDNA 合成、リアルタイム RT-qPCR 解析

Total RNA 抽出は NucleoSpin RNA (Takara Bio, Otsu, Japan) を使用した。cDNA 合成は ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した。Total RNA 抽出と cDNA 合成はメーカー推奨プロトコルに従って行った。

リアルタイム RT-qPCR 解析は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて、反応液をメーカー推奨プロトコルに従って調整した。プライマーは、内部標準 (housekeeping) 遺伝子として *Homo sapiens actin, beta (ACT-β)*、未分化マーカーとして *Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (OCT3/4)*、*Homo sapiens Nanog homeobox (NANOG)*、*Homo sapiens SRY-box 2 (SOX2)*、*Homo sapiens zinc finger protein 42 (ZFP42, REX1)*、中胚葉関連マーカーとして *Homo sapiens Wnt family member 3A (WNT3A)*、*Homo sapiens Wnt family member 8A (WNT8A)*、*Homo sapiens T, brachyury homolog (mouse) (T)*、*Homo sapiens GATA binding protein 4 (GATA4)*、内胚葉関連マーカーとして *Homo sapiens SRY-box 17 (SOX17)*、*Homo sapiens alpha-fetoprotein (AFP)*、外胚葉関連マーカーとして *Homo sapiens SRY-box 1 (SOX1)*、*Homo sapiens paired box 6 (PAX6)* を用いた。各マーカーの配列を Table 1 に示した。PCR 反応と解析は Thermal Cycler Dice (Takara Bio) を用いて行った。PCR 反応条件は変性 95°C-5 秒間、アニーリング 60°C-10 秒間、伸長 72°C-20 秒間とし、40 cycles 行った。

リアルタイム RT-qPCR は、各 cycle 終了時に生成された PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし、指数関数的増幅域で正確な定量を行う。PCR では 1 cycle ずつ指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達する。この増幅の様子をリアルタイムでモニタリングした図が増幅曲線である。増殖曲線に Threshold line (閾値) を引き、増殖曲線と Threshold line とが交わる反応 cycle 数を Threshold cycle 数 (CT) とした (Crossing Point 法)。

各サンプルの目的遺伝子の相対発現量、標準偏差は次のように計算した。

i) cDNA 濃度差の補正

各サンプルの cDNA 濃度差を補正 (normalize) するために、サンプルの内部標準遺伝子の CT を  $CT_{Housekeeping}$ 、目的遺伝子の CT を  $CT_{target}$  として以下の式を用いて、各サンプルの目的遺伝子の CT を補正した値である  $\Delta CT$  を算出した。

$$\Delta CT = CT_{target} - CT_{Housekeeping}$$

ii) 目的遺伝子の相対発現量の平均値

各サンプルの  $\Delta CT$  の平均値を  $\overline{\Delta CT}$  として以下の式を用いて、各サンプルの目的遺伝子の相対発現量の平均値である  $\bar{R}$  を算出した。

$$\bar{R} = 2^{-\overline{\Delta CT}}$$

iii) 標準偏差

標準偏差 (standard deviation) は  $\Delta CT$  から標準偏差を算出した。本研究の遺伝子発現量のグラフは対数軸で作製するため、標準偏差の値が+側と-側で異なる。そのため、 $\Delta CT$  から算出した標準偏差を  $SD_{\Delta CT}$  として以下の式を用いて、各サンプルの+側の標準偏差である  $SD(+)$  と-側の標準偏差である  $SD(-)$  を算出した。

$$SD(+)=2^{-(\overline{\Delta CT}+SD_{\Delta CT})}-2^{-(\overline{\Delta CT})}$$

$$SD(-)=2^{-(\overline{\Delta CT})}-2^{-(\overline{\Delta CT}-SD_{\Delta CT})}$$

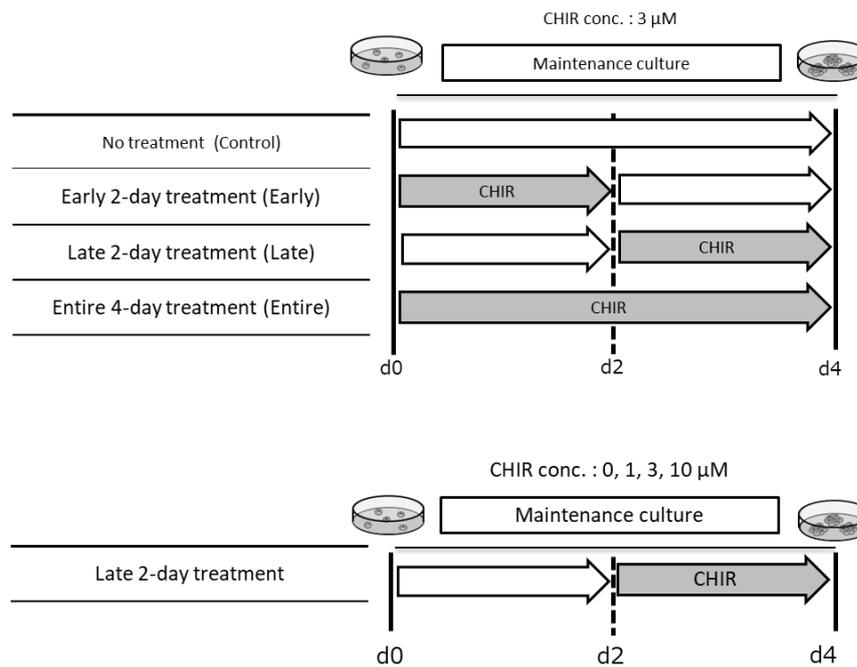
(6) CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の連続継代培養と倍加力の算出

ヒト iPS 細胞を CHIR 処理条件下で 10 継代した。Feeder-free で培養したヒト iPS 細胞を、Accutase™ を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem® hPSC XF を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.5 mg/cm<sup>2</sup> Vitronectin コート上に播種した。播種後、4 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。細胞分散時から播種後 24 時間はヒト iPS 細胞のアポトーシスを抑制するために、10 μM Y-27632 を NutriStem® hPSC XF へ添加した。培地交換の際に、様々な濃度の CHIR を含む NutriStem® hPSC XF を用いて、CHIR 処理を行った。培養 4 日目にヒト iPS 細胞の生細胞数をカウントし、再度  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.5 mg/cm<sup>2</sup> Vitronectin コート上に播種して同様の CHIR 処理を行った。CHIR 処理として、4 日間培養のうちの 2 日目から 4 日目 (後半 2 日間) に 1, 3, 10 μM CHIR を添加した。対照として、CHIR 処理せず培養したヒト iPS 細胞 (control) を用意した。これを 10 継代行った。培養 4 日目の生細胞数を  $X_n$ 、初期播種細胞数を  $X_0$  として以下の式を用いて、1 継代あたりの細胞の倍加力 (population doubling; PD) を次のように計算した。

$$PD = \frac{\ln(X_1/X_0)}{\ln 2}$$

(7) 統計解析

少なくとも 3 回の独立した実験を行った。Student's t-test を使用して統計解析を行い、\*P<0.05, \*\*P<0.01 の値を統計的に有意であるとした。



**Fig. 1. Schematic of CHIR treatment conditions.**

Treatment period: Treatment with 3  $\mu$ M CHIR was performed in three different periods of a 4-day cultivation, i.e., over the entire 4-day culture period, over the early 2-day period, and over the late 2-day period. Treatment concentration: Various concentrations of CHIR (1, 3, or 10  $\mu$ M) were applied for late 2-day period of a 4-day cultivation.

**Table 1. Primers of RT-PCR**

	Gene name	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)
Housekeeping	<i>ACT-β</i>	F: TGGCACCCAGCACAATGAA	186
		R: CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	
Undifferentiation	<i>OCT3/4</i> ( <i>POU5F1</i> )	F: TGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG	191
		R: GCAGATGGTTCGTTTGGCTGA	
	<i>NANOG</i>	F: TCCAACATCCTGAACCTCAGCTA	186
		R: AGTCGGGTTTACCAGGCATC	
	<i>SOX2</i>	F: GTGAGCGCCCTGCAGTACAA	82
		R: GCGAGTAGGACATGCTGTAGGTG	
<i>REX1</i> ( <i>ZEP42</i> )	F: GGCCTTCACTCTAGTAGTGCTCA	77	
	R: CTCCAGGCAGTAGTGATCTGAGT		
Early mesoderm	<i>T</i>	F: TGTGACAGGTACCCAACCCTGA	126
		R: ATGGGATTGCAGCATGGATAAAC	
	<i>GATA4</i>	F: TGGTCAGATGGCAGCCAGAG	107
		R: TGCTTCGAATTCGTGTTGCAG	
	<i>WNT3A</i>	F: TCTACGACGTGCACACCTG	89
R: GAACCTTACAGGGGGTTGG			
<i>WNT8A</i>	F: GTGATGGGTCAAACAATGGA	85	
	R: ATCCTTTCCCAAATTCCAC-		
Early endoderm	<i>SOX17</i>	F: CTGCAGGCCAGAAGCAGTGTTA	153
		R: CCCAAACTGTTCAAGTGGCAGA	
	<i>AFP</i>	F: CAGCCACTTGTTGCCAACTCA	195
		R: GGACATATGTTTCATCCACCACCA	
Early ectoderm	<i>SOX1</i>	F: CAGCAGTGTGCTCCAATTCA	79
		R: GCCAAGCACCGAATTCACAG	
	<i>PAX6</i>	F: AATTGATTGCAGAGTGTCGCTTC	168
		R: GCTCAGGTGCTCGGGTTCTAA	

### 3. 結果

#### (1) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞に対する CHIR99021 処理期間の最適化

CHIR 処理期間がヒト iPS 細胞へ及ぼす影響を調べた。4 日間培養のうちの 0 日目から 4 日目（全期間）、細胞がプレートに接着し継代で受けたダメージを回復しつつ増殖する誘導期にあたる 0 日目から 2 日目（前半 2 日間）、通常通りに分裂する対数増殖期にあたる 2 日目から 4 日目（後半 2 日間）の 3 つの異なる期間で CHIR 処理を行った。このときの CHIR 濃度は幹細胞研究における一般的な処理濃度である  $3\mu\text{M}$  とした。使用したヒト iPS 細胞株は 201B7 株である。

#### i) 様々な期間で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞のコロニー様相

様々な期間で CHIR 処理したヒト iPS 細胞の 24 時間ごとのコロニー様相を Fig. 2 に示した。CHIR 処理せず培養したヒト iPS 細胞（control）は、培養 1 日目から 4 日目にかけて単層コロニーを形成した。4 日間培養のうちの全期間 CHIR 処理したヒト iPS 細胞は、培養 1 日目から 3 日目にかけて辺縁のはっきりしたコロニーを形成し、培養 4 日目に単層かつ低密度な細胞集団を形成した。4 日間培養のうちの前半 2 日間 CHIR 処理したヒト iPS 細胞は、培養 1 日目から 2 日目にかけて辺縁のはっきりしたコロニーを形成し、培養 3 日目から 4 日目にかけて単層かつ低密度な細胞集団を形成した。4 日間培養のうちの後半 2 日間 CHIR 処理したヒト iPS 細胞は、培養 1 日目から 2 日目にかけて Control と同様の単層コロニーを形成し、培養 3 日目から 4 日目にかけて辺縁がはっきりとしたコロニーを形成した。

これらの結果から、正常に近いコロニーを形成したヒト iPS 細胞の CHIR 処理期間は 4 日間培養のうちの後半 2 日間であることが明らかになった。培養 0 日目から CHIR 処理したヒト iPS 細胞は、細胞数が少ない播種直後から CHIR を添加したために、細胞あたりの CHIR 負荷が大きくなり、その影響が強く現れたものと考えられる。

#### ii) 様々な期間で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の増殖と未分化性

培養 4 日目の生細胞数と未分化マーカー遺伝子の発現量を用いて、様々な期間の CHIR 処理がヒト iPS 細胞の増殖と分化へ及ぼす影響を調べた。様々な期間で CHIR 処理したヒト iPS 細胞の培養 4 日目の生細胞数を Fig. 3A に示した。CHIR 処理したヒト iPS 細胞の生細胞数は、CHIR 処理せず培養した Control と比較して約 2 倍増加した。特に、4 日間培養のうちの後半 2 日間または全期間 CHIR 処理したヒト iPS 細胞の生細胞数は顕著に増加した。

また、様々な期間で CHIR 処理したヒト iPS 細胞の培養 4 日目の未分化マーカー遺伝子の発現量を Fig. 3B に示した。4 日間培養のうちの全期間 CHIR 処理したヒト iPS 細胞の *OCT3/4* および *NANOG* 遺伝子の発現量は、Control と比較して有意に減少した。4 日間培養のうちの前半または後半 2 日間 CHIR 処理したヒト iPS 細胞のそれらの遺伝

子発現量は Control と同程度であった。

これらの結果から、CHIR 処理したヒト iPS 細胞は増殖が促進されるが、2 日間以上の CHIR 処理は未分化性を損なうことが示唆された。つまり、未分化性を損なわずに増殖を促進するヒト iPS 細胞の CHIR 処理期間は 4 日間培養のうちの後半 2 日間であるといえる。

## (2) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞に対する 4 日間培養のうちの後半 2 日間の CHIR99021 処理における同剤添加濃度の最適化

これまでの結果から、ヒト iPS 細胞の未分化性を損なわずに増殖を促進する CHIR 処理期間は 4 日間培養のうちの後半 2 日間であることが明らかになった。そのため、CHIR 処理期間を 4 日間培養のうちの後半 2 日間に固定し、CHIR 濃度 (1, 3, 10  $\mu\text{M}$ ) がヒト iPS 細胞へ及ぼす影響を調べた。CHIR がヒト iPS 細胞へ及ぼす影響は細胞株によって異なる可能性があるため、2 つのヒト iPS 細胞株 (201B7 株、253G1 株) を使用した。

### i) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞のコロニー様相

様々な濃度で CHIR 処理したヒト iPS 細胞の培養 4 日目のコロニー様相を Fig. 4 に示した。CHIR 処理せず培養した Control は、両方の株で単層コロニーを形成した。1, 3  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞は、両方の株で辺縁のはっきりしたコロニーを形成した。10  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞は、両方の株で単層かつ低密度な細胞集団を形成した。

これらの結果から、正常に近いコロニーを形成したヒト iPS 細胞への CHIR 添加濃度は 1, 3  $\mu\text{M}$  であることが示唆された。

### ii) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の増殖

倍加時間と生細胞数を用いて、様々な濃度の CHIR 処理がヒト iPS 細胞の増殖へ及ぼす影響を調べた。培養 4 日間の増殖曲線と培養 4 日目の生細胞数を Fig. 5A, B にそれぞれ示した。増殖活性の指標として、Fig. 5A に示した増殖曲線の培養 2 日目から 3 日目にかけての生細胞数の変化から、倍加時間を算出した。倍加時間と培養 4 日目の生細胞数を増殖関連の数値データとして Table 2 にまとめた。

1, 3  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞は、両方の株で CHIR 処理せず培養した Control より倍加時間を短縮し、生細胞数を増加させた。3  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞は、Control と比較して倍加時間を 201B7 株で 7.2 時間、253G1 株で 2.2 時間短縮し、生細胞数を両方の株で 2 倍程度増加させた。また、1  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞は、倍加時間を 201B7 株で 5.9 時間、253G1 株で 1.3 時間短縮し、生細胞数を両方の株で 1.5 倍程度増加させた。10  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞は、倍加時間を 201B7 株で 1.9 時間短縮したが、253G1 株では 8.7 時間延長した。生細胞数は両方の株で Control

と同程度であった。

これらの結果から、ヒト iPS 細胞の増殖を促進する CHIR 添加濃度は 1, 3  $\mu\text{M}$  であることが示唆された。

### iii) CHIR99021 処理条件下で連続継代培養したヒト iPS 細胞のコロニー様相と増殖

コロニー様相と細胞の倍加力 (PD) の変化を用いて、様々な濃度の CHIR 処理条件下での連続継代培養がヒト iPS 細胞の増殖とコロニー様相へ及ぼす影響を調べた。10 継代目のコロニー様相を Fig. 6A に示した。1  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下で継代したヒト iPS 細胞は、10 継代にわたり辺縁のはっきりしたコロニーを両方の株で形成した。3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下で継代したヒト iPS 細胞は、両方の株で継代数の増加にともない、辺縁のはっきりしたコロニーが減少した。

PD の累積値 (累積 PD 値) を Fig. 6B に示した。CHIR 処理せず継代した Control と 1  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下で継代したヒト iPS 細胞の累積 PD 値は、両方の株で継代数に比例した。1  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下で継代したヒト iPS 細胞は、201B7 株で 2 継代目以降、253G1 株で 3 継代目以降の累積 PD 値を Control と比較して有意に増加させた。10  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下で継代したヒト iPS 細胞は細胞死を両方の株で誘導し、3 継代以上培養できなかった。3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下で継代したヒト iPS 細胞は、両方の株で累積 PD 値の増加率を減少させ、201B7 株で 4 継代目以降、253G1 株で 5 継代目以降の累積 PD 値を Control と比較して有意に減少させた。

これらの結果から、連続継代培養において、正常に近いコロニー形態を維持しつつ増殖を促進するヒト iPS 細胞の CHIR 処理濃度は 1  $\mu\text{M}$  であることが示唆された。

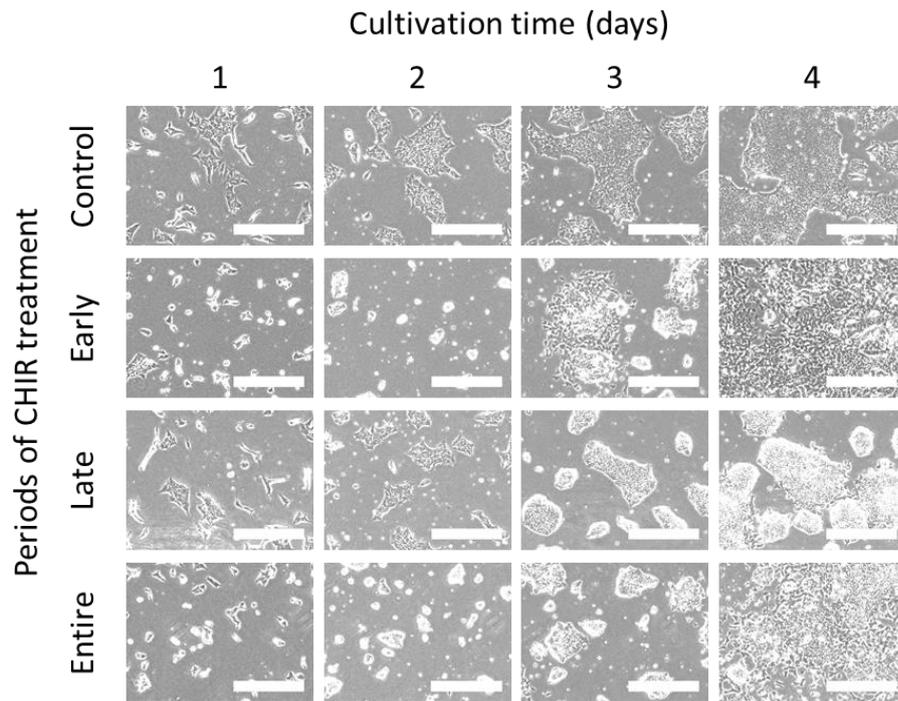
### iv) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の未分化性

未分化、中胚葉、内胚葉や外胚葉マーカー遺伝子の発現量を用いて、様々な濃度の CHIR 処理がヒト iPS 細胞の分化へ及ぼす影響を調べた。培養 4 日目の未分化マーカー遺伝子の発現量を Fig. 7A に示した。1, 3  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞の *OCT3/4*, *NANOG* および *SOX2* 遺伝子の発現量は、両方の株で CHIR 処理せず培養した Control と同程度であった。10  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞の *NANOG* および *SOX2* 遺伝子の発現量は、両方の株で Control と比較して有意に減少した。一方、*OCT3/4* 遺伝子の発現量は、201B7 株で Control と比較して有意に減少したが、253G1 株ではそれほど減少しなかった。CHIR 処理したヒト iPS 細胞の *REX1* 遺伝子の発現量は、両方の株でいずれの添加濃度であっても、Control と同程度であった。

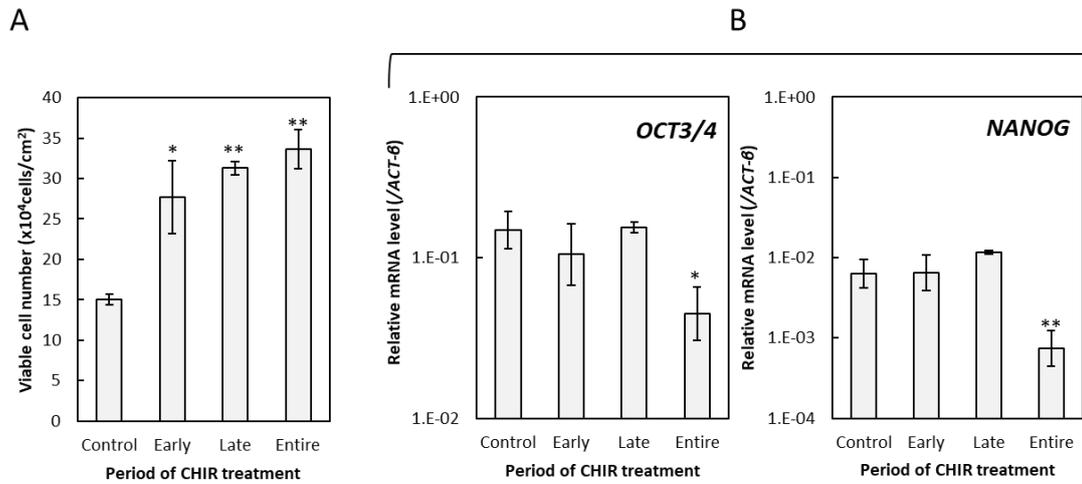
培養 4 日目の中胚葉関連マーカー遺伝子の発現量を Fig. 7B に示した。3  $\mu\text{M}$  以上の CHIR を添加したヒト iPS 細胞は、*T*, *GATA4*, *WNT3A* および *WNT8A* 遺伝子の発現量を両方の株で Control と比較して有意に増加させた。1  $\mu\text{M}$  CHIR を添加したヒト iPS 細胞のそれらの遺伝子発現量は、両方の株で Control と同程度であった。

培養4日目の内胚葉と外胚葉関連マーカー遺伝子の発現量を Fig. 7C に示した。3  $\mu$ M CHIR を添加したヒト iPS 細胞の *SOX17* 遺伝子の発現量は、両方の株で Control と比較して有意に増加した。CHIR を添加したヒト iPS 細胞の *AFP* 遺伝子の発現量は、両方の株で CHIR 添加濃度が高くなるにつれ減少した。CHIR 処理したヒト iPS 細胞の *SOX1* および *PAX6* 遺伝子の発現量は、両方の株でいずれの添加濃度であっても Control と同程度であった。

これらの結果から、未分化マーカー遺伝子の発現量が維持されるヒト iPS 細胞への CHIR 添加濃度は 1, 3  $\mu$ M であるが、3  $\mu$ M CHIR を添加したヒト iPS 細胞は内中胚葉分化を促進することが明らかになった。つまり、未分化状態を逸脱しないヒト iPS 細胞への CHIR 添加濃度は 1  $\mu$ M であるといえる。



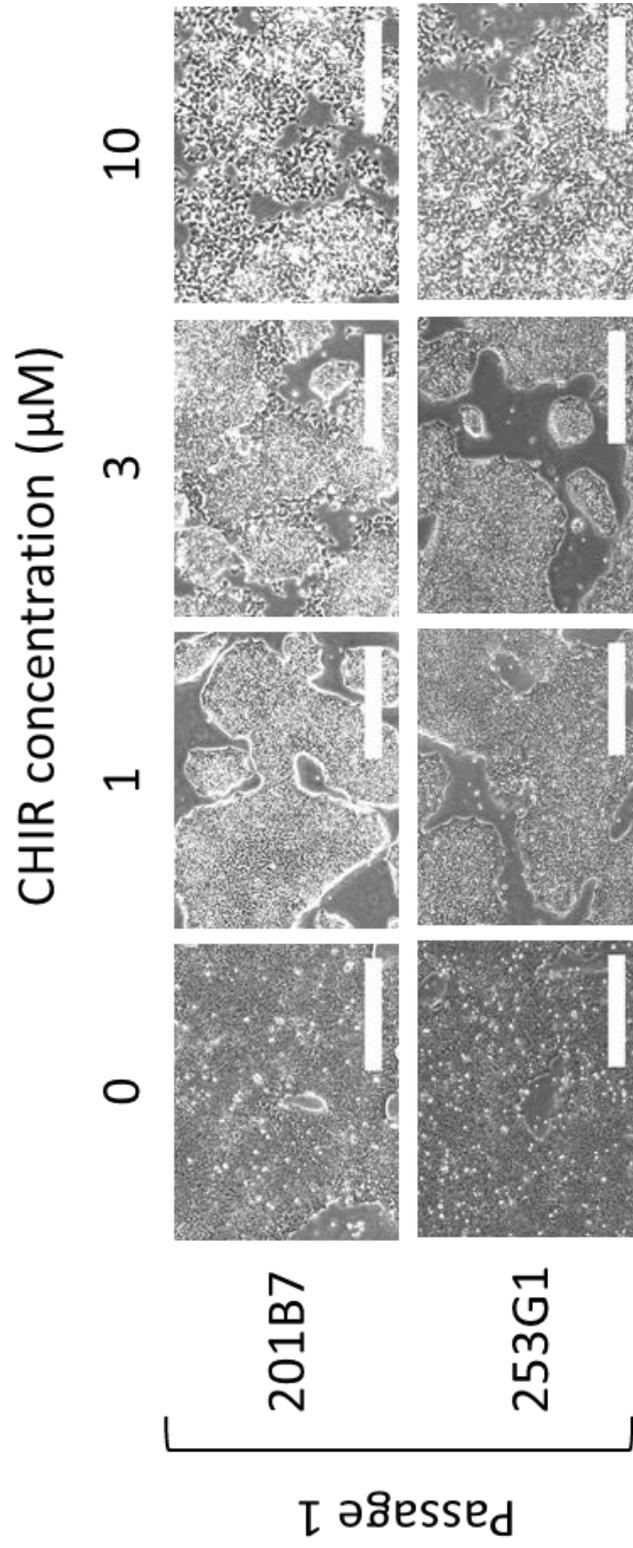
**Fig. 2. Effect of CHIR treatment period on colony morphology of hiPSC line 201B7.** Phase-contrast images of adherent cultures of single cell-dissociated hiPSCs between day 1 and day 4. Scale bar: 500  $\mu$ M.



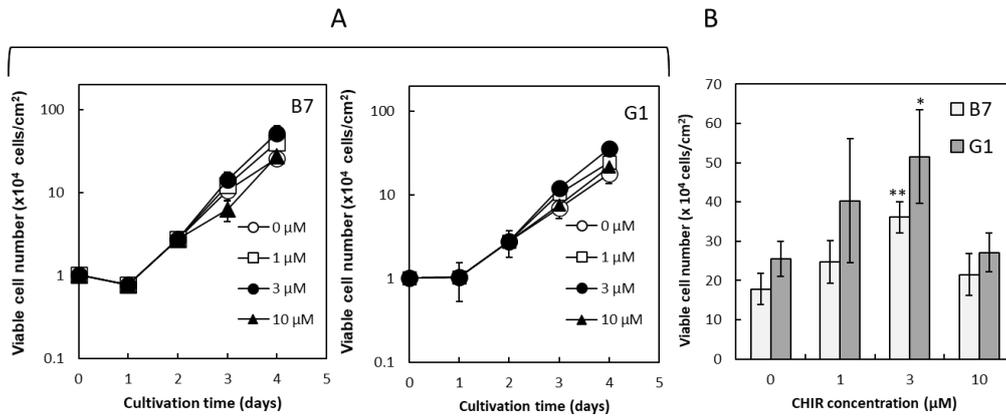
**Fig. 3. Effect of CHIR treatment period on cell yields and mRNA expression levels of pluripotency-associated genes of hiPSC line 201B7.**

(A) Cell yields:  $X_i$ , i.e., viable cell number per area of culture dish on day 4. Data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01, significance versus control calculated by Student's t-test.

(B) Pluripotency-associated genes: *OCT3/4* and *NANOG*. Total RNA was extracted from hiPSC cultures on day 4. Data were normalized to *Homo sapiens actin, beta* (*ACT-β*) expression as an endogenous control. Data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01, significance versus control calculated by Student's t-test.



**Fig. 4. Effect of CHIR concentrations on colony morphology of hiPSC lines 201B7 and 253G1.**  
Phase-contrast images of hiPSCs in adherent cultures on day 4. Scale bar: 500 μM.



**Fig. 5. Effect of CHIR concentrations on cell proliferation and cell yield of hiPSC lines 201B7 and 253G1.**

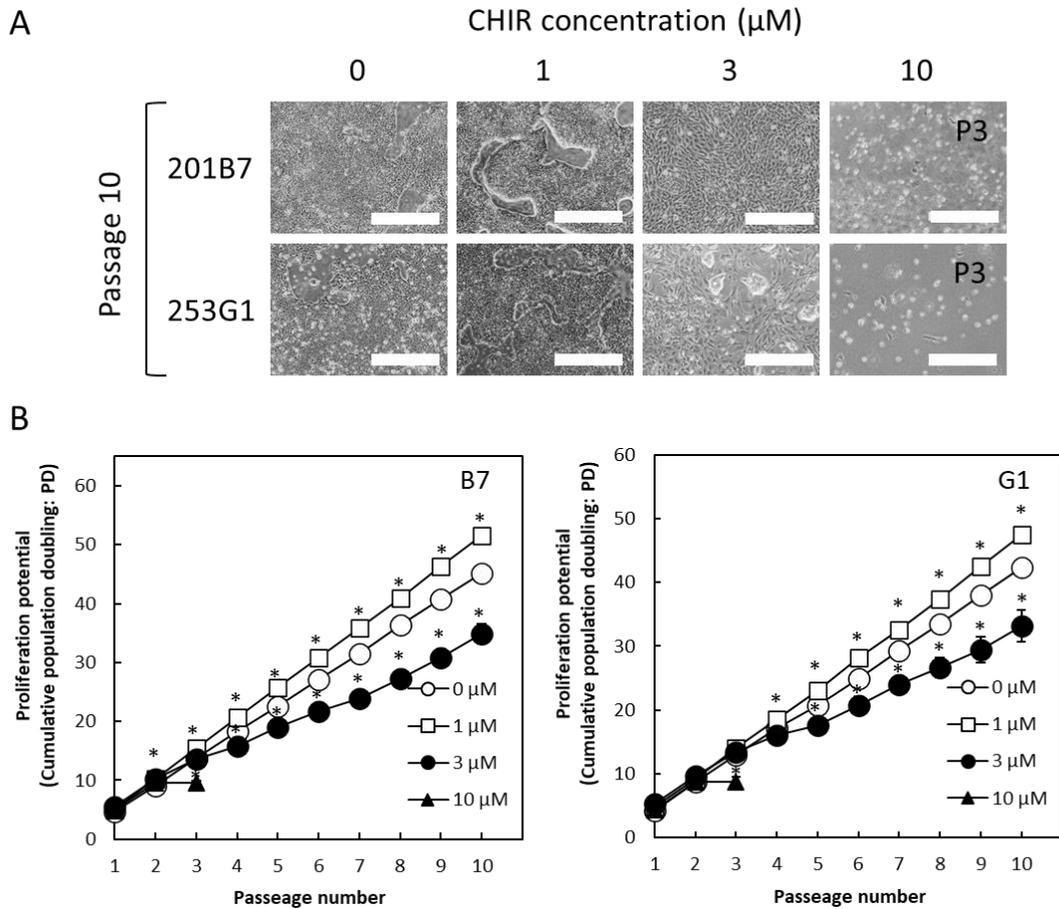
(A) Growth curves.

(B) Cell yields:  $X_t$ , i.e., viable cell number per area of culture dish on day 4. Data are represented mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 significance versus control (0  $\mu$ M CHIR) calculated by Student's t-test.

**Table 2. Cell growth-related data of  $t_d$  and  $X_f$  in both B7- and G1-hiPSC cultures.**

CHIR conc. ( $\mu\text{M}$ )	0	1	3	10	
Doubling time: $t_d$ (h)	201B7	18.2	12.3	11.0	16.3
		( $\pm 7.0$ )	( $\pm 2.0$ )	( $\pm 1.7$ )	( $\pm 3.0$ )
	253G1	12.4	11.1	10.2	21.1
		( $\pm 2.5$ )	( $\pm 1.3$ )	( $\pm 1.4$ )	( $\pm 0.6$ )
Cell yield: $X_f$ ( $\times 10^4$ cells/cm $^2$ )	201B7	17.8	24.8	36.1	21.5
		( $\pm 4.0$ )	( $\pm 5.4$ )	( $\pm 4.0$ )	( $\pm 5.3$ )
	253G1	25.4	40.3	51.6	27.1
		( $\pm 4.5$ )	( $\pm 15.8$ )	( $\pm 11.8$ )	( $\pm 5.0$ )

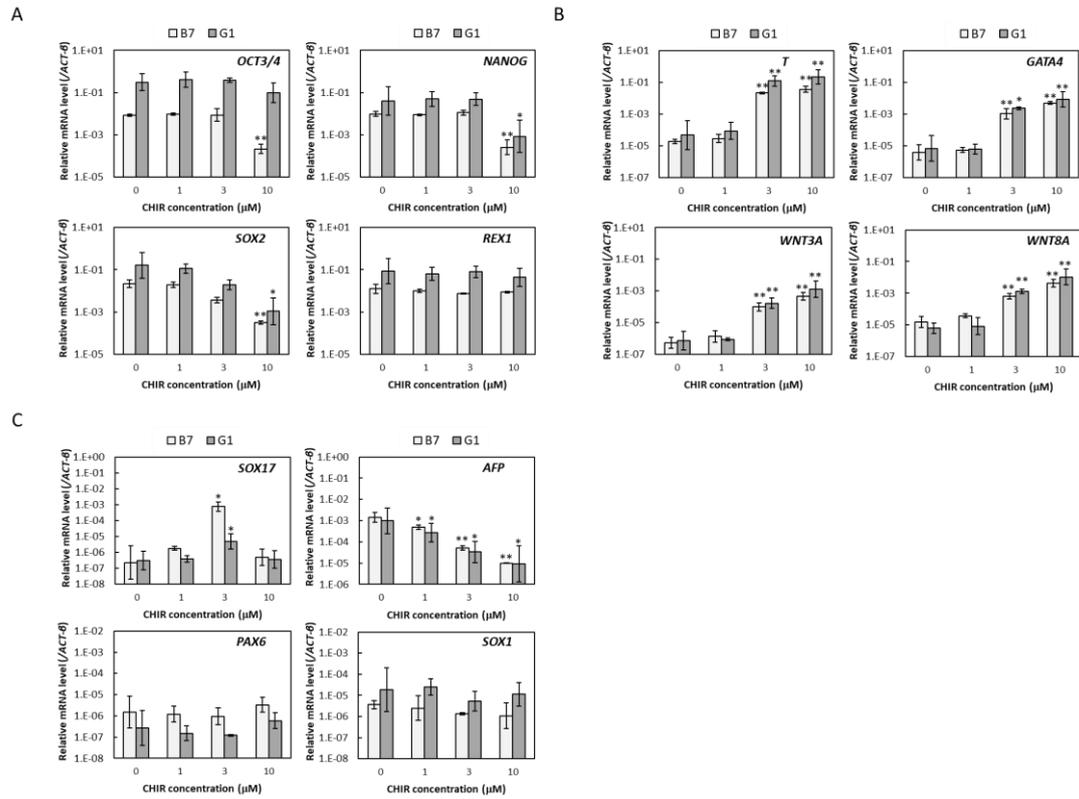
Data are represented mean  $\pm$  SD (n=3).



**Fig. 6. Effect of CHIR concentrations on colony morphology and proliferation of hiPSC lines 201B7 and 253G1 in serial subcultures.**

(A) Phase-contrast images of hiPSCs in adherent cultures on day 4 at passage 10. P3 means that the images were derived from the cultures on day 4 at passage 3. Scale bar: 500  $\mu\text{M}$ .

(B) Cumulative PDs of hiPSCs treated with various concentrations CHIR (0, 1, 3, and 10  $\mu\text{M}$ ) during 10 passages. Each experiment was repeated three times. Data are represented mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05 significance versus control (0  $\mu\text{M}$  CHIR) calculated by Student's t-test.



**Fig. 7. Effect of CHIR concentrations on the expression levels of pluripotency-associated and differentiation marker genes.**

Total RNA was extracted from hiPSC cultures on day 4. Data were normalized to *Homo sapiens actin, beta* (*ACT-β*) expression as an endogenous control. Data are represented mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 significance versus control (0  $\mu$ M CHIR) calculated by Student's t-test.

(A) Pluripotency-associated genes: *OCT3/4*, *NANOG*, *SOX2*, and *REX1*.

(B) Early mesoderm marker genes: *T*, *GATA4*, *WNT3A*, and *WNT8A*.

(C) Early endoderm marker genes: *SOX17* and *AFP*, and early ectoderm marker genes: *SOX1* and *PAX6*.

#### 4. 考察

本研究では、GSK-3 阻害剤である CHIR の処理期間と添加濃度が細胞増殖や分化へ及ぼす影響を検討した。4 日間培養のうちの後半 2 日間 1, 3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理は、ヒト iPS 細胞の増殖促進に効果的であり、辺縁のはっきりしたコロニー形態を示した (Fig. 4, 5A, B)。3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理したヒト iPS 細胞の生細胞数は、CHIR 処理せず培養した Control と比較して有意に増加した (Fig. 3A)。しかし、4 日間培養のうちの全期間の CHIR 処理は、ヒト iPS 細胞を未分化状態から逸脱させた (Fig. 3B)。また、4 日間培養のうちの後半 2 日間 10  $\mu\text{M}$  CHIR 処理には、増殖促進効果はなかった (Fig. 5A, B)。また、以前の研究で、ラット ES 細胞の効果的な増殖促進には、適度な GSK-3 阻害が必要であると報告されている<sup>(54)</sup>。つまり、4 日間培養のうちの後半 2 日間 1, 3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理は、細胞増殖を促進する中程度の GSK-3 阻害に相当すると考えられる。

また、3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下での連続継代培養は、3 継代以降ヒト iPS 細胞の増殖能を低下させたが、1  $\mu\text{M}$  CHIR 処理条件下での連続継代培養は、ヒト iPS 細胞の増殖を促進した (Fig. 6B)。継代培養での連続した高濃度 CHIR 処理は、ヒト iPS 細胞に対する CHIR の毒性を高める可能性があるといえる。さらに、以前の研究で、GSK-3 阻害剤が濃度依存的にマウス ES 細胞の生存率を低下させたと報告されている<sup>(55)</sup>。以上のことから、連続継代培養における最適な CHIR 処理濃度は 1  $\mu\text{M}$  であるといえる。

4 日間培養のうちの後半 2 日間 1, 3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理を行ったヒト iPS 細胞の *OCT3/4*, *NANOG*, *SOX2* および *REX1* といった未分化マーカー遺伝子の発現量は、CHIR 処理せず培養した Control と同程度であった (Fig. 7A)。しかし、3  $\mu\text{M}$  CHIR で処理したヒト iPS 細胞は、*T*, *GATA4*, *WNT3A* および *WNT8A* といった中胚葉マーカー遺伝子の発現を促進した (Fig. 7B)。また、ヒト iPS 細胞への 10  $\mu\text{M}$  CHIR 処理は、未分化マーカー遺伝子の発現量の減少と中胚葉マーカー遺伝子の発現量の増加が確認された (Fig. 7A, B)。ただし、*OCT3/4* 遺伝子の発現量は 253G1 株において、10  $\mu\text{M}$  CHIR 処理でも Control と同程度であった。この 201B7 株と 253G1 株における *OCT3/4* 遺伝子の発現量の差は、樹立条件の差によると考えられる。201B7 株は *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* および *c-MYC* といった 4 つの転写因子を導入し樹立されたが<sup>(2)</sup>、253G1 株は *c-MYC* 以外の 3 つの転写因子を導入し樹立されている<sup>(5)</sup>。しかし、中胚葉マーカー遺伝子の発現傾向に株間差はみられなかった。以前の研究でも、高濃度 CHIR がヒト ES 細胞の中胚葉細胞への分化を促進する可能性があると報告されている<sup>(61)</sup>。以上のことから、ヒト多能性幹細胞への高濃度 CHIR は、中胚葉分化を促進することが示唆された。そして、後半 2 日間 3  $\mu\text{M}$  CHIR 処理は、ヒト iPS 細胞の未分化維持と中胚葉分化促進の境界となる CHIR 曝露条件であるといえる。

したがって、ヒト iPS 細胞の未分化性を維持しつつ増殖性を促進する CHIR 処理条件は、4 日間培養のうちの後半 2 日間 1  $\mu\text{M}$  CHIR 添加である。後半 2 日間 1  $\mu\text{M}$  CHIR 処理は、従来法と比較して一度の処理で生細胞数を 1.5 倍程度増加させ、10 継代にわたる連続処理でもその細胞増殖促進効果を継続させることが明らかになった。また、CHIR がヒト iPS 細

胞の増殖と分化へ及ぼす影響は、処理期間、添加濃度、添加時期の3要因によって左右されると考えられる。その境界となる CHIR 曝露条件は、後半2日間3  $\mu\text{M}$  CHIR 添加であるといえる。

## 第2節 接着培養をベースとしたヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導における CHIR99021 処理条件の最適化

### 1. 序

2017 年現在、日本で心疾患（高血圧性を除く）を治療中の患者数は約 170 万人といわれ<sup>(56)</sup>、年間 8 万人の方が心不全で亡くなっている<sup>(57)</sup>。特に、重症な慢性心不全は最新の循環器治療の技術を持ってしても予後が悪く、根治治療である心臓移植は深刻なドナー不足である。改正臓器移植法の施行以来、心臓移植患者数は従来に比べ増加したが、心臓移植が必要な患者を全て治療することは難しい。そのため、再生心筋細胞を用いた細胞療法の臨床化が求められている<sup>(58, 59)</sup>。その細胞療法の細胞源として、自己増殖能と多分化能を持つヒト iPS 細胞<sup>(1, 2)</sup>が注目されている。十分な量のヒト iPS 細胞由来の機能性心筋細胞を獲得するために、これまで様々な心筋細胞分化誘導プロトコルが提案されてきた。

1985 年に Doetschman TC らによって、マウス ES 細胞の心筋細胞、内臓卵黄嚢や血島への分化が報告されて以降<sup>(60)</sup>、心筋細胞への分化誘導後に細胞移植を行うことを念頭に研究が進められるようになった<sup>(61)</sup>。その後、2001 年に Kehat I らによって、ヒト ES 細胞が自然発生的に心筋細胞へ分化することが報告され<sup>(62)</sup>、ヒト ES 細胞や iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導方法の開発が盛んに行われるようになった。Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) 阻害である CHIR99021 (CHIR) は処理期間と添加濃度に依存して中胚葉分化を促進するため、多能性幹細胞の心筋細胞分化誘導に使用されることが多い化合物である<sup>(51, 52, 63)</sup>。多能性幹細胞の心筋細胞分化誘導は、心臓発生や心筋細胞分化において重要な増殖因子を段階的に添加することで行われる。心筋細胞への段階的分化誘導において、中胚葉に傾倒した細胞は、中胚葉から心筋中胚葉、心筋前駆細胞に至る一連の発生段階を経て、心筋細胞へと分化する<sup>(74, 75)</sup>。

これまでの結果から、ヒト iPS 細胞を 4 日間接着培養するとき、その後半 2 日間を 3  $\mu$ M 以上の高濃度 CHIR で処理すると、中胚葉分化を促進することが明らかになった。このことから、接着培養条件下での高濃度 CHIR 添加は心筋細胞への段階的分化誘導における中胚葉分化段階の代替になると考えた。本実験で使用した Thermo Fisher Scientific Inc. の PSC Cardiomyocyte differentiation kit 推奨プロトコルは、3 種類の分化誘導培地を用いて、60~80% confluency まで接着培養条件下で未分化維持した多能性幹細胞を心筋細胞へ段階的に分化誘導するものである。当研究室の知見から、PSC Cardiomyocyte differentiation kit 推奨プロトコルにおける中胚葉・心筋中胚葉分化段階を Medium A、心筋前駆細胞誘導を Medium B、心筋細胞成熟を Maintenance medium が担っていると考えられる<sup>(66)</sup>。

本研究では、接着培養したヒト iPS 細胞への高濃度 CHIR 処理による PSC Cardiomyocyte differentiation kit 推奨プロトコルの中胚葉・心筋中胚葉分化段階の代替を試みた。高濃度 CHIR 処理条件下での接着培養をヒト iPS 細胞の心筋細胞分化の前培養として適用することで、心筋細胞への分化誘導期間を短縮することが可能であると考えた。

## 2. 実験材料及び方法

### (1) フィーダー存在下 (on feeder) でのヒト iPS 細胞の培養

本研究ではヒト iPS 細胞の標準細胞株である 201B7 株<sup>(2)</sup>、253G1 株<sup>(5)</sup>を使用した。これらの細胞株は文部科学省に承認されたナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) を通じて理研バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) より提供された。

Feeder layer 上で培養したヒト iPS 細胞へ Collagenase-trypsin-KSR (CTK) 溶液を添加し、Feeder layer を取り除いた。残ったヒト iPS 細胞をセルスクレーパーで物理的に剥がした。剥がしたヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ 20% Knockout serum replacement (KSR, Gibco, Grand Island, NY, USA)、1% GlutaMAX supplement (Gibco)、0.1 mM Non-essential amino acids (NEAA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、0.1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)、25 units/mL Penicillin、25  $\mu$ g/mL Streptomycin (Gibco)、4 ng/mL Recombinant human fibroblast growth factor 2 (FGF2, Oriental Yeast Co., Ltd. Tokyo, Japan) を含む DMEM-Ham's F-12 basal medium (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を適量 Feeder layer 上に播種した。播種後、6 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。培地交換は毎日行った。

Feeder layer を作製するために、ネオマイシン抵抗性 (neor) 発現ベクターと LIF 発現ベクターを安定的に組み込んだ STO 細胞である SNL76/7 (ECACC 07032801, DS Pharma Biomedical Co., Osaka, Japan) を使用した<sup>(53)</sup>。STO 細胞を、7.7% Fetal bovine serum (FBS, Gibco)、25 units/mL Penicillin、25  $\mu$ g/mL Streptomycin (Gibco) を含む DMEM basal medium (Nacalai Tesque) を用いて、0.1% Gelatin (Sigma) コート上で 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。STO 細胞を 10  $\mu$ g/L の Mitomycin C (Sigma) を用いて 2 時間 15 分処理し、増殖能を不活化させた。不活化した STO 細胞を 0.1% Trypsin-EDTA (Nacalai Tesque) を用いて分散し、 $3.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.1% gelatin コート上に播種した。播種後、2 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養し、Feeder layer として使用した。

### (2) フィーダー非存在下 (feeder-free) でのヒト iPS 細胞の培養

Feeder layer 上で培養したヒト iPS 細胞へ Collagenase-trypsin-KSR (CTK) 溶液を添加し、Feeder layer を取り除いた。残ったヒト iPS 細胞を、Accutase™ (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem® hPSC XF (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.5 mg/cm<sup>2</sup> Vitronectin (Life Technologies) コート上に播種した。播種後、4 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。細胞分散時から播種後 24 時間はヒト iPS 細胞の

アポトーシスを抑制するために、10  $\mu$ M Y-27632 (ROCK inhibitor, Nacalai Tesque) を NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF へ添加した。培地交換は Y-27632 を含まない NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を用いて毎日行った。Feeder-free でヒト iPS 細胞を 3 継代し、残存した Feeder layer を除去して実験を行った。以下の実験には、3~20 継代した iPS 細胞を用いた。

### (3) 接着培養条件下のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理

Feeder-free で培養したヒト iPS 細胞を、Accutase<sup>™</sup> を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で  $2.5 \mu$ L/cm<sup>2</sup> Corning<sup>®</sup> Matrigel<sup>®</sup> hESC-Qualified Matrix (Matrigel<sup>®</sup>, CORNING, Corning, NY, USA) コート上に播種した。播種後、4 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。細胞分散時から播種後 24 時間はヒト iPS 細胞のアポトーシスを抑制するために、10  $\mu$ M Y-27632 を NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF へ添加した。培地交換の際に、様々な濃度の CHIR99021 (CHIR, Fujifilm Wako, Osaka, Japan) を含む NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を用いて、CHIR 処理を行った。CHIR 処理として、4 日間培養のうちの 2 日目から 4 日目 (後半 2 日間) に 0, 1, 3, 10 $\mu$ M CHIR を添加した。

### (4) 接着培養をベースとした心筋細胞への段階的分化誘導

CHIR 処理条件下で培養したヒト iPS 細胞を PSC Cardiomyocyte differentiation kit (PSC kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) の Medium B で 2 日間、Maintenance medium で 8 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。分化誘導期間中の培地交換は 2 日に 1 回行った。定期的に顕微鏡観察を行い、細胞収縮の有無を観察した。

対照として、PSC kit 推奨プロトコルに従い、接着培養ベースで心筋細胞への分化誘導を行った (PSC kit control-monolayer)。PSC kit control-monolayer では、CHIR 処理を行わず培養したヒト iPS 細胞を、PSC kit の Medium A で 2 日間、Medium B で 2 日間、Maintenance medium で 8 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。分化誘導期間中の培地交換は 2 日に 1 回行った。定期的に顕微鏡観察を行い、細胞収縮の有無を観察した。

### (5) Total RNA 抽出及び cDNA 合成、リアルタイム RT-qPCR 解析

Total RNA 抽出は NucleoSpin RNA (Takara Bio, Otsu, Japan) を使用した。cDNA 合成は ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した。Total RNA 抽出と cDNA 合成はメーカー推奨プロトコルに従って行った。

リアルタイム RT-qPCR 解析は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて、反応液をメーカー推奨プロトコルに従って調整した。プライマーは、内部標準 (Housekeeping) 遺伝子として *TATA binding protein (TBP)*、心筋成熟マーカーとして *Homo sapiens myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (MYH6)*, *Homo sapiens troponin T type 2 (TNNT2)*,

*Homo sapiens myosin, light chain 2 (MLC2A)*を用いた。PCR 反応と解析は Thermal Cycler Dice (Takara Bio)を用いて行った。PCR 反応条件は変性 95°C-5 秒間、アニーリング 60°C -10 秒間、伸長 72°C-20 秒間とし、40 cycles 行った。

リアルタイム RT-qPCR は、各 cycle 終了時に生成された PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし、指数関数的増幅域で正確な定量を行う。PCR では 1 cycle ずつ指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達する。この増幅の様子をリアルタイムでモニタリングした図が増幅曲線である。増幅曲線に Threshold line (閾値) を引き、増幅曲線と Threshold line とが交わる反応 cycle 数を Threshold cycle 数 (CT) とした (Crossing Point 法)。

各サンプルの目的遺伝子の相対発現量、標準偏差は次のように計算した。

i) cDNA 濃度差の補正

各サンプルの cDNA 濃度差を補正 (normalize) するために、サンプルの内部標準遺伝子の CT を  $CT_{Housekeeping}$ 、目的遺伝子の CT を  $CT_{target}$  として、以下の式を用いて各サンプルの目的遺伝子の CT を補正した値である  $\Delta CT$  を算出した。

$$\Delta CT = CT_{target} - CT_{Housekeeping}$$

ii) 目的遺伝子の相対発現量の平均値

各サンプルの  $\Delta CT$  の平均値を  $\overline{\Delta CT}$  として、以下の式を用いて各サンプルの目的遺伝子の相対発現量の平均値である  $\bar{R}$  を算出した。

$$\bar{R} = 2^{-\overline{\Delta CT}}$$

iii) 標準偏差

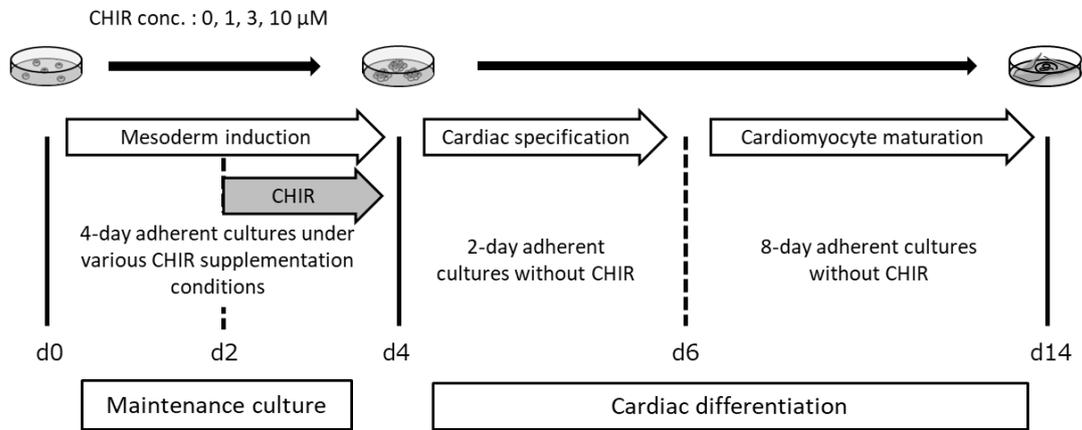
標準偏差 (standard deviation) は  $\Delta CT$  から標準偏差を算出した。本研究の遺伝子発現量のグラフは対数軸で作製するため、標準偏差の値が+側と-側で異なる。そのため、 $\Delta CT$  から算出した標準偏差を  $SD_{\Delta CT}$  として、以下の式を用いて各サンプルの+側の標準偏差である  $SD(+)$  と-側の標準偏差である  $SD(-)$  を算出した。

$$SD(+)=2^{-(\overline{\Delta CT}+SD_{\Delta CT})}-2^{-(\overline{\Delta CT})}$$

$$SD(-)=2^{-(\overline{\Delta CT})}-2^{-(\overline{\Delta CT}-SD_{\Delta CT})}$$

(6) 統計解析

少なくとも 3 回の独立した実験を行った。Student's t-test を使用して統計解析を行い、\*P<0.05, \*\*P<0.01 の値を統計的に有意であるとした。



**Fig. 8. Schematic showing CHIR treatment conditions in cardiac differentiation in adherent cultures.**

Workflow describing the stepwise cardiac differentiation protocol after applying various concentrations of CHIR (1, 3, or 10  $\mu\text{M}$ ) for late 2-day period of a 4-day cultivation.

**Table 3. Primers of RT-PCR**

	Gene name	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)
Housekeeping	<i>TBP</i>	F: GCTGGCCCATAGTGATCTTT R: CTTCACACGCCAAGAAACAGT	60
cardiac differentiation	<i>MYH6</i>	F: CGCTGAGTCCCAGGTCAACA R: TTACAGGTTGGCAAGAGTGAGGTTC	115
	<i>TNNT2</i>	F: GAGCTGTGGCAGAGCATCTAT R: ATCCTGTTTCGGAGAACATTG	122
	<i>MLC2A</i>	F: GCAGGCGGAGAGGTTTTTC R: AGTTGCCAGTCACGTCAGG	93

### 3. 結果

通常ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導は、中胚葉分化、心筋前駆細胞への誘導、心筋成熟という 3 つの過程を経て行われる。これまでの結果から、ヒト iPS 細胞を 4 日間接着培養するとき、その後半 2 日間を 3  $\mu$ M 以上の高濃度 CHIR で処理すると、中胚葉分化を促進することが明らかになった。そのため、接着培養したヒト iPS 細胞への高濃度 CHIR 添加は、心筋細胞分化誘導プロトコルにおける中胚葉分化段階の代替になると考え、ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導へ与える CHIR 処理の影響を調べた。CHIR がヒト iPS 細胞へ及ぼす影響は細胞株によって異なる可能性があるため、2 つのヒト iPS 細胞株 (201B7 株、253G1 株) を使用した。

#### (1) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導後の様相と収縮

心筋細胞への分化誘導後の細胞様相と細胞収縮の有無を Table 4 にまとめた。PSC kit 推奨プロトコルに従って心筋細胞への分化誘導を行った場合 (PSC kit control-monolayer)、細胞の接着と伸展を両方の株で確認したが、収縮がみられたのは 201B7 株のみであった。PSC kit 推奨プロトコルの中胚葉分化段階を 3  $\mu$ M CHIR 処理で代替した場合、両方のヒト iPS 細胞株で網目状に積層化し、大きな細胞収縮が well 全体で確認された。1  $\mu$ M 以下で CHIR 処理したヒト iPS 細胞は、201B7 株で広範囲にわたって細胞の接着と伸展が確認されたが、253G1 株では一部を除き細胞の剥離が確認された。また、10  $\mu$ M CHIR 処理したヒト iPS 細胞は、両方の株で広範囲にわたって細胞の接着と伸展が確認された。

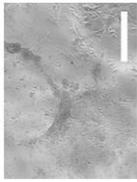
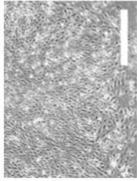
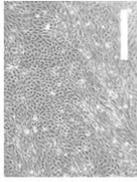
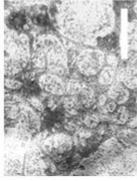
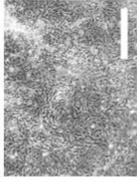
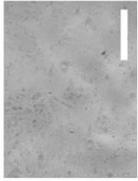
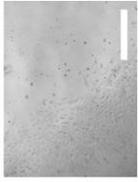
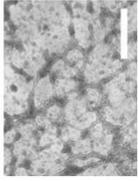
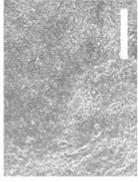
これらの結果から、細胞収縮が確認され心筋細胞への分化が示唆された CHIR 処理濃度は 3  $\mu$ M であるといえる。また、3  $\mu$ M CHIR 処理では、両方のヒト iPS 細胞株で高い再現性を持ち、広範囲で細胞収縮がみられた。よって、3  $\mu$ M CHIR 処理は、PSC kit 推奨プロトコルの中胚葉分化段階を代替しているといえる。

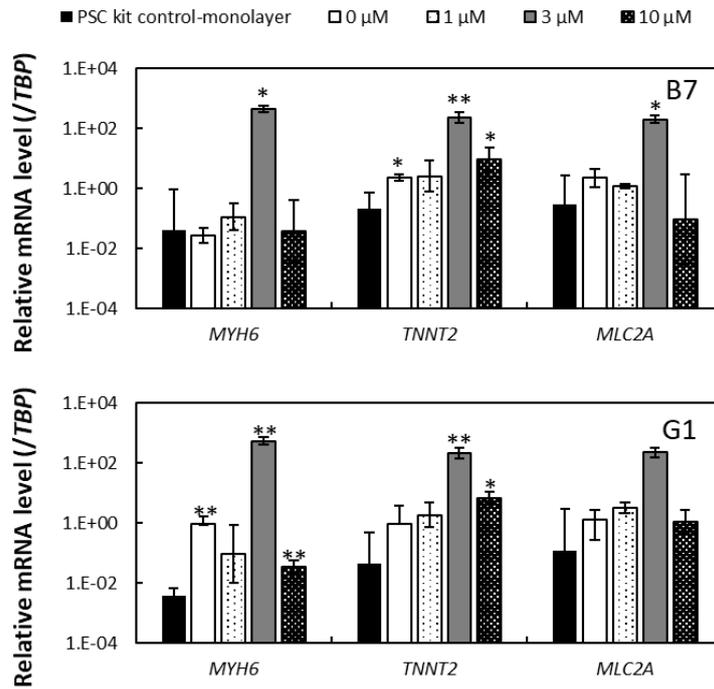
#### (2) 様々な濃度で CHIR99021 処理したヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導後の心筋成熟

心筋細胞への分化誘導後の心筋成熟マーカー遺伝子の発現量を Fig. 9 に示した。CHIR 処理で中胚葉分化段階を代替して心筋細胞へ分化誘導した場合、*MYH6*、*TNNT2* および *MLC2A* 遺伝子の発現量は、両方のヒト iPS 細胞株で PSC kit control-monolayer より増加した。それは、3  $\mu$ M CHIR 処理のときに最も顕著であった。特に、201B7 株において、それらの遺伝子発現量は、PSC kit control-monolayer と比較して有意に増大した。

これらの結果から、心筋細胞分化誘導の中胚葉分化段階を 3  $\mu$ M CHIR 処理により代替可能であることが示された。すなわち、接着培養をベースとしたヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導において、4 日間の接着培養のうちの後半 2 日間に 3  $\mu$ M CHIR 添加を行うことは、心筋細胞分化に向けた中胚葉分化を促進する方法として有効であるといえる。

Table 4. Effect of CHIR treatments on cardiac differentiation.

		CHIR concentration ( $\mu\text{M}$ )					
PSC kit Control-monolayer		0	1	3	10		
201B7	Phase-contrast images						
	Cell contractility reproducibility	Low	—	—	High reproducibility	—	
253G1	Phase-contrast images						
	Cell contractility	—	—	—	High reproducibility	—	



**Fig. 9. Effect of CHIR treatments on the expression levels of cardiac differentiation-associated genes.**

Cardiac differentiation-associated genes: *MYH6*, *TNNT2* and *MLC2A*. Total RNA was extracted from adherent cultures at the end of the cardiac differentiation process on day 14 or 16. Data were normalized to *TATA binding protein* (*TBP*) expression as an endogenous control. Data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01, significance versus control (PSC kit control-monolayer) calculated by Student's t-test.

#### 4. 考察

4日間の接着培養のうちの後半2日間を3  $\mu$ M CHIRで処理したヒトiPS細胞は、中胚葉分化を促進することが明らかになった。心筋細胞分化誘導における中胚葉分化段階を3  $\mu$ M CHIR処理で代替した場合、PSC kit推奨プロトコルよりも高い再現性かつ広範囲でヒトiPS細胞から拍動性心筋細胞が発生した (Table 4, Fig. 9)。

これまで結果から、ヒトiPS細胞への後半2日間3  $\mu$ M CHIR処理は、未分化維持と中胚葉分化促進の境界となるCHIR曝露条件であることが明らかになった。3  $\mu$ M未満のCHIR処理条件である0, 1  $\mu$ M CHIR処理は、中胚葉マーカーである *T*, *GATA4*, *WNT3A* および *WNT8A* 遺伝子の発現が不十分であったため (Fig. 7B)、その後の心筋細胞分化誘導において拍動性心筋細胞が得られなかったと考えられる。以前の研究で、WNT3Aは胚発生過程で中胚葉系統への誘導に寄与すると報告されている<sup>(77)</sup>。また、Wnt/ $\beta$ -Catenin経路の活性化因子であるWnt3aは、中胚葉の形成を促進し、心筋細胞の表現型への分化につながると考えられている<sup>(78)</sup>。さらに、ヒトES細胞の心筋細胞分化誘導において、*WNT3*と*WNT8A*は*T*の発現と中胚葉分化を促進することが明らかになっている<sup>(79)</sup>。すなわち、3  $\mu$ M未満のCHIR処理は、Wntシグナル伝達の活性と中胚葉分化が不十分であることから、心筋細胞分化誘導における中胚葉分化段階の代替として不適である。一方、10  $\mu$ M CHIR処理では、3  $\mu$ M CHIR処理と同程度の中胚葉マーカー遺伝子の発現がみられたが、その後の心筋細胞分化誘導において拍動性心筋細胞が得られなかった (Table 4, Fig. 9)。10  $\mu$ M CHIR処理は3  $\mu$ M CHIR処理と異なり、*OCT3/4*, *NANOG* および *SOX2* といった未分化マーカー遺伝子の発現を減少させたためと考えられる (Fig. 7A)。よって、心筋細胞分化誘導における中胚葉分化段階において、未分化マーカー遺伝子の早期消退は望ましくないと思われる。

以上のことから、4日間の接着培養のうちの後半2日間に3  $\mu$ M CHIR処理を行うことは、心筋細胞分化に向けた中胚葉分化を促進する方法として有効であることが明らかになった。

### 第3節 要約

CHIR99021 (CHIR) は、Wnt シグナルを活性化させる Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)阻害剤の一つである。本研究では、ヒト iPS 細胞の維持培養（接着単層培養）における CHIR 処理条件がヒト iPS 細胞の多能性と増殖性にどのように影響を及ぼすのかを検討した。すなわち、様々な CHIR 処理条件下でのヒト iPS 細胞の多能性と増殖性を評価し、さらに未分化維持と細胞増殖促進が両立する CHIR 処理条件の最適化を行った。4日間培養のうちの後半2日間に1  $\mu$ M CHIR で処理を行うと、ヒト iPS 細胞の増殖が促進され、細胞が密で辺縁のはっきりしたコロニーが形成された。3  $\mu$ M CHIR 処理は処理期間に関わらずヒト iPS 細胞の増殖を促進したが、4日間培養のうちの全期間で処理を行うと、ヒト iPS 細胞は未分化状態から逸脱した。また、10  $\mu$ M CHIR 処理では、CHIR による細胞増殖促進効果は得られず、ヒト iPS 細胞は低密度なコロニーを形成した。連続継代培養を行ったところ、1  $\mu$ M CHIR 処理のみで CHIR の細胞増殖促進効果が継続することが明らかになった。1, 3  $\mu$ M CHIR 処理したヒト iPS 細胞は、未分化マーカー遺伝子の発現を維持したが、3, 10  $\mu$ M CHIR 処理では中胚葉マーカー遺伝子の発現を促進した。このことから、後半2日間3  $\mu$ M CHIR 処理は、ヒト iPS 細胞の未分化維持と中胚葉分化促進の境界となる CHIR 曝露条件であると考えられる。よって、未分化性を維持したままヒト iPS 細胞の増殖を促進する最適な CHIR 処理条件は、4日間培養のうちの後半2日間1  $\mu$ M CHIR 添加であるといえる。

これまでの結果から、ヒト iPS 細胞を4日間接着培養するとき、その後半2日間で3  $\mu$ M 以上の高濃度 CHIR で処理すると、中胚葉分化が促進されることが明らかになった。本研究では、この現象を利用してヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化を効率化することを試みた。すなわち、高濃度 CHIR 処理条件下での接着培養をヒト iPS 細胞の心筋細胞分化の前培養として適用することで、中胚葉に傾倒したヒト iPS 細胞を作出することができ、心筋細胞への分化誘導期間を短縮することが可能であると考えた。CHIR 処理により中胚葉へ傾倒したヒト iPS 細胞を心筋細胞へ分化誘導したところ、3  $\mu$ M CHIR 処理のみで広範囲に拍動性心筋細胞が発生した。3  $\mu$ M CHIR 処理したヒト iPS 細胞の中胚葉分化マーカー遺伝子の発現量は有意に増加したが、未分化マーカー遺伝子の発現は維持されていた。CHIR 処理濃度を10  $\mu$ M にすると、未分化マーカー遺伝子の発現量が減少し、拍動性心筋細胞の発生はみられなかった。このことは、中胚葉分化段階における未分化マーカー遺伝子発現の消退は、心筋細胞分化誘導促進の観点からは望ましくないといえる。以上のことから、心筋細胞への段階的分化誘導における中胚葉・心筋中胚葉分化段階の代替として最適な CHIR 処理条件は、4日間培養のうちの後半2日間3  $\mu$ M CHIR 添加である。

## 参考文献

1. Takahashi K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, **Cell**, 2006 Aug; **126**(4): 663-76.
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, **Cell**, 2007 Nov; **131**(5): 861-72.
3. Evans MJ, Kaufman MH, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, **Nature**, 1981 Jul; **292**(5819): 154-6.
4. Martin GR, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1981; **78**(12): 7634-8.
5. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S, Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, **Nat Biotechnol**, 2008 Jan; **26**(1): 101-6.
6. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K, Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells, **Cell Stem Cell**, 2010 Jul; **7**(1): 11-4.
7. Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M, Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells, **Nat Protoc**, 2009; **4**(6) :811-24.
8. Osakada F, Jin ZB, Hiramami Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, Sasai Y, Takahashi M, In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction, **J Cell Sci**, 2009 Sep; **122**(Pt 17): 3169-79.
9. Doi D, Magotani H, Kikuchi T, Ikeda M, Hiramatsu S, Yoshida K, Amano N, Nomura M, Umekage M, Morizane A, Takahashi J, Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease, **Nat Commun**, 2020 Jul; **11**(1) :3369.
10. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, Mizuma H, Takara S, Takahashi R, Inoue H, Morita S, Yamamoto M, Okita K, Nakagawa M, Parmar M, Takahashi J, Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model, **Nature**, 2017 Aug; **548**(7669): 592-6.
11. Ishida M, Miyagawa S, Saito A, Fukushima S, Harada A, Ito E, Ohashi F, Watabe T, Hatazawa J, Matsuura K, Sawa Y, Transplantation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes is superior to somatic stem cell therapy for restoring cardiac function and oxygen consumption in a porcine model of myocardial infarction,

- Transplantation**, 2019 Feb; **103**(2): 291-8.
12. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T, Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells, **Biochem Biophys Res Commun**, 2012 Aug; **425**(2): 321-7.
  13. 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 interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2014; **111**(47):16772-7.
  14. Blinova K, Dang Q, Millard D, Smith G, Pierson J, Guo L, Brock M, Lu HR, Kraushaar U, Zeng H, Shi H, Zhang X, Sawada K, Osada T, Kanda Y, Sekino Y, Pang L, Feaster TK, Kettenhofen R, Stockbridge N, Strauss DG, Gintant G, International multisite study of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug proarrhythmic potential assessment, **Cell Rep**, 2018 Sep; **24**(13): 3582-92.
  15. Takasuna K, Kazusa K, Hayakawa T, Comprehensive cardiac safety assessment using hiPS-cardiomyocytes (consortium for safety assessment using human iPS cells: CSAHi), **Curr Pharm Biotechnol**, 2020; **21**(9): 829-41.
  16. Iwao T, Development of an in vitro system for evaluating intestinal drug disposition using human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells, **Yakugaku Zasshi**, 2018; **138**(10): 1241-7.
  17. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K, Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons, **Science**, 2008 Aug; **321**(5893): 1218-21.
  18. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ, Disease-specific induced pluripotent stem cells, **Cell**, 2008 Sep; **134**(5): 877-86.
  19. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN, Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient, **Nature**, 2009 Jan; **457**(7227): 277-80.
  20. Jing D, Parikh A, Canty JM Jr, Tzanakakis ES, Stem cells for heart cell therapies, **Tissue Eng Part B Rev**, 2008; **14**(4):393-406.
  21. Miyagawa S, Domae K, Yoshikawa Y, Fukushima S, Nakamura T, Saito A, Sakata Y, Hamada S, Toda K, Pak K, Takeuchi M, Sawa Y, Phase I clinical trial of autologous stem cell-sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy, **J Am Heart Assoc**, 2017

- Apr; **6**(4): e003918.
22. Lock LT, Tzanakakis ES, Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes, **Tissue Eng**, 2007 Jul; **13**(7): 1399-412.
  23. Zweigerdt R, Large scale production of stem cells and their derivatives, **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 2009; **114**: 201-35.
  24. Olmer R, Lange A, Selzer S, Kasper C, Haverich A, Martin U, Zweigerdt R, Suspension culture of human pluripotent stem cells in controlled, stirred bioreactors, **Tissue Eng Part C Methods**, 2012; **18**(10): 772-84.
  25. Serra M, Brito C, Correia C, Alves PM, Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application, **Trends Biotechnol**, 2012 Jun; **30**(6): 350-9.
  26. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW, Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells, **Science**, 2009 Jun; **324**(5935): 1673-7.
  27. Veraitch FS, Scott R, Wong JW, Lye GJ, Mason C, The impact of manual processing on the expansion and directed differentiation of embryonic stem cells, **Biotechnol Bioeng**, 2008 Apr; **99**(5): 1216-29.
  28. Leung HW, Chen A, Choo AB, Reuveny S, Oh SK, Agitation can induce differentiation of human pluripotent stem cells in microcarrier cultures, **Tissue Eng Part C Methods**, 2011 Feb; **17**(2): 165-72.
  29. Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K, A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, **Stem Cells Transl Med**, 2014; **3**(12): 1473-83.
  30. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H, Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages, **Development**, 1998 May; **125**(9): 1747-57.
  31. Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Kanaami S, Ohno R, Sakamoto K, Kodama M, Kurokawa J, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Okada M, Nakajima K, Tanosaki S, Someya S, Hirano A, Kawaguchi S, Kobayashi E, Fukuda K, Efficient large-scale 2D culture system for human induced pluripotent stem cells and differentiated cardiomyocytes, **Stem Cell Reports**, 2017 Nov; **9**(5): 1406-14.
  32. Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR, Ma ST, Reeder JW, Samuels I, Slabiak T, Wagman AS, Hammond ME, Harrison SD, Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo, **Diabetes**, 2003 Mar; **52**(3): 588-95.

33. 丹羽 仁史: 幹細胞の多能性を規定する分子機構. 領域融合レビュー, 1, e008 (2012)
34. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S, Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors, **Cell Stem Cell**, 2009 Jan; **4**(1): 16-9.
35. Brouwer M, Zhou H, Nadif Kasri N, Choices for induction of pluripotency: recent developments in human induced pluripotent stem cell reprogramming strategies, **Stem Cell Rev Rep**, 2016; **12**(1): 54-72.
36. Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, Hao E, Schöler HR, Hayek A, Ding S, Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2, **Stem Cells**, 2009; **27**(12): 2992-3000.
37. Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornruksa S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R, Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency, **Cell Stem Cell**, 2014 Oct; **15**(4): 471-87.
38. Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, Wu Y, Li H, Liu K, Wu C, Song Z, Zhao Y, Shi Y, Deng H, Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules, **Cell Res**, 2011; **21**(1): 196-204.
39. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H, Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds, **Science**, 2013 Aug; **341**(6146): 651-4.
40. Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A, The ground state of embryonic stem cell self-renewal, **Nature**, 2008 May; **453**(7194): 519-23.
41. Kiyonari H, Kaneko M, Abe S, Aizawa S, Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability, **Genesis**, 2010 May; **48**(5): 317-27.
42. Govarthanan K, Vidyasekar P, Gupta PK, Lenka N, Verma RS, Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitor- CHIR 99021 augments the differentiation potential of mesenchymal stem cells, **Cytotherapy**, 2020 Feb; **22**(2): 91-105.
43. Jiang M, Chen H, Lai S, Wang R, Qiu Y, Ye F, Fei L, Sun H, Xu Y, Jiang X, Zhou Z, Zhang T, Li Y, Xie J, Fang Q, Gale RP, Han X, Huang H, Guo G, Maintenance of human haematopoietic stem and progenitor cells in vitro using a chemical cocktail, **Cell Discov**, 2018 Oct; **4**: 59.
44. Narcisi R, Arikian OH, Lehmann J, Ten Berge D, van Osch GJ, Differential effects of small molecule WNT agonists on the multilineage differentiation capacity of human

- mesenchymal stem cells, **Tissue Eng Part A**, 2016 Nov; **22**(21-22): 1264-73.
45. Ye S, Tan L, Yang R, Fang B, Qu S, Schulze EN, Song H, Ying Q, Li P, Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains, **PLoS One**, 2012; **7**(4): e35892.
  46. 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, **Cytotechnology**, 2015; **67**(2): 191-7.
  47. Fan Y, Ho BX, Pang JKS, Pek NMQ, Hor JH, Ng SY, Soh BS, Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated signaling re-activates proliferation of matured cardiomyocytes, **Stem Cell Res Ther**, 2018 Dec; **9**(1): 338.
  48. Mae SI, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K, Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells, **Nat Commun**, 2013; **4**: 1367.
  49. Naujok O, Diekmann U, Lenzen S, The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling, **Stem Cell Rev Rep**, 2014 Aug; **10**(4): 480-93.
  50. Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, Liu J, Wu Y, Dong W, Dunn KK, Shusta EV, Palecek SP, Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling, **Stem Cell Reports**, 2014 Nov; **3**(5): 804-16.
  51. Gonzalez R, Lee JW, Schultz PG, Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells, **Angew Chem Int Ed Engl**, 2011 Nov; **50**(47): 11181-5.
  52. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP, Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2012 Jul; **109**(27): E1848-57.
  53. 古江-楠田 美保:日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化:その 1, 組織培養研究, 27, 139-147 (2008)
  54. Meek S, Wei J, Sutherland L, Nilges B, Buehr M, Tomlinson SR, Thomson AJ, Burdon T, Tuning of  $\beta$ -catenin activity is required to stabilize self-renewal of rat embryonic stem cells, **Stem Cells**, 2013 Oct; **31**(10): 2104-15.
  55. Naujok O, Lentjes J, Diekmann U, Davenport C, Lenzen S, Cytotoxicity and activation of the Wnt/beta-catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors, **BMC Res Notes**, 2014 Apr; **7**: 273.
  56. 平成 29 年 (2017) 患者調査の概況, 15 (2017)

57. 令和元年（2019）人口動態統計（確定数）の概況, 18（2019）
58. Hansson EM, Lindsay ME, Chien KR, Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics, **Cell Stem Cell**, 2009 Oct; **5**(4): 364-77.
59. Riazi AM, Kwon SY, Stanford WL, Stem cell sources for regenerative medicine, **Methods Mol Biol**, 2009; **482**: 55-90.
60. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R, The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium, **J Embryol Exp Morphol**, 1985 Jun; **87**: 27-45.
61. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ, Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, **J Clin Invest**, 1996 Jul; **98**(1): 216-24.
62. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L, Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, **J Clin Invest**, 2001; **108**(3): 407-14.
63. Kadari A, Mekala S, Wagner N, Malan D, Köth J, Doll K, Stappert L, Eckert D, Peitz M, Matthes J, Sasse P, Herzig S, Brüstle O, Ergün S, Edenhofer F, Robust generation of cardiomyocytes from human iPS cells requires precise modulation of BMP and WNT signaling, **Stem Cell Rev Rep**, 2015 Aug; **11**(4): 560-9.
64. Rajala K, Pekkanen-Mattila M, Aalto-Setälä K, Cardiac differentiation of pluripotent stem cells, **Stem Cells Int**, 2011; **2011**: 383709.
65. Später D, Hansson EM, Zangi L, Chien KR, How to make a cardiomyocyte, **Development**, 2014 Dec; **141**(23): 4418-31.
66. 河西美波：ヒト iPS 細胞から心筋細胞への各分化段階における心筋関連遺伝子発現プロフィール, 山梨大学生命環境学部 卒業論文(2018)
67. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, Reinecke H, Moon RT, Murry CE, Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2007 Jun; **104**(23): 9685-90.
68. Tran TH, Wang X, Browne C, Zhang Y, Schinke M, Izumo S, Burcin M, Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells, **Stem Cells**, 2009 Aug; **27**(8): 1869-78.
69. Mazzotta S, Neves C, Bonner RJ, Bernardo AS, Docherty K, Hoppler S, Distinctive roles of canonical and noncanonical Wnt signaling in human embryonic cardiomyocyte development, **Stem Cell Reports**, 2016 Oct; **7**(4): 764-76.

## 第2章 浮遊培養をベースとしたヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導における胚様体形成期間中の CHIR99021 処理条件の最適化

### 第1節 序

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) は 2006 年に京都大学の山中らによってマウス線維芽細胞から樹立され<sup>(1)</sup>、2007 年にはヒト線維芽細胞からもその作製が報告された<sup>(2)</sup>。iPS 細胞は、1981 年に Evans MJ らと Martin GR らによって樹立された胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞)<sup>(3,4)</sup>と同様に、無限の増殖能とすべての組織細胞へ分化できる多能性を有している。さらに、初期胚から樹立される ES 細胞と異なり、iPS 細胞は生体の体細胞から樹立できることから<sup>(5,6)</sup>、倫理的課題の克服が可能となった。そのため、ヒト iPS 細胞は、再生医療や創薬研究などの様々な分野への応用が期待されている。特に、心筋細胞系統へ分化できる能力は、心疾患における細胞をベースとした治療法の開発や臓器移植の代替<sup>(7,8)</sup>、薬剤毒性評価系<sup>(9,10)</sup>などへの応用が期待されているため、これまで様々な心筋細胞への分化誘導方法が提案されてきた。

1985 年に Doetschman TC らによって、マウス ES 細胞の心筋細胞、内臓卵黄嚢や血島への分化が報告されて以降<sup>(11)</sup>、心筋細胞への分化誘導後に細胞移植を行うことを念頭に研究が進められるようになった<sup>(12)</sup>。その後、2001 年に Kehat I らによってヒト ES 細胞が自然発生的に心筋細胞へ分化することが報告され<sup>(13)</sup>、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導方法の開発が盛んに行われるようになった。ヒト多能性細胞由来の心筋細胞の臨床応用に向けて、これまで様々な心筋細胞への分化誘導方法が開発されてきたが<sup>(14,15)</sup>、その多くは動物培養細胞との共培養<sup>(16,17)</sup>、血清<sup>(13,18)</sup>、様々な増殖因子の添加<sup>(19,20)</sup>や細胞外マトリックス<sup>(21)</sup>による誘導などを用いる複雑なものとなっている。これらの培養方法は生物由来の成分に大きく依存しており、動物培養細胞の品質、血清、増殖因子や細胞外マトリックスのロット間差などの影響を受けやすく、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導の再現性は低い。また、臨床応用に適した GMP (good manufacturing practice) グレードのヒト組換えタンパク質は非常に高価であるため、培養コストが上がる。

近年、再生医療や創薬研究などへの応用という観点から、動物由来の因子の使用や動物培養細胞との共培養をしない培養法 (xeno-free) の確立および不明な因子を含まない培地 (defined medium) の開発が求められている。そのため、生理活性を持つ化合物によるヒト iPS 細胞のシグナル制御が注目を集めている。化合物を血清や増殖因子などの代替として用いることで、既知の因子のみで培地調製が可能になり、培養コストが削減され、心筋細胞への分化誘導の再現性が向上すると考えられる<sup>(22)</sup>。

Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) 阻害剤 CHIR99021 (CHIR) は、体細胞の初期化<sup>(23-28)</sup>、多能性維持<sup>(29-31)</sup>、細胞増殖促進<sup>(32-36)</sup>や特定組織細胞への分化誘導<sup>(37-41)</sup>などに用いられており、多能性幹細胞の培養で最も使用されている化合物の 1 つである。特に、心筋細胞への段階的分化誘導における中胚葉分化段階で、処理期間と添加濃度に依存して中胚葉分化を促進する CHIR を使用した分化誘導方法は数多く存在する<sup>(40-42)</sup>。つまり、CHIR が

Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路内の GSK-3 を阻害することで、 $\beta$ -Catenin の分解を防ぎ<sup>(43)</sup>、Wnt シグナル伝達を活性化し、多能性幹細胞の分化方向を中胚葉系統に拘束する役割を果たしている<sup>(44, 45)</sup>。心筋細胞への段階的分化誘導において、中胚葉に傾倒した細胞は、中胚葉から心筋中胚葉、心筋前駆細胞に至る一連の発生段階を経て心筋細胞へと分化する<sup>(46, 47)</sup>。

胚様体 (embryoid body; EB) は、多能性幹細胞を非接着性の培養器で浮遊培養することにより自然凝集させて得られる三次元の細胞塊である<sup>(11)</sup>。胚様体は、前後、左右、背腹といった個体の 3 軸はランダムではあるが、胚発生を模倣しており、ヒト多能性幹細胞を三胚葉すべてに自発的に分化させることが可能である<sup>(48)</sup>。胚様体形成後の多能性幹細胞は、確率的に三胚葉のそれぞれから派生する前駆細胞を経て、心筋細胞を含む組織細胞へ分化する<sup>(13)</sup>。以前の研究で、胚様体内部での細胞間相互作用が中胚葉や初期心筋細胞系統に関連するマーカー遺伝子の発現を促進すると明らかになった<sup>(46)</sup>。ゆえに、ヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導で、浮遊培養をベースとした分化誘導方法は数多く存在する<sup>(41, 49, 50)</sup>。これらの分化誘導方法における CHIR 処理は、4~7 日間の浮遊培養での胚様体形成後 24 時間 7.5, 12  $\mu$ M CHIR 添加で行われている<sup>(49, 50)</sup>。また、接着培養をベースとした心筋細胞への分化誘導方法では、CHIR 処理は接着培養後 42~60 時間 5  $\mu$ M CHIR 添加で行われている<sup>(42)</sup>。

心筋細胞への分化誘導研究において、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR 処理がヒト iPS 細胞の中胚葉や心筋細胞への分化傾向へ及ぼす影響に関する報告はない。また、数多くの心筋細胞への分化誘導方法が開発されていくなかで、最適な CHIR 処理条件が定まらないのは、CHIR 処理段階での細胞形態と発生段階に起因する可能性がある。また、CHIR が多能性幹細胞へ及ぼす影響は、細胞増殖や分化といった発生段階<sup>(25, 34, 39, 40)</sup>や浮遊培養か接着培養かといった細胞形態<sup>(42, 49, 50)</sup>によって異なる。加えて、胚様体の三次元構造は、CHIR 曝露を妨げる可能性があるため<sup>(51)</sup>、胚様体形成が完了する前に CHIR 処理を行う必要があると考えたが、心筋細胞への分化誘導過程で胚様体形成期間中の CHIR 処理に関する検討はなされていない。以上のことから、本研究では、胚様体形成期間中の CHIR 処理がヒト iPS 細胞へ及ぼす影響を調べるとともに、心筋細胞へ分化しうる中胚葉へ傾倒した胚様体の作出を試みた。

## 第2節 実験材料及び方法

### 1. フィーダー存在下 (on feeder) でのヒト iPS 細胞の培養

本研究ではヒト iPS 細胞の標準細胞株である 201B7 株<sup>(2)</sup>を使用した。これらの細胞株は文部科学省に承認されたナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) を通じて理研バイオリソース研究センター (RIKEN BRC) より提供された。

Feeder layer 上で培養したヒト iPS 細胞へ Collagenase-trypsin-KSR (CTK) 溶液を添加し、Feeder layer を取り除いた。残ったヒト iPS 細胞をセルスクレーパーで物理的に剥がした。剥がしたヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ 20% Knockout serum replacement (KSR, Gibco, Grand Island, NY, USA)、1% GlutaMAX supplement (Gibco)、0.1 mM Non-essential amino acids (NEAA, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、0.1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)、25 units/mL Penicillin、25  $\mu$ g/mL Streptomycin (Gibco)、4 ng/mL Recombinant human fibroblast growth factor 2 (FGF2, Oriental Yeast Co., Ltd. Tokyo, Japan) を含む DMEM-Ham's F-12 basal medium (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を適量 Feeder layer 上に播種した。播種後、6 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。培地交換は毎日行った。

Feeder layer を作製するために、ネオマイシン抵抗性 (neor) 発現ベクターと LIF 発現ベクターを安定的に組み込んだ STO 細胞である SNL76/7 (ECACC 07032801, DS Pharma Biomedical Co., Osaka, Japan) を使用した<sup>(52)</sup>。STO 細胞を、7.7% Fetal bovine serum (FBS, Gibco)、25 units/mL Penicillin、25  $\mu$ g/mL Streptomycin (Gibco) を含む DMEM basal medium (Nacalai Tesque) を用いて、0.1% Gelatin (Sigma) コート上で 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。STO 細胞を 10  $\mu$ g/L の Mitomycin C (Sigma) を用いて 2 時間 15 分処理し、増殖能を不活化させた。不活化した STO 細胞を 0.1% Trypsin-EDTA (Nacalai Tesque) を用いて分散し、 $3.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.1% gelatin コート上に播種した。播種後、2 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養し、Feeder layer として使用した。

### 2. フィーダー非存在下 (feeder-free) でのヒト iPS 細胞の培養

Feeder layer 上で培養したヒト iPS 細胞へ Collagenase-trypsin-KSR (CTK) 溶液を添加し、Feeder layer を取り除いた。残ったヒト iPS 細胞を、Accutase™ (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem® hPSC XF (Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel) を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で 0.5 mg/cm<sup>2</sup> Vitronectin (Life Technologies) コート上に播種した。播種後、4 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。細胞分散時から播種後 24 時間はヒト iPS 細胞の

アポトーシスを抑制するために、10  $\mu$ M Y-27632 (ROCK inhibitor, Nacalai Tesque) を NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF へ添加した。培地交換は Y-27632 を含まない NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を用いて毎日行った。Feeder-free でヒト iPS 細胞を 3 継代し、残存した Feeder layer を除去して実験を行った。以下の実験には、3~20 継代した iPS 細胞を用いた。

### 3. 胚様体形成期間中のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理

Feeder-free で培養したヒト iPS 細胞を、Accutase<sup>™</sup> を用いて酵素処理し、緩やかなピペッティングを行ってシングルセルまで分散した。分散したヒト iPS 細胞を遠心分離し、上清を除去した。沈殿したペレットへ無血清培地である NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を加えて再懸濁した。得られた細胞懸濁液を NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF で  $1.5 \times 10^4$  cells/mL となるように希釈し、Lipidure<sup>®</sup> (NOF Co., Tokyo, Japan) -coated 96-well U 底 plate に 200  $\mu$ L/well で播種した。播種後、4 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。細胞分散時から EB 形成期間はヒト iPS 細胞のアポトーシスを抑制するために、終濃度 10  $\mu$ M となるよう Y-27632 を添加した。培地交換は NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を用いて毎日半量行った。培地交換の際に、様々な濃度の CHIR99021 (CHIR, Fujifilm Wako, Osaka, Japan) を含む NutriStem<sup>®</sup> hPSC XF を用いて、CHIR 処理を行った。

Fig. 1 で示したように CHIR 処理を 4 日間の胚様体形成期間のうち 3 日目から 4 日目 (1 日間)、2 日目から 4 日目 (2 日間)、0 日目から 4 日目 (4 日間) で行った。それぞれの期間に添加する CHIR 濃度を 1, 2, 4, 8, 16  $\mu$ M とし、あわせて 15 条件の胚様体を形成した。対照として、胚様体形成期間中に CHIR 処理を行わず培養した胚様体 (control-EB) を用意した。定期的に顕微鏡観察を行い、胚様体様相の変化を観察した。

### 4. 胚様体形成後のヒト iPS 細胞への CHIR99021 処理

胚様体形成期間中に CHIR 処理を行わず培養して得られた Control-EB を、1% BSA (Sigma)、0.1 mM NEAA、1% GlutaMAX supplement、0.5 mM L-Carnitine Hydrochloride (Nacalai Tesque)、10 ng/mL FGF2、0.1%  $\beta$ -Mercaptoethanol、1, 2, 4, 8, 16  $\mu$ M CHIR を含む Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Nacalai Tesque) を加えた Lipidure<sup>®</sup>-coated 96-well U 底 plate へ移行し、2 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。

### 5. 胚様体の直径計測

デジタル顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) を使用して、胚様体様相を定期的に撮影した。胚様体の直径は短径と長径の平均によって算出するのが一般的であるが、実験者間差を生じやすい。そのため、本実験では投影面の面積から直径を求めることで誤差を生じにくくした。顕微鏡画像から ImageJ により投影面の面積  $S$  を計測し、以下の式を用いて胚様体の直径である  $d$  を算出した。

$$d = 2 \sqrt{\frac{S}{\pi}}$$

## 6. 浮遊培養をベースとした心筋細胞への段階的分化誘導

様々な CHIR 処理条件下で培養して得られた胚様体と CHIR 処理を行わず培養して得られた Control-EB を、PSC Cardiomyocyte differentiation kit (PSC kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)の Medium B を加えた Lipidure®-coated 96-well U 底 plate へ移行し、2 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。その後、PSC kit の Maintenance medium を 0.1% gelatin-coated 24-well plate へ移行し、8 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。分化誘導期間中の培地交換は 2 日に 1 回行った。定期的に顕微鏡観察を行い、心筋分化による細胞収縮の有無を観察した。

対照として、PSC kit 推奨プロトコルを応用し、胚様体形成後に心筋細胞への分化誘導を行った (PSC kit control-EB)。CHIR 処理を行わず培養して得られた Control-EB を、PSC kit の Medium A を加えた Lipidure®-coated 96-well U 底 plate へ移行し、2 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。その後、PSC kit の Medium B を加えた Lipidure®-coated 96-well U 底 plate へ移行し、2 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。PSC kit の Maintenance medium を 0.1% gelatin-coated 24-well plate へ移行し、8 日間 37°C-5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターにて培養した。分化誘導期間中の培地交換は 2 日に 1 回行った。定期的に顕微鏡観察を行い、心筋分化による細胞収縮の有無を観察した。

## 7. Total RNA 抽出及び cDNA 合成、リアルタイム RT-qPCR 解析

Total RNA 抽出は NucleoSpin RNA (Takara Bio, Otsu, Japan) を使用した。cDNA 合成は ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用した。Total RNA 抽出と cDNA 合成はメーカー推奨プロトコルに従って行った。

リアルタイム RT-qPCR 解析は Thunderbird SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて、反応液をメーカー推奨プロトコルに従って調整した。プライマーは、内部標準 (Housekeeping) 遺伝子として *TATA binding protein (TBP)*、中胚葉マーカーとして *Homo sapiens T, brachyury homolog (mouse) (T)*, *Homo sapiens GATA binding protein 4 (GATA4)*, *Homo sapiens Wnt family member 3A (WNT3A)*, *Homo sapiens Forkhead box C1 (FOXC1)*, *Homo sapiens Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (DKK1)*, *Homo sapiens mesoderm posterior basic helix-loop-helix transcription factor 1 (MESP1)*、未分化マーカーとして *Homo sapiens POU class 5 homeobox 1 (POU5F1, OCT3/4)*, *Homo sapiens Nanog homeobox (NANOG)*、心筋成熟マーカーとして *Homo sapiens troponin T type 2 (TNNT2)*, *Homo sapiens myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha (MYH6)*, *Homo sapiens myosin, light chain 2 (MLC2A)* を用いた。PCR 反応と解析は Thermal Cycler Dice (Takara Bio) を

用いて行った。PCR 反応条件は変性 95°C-5 秒間、アニーリング 60°C-10 秒間、伸長 72°C-20 秒間とし、40 cycles 行った。

リアルタイム RT-qPCR は、各 cycle 終了時に生成された PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし、指数関数的増幅域で正確な定量を行う。PCR では 1 cycle ずつ指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達する。この増幅の様子をリアルタイムでモニタリングした図が増幅曲線である。増殖曲線に Threshold Line (閾値) を引き、増殖曲線と Threshold Line とが交わる反応 cycle 数を Threshold cycle 数 (CT) とした (Crossing Point 法)。

各サンプルの目的遺伝子の相対発現量、標準偏差は次のように計算した。

i) cDNA 濃度差の補正

各サンプルの cDNA 濃度差を補正する (Normalize) ために、サンプルの内部標準遺伝子の CT を  $CT_{Housekeeping}$ 、目的遺伝子の CT を  $CT_{target}$  とし、以下の式を用いて各サンプルの目的遺伝子の CT を補正した値である  $\Delta CT$  を算出した。

$$\Delta CT = CT_{target} - CT_{Housekeeping}$$

ii) 目的遺伝子の相対発現量の平均値

各サンプルの  $\Delta CT$  の平均値を  $\overline{\Delta CT}$  とし、以下の式を用いて各サンプルの目的遺伝子の相対発現量の平均値である  $\bar{R}$  を算出した。

$$\bar{R} = 2^{-\overline{\Delta CT}}$$

iii) 標準偏差

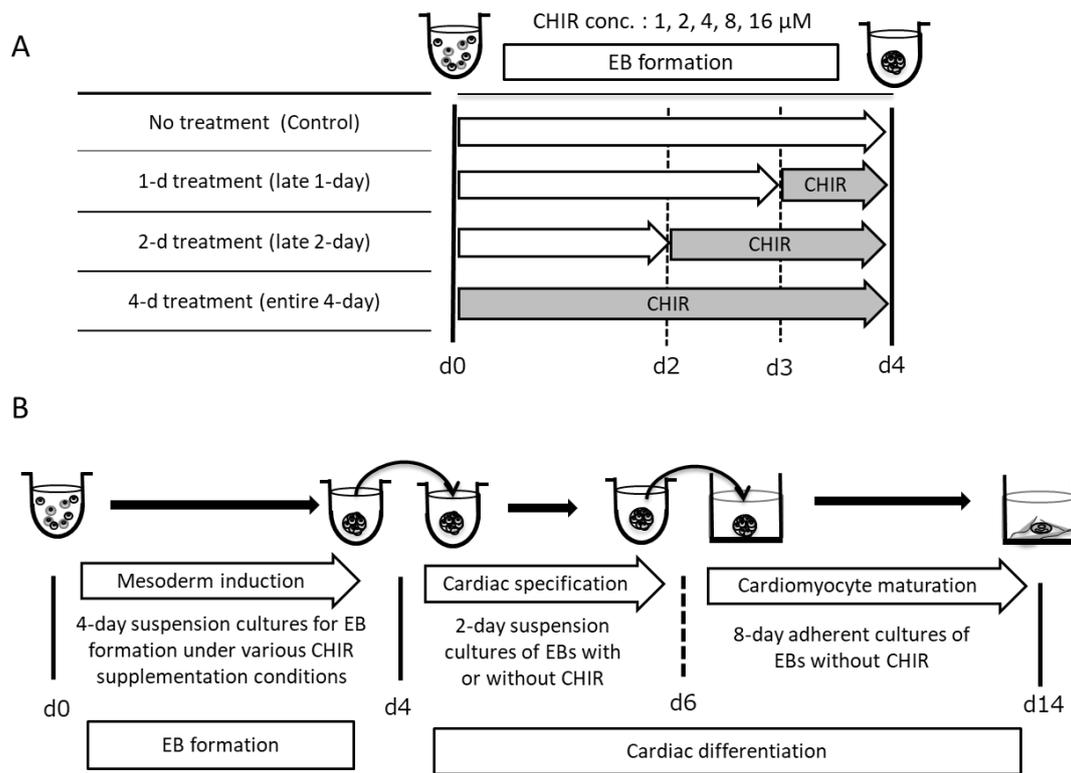
標準偏差 (standard deviation) は  $\Delta CT$  から標準偏差を算出した。本研究の遺伝子発現量のグラフは対数軸で作製するため、標準偏差の値が+側と-側で異なる。そのため、 $\Delta CT$  から算出した標準偏差を  $SD_{\Delta CT}$  とし、以下の式を用いて各サンプルの+側の標準偏差である  $SD(+)$  と-側の標準偏差である  $SD(-)$  を算出した。

$$SD(+)=2^{-(\overline{\Delta CT}+SD_{\Delta CT})}-2^{-(\overline{\Delta CT})}$$

$$SD(-)=2^{-(\overline{\Delta CT})}-2^{-(\overline{\Delta CT}-SD_{\Delta CT})}$$

## 8. 統計解析

少なくとも 3 回の独立した実験を行った。Student's t-test を使用して統計解析を行った。また、Tukey-Kramer test を使用して Pairwise 多重比較を行った。\*P<0.05、\*\*P<0.01 の値を統計的に有意であるとした。



**Fig. 1. Schematic showing CHIR treatment conditions in EB formation-based cardiac differentiation.**

(A) Various concentrations of CHIR were added to the suspension cultures for 1, 2, or 4 days during EB formation. Single cell-dissociated hiPSCs (line 201B7) were cultured in non-adherent conditions for 4 days to form cell aggregates. Various concentrations (1, 2, 4, 8, and 16  $\mu$ M) of CHIR were added to the suspension cultures over different durations, i.e., late 1-day (1-d treatment), late 2-day (2-d treatment), and the entire 4-day period (4-d treatment).

(B) Workflow describing the stepwise cardiac differentiation protocol based on EB formation.

**Table 1. Primers of RT-PCR**

	Gene name	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)
Housekeeping	<i>TBP</i>	F: GCTGGCCCATAGTGATCTTT	60
		R: CTTCACACGCCAAGAAACAGT	
Mesoderm	<i>T</i>	F: TGTGACAGGTACCCAACCCTGA	126
		R: ATGGGATTGCAGCATGGATAAAC	
	<i>GATA4</i>	F: TGGTCAGATGGCAGCCAGAG	107
		R: TGCTTCGAATTCGTGTTGCAG	
	<i>WNT3A</i>	F: TCTACGACGTGCACACCTG	89
		R: GAACCTTACAGGGGGTTGG	
	<i>FOXC1</i>	F: GCTGGCCCATAGTGATCTTT	61
R: CTTCACACGCCAAGAAACAGT			
<i>DKK1</i>	F: GCTGGCCCATAGTGATCTTT	122	
	R: CTTCACACGCCAAGAAACAGT		
<i>MESP1</i>	F: GCTGGCCCATAGTGATCTTT	71	
	R: CTTCACACGCCAAGAAACAGT		
Undifferentiation	<i>OCT3/4 (POU5F1)</i>	F: TGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG	191
		R: GCAGATGGTTCGTTTGGCTGA	
	<i>NANOG</i>	F: TCCAACATCCTGAACCTCAGCTA	186
cardiac differentiation	<i>MYH6</i>	F: CGCTGAGTCCCAGGTCAACA	115
		R: TTACAGGTTGGCAAGAGTGAGGTTC	
	<i>TNNT2</i>	F: GAGCTGTGGCAGAGCATCTAT	122
		R: ATCCTGTTTCGGAGAACATTG	
<i>MLC2A</i>	F: GCAGGCGGAGAGGTTTTTC	93	
	R: AGTTGCCAGTCACGTCAGG		

### 第3節 結果

通常ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導は、中胚葉分化、心筋前駆細胞への誘導、心筋成熟という3つの過程を経て行われる。中胚葉や心筋細胞へ分化させるための CHIR 処理条件は、浮遊培養か接着培養かといった細胞形態によって異なる。7.5 または 12  $\mu\text{M}$  CHIR を胚様体形成後 24 時間添加する浮遊培養ベースのプロトコル<sup>(49, 50)</sup>や 5  $\mu\text{M}$  CHIR を接着培養後 42 ~60 時間添加する接着培養ベースのプロトコル<sup>(42)</sup>が存在する。このように、様々な心筋細胞分化誘導プロトコルが検討されてきたが、胚様体形成期間中の CHIR 処理に関する検討はされていない。本実験では、胚様体形成期間中の CHIR 処理がヒト iPS 細胞へ及ぼす影響を調べるとともに、心筋細胞へ分化しうる中胚葉へ傾倒した胚様体の作出を試みた。

#### 1. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の生育

ヒト iPS 細胞からの胚様体形成期間中の CHIR 処理が胚様体の様相と直径へ及ぼす影響を調べた。培養4日目の胚様体の様相と直径を Fig. 2A, B に示した。また、培養4日間の胚様体の様相と直径の変化を Fig. 3 にまとめた。4日間の胚様体形成のうち全期間を CHIR 処理したとき、CHIR 添加濃度が高くなるにつれ、1~4  $\mu\text{M}$  の範囲では濃度依存的に胚様体形成が促進されたが、8  $\mu\text{M}$  CHIR 添加では抑制された。また、16  $\mu\text{M}$  CHIR 添加は細胞死を誘導したため、胚様体が形成されなかった。後半2日間 CHIR 処理した場合、2~8  $\mu\text{M}$  の範囲では胚様体形成はわずかに促進されたが、16  $\mu\text{M}$  CHIR 添加では抑制された。後半1日間の CHIR 処理では、胚様体の生育は CHIR 処理せず培養した胚様体 (control-EB) と同程度であった。

以上の結果から、胚様体形成期間のうち2日間以上の CHIR 処理は、胚様体の生育に影響を及ぼすことが明らかになった。また、高濃度の CHIR 添加では、細胞死が誘導され、胚様体が形成されなかった。

#### 2. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の中胚葉分化

胚様体形成期間中に様々な条件で CHIR 処理して得られた胚様体の培養4日目における中胚葉マーカー遺伝子の発現量を Fig. 4A に示した。胚様体形成期間のうち後半2日間 CHIR 処理した胚様体は、CHIR 添加濃度が高くなるにつれ、*T*, *GATA4*, *WNT3A*, *FOXC1*, *DKK1* および *MESPI* 遺伝子の発現量を増加させた。特に、4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体のそれらの遺伝子発現量は最も増加した。後半1日間または4日間 CHIR 処理した胚様体のそれらの遺伝子発現量は、CHIR 添加濃度が高くなるにつれ増加したが、その効果は後半2日間の CHIR 処理ほどではなかった。特に、後半1日間4~16  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体の *FOXC1* 遺伝子の発現量は、後半2日間の CHIR 処理と比較して有意に減少した。また、4日間4, 8  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体の *WNT3A* 遺伝子の発現量は、後半2日間の CHIR 処理と比較して有意に減少した。

胚様体形成4日目の未分化マーカー遺伝子の発現量を Fig. 4B に示した。後半1日間また

は 2 日間 CHIR 処理した胚様体の *OCT3/4* 遺伝子の発現量は、CHIR 処理せず培養した Control-EB と同程度であった。一方、*NANOG* 遺伝子の発現量は、1~4  $\mu\text{M}$  CHIR 添加で Control-EB と同程度であったが、8,16  $\mu\text{M}$  CHIR 添加では減少した。4 日間 CHIR 処理した胚様体の *OCT3/4* および *NANOG* 遺伝子の発現量は、1,2  $\mu\text{M}$  CHIR 添加で Control-EB と同程度であったが、4,8  $\mu\text{M}$  CHIR 添加で減少した。

以上の結果から、最も中胚葉分化が促進された胚様体形成期間中の CHIR 処理条件は、後半 2 日間の 4  $\mu\text{M}$  CHIR 添加であるといえる。また、後半 2 日間 4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体は未分化マーカー遺伝子の発現を維持していることが明らかになった。

### 3. 胚様体形成後に CHIR99021 処理した胚様体の中胚葉分化

胚様体形成期間のうち後半 2 日間 4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体と胚様体形成後 2 日間 1~16  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体の中胚葉マーカー遺伝子の発現量を比較した。それらの中胚葉マーカー遺伝子の発現量を Fig. 5 にまとめた。胚様体形成後 2 日間 CHIR を添加した胚様体の *WNT3A*, *T* および *GATA4* 遺伝子の発現量は、1~8  $\mu\text{M}$  CHIR 添加ではほとんど変化がみられず、16  $\mu\text{M}$  CHIR 添加のみ著しく増加した。しかし、胚様体形成後 2 日間 16  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体のそれらの遺伝子発現量は、胚様体形成期間のうち後半 2 日間 4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体には及ばなかった。

以上の結果から、胚様体形成後の CHIR 処理は、CHIR の中胚葉分化促進効果を抑制することが示唆された。

### 4. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の心筋細胞への分化誘導後の様相と収縮

心筋細胞への分化誘導後の細胞様相と細胞収縮率を Fig. 6A にまとめた。それぞれの細胞様相の右上に示した数値は細胞収縮率である。収縮率とは、最初に播種された胚様体のうち培養最終日までに細胞収縮が確認された胚様体の比率である。胚様体形成期間のうち後半 1 日間 1~4  $\mu\text{M}$ 、2 日間 1, 2  $\mu\text{M}$ 、4 日間 1  $\mu\text{M}$  CHIR 処理といった比較的低濃度で CHIR 処理した胚様体は心筋細胞への分化誘導後、Control-EB と同様に崩れ、培地交換のたびに失われた。一方、後半 1 日間 8, 16  $\mu\text{M}$ 、2 日間 4~16  $\mu\text{M}$ 、4 日間 2~8  $\mu\text{M}$  CHIR 処理といった比較的高濃度で CHIR 処理した胚様体は、細胞の接着と伸展が確認された。細胞の接着と伸展が確認された CHIR 処理条件のうち後半 1 日間 8  $\mu\text{M}$ 、2 日間 4  $\mu\text{M}$ 、4 日間 2  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体のみ細胞収縮が確認された。細胞収縮率は、後半 1 日間 8  $\mu\text{M}$ 、2 日間 4  $\mu\text{M}$  CHIR 添加では 100% であり、4 日間 2  $\mu\text{M}$  CHIR 添加では 71% であった。

また、心筋細胞への分化誘導後の細胞収縮率の変化を Fig. 6B に示した。胚様体形成後に心筋細胞への分化誘導を行った場合 (PSC kit control-EB)、細胞収縮は心筋細胞への分化誘導 7 日目以降に確認された。一方、後半 1 日間 8  $\mu\text{M}$ 、2 日間 4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体の細胞収縮は、PSC kit control-EB より 2 日間早い 5 日目以降に確認された。4 日間 2  $\mu\text{M}$

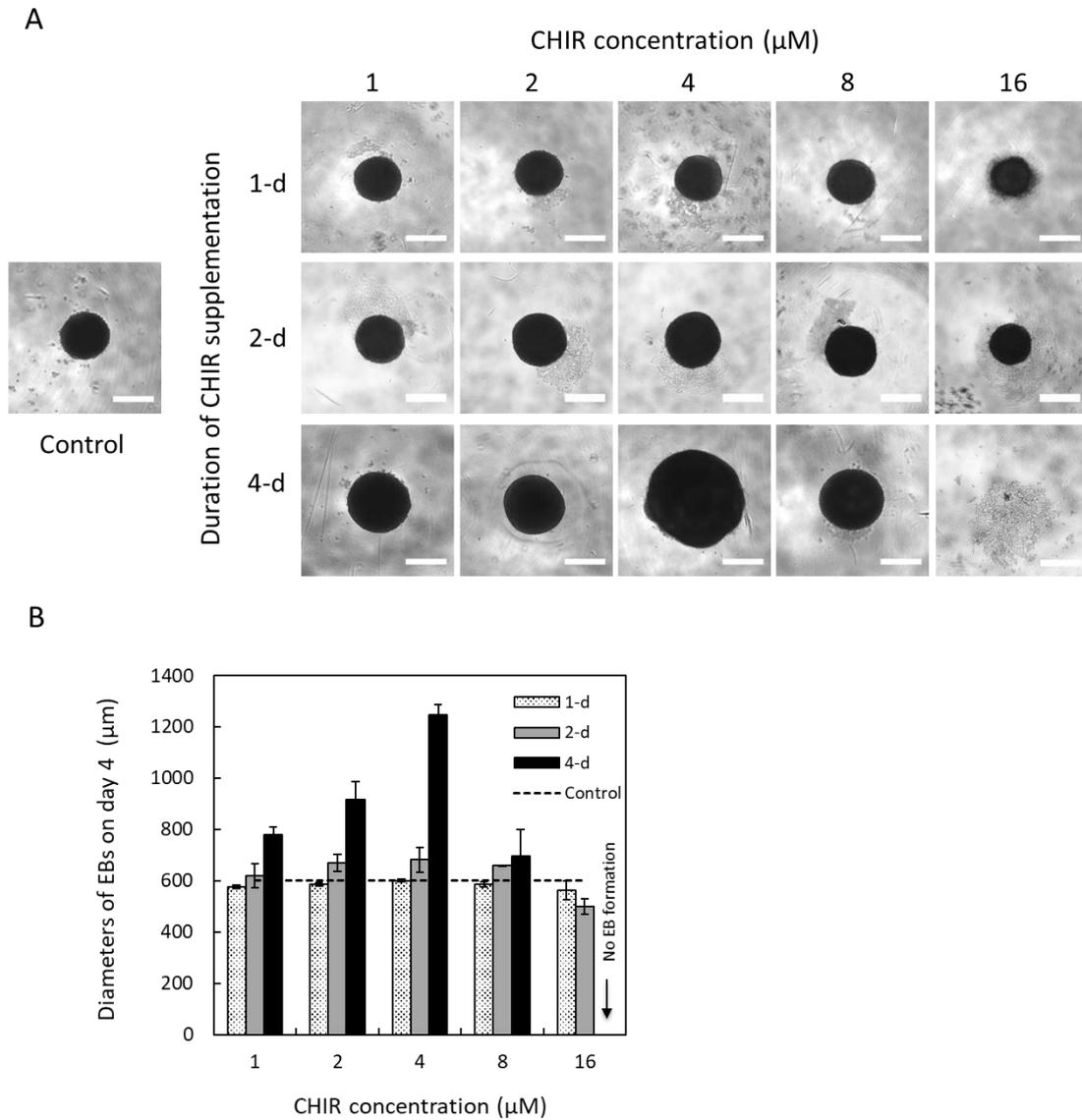
CHIR を添加した胚様体の細胞収縮は、PSC kit control-EB と同じ 7 日目に確認された。

以上の結果から、心筋細胞への分化誘導へ適応可能な胚様体形成期間中の CHIR 処理条件は、後半 1 日間 8  $\mu$ M、2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加であることが示唆された。また、胚様体形成後に心筋細胞への分化誘導を行うよりも早く拍動性心筋細胞を得られる可能性が示唆された。

#### 5. 胚様体形成期間中に CHIR99021 処理した胚様体の心筋細胞への分化誘導後の心筋成熟

心筋細胞への分化誘導後の心筋成熟マーカー遺伝子の発現量を Fig. 7 に示した。心筋細胞への分化誘導後に 100%の確率で細胞収縮が確認された胚様体と細胞収縮が確認されなかった胚様体の心筋成熟マーカー遺伝子の発現量を比較した。胚様体形成期間のうち後半 1 日間 8  $\mu$ M、2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加した胚様体は、後半 2 日間 8  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体よりも *MYH6*, *TNNT2* および *MLC2A* 遺伝子の発現量を顕著に増加させた。後半 2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加した胚様体のそれらの遺伝子発現量は、PSC kit control-EB と同程度まで増大した。一方、後半 1 日間 8  $\mu$ M CHIR 添加した胚様体は、*MYH6* および *MLC2A* 遺伝子の発現量を PSC kit control-EB と比較して有意に減少させ、*TNNT2* 遺伝子の発現量を PSC kit control-EB と同程度まで増加させた。後半 2 日間 8  $\mu$ M CHIR 添加した胚様体の *MYH6*, *TNNT2* および *MLC2A* 遺伝子の発現量は、PSC kit control-EB と比較して有意に減少した。

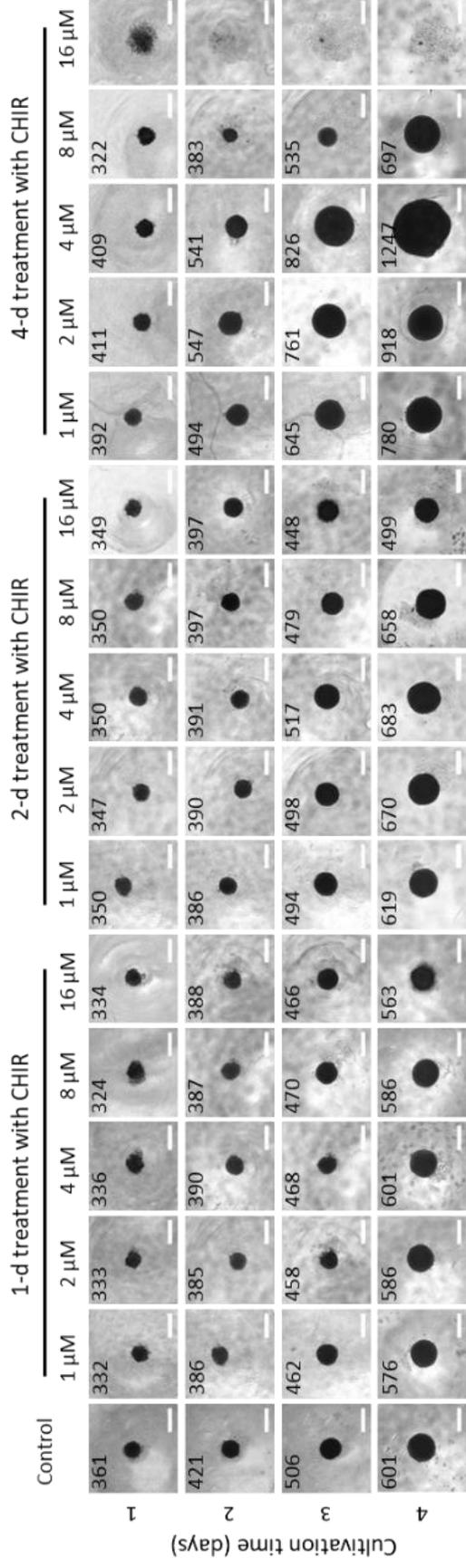
以上の結果から、胚様体形成期間のうち後半 1 日間 8  $\mu$ M、2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加した胚様体を心筋細胞へ分化誘導した際に確認された細胞収縮は、心筋細胞への分化誘導が成功したため生じたといえる。また、後半 2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加した胚様体のみ心筋成熟マーカー遺伝子の発現量が PSC kit control-EB と同程度であったことから、心筋細胞への分化誘導に最適な胚様体形成期間中の CHIR 処理条件は、後半 2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加であることが明らかになった。



**Fig. 2. Effect of CHIR supplementation to hiPSC cultures during EB formation.**

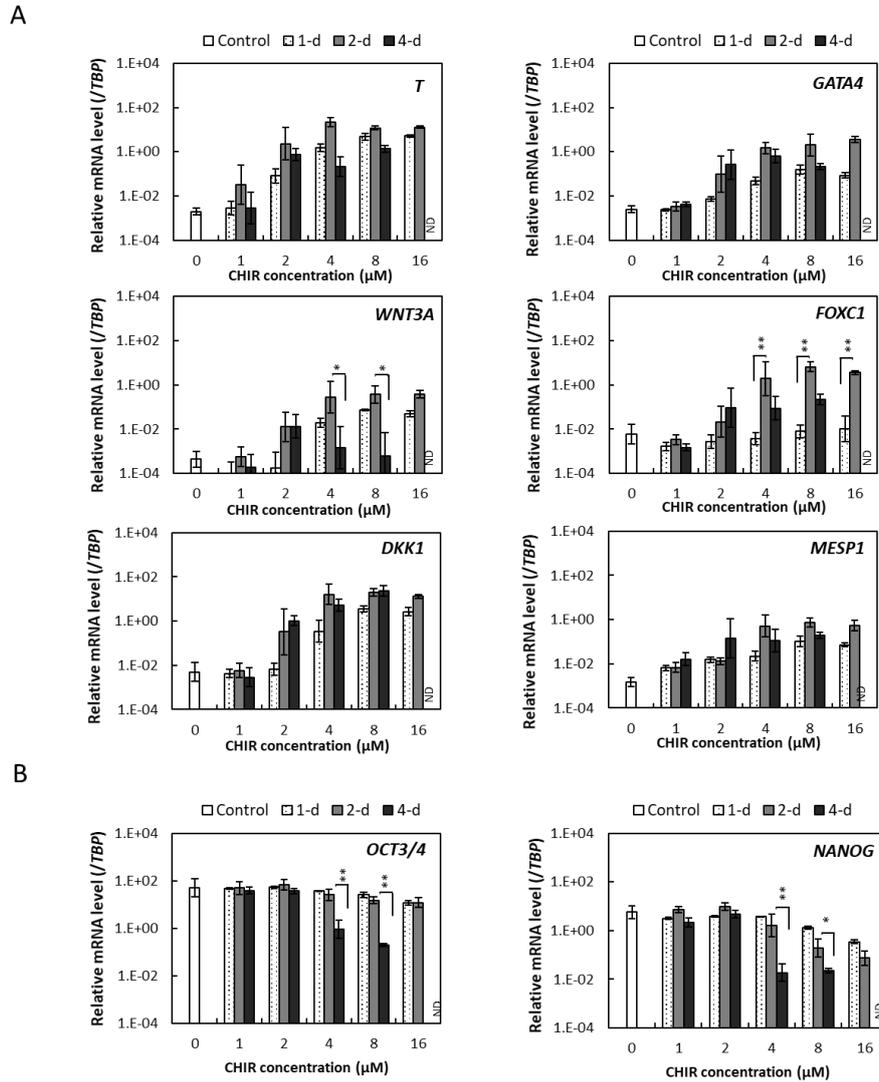
(A) Phase-contrast images of the EBs at day 4 in 4-day suspension cultures. Scale bar: 500  $\mu\text{M}$ .

(B) Effect of CHIR supplementation on the size of EBs at day 4 in 4-day suspension cultures. Data are represented as mean  $\pm$  SD ( $n=24$ ). The dotted line represents the average size of control-EBs.



87 **Fig. 3. The changes in morphology and diameter in the EBs over time during CHIR treatment.**

The value displayed on each image is mean diameter of the EB. No cell aggregation was observed in 4-d treatment with 16  $\mu$ M CHIR.

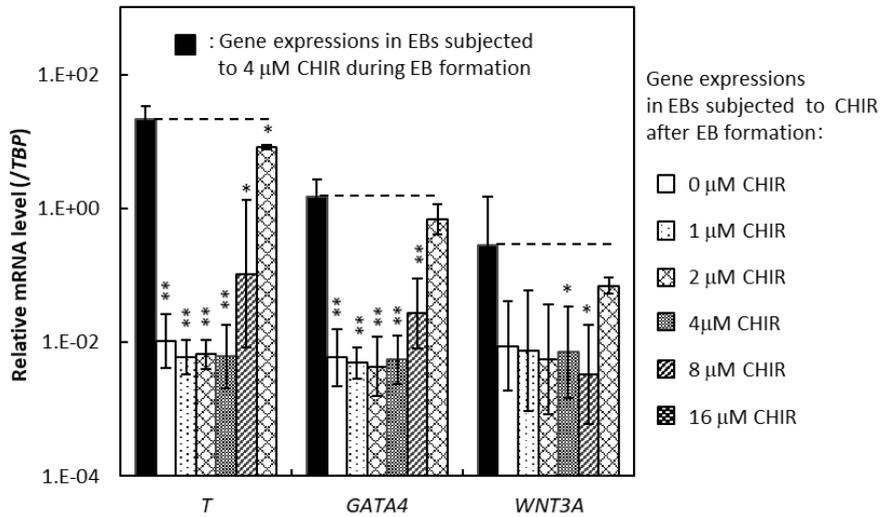


**Fig. 4. Effect of CHIR supplementation to hiPSC cultures during EB formation on expression levels of mesoderm and pluripotency-associated genes.**

Total RNA was extracted from EBs after a 4-day suspension culture period. Data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 significance was calculated using Tukey-Kramer test between EBs 2-d treated with 4  $\mu$ M CHIR and 1-d treated EBs or 4-d treated EBs at the same CHIR concentration. ND means there is no data.

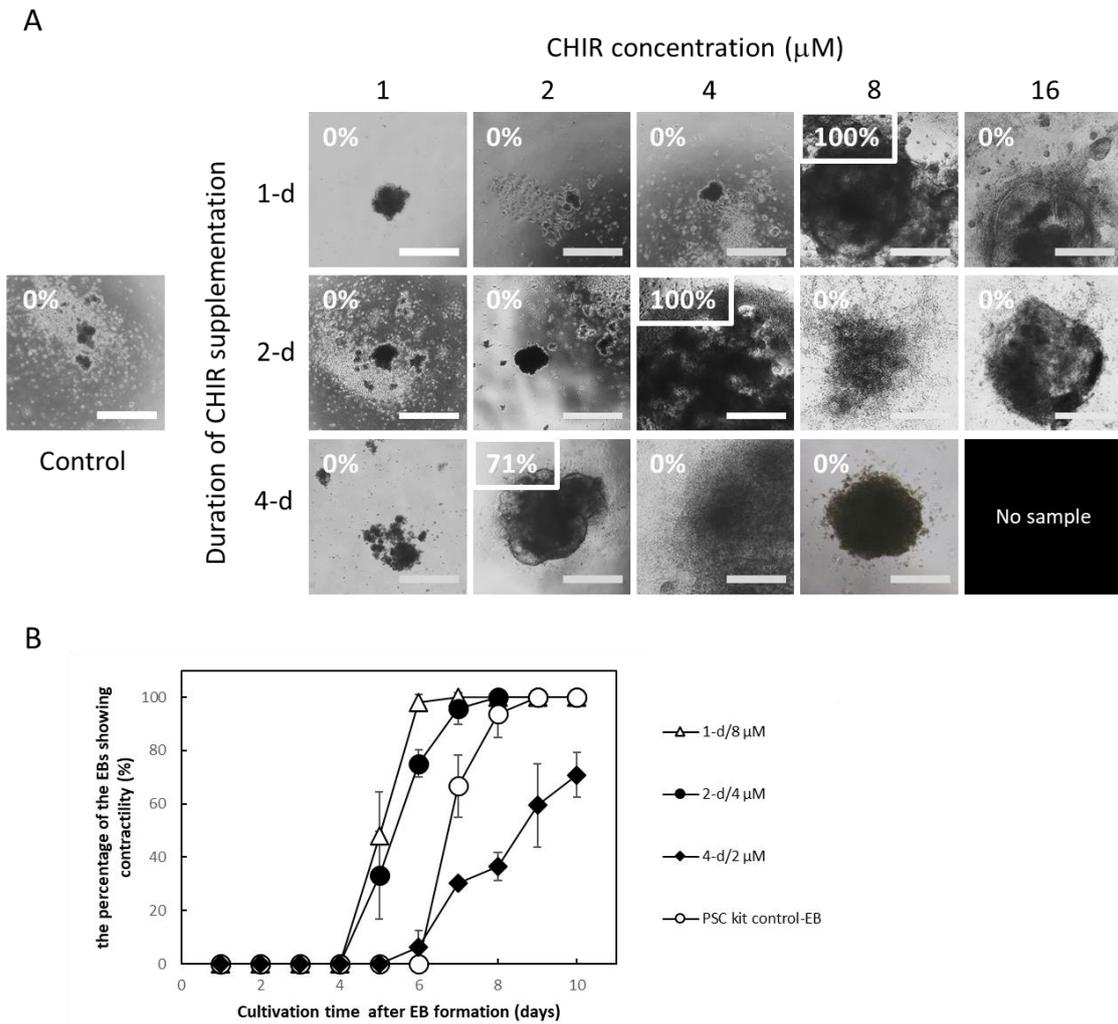
(A) Expressions of mesoderm-associated genes : *T*, *GATA4*, *WNT3A*, *FOXC1*, *DKK1* and *MESP1*.

(B) Expressions of pluripotency-associated genes : *OCT3/4* and *NANOG*.



**Fig. 5. Effect of CHIR supplementation to hiPSC cultures following EB formation on the expression levels of mesoderm-associated gene expressions.**

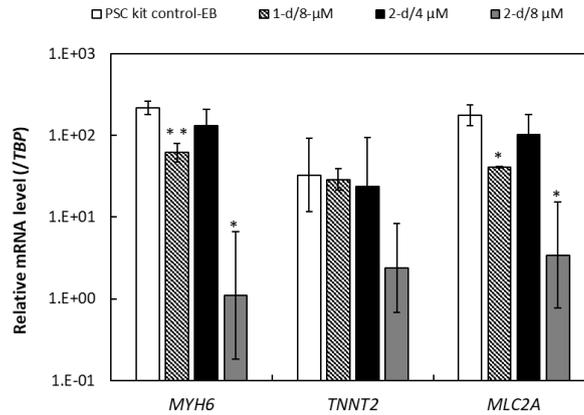
Following a 4-day suspension culture period, the resulting EBs were treated with CHIR for 2 days. Closed bars and solid lines indicate the gene expression levels in EBs 2-d treated with 4  $\mu$ M CHIR during EB formation (based on the data presented in Fig. 4A). Total RNA was extracted from EBs at day 4. Other bars indicate the gene expression levels in EBs subjected to various concentrations of CHIR after EB formation. Total RNA was extracted from EBs at day 6. Data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01 significance was calculated using Student's t-test for each mesoderm-associated gene in comparison to the EBs 2-d treated with 4  $\mu$ M CHIR during EB formation.



**Fig. 6. Effect of CHIR supplementation on EB formation-based cardiac differentiation.**

(A) Phase-contrast images of EBs induced into cardiomyocytes for 10 days after EB formation. Scale bar: 500  $\mu\text{M}$ . Percentage values indicated on the images refer to the ratio of the EBs showing contractility to all wells by day 14 including EB formation for 4 days.

(B) Time course changes in the percentage of the EBs showing contractility after EB formation. Data are represented as mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).



**Fig. 7. Effect of CHIR treatments on the expression levels of cardiac differentiation-associated genes.**

Cardiac differentiation-associated genes: *MYH6*, *TNNT2* and *MLC2A*. Total RNA was extracted from adherent cultures at the end of the cardiac differentiation process on day 14 or 16. Data were normalized to *TATA binding protein (TBP)* expression as an endogenous control. Data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3). \*P<0.05, \*\*P<0.01, significance versus control (PSC kit control-EB) calculated by Student's t-test.

#### 第4節 考察

本研究において、中胚葉に傾倒した胚様体は、特定の CHIR 処理条件下でのみ作出された。そのため、CHIR 曝露は処理期間、添加濃度、添加時期の3要因によって左右されると考えられる。なかでも、4日間の胚様体形成期間のうち後半2日間4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体は、*T*, *GATA4*, *WNT3A*, *FOXCl*, *DKK1* および *MESPI* といった中胚葉マーカー遺伝子の発現量を有意に増加させた (Fig. 4A)。一方、胚様体形成期間のうち1日間または4日間 CHIR 処理した胚様体の中胚葉分化促進効果は低く、後半2日間の CHIR 処理には及ばなかった。(Fig. 5)。

特に、4日間の CHIR 処理というより高曝露な CHIR 処理条件で培養した胚様体は、後半2日間 CHIR 処理した胚様体と比較して *WNT3A* 遺伝子の発現量を有意に減少させた (Fig. 4A)。*WNT3A* は胚発生の過程で中胚葉系統への誘導に寄与すると報告されている<sup>(53)</sup>。さらに、Wnt/ $\beta$ -Catenin 経路の活性化因子である Wnt3a は、中胚葉の形成を促進し、心筋細胞の表現型への分化につながると考えられている<sup>(54)</sup>。つまり、4日間の CHIR 処理は、胚様体形成期間中の中胚葉分化誘導の重要な指標である Wnt シグナル伝達の活性を抑制することが明らかになった。また、ヒト iPS 細胞が凝集していない培養初期段階から CHIR を添加し培養する4日間の CHIR 処理は、胚様体の生育に大きな影響を与えた (Fig. 2A, B)。特に、16  $\mu\text{M}$  CHIR 添加は細胞死を誘導し、胚様体形成を阻害した。したがって、4日間の CHIR 処理は行わないことが望ましい。

胚様体形成後に CHIR 処理した胚様体の中胚葉分化促進効果は、胚様体形成期間中の CHIR 処理と比較して抑制された。胚様体形成後の CHIR 処理において、*T*, *GATA4* および *WNT3A* といった中胚葉マーカー遺伝子の発現量を増加させるためには、胚様体形成後2日間16  $\mu\text{M}$  CHIR を添加する必要がある。しかし、それらの遺伝子発現量は、胚様体形成期間のうち後半2日間4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加した胚様体の発現量には及ばなかった (Fig. 5)。以前の研究で、胚様体を中胚葉かつ心筋細胞へ分化させる CHIR 添加濃度は12  $\mu\text{M}$  であり<sup>(49)</sup>、単層で培養したヒト iPS 細胞の *T* の発現および心筋分化を強化する CHIR 添加濃度は5  $\mu\text{M}$  であると報告されている<sup>(42)</sup>。以上のことから、CHIR のヒト iPS 細胞に対する作用は胚様体の三次元構造によって抑制され、中胚葉分化促進効果を得るには、16  $\mu\text{M}$  という高濃度の CHIR 添加が必要になることがわかった。しかし、高濃度の CHIR 処理はヒト iPS 細胞の細胞死を誘導する。胚様体形成期間のうち4日間16  $\mu\text{M}$  CHIR 添加は細胞死を誘導したため、胚様体が形成されなかった (Fig. 2A)。以前の研究でも、接着培養条件下での10  $\mu\text{M}$  CHIR 添加はヒト iPS 細胞の増殖を阻害する可能性が示唆され、GSK-3 阻害剤が濃度依存的にマウス ES 細胞の生存率を低下させたと報告されている<sup>(55)</sup>。よって、胚様体形成後の CHIR 処理と比較して、胚様体形成期間中の CHIR 処理は細胞毒性が低く、中胚葉に傾倒した胚様体を作成するために最も効果的なアプローチであるといえる。

胚様体形成期間のうち後半1日間8  $\mu\text{M}$ 、2日間4  $\mu\text{M}$  CHIR を添加して得られた胚様体は、100%の確率で細胞収縮がみられ (Fig. 6A)、胚様体形成後に心筋細胞への分化誘導を

行った PSC kit control-EB よりも 2 日間早く細胞収縮が確認された (Fig. 6B)。これらの処理条件で CHIR を添加した胚様体は、*WNT3A* 遺伝子の発現が大幅に促進され (Fig. 4A)、*OCT3/4* および *NANOG* 遺伝子の発現が維持された (Fig. 4B)。一方、4 日間 2  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体は上記の CHIR 処理した胚様体と同程度の CHIR 曝露条件下で形成されたが、細胞収縮率は 71%であった。これは、4 日間 2  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体の *WNT3A* 遺伝子の発現量が不十分だったためと考えられる (Fig. 4A)。また、後半 2 日間 8, 16  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体は、4  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体と比較して *NANOG* 遺伝子の発現量を減少させ (Fig. 4B)、その後の心筋細胞への分化誘導では細胞収縮がみられなかった (Fig. 6A)。つまり、Wnt シグナル伝達の活性化と未分化維持の両方が心筋細胞への分化誘導に必要な不可欠な条件であるといえる。

また、100%の確率で細胞収縮がみられた胚様体の心筋成熟マーカー遺伝子の発現を比較すると、後半 2 日間 4  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体は心筋細胞への分化誘導後、PSC kit control-EB と同程度まで *MYH6*, *TNNT2* および *MLC2A* といった心筋成熟マーカー遺伝子の発現量を増加させた (Fig. 7)。しかし、後半 1 日間 8  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体は、PSC kit control-EB と比較して *MYH6* および *MLC2A* 遺伝子の発現量を有意に減少させ、*TNNT2* 遺伝子の発現量を PSC kit control-EB と同程度まで増加させた。(Fig. 7)。これは、後半 1 日間 8  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体の *FOXC1* 遺伝子の発現量が後半 2 日間の CHIR 処理と比較して有意に減少し、他の中胚葉マーカー遺伝子の発現量が後半 2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加と比較して不十分だったためといえる (Fig. 4A)。特に、*Foxc1* は心筋中胚葉形成に重要な役割を果たし、心筋形成の初期段階で調節機能を持つことがわかっている<sup>(56)</sup>。つまり、より心筋成熟を促進させるには、胚様体形成段階で *FOXC1* が発現していることが望ましいといえる。後半 1 日間の CHIR 処理における中胚葉分化促進効果の抑制は、胚様体形成期間のうち 3 日目から 4 日目という細胞の凝集がほぼ完了した段階で CHIR を添加したためだと考えられる。

したがって、胚様体形成期間のうち後半 2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加は、心筋細胞へ分化しうる中胚葉へ傾倒した胚様体を作出するのに最適な CHIR 処理条件であるといえる。また、胚様体形成期間中の CHIR 処理は、高効率で従来よりも短期間で収縮性心筋細胞を得られる可能性が示唆された。GSK-3 阻害剤である CHIR は、胚様体形成の過程でヒト iPS 細胞の中胚葉分化を調整するために有用である。ただし、CHIR は中胚葉分化促進以外に、自己増殖、未分化状態の逸脱、細胞毒性などの複数の作用がある。胚様体の三次元構造自体が CHIR の中胚葉分化促進効果を抑制する可能性があることから、胚様体のような細胞塊を形成する細胞分化プロセスでは CHIR の添加時期が特に重要である。

## 第5節 要約

CHIR99021 (CHIR) は、Wnt シグナルを活性化させる Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)阻害剤の一つである。ヒト iPS 細胞の胚様体形成培養中に CHIR 処理を実施した場合、胚様体形成にどのような影響が現れるかを調べたところ、CHIR 存在下で形成された胚様体では、中胚葉分化マーカー遺伝子発現量が増加する傾向がみられた。本研究では、胚様体形成期間中の CHIR 処理により、心筋細胞へ分化しうる中胚葉へ傾倒した胚様体の作出を試みた。4日間の胚様体形成期間のうち後半2日間4  $\mu$ M CHIR を添加した胚様体は、中胚葉分化マーカー遺伝子の発現を最も増大させ、かつ未分化マーカー遺伝子の発現を維持していた。得られた胚様体を心筋細胞へ分化誘導したところ、拍動性心筋細胞が発生した。また、胚様体形成期間のうち1日間または4日間 CHIR 処理した胚様体の中胚葉系統割合は低く、後半2日間の CHIR 処理には及ばなかった。また、胚様体形成後に CHIR 処理を行ったところ、CHIR の作用は胚様体形成期間中の CHIR 処理と比較して抑制された。胚様体の三次元構造が障害となって、CHIR が細胞に到達しにくくなることが、中胚葉分化促進効果を抑制する一因ではないかと考えられる。よって、胚様体のような細胞塊を形成する細胞分化プロセスでは CHIR の添加時期が特に重要であるといえる。以上のことから、胚様体形成期間のうち後半2日間4  $\mu$ M CHIR 添加は、心筋細胞へ分化しうる中胚葉へ傾倒した胚様体を作成するのに最適な CHIR 処理条件である。

## 参考文献

1. Takahashi K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, **Cell**, 2006 Aug; **126**(4): 663-76.
2. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, **Cell**, 2007 Nov; **131**(5): 861-72.
3. Evans MJ, Kaufman MH, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, **Nature**, 1981 Jul; **292**(5819): 154-6.
4. Martin GR, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, **Proc Natl Acad Sci USA**, 1981; **78**(12): 7634-8.
5. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S, Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, **Nat Biotechnol**, 2008 Jan; **26**(1): 101-6.
6. Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K, Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells, **Cell Stem Cell**, 2010 Jul; **7**(1): 11-4.
7. Hansson EM, Lindsay ME, Chien KR, Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics, **Cell Stem Cell**, 2009 Oct; **5**(4): 364-77.
8. Riazi AM, Kwon SY, Stanford WL, Stem cell sources for regenerative medicine, **Methods Mol Biol**, 2009; **482**: 55-90.
9. Blinova K, Dang Q, Millard D, Smith G, Pierson J, Guo L, Brock M, Lu HR, Kraushaar U, Zeng H, Shi H, Zhang X, Sawada K, Osada T, Kanda Y, Sekino Y, Pang L, Feaster TK, Kettenhofen R, Stockbridge N, Strauss DG, Gintant G, International multisite study of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug proarrhythmic potential assessment, **Cell Rep**, 2018 Sep; **24**(13): 3582-92.
10. Takasuna K, Kazusa K, Hayakawa T, Comprehensive cardiac safety assessment using hiPS-cardiomyocytes (consortium for safety assessment using human iPS cells: CSAHi), **Curr Pharm Biotechnol**, 2020; **21**(9): 829-41.
11. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R, The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium, **J Embryol Exp Morphol**, 1985 Jun; **87**: 27-45.
12. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ, Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, **J Clin Invest**, 1996 Jul;

- 98(1): 216-24.
13. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L, Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, **J Clin Invest**, 2001; **108**(3): 407-14.
  14. Talkhabi M, Aghdami N, Baharvand H, Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art, **Life Sci**, 2016 Jan; **145**: 98-113.
  15. Devalla HD, Passier R, Cardiac differentiation of pluripotent stem cells and implications for modeling the heart in health and disease, **Sci Transl Med**, 2018 Apr; **10**(435): eaah5457.
  16. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L, Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells, **Circulation**, 2003 Jun; **107**(21): 2733-40.
  17. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK, Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A, **PLoS One**, 2011 Feb; **6**(2): e16734.
  18. Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao X, Ma Y, Qin L, Kang J, Wei B, Wang L, Jin Y, Yang HT, Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells, **Cell Res**, 2012 Jan; **22**(1): 219-36.
  19. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM, Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population, **Nature**, 2008 May; **453**(7194): 524-8.
  20. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G, Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines, **Cell Stem Cell**, 2011 Feb; **8**(2): 228-40.
  21. Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR, Hou L, Soerens AG, Yu J, Palecek SP, Lyons GE, Thomson JA, Herron TJ, Jalife J, Kamp TJ, Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method, **Circ Res**, 2012; **111**(9): 1125-36.
  22. Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N,

- Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N, A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions, **Cell Rep**, 2012 Nov; **2**(5): 1448-60.
23. Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S, Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors, **Cell Stem Cell**, 2009 Jan; **4**(1): 16-9.
  24. Brouwer M, Zhou H, Nadif Kasri N, Choices for induction of pluripotency: recent developments in human induced pluripotent stem cell reprogramming strategies, **Stem Cell Rev Rep**, 2016; **12**(1): 54-72.
  25. Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, Hao E, Schöler HR, Hayek A, Ding S, Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2, **Stem Cells**, 2009; **27**(12): 2992-3000.
  26. Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornruksa S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R, Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency, **Cell Stem Cell**, 2014 Oct; **15**(4): 471-87.
  27. Li Y, Zhang Q, Yin X, Yang W, Du Y, Hou P, Ge J, Liu C, Zhang W, Zhang X, Wu Y, Li H, Liu K, Wu C, Song Z, Zhao Y, Shi Y, Deng H, Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules, **Cell Res**, 2011; **21**(1): 196-204.
  28. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H, Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds, **Science**, 2013 Aug; **341**(6146): 651-4.
  29. Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A, The ground state of embryonic stem cell self-renewal, **Nature**, 2008 May; **453**(7194): 519-23.
  30. Kiyonari H, Kaneko M, Abe S, Aizawa S, Three inhibitors of FGF receptor, ERK, and GSK3 establishes germline-competent embryonic stem cells of C57BL/6N mouse strain with high efficiency and stability, **Genesis**, 2010 May; **48**(5): 317-27.
  31. Govarthanan K, Vidyasekar P, Gupta PK, Lenka N, Verma RS, Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibitor- CHIR 99021 augments the differentiation potential of mesenchymal stem cells, **Cytotherapy**, 2020 Feb; **22**(2): 91-105.
  32. Jiang M, Chen H, Lai S, Wang R, Qiu Y, Ye F, Fei L, Sun H, Xu Y, Jiang X, Zhou Z, Zhang T, Li Y, Xie J, Fang Q, Gale RP, Han X, Huang H, Guo G, Maintenance of human haematopoietic stem and progenitor cells in vitro using a chemical cocktail, **Cell Discov**, 2018 Oct; **4**: 59.

33. Narcisi R, Arikan OH, Lehmann J, Ten Berge D, van Osch GJ, Differential effects of small molecule WNT agonists on the multilineage differentiation capacity of human mesenchymal stem cells, **Tissue Eng Part A**, 2016 Nov; **22**(21-22): 1264-73.
34. Ye S, Tan L, Yang R, Fang B, Qu S, Schulze EN, Song H, Ying Q, Li P, Pleiotropy of glycogen synthase kinase-3 inhibition by CHIR99021 promotes self-renewal of embryonic stem cells from refractory mouse strains, **PLoS One**, 2012; **7**(4): e35892.
35. 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, **Cytotechnology**, 2015; **67**(2): 191-7.
36. Fan Y, Ho BX, Pang JKS, Pek NMQ, Hor JH, Ng SY, Soh BS, Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated signaling re-activates proliferation of matured cardiomyocytes, **Stem Cell Res Ther**, 2018 Dec; **9**(1): 338.
37. Mae SI, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K, Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells, **Nat Commun**, 2013; **4**: 1367.
38. Naujok O, Diekmann U, Lenzen S, The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling, **Stem Cell Rev Rep**, 2014 Aug; **10**(4): 480-93.
39. Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, Liu J, Wu Y, Dong W, Dunn KK, Shusta EV, Palecek SP, Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling, **Stem Cell Reports**, 2014 Nov; **3**(5): 804-16.
40. Gonzalez R, Lee JW, Schultz PG, Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells, **Angew Chem Int Ed Engl**, 2011 Nov; **50**(47): 11181-5.
41. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP, Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2012 Jul; **109**(27): E1848-57.
42. Kadari A, Mekala S, Wagner N, Malan D, Köth J, Doll K, Stappert L, Eckert D, Peitz M, Matthes J, Sasse P, Herzig S, Brüstle O, Ergün S, Edenhofer F, Robust Generation of cardiomyocytes from human iPS cells requires precise modulation of BMP and WNT signaling, **Stem Cell Rev Rep**, 2015 Aug; **11**(4): 560-9.
43. 丹羽 仁史: 幹細胞の多能性を規定する分子機構. 領域融合レビュー, 1, e008 (2012)
44. Davis LA, Zur Nieden NI, Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch, **Cell Mol Life Sci**, 2008 Sep; **65**(17): 2658-74.

45. Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S, Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions, **Stem Cell Reports**, 2014 May; **2**(6): 751-60.
46. Rajala K, Pekkanen-Mattila M, Aalto-Setälä K, Cardiac differentiation of pluripotent stem cells, **Stem Cells Int**, 2011; **2011**: 383709.
47. Später D, Hansson EM, Zangi L, Chien KR, How to make a cardiomyocyte, **Development**, 2014 Dec; **141**(23): 4418-31.
48. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N, Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers, **Mol Med**, 2000 Feb; **6**(2): 88-95.
49. Fonoudi H, Ansari H, Abbasalizadeh S, Larijani MR, Kiani S, Hashemizadeh S, Zarchi AS, Bosman A, Blue GM, Pahlavan S, Perry M, Orr Y, Mayorchak Y, Vandenberg J, Talkhabi M, Winlaw DS, Harvey RP, Aghdami N, Baharvand H, A universal and robust integrated platform for the scalable production of human cardiomyocytes from pluripotent stem cells, **Stem Cells Transl Med**, 2015 Dec; **4**(12): 1482-94.
50. Kempf H, Olmer R, Kropp C, Rückert M, Jara-Avaca M, Robles-Diaz D, Franke A, Elliott DA, Wojciechowski D, Fischer M, Roa Lara A, Kensah G, Gruh I, Haverich A, Martin U, Zweigerdt R, Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture, **Stem Cell Reports**, 2014; **3**(6): 1132-46.
51. Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K, A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, **Stem Cells Transl Med**, 2014; **3**(12): 1473-83.
52. 古江-楠田 美保:日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化:その 1, 組織培養研究, 27, 139-147 (2008)
53. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, Reinecke H, Moon RT, Murry CE, Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells, **Proc Natl Acad Sci USA**, 2007 Jun; **104**(23): 9685-90.
54. Tran TH, Wang X, Browne C, Zhang Y, Schinke M, Izumo S, Burcin M, Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells, **Stem Cells**, 2009 Aug; **27**(8): 1869-78.
55. Naujok O, Lentjes J, Diekmann U, Davenport C, Lenzen S, Cytotoxicity and activation of

the Wnt/beta-catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors, **BMC Res Notes**, 2014 Apr; **7**: 273.

56. Lambers E, Arnone B, Fatima A, Qin G, Wasserstrom JA, Kume T, Foxc1 regulates early cardiomyogenesis and functional properties of embryonic stem cell derived cardiomyocytes, **Stem Cells**, 2016 Jun; **34**(6): 1487-500.

## 総 括

Wnt シグナルの活性化は、多能性幹細胞の未分化維持と特定組織細胞への分化誘導の両方で重要な役割を果たしている。Wnt シグナルを活性化させる Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)阻害剤の一つである CHIR99021 (CHIR) は、体細胞の初期化から特定組織細胞への分化誘導に至るまで様々な用途で使用されている。CHIR が多能性幹細胞へ及ぼす影響は、細胞増殖や分化といった発生段階や浮遊培養か接着培養かといった細胞形態によって異なる。また、細胞増殖や分化といったヒト iPS 細胞の培養目的に応じて、処理期間と添加濃度を組み合わせた複雑な CHIR 処理条件を最適化する試みはなされていない。以上のことから、本研究では、ヒト iPS 細胞の未分化増殖および心筋細胞分化における CHIR 処理条件の最適化を行った。

### 第 1 章 接着培養条件下での CHIR99021 処理がヒト iPS 細胞の増殖と分化へ及ぼす影響

本研究では、ヒト iPS 細胞の接着培養において、GSK-3 阻害剤である CHIR の処理期間と添加濃度が細胞増殖や分化へ及ぼす影響を検討し、未分化増殖と心筋細胞分化における同剤適用条件の最適化を行った。

4 日間培養のうちの後半 2 日間に 1  $\mu$ M CHIR で処理を行うと、ヒト iPS 細胞の増殖が促進され、細胞が密で辺縁のはっきりしたコロニーが形成された。3  $\mu$ M CHIR 処理は処理期間に関わらずヒト iPS 細胞の増殖を促進したが、4 日間培養のうちの全期間で処理を行うと、ヒト iPS 細胞は未分化状態から逸脱した。また、10  $\mu$ M CHIR 処理では、CHIR による細胞増殖促進効果は得られず、ヒト iPS 細胞は低密度なコロニーを形成した。連続継代培養を行ったところ、1  $\mu$ M CHIR 処理の場合のみで CHIR の細胞増殖促進効果が継続することが明らかになった。後半 2 日間 1 または 3  $\mu$ M CHIR で処理したヒト iPS 細胞は、*OCT3/4*, *NANOG*, *SOX2* および *REX1* といった未分化マーカー遺伝子の発現を維持したが、3 または 10  $\mu$ M CHIR で処理したヒト iPS 細胞では、*T*, *GATA4*, *WNT3A* および *WNT8A* といった中胚葉マーカー遺伝子の発現が促進された。よって、後半 2 日間 3  $\mu$ M CHIR 添加は、ヒト iPS 細胞の未分化維持と中胚葉分化促進の境界となる CHIR 曝露条件であるといえる。以上のことから、未分化性を維持したままヒト iPS 細胞の増殖を促進する最適な CHIR 処理条件は、4 日間培養のうちの後半 2 日間 1  $\mu$ M CHIR 添加である。

ヒト iPS 細胞を 4 日間接着培養するとき、その後半 2 日間を 3  $\mu$ M 以上の高濃度 CHIR で処理すると、中胚葉分化が促進されることが明らかになった。高濃度 CHIR 処理条件下での接着培養をヒト iPS 細胞の心筋細胞分化の前培養として適用することで、心筋細胞への分化誘導期間を短縮することが可能であると考えた。CHIR 処理により中胚葉へ傾倒したヒト iPS 細胞を心筋細胞へ分化誘導したところ、3  $\mu$ M CHIR 処理のみで広範囲に拍動性心筋細胞が発生した。一方、10  $\mu$ M CHIR 処理では、3  $\mu$ M CHIR 処理と同程度の中胚葉マーカー遺伝子の発現がみられたが、拍動性心筋細胞が得られなかった。10  $\mu$ M CHIR 処理は 3

μM CHIR 処理と異なり、未分化マーカー遺伝子の発現を減少させたためと考えられる。よって、心筋細胞分化誘導における中胚葉分化段階において、未分化マーカー遺伝子の早期消退は望ましくない。以上のことから、心筋細胞への段階的分化誘導における中胚葉・心筋中胚葉分化段階の代替として最適な CHIR 処理条件は、4 日間培養のうちの後半 2 日間 3 μM CHIR 添加である。

## 第 2 章 浮遊培養をベースとしたヒト iPS 細胞の心筋細胞分化誘導における胚様体形成期間中の CHIR99021 処理条件の最適化

ヒト iPS 細胞の胚様体形成培養中に CHIR 処理を実施した場合、胚様体形成にどのような影響が現れるかを調べたところ、CHIR 存在下で形成された胚様体では、中胚葉分化マーカー遺伝子発現量が増加する傾向がみられた。本研究では、胚様体形成期間中の CHIR 処理により、心筋細胞へ分化しうる中胚葉へ傾倒した胚様体の作出を試みた。

4 日間の胚様体形成期間のうち後半 2 日間 4 μM CHIR を添加して得られた胚様体は、*T*, *GATA4*, *WNT3A*, *FOXC1*, *DKK1* および *MESPI* といった中胚葉マーカー遺伝子の発現量を有意に増加させた。CHIR 処理期間を 1 日間または 4 日間とした場合、処理濃度にかかわらず胚様体の中胚葉分化促進効果は低く、後半 2 日間の 4 μM CHIR 処理には及ばなかった。特に、1 日間 CHIR 処理では *FOXC1* 遺伝子の発現量は減少し、4 日間 CHIR 処理では *WNT3A* 遺伝子の発現量は減少した。一方、*OCT3/4* および *NANOG* といった未分化マーカー遺伝子の発現量は、後半 2 日間 4 μM CHIR を添加した胚様体でも維持されていた。以上のことから、未分化マーカー遺伝子の発現を維持したまま、最も中胚葉分化が促進された胚様体を作成する CHIR 処理条件は、胚様体形成期間のうち後半 2 日間 4 μM CHIR 添加であることがわかった。

CHIR 処理による胚様体の中胚葉分化促進効果は、CHIR 処理を胚様体形成後に実施すると、胚様体形成期間中に実施するのに比べて抑制された。胚様体形成後の CHIR 処理において、*T*, *GATA4* および *WNT3A* といった中胚葉マーカー遺伝子の発現量を増加させるためには、胚様体形成後 2 日間 16 μM CHIR を添加する必要がある。しかし、それらの遺伝子発現量は、胚様体形成期間のうち後半 2 日間 4 μM CHIR を添加した胚様体の発現量には及ばなかった。これは、胚様体の三次元構造によって CHIR の作用が抑制されたためであると考えられる。高濃度の CHIR はヒト iPS 細胞の細胞死を誘導することから、CHIR 処理濃度は低い方が望ましい。したがって、胚様体形成期間中に CHIR 処理を実施する方が、胚様体形成後に実施するよりも CHIR の細胞毒性を低く抑えながら、中胚葉に傾倒した胚様体を作成できるため、より効果的なアプローチであるといえる。

胚様体形成期間中の CHIR 処理により中胚葉に傾倒した胚様体を心筋細胞へ分化誘導したところ、胚様体形成期間のうち後半 1 日間 8 μM および 2 日間 4 μM CHIR を添加して得られた胚様体では 100% の確率で細胞収縮がみられた。特に、後半 2 日間 4 μM CHIR を添加して得られた胚様体では、*MYH6*, *TNNT2* および *MLC2A* といった心筋成熟マーカー遺

伝子の発現量が最も増加した。以上のことから、心筋細胞へ分化しうる中胚葉へ傾倒した胚様体を作成するのに最適な CHIR 処理条件は、胚様体形成期間のうち後半 2 日間 4  $\mu$ M CHIR 添加であることがわかった。

## 謝 辞

本研究の遂行ならびに論文を取りまとめるにあたり、終始懇切丁寧なご指導とご教示を賜りました山梨大学大学院 総合研究部 生命環境学域教授 黒澤 尋先生に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行ならびに論文の作製にあたり、終始ご指導いただき、有益な助言を賜りました山梨大学大学院 総合研究部 生命環境学域教授 岸上 哲士先生、同教授 若山 照彦先生、同教授 幸田 尚先生、同准教授 升井 伸治先生に深く感謝いたします。

本研究において、実験を遂行するにあたり多くのご助言を頂きました梨大学大学院 総合研究部 生命環境学域助教 大貫 喜嗣先生に厚く御礼申し上げます。また、献身的な協力をしていただいた澤登 美空氏（現サクラファインテックジャパン株式会社）、河西 美波氏（現アルソア本社株式会社）に感謝いたします。

研究室において、様々な協力をしていただいた山梨大学生命環境学部生命工学科および同大学院医工農学総合教育部の卒業生・在校生諸氏に感謝いたします。