

# 学位論文

## Doctoral Thesis

論文題名: マウスES細胞を用いた三胚葉細胞の分化と、新規膵臓細胞  
分化誘導系の確立

(Differentiation of the mouse ES cells into three germ layers and  
establishment of novel pancreatic differentiation procedure)

著者名

樋口 裕一郎

Yuichiro Higuchi

指導教員

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻多能性幹細胞学 桑昭苑 教授

審査委員名:	腎臓形成学担当教授	西中村隆一
	小児科学担当教授	遠藤文夫
	病態生化学担当教授	山縣和也
	幹細胞誘導学担当教授	江良択実

2010年3月

## 目次

要旨	4
学位論文の骨格となる参考論文と関連論文	6
謝辞	7
略語一覧	8
研究の背景と目的	9
1. はじめに	
2. 初期発生と膵臓分化	
・ 中内胚葉から内胚葉へ	
・ 内胚葉の発生 TGF $\beta$ シグナル	
・ 膵臓発生と Pdx1	
3. ES 細胞の分化誘導	
4. ES 細胞から膵臓細胞への分化	
5. 目的	
・ M15 細胞を用いた三胚葉系譜への分化誘導	
・ 擬似基底膜を用いた新規膵分化誘導法の確立	
実験方法	16
1. マウス ES/iPS 細胞株	
2. 細胞株	
3. 液性因子	
4. M15 細胞を用いた分化誘導	
・ 内胚葉、膵前駆細胞培養	
・ 神経分化	
・ 中胚葉分化	
5. sBM の作製	
6. sBM を用いた分化誘導	

- 7. ノックダウン実験
- 8. 腎被膜下への移植
- 9. RT-PCR
- 10. 免疫細胞化学、免疫組織化学的解析
- 11. フローサイトメトリー解析
- 12. マイクロアレイ解析

---

実験結果 25

- 1. M15 細胞を用いた三胚葉系譜への分化誘導
  - ES 細胞の神経外胚葉、中胚葉系譜への分化誘導
  - 神経への分化
  - 中胚葉系譜への分化
  - ES 細胞由来各種前駆細胞の純化、解析
- 2. 擬似基底膜を用いた新規膵分化誘導法の確立
  - M15 細胞からの膵前駆細胞誘導は Lama5 を介して行われる
  - sBM 上において、ES 細胞は胚性内胚葉へと分化する
  - sBM 上において、ES 細胞は膵臓系譜の細胞へと分化する
  - ヘパラン硫酸プロテオグリカンは膵臓分化に関わる
  - sBM 上で分化した細胞は生体内において成熟膵臓細胞へと分化する

---

考察 34

- 1. M15 細胞を用いた三胚葉系譜への分化誘導
- 2. 擬似基底膜を用いた新規膵分化誘導法の確立

---

結語 38

---

図、Table 39

---

参考文献 85

## 要旨

### **1. M15 細胞を用いた三胚葉系譜への分化誘導**

【目的】胚性幹細胞（Embryonic stem cell, ES 細胞）は初期胚に由来する多能性幹細胞で、細胞系譜の決定、可塑性などの機構について試験管内で解析できる有用なモデルとなる。当研究室ではマウス ES 細胞から膵臓系譜の細胞を誘導する系として、マウス胎仔中腎由来の細胞株、M15 を支持細胞として用いる培養系を確立した。その分化誘導に関わるシグナル群を詳細に検討した結果、培養過程に加える液性因子を変える事で、外胚葉や中胚葉系譜の細胞をも分化しうる事を見出した。そこで、M15 細胞を用いて ES 細胞から誘導した三胚葉系譜の細胞が、それぞれの特性を有しているのかを確認した。

【方法】M15 細胞上で分化誘導した外胚葉、中胚葉系譜の細胞について成熟化の検討を行った。また、誘導した各胚葉系譜の細胞をフローサイトメーターを用いて純化し、その網羅的遺伝子発現解析を行う事で ES 由来各胚葉細胞の特性を確認した。

【結果】M15 細胞上で添加する液性因子を変えて培養する事により、マウス ES 細胞は成熟した神経細胞や筋、骨、脂肪細胞へとそれぞれ分化した。網羅的遺伝子発現解析の結果、誘導された神経外胚葉（5 日目）では前後軸、及び背腹軸に沿って特異的に発現する神経マーカーの発現が認められた。また、誘導した側板中胚葉、沿軸中胚葉（5 日目）についても同様に、それぞれのマーカー遺伝子の発現が確認された。

【考察】M15 細胞を用いた分化誘導系において神経外胚葉、中胚葉、胚性内胚葉の細胞を効率的に産生できる事が示された。これらの結果は M15 細胞を用いた分化誘導系が、三胚葉系譜の分化メカニズムを解析するためのモデルとして非常に有用であることを示している。

### **2. 擬似基底膜を用いた新規膵分化誘導系の確率**

【目的】固定した M15 細胞は膵臓系譜への分化誘導能を維持しており、この事から、M15 細胞の構成する基底膜構造が膵臓系譜への分化に重要な役割を果たしている事を推測した。そこで、支持細胞を用いない新規の膵分化誘導系として、擬似基底膜を用いる方法について検討した。

【方法】共同研究者である持立克身先生のグループが開発した、擬似基底膜を

用いる培養系について膵臓分化誘導能を検討した。加えて、基底膜からの膵臓分化誘導メカニズムを解析する目的で、ラミニン、インテグリン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン遺伝子のノックダウン実験を行った。

【結果】擬似基底膜上において、ES細胞は胚性内胚葉細胞、膵臓前駆細胞へと分化し、最終的にインスリン産生膵β細胞へと分化した。またラミニン、インテグリンの発現抑制、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの発現抑制と糖鎖の分解は、それぞれ有意にES細胞から膵臓系譜への分化を抑制した。擬似基底膜上で分化誘導した細胞をマウス腎被膜下に移植したところ、生体内で膵島様の構造を形成した。

【考察】基底膜構造は膵臓系譜への分化過程に関与しており、その構成因子が誘導過程において重要な役割を担っている事が示された。今回新たに確立された擬似基底膜を用いる分化誘導法は支持細胞を全く使用しておらず、基底膜構造が細胞の運命決定に与える役割を解析するためのモデルとして、非常に優れている事が示された。

## 学位論文の骨格となる参考論文と関連論文

### ・ 主論文

Nobuaki Shiraki\*, Yuichiro Higuchi\*, Seiko Harada, Kahoko Umeda, Takayuki Isagawa, Hiroyuki Aburatani, Kazuhiko Kume, Shoen Kume. (\*Co-first author)  
“Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers”  
**Biochem. Biophys. Res. Comm.** Vol. 381. 694-699 (2009)

### ・ 関連論文

NOBUAKI SHIRAKI, TETSU YOSHIDA, KIMI ARAKI, AKIHIRO UMEZAWA, YUICHIRO HIGUCHI, HIDEO GOTO, KAZUHIKO KUME, and SHOEN KUME.  
“Guided Differentiation of Embryonic Stem Cells into Pdx1-Expressing Regional-Specific Definitive Endoderm” **Stem Cells** Vol. 26 No. 4. 874 -885 (2008)

Yuichiro Higuchi, Nobuaki Shiraki, Keitaro Yamane, Zeng Qin, Katsumi Mochitate, Kimi Araki, Manami Hara, Kazuhiko Kume and Shoen Kume. “Synthesized basement membrane substrata direct the differentiation of mouse ES cells into pancreatic lineages” (submitted)

樋口裕一郎、白木伸明、桑昭苑 “iPS 細胞を用いた膵臓細胞の作製と、その移植医療への応用” **移植**、Vol. 44. 119-125 (2009)

樋口裕一郎、白木伸明、桑昭苑 “ES 細胞を用いて消化器系幹細胞を効率的に作製、培養する技術” **幹細胞の分化誘導と応用 -ES・iPS・体性幹細胞研究最前線-**、119-125 (2009)

## 謝辞

本研究の実施にあたり、終始有益な御助言ならびにご指導を賜りました熊本大学大学院医学研究科多能性幹細胞分野の桑 昭苑教授、桑 和彦准教授に心から感謝いたします。また、同研究室の白木伸明助教、後藤秀生博士、梅田香穂子氏、原田聖子氏、山根恵太郎氏には有意義な討論と適切な助言に加え、様々なご援助をして頂きました。マウスへの移植実験に関しては、山根恵太郎氏との共同で行いました。本研究を支えてくださいました研究室の皆様にご礼申し上げます。

分化細胞のマイクロアレイ解析を行っていただいた東京大学先端科学技術研究センター、ゲノムサイエンス分野の油谷浩幸博士、砂河孝行博士に深く感謝いたします。

擬似基底膜を供与頂いた国立環境研究所の持立克身博士に深く感謝いたします。

インスリン含有量の測定を行っていただいた熊本大学大学院医学薬学研究部、病態生化学分野の山縣和也教授、瀬ノ口隆文助教に深く感謝いたします。

*Insulin1*/GFP マウスを供与頂いたシカゴ大学の Dr. Manami Hara に深く感謝いたします。

ES 細胞の樹立に多大な御協力を頂いた熊本大学発生医学研究所、表現系クリニック分野の荒木喜美准教授に深く感謝いたします。

M15 細胞は野瀬俊明博士（三菱化学生命科学研究所）および Dr. M. Rassoulzadegan (University of Nice-Sophia Antipolis)、OP9 細胞は西川伸一博士（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター）、PA6 細胞は笹井芳樹博士（同所属）から供与されました。深く感謝致します。

本研究は文部科学省グローバル COE プログラム「細胞系譜制御研究の国際的人材育成ユニット」の支援を受け、著者は G-COE ジュニア・リサーチアソシエイトとして平成20年4月から同10月まで雇用され支援を受けました。また、筆者は iPS 細胞研究国際拠点人材養成事業の非常勤研究員として平成20年11月から雇用され、支援を受けました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 略語一覽

Amy	:	Amylase
BMP	:	Bone morphogenetic protein
C-pep	:	C-peptide
DBA	:	Dolichos biflorus agglutinin
ES cell	:	Embryonic stem cell
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FGF	:	Fibroblast growth factor
Foxa2	:	Forkhead box A2
Gcg	:	Glucagon
GLP1	:	Glucagon like peptide 1
Hspg	:	Heparan sulfate proteoglycan
Ins	:	Insulin
iPS cell	:	Induced pluripotent stem cell
Itgb1	:	Integrin $\beta$ 1
Lama5	:	Laminin $\alpha$ 5
LIF	:	Leukemia inhibitory factor
LPM	:	Lateral plate mesoderm
MEF	:	Mouse embryonic fibroblast
PAM	:	Paraxial mesoderm
PDGFR	:	Platelet derived growth factor receptor
Pdx1	:	Pancreatic duodenum homeobox 1
Ppy	:	Pancreatic polypeptide
RA	:	Retinoic acid
sBM	:	synthesized basement membrane
Sox17	:	SRY-box containing gene 17
Sst	:	Somatostatin
TGF	:	Transforming growth factor
VEGF	:	Vascular endothelial growth factor



## 研究の背景と目的

### 1. はじめに

胚性幹細胞 (Embryonic stem cell, ES 細胞) は初期胚から樹立された多能性の幹細胞株であり、原理的には三胚葉由来のあらゆる細胞に分化することが可能である。1998年にヒト ES 細胞が樹立されて以降、再生医療や新薬開発の観点から、ES 細胞を用いて血球系、神経、色素細胞などさまざまな細胞を分化誘導しようとする研究が盛んに行われており、それらを作製したという報告も多くなされている<sup>1</sup>。また、体細胞から ES 細胞と同等の分化能を有する人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells, iPS 細胞) が作製され、その技術を臨床レベルで応用することへの期待が更に高まっている<sup>2,3</sup>。

一方、材料が手に入れやすく、遺伝子改変が比較的容易に行え、試験管内での観察が可能であるという点から、ES、iPS 細胞の分化系は発生・分化解析のモデル系としても非常に有用であると考えられる。生体内にごく少数しか存在せず、解析が困難な組織幹細胞を大量に分化誘導することができれば、その性質について詳細な検討が可能となる。当研究室においても、マウス ES 細胞から内胚葉由来の組織である膵臓の細胞を分化誘導することで、その分化メカニズムを明らかにしようとして試みてきた<sup>4-6</sup>。

このように、ES、iPS 細胞を用いた三胚葉細胞の分化誘導系の確立は、将来的な再生医療への応用という観点からのみではなく、発生機構を解明するという学術的観点からしても非常に重要である。

### 2. 初期胚発生と膵臓分化

#### ・ 中内胚葉から内胚葉へ

脊椎動物において、原腸陥入は初期の臓器形成において非常に重要なステップである。この段階で、エピブラストは内胚葉、中胚葉および外胚葉の三胚葉へ分かれる。その後、初期の腸管内胚葉では前後軸に沿って領域化がおき、呼吸器官や消化器官の形成が起こる<sup>7</sup>。Lawson らはマウスでは胚性内胚葉は原条の前方から発生することを報告している<sup>8</sup>。また、他の動物を用いた実験からも胚性内胚葉および中胚葉は、共通の前駆細胞である中内胚葉から分化することがわかっている<sup>9,10</sup>。胚性内胚葉への分化にかかわる遺伝子に関しては、遺伝子改変マウスを用いた解析が用いられている<sup>11,12</sup>。しかし、遺伝子改変マウスを用いた解析で

は、遺伝子の欠損により、原腸陥入自体が影響を受けることや、内胚葉だけでなく中胚葉形成までも影響を受けることがあるため、遺伝子の働きを内胚葉に絞って評価することが困難な場合がある<sup>13</sup>。また、マウス初期胚では内胚葉細胞が少ないことから、その分化誘導機序の解明には *in vitro* における実験系が有用であると期待される。

#### ・ 内胚葉の発生と TGFβシグナル

脊椎動物では、内胚葉の発生には TGFβシグナルの活性化が関与している。機能欠損実験では、TGFβシグナルを阻害するドミナント・ネガティブ型の TGFβレセプター過剰発現により、予定内胚葉領域が中胚葉や外胚葉へ分化することが報告されている<sup>14</sup>。機能獲得実験では、ゼブラフィッシュ TGFβ Type I レセプターである TARAM-A の過剰発現により、中内胚葉マーカーの発現が誘導され、初期分裂割球が内胚葉へ分化することが報告されている<sup>15</sup>。また、ホヤ、マウスおよびゼブラフィッシュを用いた実験から TGFβレセプターのリガンドである Nodal が中胚葉および内胚葉系譜への特異的な誘導シグナルとして働くことが報告されている<sup>11,16</sup>。TGFβレセプターの下流で働く Smad についても、Smad2 欠損マウスでは原条、中胚葉および内胚葉の形成が阻害されることが報告されており、Nodal 欠損マウスにおいても同様の表現型を示す<sup>11</sup>。また、内胚葉誘導には高濃度の Nodal が必要であり、中胚葉誘導には低濃度で十分であることも報告されている<sup>17</sup>。Nodal シグナルにより、レセプターを介して Smad2 は活性化され Smad4 と結合して核内に移行する。そこで Smad は他の DNA 結合蛋白質である Foxh1 や Mix ファミリー蛋白質と複合体を形成し、標的とする遺伝子の発現を調節することが報告されている<sup>18,19</sup>。Mix ファミリーに関しては、アフリカツメガエルのアニマルキャップを用いた実験から、*mix.1*, *milk* および *mixer* の強制発現により中胚葉および内胚葉関連遺伝子の発現が上昇することが報告されている。また、ゼブラフィッシュの Mix 遺伝子 *bonnie and clyde(Bon)* の欠損により、内胚葉前駆細胞の低形成が起こることが報告されている<sup>20</sup>。

#### ・ 臍臓発生と Pdx1

原腸陥入の終了に伴い、三胚葉の系譜が決定され、腸管形成および臓器形成につながる前後軸に沿った初期腸管内胚葉の領域化が起こる。呼吸器官や消化器官は、近接した中胚葉や外胚葉との相互作用により、内胚葉の特異的な領域から発

生する。膵臓発生においては近接する脊索と血管からのシグナルが重要であることが報告されており、脊索からのシグナルとしてアクチビン B と bFGF<sup>21, 22</sup> が、血管からは VEGF がそれぞれ働いていると考えられている<sup>23</sup>。腸管内胚葉の発生は、形態学的には詳細に観察されているが、内胚葉臓器形成において働く因子については情報が少ない。マウス胚において *Pdx1* (*Pancreatic duodenum homeobox 1*) は、胎生 8.5 日目の腸管背側内胚葉の予定膵臓領域に発現する。*Pdx1* は、胎生 9.5 日目には背側および腹側の膵原基に発現が認められ、成体では胃の後部、十二指腸上皮およびインスリンを産生する $\beta$ 細胞に発現している。また、*Pdx1* はインスリンの発現を制御していることも報告されている<sup>24</sup>。*Pdx1* 遺伝子欠損マウスを用いた解析から、*Pdx1* が胃の後部、膵臓や十二指腸の発生に必要であることがわかっている。

### 3. ES 細胞の分化誘導

初期発生過程における三胚葉の確立は、細胞の運命を決定する上で最初に起こる重要な過程の一つである。しかし、初期胚を用いてそのメカニズムを解析する際には、胚の大きさや限られた細胞数などが問題となってしまう。その代替手段として、ES 細胞を用いて初期分化過程を試験管内で解析する技術が注目されている。ES 細胞から三胚葉の細胞を分化誘導する方法としては胚様体を形成させる方法が一般的であった。ES 細胞は非接着性に培養すると胚様体と呼ばれる細胞塊を形成し、内胚葉、中胚葉、外胚葉のいずれの細胞も出現する。しかし、それぞれの出現率は一定ではなく、各胚葉の細胞を積極的に分化誘導するために、様々な検討がなされている。

外胚葉、特に神経細胞を ES 細胞より分化誘導する研究は、他の胚葉と比較しても研究の進んでいる分野である。神経への誘導を促す因子としてはレチノイン酸や bFGF などがよく知られており、これらを液性因子として添加する事で、高効率に神経の幹細胞が誘導される事が知られている。この他にも PA6 と呼ばれるストロマ細胞を支持細胞として用いる方法がよく知られている<sup>25</sup>。

ES 細胞から中胚葉系譜の細胞を誘導する方法については、特に血球や心筋の細胞を誘導する方法などについて詳細な検討がなされている。中胚葉由来の細胞を誘導する方法としても支持細胞を用いる方法が知られており、これには OP9 と呼ばれるストロマ細胞が用いられる<sup>26</sup>。同細胞は造血前駆細胞から免疫系細胞である B 細胞への分化及びその維持を支持できるストロマ細胞株として

知られており、これと ES 細胞を共培養する事によって血球系の細胞や心筋細胞などが分化誘導される。

内胚葉系譜の分化についても、初期には胚様体を形成させる方法が一般的であった。Kubo らは正常発生において、内胚葉が中内胚葉と呼ばれる、中胚葉、内胚葉の共通の前駆体から分化することに着目し、初期中胚葉マーカーである **Brachyury (T)** の発現を指標として、胚様体形成法で初期中胚葉細胞を分化誘導した<sup>27</sup>。更に、その初期中胚葉細胞をフローサイトメーターによって濃縮し、無血清条件下で液性因子としてアクチビンを添加し、付着培養することで内胚葉分化が分化誘導されることを報告した。また、同じグループが中内胚葉および内胚葉マーカーである **Foxa2** と上述の **T** の発現を指標にして、正常発生において内胚葉が発生する領域である前方原条の細胞を分化誘導することに成功した<sup>28</sup>。彼らはこの細胞群から膵臓幹細胞や肝臓幹細胞が分化誘導できることも報告している。更に、2005 年に Yasunaga らによりマウス<sup>29</sup>、D'Amour らによりヒト ES 細胞<sup>30</sup> から内胚葉への効率的な分化誘導方法が報告された。彼らは胚様体の形成を介することなく、無血清条件下でアクチビン含有培地を用いて培養することにより、マウスおよびヒト ES 細胞から高効率で内胚葉を分化誘導したと報告している。これらの報告から、ES 細胞から内胚葉を介して消化器系幹細胞を分化誘導可能であることが示された。

#### 4. ES 細胞から膵臓細胞への分化

1981 年にマウス、1998 年にヒトの ES 細胞が樹立されて以来、多くのグループが ES 細胞を用いて膵臓の細胞を分化誘導する課題に取り組んできた。しかしながら、多くの培養系はその分化効率が非常に悪く、作成した細胞に対してグルコース応答性や糖尿病マウスに対する治療効果などといった機能的評価が困難であった。そのような中で一つのブレイクスルーとなったのが、先述した ES 細胞からの正常発生に沿った内胚葉細胞分化誘導法の確立である。これらの報告により ES 細胞から胚性内胚葉を介して膵臓細胞を分化誘導できることが示唆され、膵β細胞を誘導する方法の確立についても期待が高まった。

2006 年、D'Amour らはヒト ES 細胞を用いて膵β細胞を分化誘導する方法を報告し、注目を集めた<sup>31</sup>。同方法では試験管内培養条件下に加える液性因子の組み合わせを変えることで、ES 細胞から胚性内胚葉、膵臓前駆細胞、インスリン産生細胞を正常発生に沿った形で誘導できることを示している。しかし、出

現するインスリン産生細胞は糖応答能に乏しいことも示されており、臨床応用へ向けての課題を残した。彼らは論文中でこの問題に対し、グルコースへの応答性は胎児が生まれてから獲得する機能であり、得られたインスリン産生細胞は完全に成熟しておらず、胎児期の膵β細胞に近いと説明している。これを受けて 2008 年、同グループの Kroon らはヒト ES 細胞から誘導した未熟な膵臓内胚葉細胞をマウスに移植すると、生体内で成熟化が促され、糖応答能を有する膵β細胞が分化誘導されることを報告した<sup>32</sup>。同報告は未分化な膵臓細胞を成熟化させる方法として、生体内の環境が適していることを示した点でも非常に重要である。

当研究室では ES 細胞から膵臓への分化誘導法を確立するにあたり、胚発生期における膵臓の発生機構に着目した。膵臓の発生、分化には隣接する中胚葉からの誘導が重要である事が知られている。我々はこの点に注目し、中胚葉由来の細胞株と ES 細胞を共培養することで膵臓を誘導できないかと考えた。複数の中胚葉由来細胞株をスクリーニングした結果、マウス胎仔中腎由来の細胞株である M15 細胞に膵臓の前駆細胞を誘導する能力があることを見出した<sup>6</sup>。我々は M15 細胞による膵臓分化メカニズムの解明を目的として、マイクロアレイ解析および液性因子の添加実験による検討を行った。まず ES 細胞から膵臓系譜への分化誘導過程を初期（中内胚葉分化）、中期（内胚葉分化）および後期（膵前駆細胞への分化）の三段階に分類して、各段階でどのようなシグナルが働いているかを検討した。分化初期では、まず FGF が ES 細胞を未分化状態から分化状態へ移行させ、つぎにアクチビンが中内胚葉分化を促進しつつ、外胚葉分化を阻害していた。さらに中期では、アクチビンおよび FGF は中内胚葉から内胚葉分化を、BMP は中胚葉分化を正に制御することがわかった。分化後期の膵臓内胚葉への分化時期ではアクチビン・FGF・レチノイン酸が分化を正に制御していることを明らかにした。また、我々はトランスフィルターを用いた支持細胞無しの分化誘導についても検討した。この条件下では膵臓細胞への分化が著しく阻害され、これに対して固定した M15 細胞は膵臓への分化誘導を維持していた。これらの結果から、M15 細胞により形成される基底膜構成成分の中に膵臓分化を促す因子が存在する事が示唆された。最終的に、M15 細胞との共培養と液性因子（アクチビン・FGF）の添加とを組み合わせることより、全細胞の約 30%を膵前駆細胞に分化誘導することに成功した。得られた膵前駆細胞はマウス腎皮膜下への移植により、膵臓を構成するすべての細胞へ分化すること

を確認している。

## 5. 目的

### ・ M15 細胞を用いた三胚葉系譜への分化誘導

当研究室で確立されたマウス胎仔中腎由来の細胞株である M15 細胞を用いた ES 細胞の分化誘導法は、膵や肝といった領域特異的な腸管内胚葉の細胞を分化する事の出来る、汎用性の高い系である<sup>5, 6</sup>。本分化誘導条件下において、ES 細胞は中内胚葉から胚性内胚葉を経て、最終的に肝や膵などの領域特異的な内胚葉細胞へと、正常発生に沿って分化する。これを促すシグナル群を詳細に解析した結果、先ず、ES 細胞は FGF の刺激 (ERK シグナル系の活性化) により、未分化状態から脱却する。続いて、アクチビン、p38 MAPK シグナルが中内胚葉と神経外胚葉系譜への分化を分岐させる。中内胚葉はアクチビンにより胚性内胚葉系譜、BMP により中胚葉系譜へとそれぞれ分化する。bFGF とアクチビンによって胚性内胚葉分化が亢進される事を突き止め、神経外胚葉系譜、中胚葉系譜への分化についても、これに関わるシグナル群が明らかになった。これらの結果から、当初 ES 細胞から内胚葉系細胞を分化誘導するという活性を有することで M15 細胞に注目したが、M15 細胞は内胚葉特異的に誘導する活性を示すというよりは、三胚葉の細胞を分化誘導する活性を有することが示唆された。本研究では、M15 細胞を用いて誘導された神経外胚葉系譜、中胚葉系譜の細胞について、試験管内の条件下で成熟化する能力を有しているかについて検討を行った。また、ES 細胞から誘導した三胚葉の細胞における、DNA マイクロアレイによる詳細な遺伝子発現解析を行った。

### ・ 擬似基底膜を用いた新規膵分化誘導法の確立

トランスフィルターを用いた分化誘導実験、また、固定した M15 細胞を用いた分化誘導実験の結果より、膵臓分化の誘導には M15 細胞により形成される細胞膜上に存在する分子が重要である事が示唆された。そのため、基底膜成分に焦点を絞って、膵臓の分化誘導におけるその役割について研究を進めた。基底膜は上皮細胞下に存在する、他の器官や結合組織を隔てている薄いシート上の膜構造である。その構造は細胞外マトリックス分子が高度に集積することで形成されており、主な構成分子としてIV型コラーゲン、ラミニン (Laminin, LN)、エンタクチン/ニドゲン、パールカン (Perlecan/Heparan sulfate proteoglycan

2, Hspg2) が知られている<sup>33</sup>。最新のモデルによると、基底膜はIV型コラーゲンのネットワークに LN ネットワークがエンタクチンを介して連結される事により形成される。基底膜は上皮細胞の足場となって細胞の接着や移動に関与するだけでなく、その構造中に多様な分泌因子をトラップする事により、周囲の細胞の増殖や分化などにも影響を与えている<sup>34, 35</sup>。以前、我々の共同研究者である持立克身博士のグループが、試験管内において不死化2型肺胞上皮細胞 (SV40-T2) とマトリゲルを共培養する事で基底膜を作製し<sup>36</sup>、この新規基層である擬似基底膜 (synthesized basement membrane, sBM) 上において気管原基細胞を繊毛細胞へと終分化させる方法を報告している<sup>37</sup>。

本研究において、我々は sBM を用いた方法が膵臓分化誘導法として有効であるかを示した。また、基底膜のもつ分化誘導メカニズムを明らかにするために、各種基底膜構成因子の発現抑制実験を行い、膵臓の領域化と基底膜との関わりについて検討を行った。

## 実験方法

### 1. マウス ES/iPS 細胞株

*Pdx 1*/GFP ES 細胞株、SK7 は *Pdx1* プロモーター下に *GFP* を導入した組み替え遺伝子をホモで持つ遺伝子組み換えマウス<sup>38</sup> の胚盤胞より樹立した。また *Insulin1*/GFP ES 細胞株、ING112 は *Insulin1* プロモーター下に *GFP* を導入した組み替え遺伝子をホモで持つ遺伝子組み換えマウス<sup>39</sup> の胚盤胞より樹立した。マウス iPS 細胞株の 20D-17 細胞<sup>40</sup> は京都大学、山中伸弥先生の研究室より供与された。各 ES 細胞及び iPS 細胞は下記の培地を用いて、マウス繊維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 上で培養した。

#### 【ES 細胞維持培地】

Glasgow minimum essential medium (GMEM)	(Invitrogen)
15% Knock-out serum replacement (KSR)	(Invitrogen)
1% Fetal bovine serum (FBS)	(Hyclone)
100 µM nonessential amino acids (NEAA)	(Invitrogen)
2 mM L-glutamine (L-Gln)	(ナカライ)
50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin	(ナカライ)
1 mM sodium pyruvate	(Invitrogen)
100 µM β-mercaptoethanol (2-ME)	(Sigma)
1000 units/ml leukemia inhibitory factor (LIF)	(Chemicon)

#### 【iPS 細胞維持培地】

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	(Invitrogen)
15% FBS	
100 µM NEAA	
2 mM L-Gln	
50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin	
100 µM 2-ME	
1000 units/ml LIF	

### 2. 細胞株

マウス胎仔中腎由来細胞株、M15 細胞は野瀬俊明博士 (三菱化学生命科学研究所) および Dr. M. Rassoulzadegan (University of Nice-Sophia Antipolis)、



OP9 は西川伸一博士（理化学研究所、発生・再生科学総合研究センター）、PA6 は笹井芳樹博士（同所属）から供与された。ウイルス作製用の細胞株 LinX、と 293FT についてはそれぞれ Open Biosystems、Invitrogen より購入した。各細胞は下記の培地で培養した。M15 細胞はコンフルエントになるまで培養し、マイトマイシン C (Sigma) 処理 (200 µg/ml、37°C、2.5 時間) したものを分化実験に用いた。分化誘導前日にゼラチンコートしたプレート中に、6 well プレートの場合  $8 \times 10^5$  cells/well、24 well プレートの場合  $2 \times 10^5$  cells/well の濃度でそれぞれ播いた。擬似基底膜の作製に用いた hLN-293 細胞は土井正行博士、Dr. Karl Tryggvason (Karolinska Institute, Sweden) から供与された。

【細胞株用培地】

DMEM high-glucose (4500mg/ml)

10% FBS

2 mM L-Gln

50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin

### 3. 液性因子

各種液性因子は以下の濃度で使用した。

液性因子	購入元	使用濃度
Recombinant human activin-A	R&D Systems Ins., Minneapolis	20 ng/ml→胚性内胚葉 100 ng/ml→中内胚葉
Human bFGF	Peprotech, Rocky Hill, NJ	50 ng/ml
Recombinant human BMP7	R&D systems Ins.	25 ng/ml
SB203580;	Lonza	10 nM
Retinoic acid (RA)	Sigma-Aldrich	1 µM
Nicotinamide (NA)	Sigma-Aldrich	10 mM
Glucagon-like peptide (GLP1)	Sigma-Aldrich	10 nM
Heparitinase	生化学バイオビジネス	3.5 mU/ml

### 4. M15 を用いた分化誘導

- ・ 内胚葉、腭前駆細胞培養

分化実験に用いる ES、iPS 細胞は MEF 上で培養した後、0.25%

Trypsin-EDTA を用いて解離させる。トリプシン反応後、血清含有培地で反応停止の後、4°C、1000 rpm の遠心によって細胞を回収する。回収した細胞は分化用培地で再懸濁した後、24 well プレートの場合 5000 cells/well、6 well プレートの場合 20000 cells/well の濃度で、マイトマイシン C 処理済み M15 細胞を播き込んでおいたプレートに播く。分化培地の詳細は下記に記す。長期培養（図 4, M15 d28）の際には、培養 13-28 日目において、後述する sBM 用分化培地 3 を用いて培養した。

【分化培地】

DMEM high-glucose (4500mg/ml)

10% FBS

100  $\mu$ M NEAA

2 mM L-Gln

50 units/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml streptomycin

100  $\mu$ M 2-ME

20 ng/ml Activin A

50 ng/ml bFGF

・ 神経分化

神経分化を誘導する培地として、MAPK 阻害剤である SB203580 (Calbiochem, San Diego) を 10nM の濃度で添加した分化培地を使用した。培養 5 日目の時点で、培地を NeuroCult™ NSC proliferation medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC) に変更し、20 日目まで培養を継続した。培地交換は 1 日おきに行った。

・ 中胚葉分化

分化培地として BMP7 を 25ng/ml の濃度で添加した分化培地を使用した。脂肪細胞への分化には、培養 8 日目の時点から誘導培地から維持培地に切り替える処理を、3 回繰り返した。誘導培地には Adipogenic Induction Medium (Lonza, Basel, Switzerland)、維持培地には Adipogenic Maintenance Medium (Lonza) をもちいて、誘導培地で 3 日間、維持培地で 2 日間のサイクルを繰り返した。分化した細胞は固定後、60%イソプロパノールで室温 1 分間処理した後、Oil red O solution (Sigma-Aldrich) で室温 15 分間処理して解析を行った。

骨分化では、培養 8 日目の時点で培地を Osteogenesis Induction Medium (Lonza) に切り替え、その後 12 日間培養した。培地交換は 1 日おきに行った。骨誘導細胞は固定後、1%の alizarin red S solution (Sigma-Aldrich) で室温 2 分間処理し、カルシウムの沈着を染色した。

## 5. sBM の作製

sBM は 6 well プレート用セルカルチャーインサートと PET porous membrane (ポアサイズ 3  $\mu\text{m}$ 、BD, #3091) を用いて作製した。まず I 型コラーゲンの硬質マトリックスである繊維状コラーゲン基層、“Fib”を porous membrane に準備する。次に Fib を styrene-maleic anhydride hydrophobic copolymer (MAST)と共有結合する oligo-N-acetylglucosamine (GlcNAc)<sub>n</sub>によって、10-20  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で一晩培養することでコートする。GlcNAc 及び MAST を Fib に取り込ませた後、余剰分の GlcNAc-MAST 分子を洗い流す目的で、DMEM で数時間処理する。ここに hLN10-293 細胞を  $9.6 \times 10^6$  cells/well の濃度で播き込み、1%の FBS と 0.2 mM の ascorbate-2-phosphate (Sigma) を添加した DMEM を用いて 2 週間培養する。培養終了後、50 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$  と 0.1% Triton X-100、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む D-PBS(-)で処理して細胞を除去し、これを rLN10-sBM とする。新規作成した rLN10-sBM は保存液に浸した状態で  $-75^\circ\text{C}$  で凍結させ、使用日の前日に  $4^\circ\text{C}$  で融解して用いた。

## 6. sBM を用いた分化誘導

先述の通り、sBM は使用前日より  $-75^\circ\text{C}$  から  $4^\circ\text{C}$  に移し、一晩かけて融解させる。ES、iPS 細胞は M15 分化誘導法の際と同様に準備し、10,000 cells/well で sBM 上に播き込む。使用する培地の概要は図 3 A と以下に記載する。ヘパリチナーゼ処理の際には、ES 細胞を播く前の 3 時間と、分化 10-15 日目の期間において 3.5 mU/ml のヘパリチナーゼを培地中に加える事で行った。

### 【sBM 分化培地 1 (培養 1-10 日目)】

DMEM high-glucose (4500mg/ml)

2.5 mg/ml ALBUMAX II (Invitrogen)

Insulin-Transferrin-Selenium-G Supplement (ITS) (Invitrogen)

※10 mg/L insulin , 5.5 mg/L transferrin, 6.7 mg/ml sodium selenite

100  $\mu\text{M}$  NEAA

2 mM L-Gln

50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin

100 µM 2-ME

20 ng/ml Activin A

50 ng/ml bFGF

【sBM 分化培地 2 (培養 10 - 13 日目)】

sBM 分化培地 1 + 1µM retinoic acid

【sBM 分化培地 3 (培養 13 - 28 日目)】

DMEM low-glucose (1000mg/ml) (Invitrogen)

2.5 mg/ml ALBUMAX

ITS

100 µM NEAA

2 mM L-Gln

50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin

100 µM 2-ME

10 mM nicotinamid

10nM GLP1

## 7. ノックダウン実験

M15 細胞における *Laminin a5* (*Lama5*) のノックダウン実験は、これに対する shRNA の発現ベクターを導入する事によって行った。ノックダウン細胞の作製にはネガティブコントロール用の Expression Arrest™ Non-silencing control shRNA (Open Biosystems, #RHS1707)、もしくは *Lama5* shRNA (Open Biosystems, # RMM1766-96742027) レトロウィルスベクターを使用した。公開されている企業のプロトコルに従い、トランスフェクション前日にレトロウィルスパッケージング用の LinX 細胞 (Open Biosystems) をプレートに播き、その翌日に Arret-In Transfection Reagent (Open Biosystems) を用いてウィルスベクターのトランスフェクションを行った。24 時間後、ウィルスを含んだ培養上清を回収し、ここに 4 µg/ml のポリブレン (Sigma) を加えて M15 細胞に感染させた。感染後 24 時間で培地を交換した後、1.5 µg/ml の puromycin で薬剤選抜を行い、耐性となった感染細胞を実験に使用した。

*Integrin β1* (*Itgb1*) の抑制実験では、レンチウィルスによる shRNA 発現系を利用した。この際、ネガティブコントロール用の Expression Arrest™

Non-silencing control shRNA (Open Biosystems, #RHS4080)、もしくは *Itgb1* shRNA (Open Biosystems, #RMM3981-97055034) レンチウイルスベクターをそれぞれ使用した。ウイルス作製に用いた 293-FT 細胞 (Invitrogen) はトランスフェクション前日にプレートに播き、翌日、レンチウイルスベクターと ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen) を FuGENE6 Transfection Reagent (Roche) を用いて導入した。翌日、培地を sBM 分化誘導用培地 2 に変更し、この 24 時間後にウイルスを含む培養上清を回収したのち、分化細胞への感染実験を行った。実験過程において、未感染細胞の除去を目的として培養 13-15 日目にかけて 1.5 µg/ml の puromycin による薬剤選抜を行った。

*Heparan sulfate proteoglycan 2 (Hspg2)* の抑制実験では、*Lama5* の際と同様、レトロウイルスによる shRNA 導入系を使用した。ネガティブコントロールベクターには *Lama5* で用いたものと同じベクターを使用し、これと *Hspg2* shRNA (Open Biosystems, #RMM1766-98467532) レトロウイルスベクターを使用し、作製したウイルスを SK7 ES 細胞に感染させた。ウイルスの調整及び感染については *Lama5* ノックダウン M15 細胞の作製と同様の方法で行った。薬剤選抜後、生き残った細胞を株化して *Hspg2* の発現抑制効果をそれぞれ確認し、実験に使用した。

## 8. 腎被膜下への移植

培養 28 日目に sBM 上で培養した細胞を 0.25% trypsin-EDTA によって解離し、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-coated 24-well dish (Nunc) 中に  $5 \times 10^5$  cells/well で播き込んで一晩培養する。翌日、浮遊細胞を遠心して回収し、2.1 mg/ml コラーゲンゲルに  $5 \times 10^5$  cells/10 µl の濃度で再懸濁する。コラーゲンゲルは Cellmatrix® Type I-A collagen kit (Nitta Gelatin) を用いて、プロトコルに沿って調整した。調整した細胞懸濁液 10µl を 1 匹の C.B-17/Icr-scid/scid Jcl マウス腎被膜下に 29G インスリンシリンジ (BD) を用いて注射した。4 週間後、レシピエントマウスを頸椎脱臼し、移植片を腎臓より回収した。回収後の移植片は RNA を抽出して RT-PCR 解析を行う他、4% Paraformaldehyde (PFA) を用いて固定し、凍結切片作製のサンプルとした (下記参照)。

## 9. RT-PCR

RNAの抽出はRNeasy® Micro/Mini Kit (Qiagen) を用いて、プロトコルに従って行った。逆転写には抽出後の RNA、3µg を使用し、Oligo dT primers (Toyobo) 及び ReverTra Ace (Toyobo) を用いて 20µl の系で cDNA を合成した。得られた cDNA を 10 倍希釈後、その 1µl を PCR 反応の鋳型として使用した。使用したプライマーの配列については Table. 6 に記載した。PCR 産物の 5 分の 1 を 5% PAGE で分離し、DNA は SYBR Green I (Molecular Probes) で染色し、Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) で検出した。

### 【PCR 反応条件 1】

熱変性反応	96°C	30 秒
アニーリング	60°C	2 秒
伸長反応	72°C	45 秒

### 【PCR 反応条件 2 ( $\beta$ -actin, *Ins1*)】

熱変性反応	96°C	30 秒
アニーリング、伸長反応	68°C	45 秒

Real-time PCR には Thunderbird™ SYBR® qPCR mix (Toyobo) を使用した。解析には 7500 Fast リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を使用し、データは 7500 Fast System SDS software (Applied Biosystems) を用いて取得した。反応条件はいずれも熱変性 95°C、3 秒→アニーリング及び伸長 60°C、30 秒の 40 サイクルで行い、各発現量の値はスタンダードカーブ法に基づいて決定した。

## 10. 免疫細胞化学、免疫組織化学的解析

免疫細胞化学で評価する際は、支持細胞及び ES 細胞をゼラチンコートした Nunc Thermanox cover slips 24 well type (Nunc) 上で培養した。細胞を PBS で洗浄後、4% PFA を用いて室温で 30 分間固定し、下記の抗体を用いて染色した。

免疫組織化学で評価する際は、回収した移植片は細切して PBS 洗浄後、4% PFA を用いて 4°C で一晩インキュベートする。翌日 PBS で洗浄後、15% スクロース/PBS で 4°C、一晩インキュベートした後、更に 30% スクロース/PBS で 4°C、一晩インキュベートする。翌日、移植片は OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン) を用いて包埋した。これより凍結切片を作成した後、

各種抗体での染色を行った。各抗体の情報は下記を参照。

染色の際、全ての切片は DAPI (Roche) を用いて核染色を行った。画像は Leica Spectral Confocal Scanning System, TCS-SP2 (Leica) を用いて取得した。

【一次抗体 (希釈濃度、購入元)】

Mouse anti- $\alpha$ -actin (Sigma-Aldrich)

Goat anti-Amylase (x100 Santa Cruz Biotechnology; SCB)

Mouse anti- $\beta$ III-tubulin (Sigma-Aldrich)

Guinea pig anti-C-peptide (x1000, Linco)

Biotin-conjugated *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA) lectin (x100, Sigma)

Rabbit anti-GFAP (Dako, Glostrup, Denmark)

Rabbit anti-GFP (x1000, MBL)

Mouse anti-Glucagon (x1000, Sigma)

Mouse anti-insulin (x1000 Sigma)

Rabbit-MafA (x1000, Abcam)

Mouse anti-myosin (Sigma-Aldrich)

Mouse anti-Nkx6-1 (x1000, Hybridoma bank)

Mouse anti-O4 (Chemicon)

Rabbit anti-pancratic polypeptide (x100, Dako)

Rat anti-PECAM-1 (BD Pharmingen, San Diego)

Goat anti-Somatostatin (x100, SCB)

Mouse anti-TH (Sigma-Aldrich)

【二次抗体】

Alexa 488, 568 or 633-conjugated antibodies (x1000, Molecular Probes)

フローサイトメトリーに用いた抗体については、次項を参照。

## 11. フローサイトメトリー解析

sBM 上での培養 15 日目における *Pdx1*/GFP 陽性細胞検出の際には分化細胞を 0.25% trypsin-EDTA で処理し、解離した。細胞は 1% FBS 及び propidium iodide を含む Hanks buffered salt solution (Sigma) に再懸濁した後、40  $\mu$ m メッシュを用いて濾過し、解析用のサンプルとした。

抗体染色を伴うフローサイトメトリー解析の際には、細胞を Cell Dissociation

Buffer (Invitrogen) で 37°C、20 分間処理して剥がし、 $1 \times 10^6$  cells/50 $\mu$ l の濃度に調整して抗体染色を行った。使用した抗体を以下に記す。

Biotin-conjugated anti-E-cadherin (BD)

Phycoerythrin-conjugated anti-CXCR4 (BD)

Biotin-conjugated anti-platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  (BD)

Phycoerythrin-conjugated anti-Flk1 (BD)

Phycoerythrin-conjugated anti-SSEA1 (R&D systems)

Streptavidin-allophycocyanin (BD)

サンプルは FACS Canto (Becton Dickinson) (Becton Dickinson) 用いて解析し、データは BD FACSDiva Software (Becton Dickinson) を用いて取得した。細胞の純化には FACS Aria (Becton Dickinson) を使用した。得られたデータの解析には Flowjo program (Tree Star) を使用した。

## 12. マイクロアレイ解析

未分化 ES 細胞、ES 細胞由来 4 日目中内胚葉 (E-cadherin + /PDGFR $\alpha$  + /CXCR4 -)、5 日目胚性内胚葉 (E-cadherin + /PDGFR $\alpha$  - /CXCR4 +)、側板中胚葉 (E-cadherin - /PDGFR $\alpha$  - /Flk1 +)、沿軸中胚葉 (E-cadherin - /PDGFR $\alpha$  + /Flk1 -) および神経外胚葉細胞 (SSEA1 - /PDGFR $\alpha$  - /Flk1 -) より抽出した cDNA はビオチン化し、MOE430 2.0 series probe array (GeneChip, Affimetrix, Santa Clara, CA) を用いてハイブリダイズさせた。各プローブの蛍光強度は GeneChip Analysis Suite 5.0 computer program (Affymetrix) を用いて定量化した。標準化した各アレイの結果を GeneSpring GX program, version 7.3 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, <http://www.agilent.com>) によって解析した。

## 13. インスリン含有量測定

移植片内におけるインスリン含有量の測定はレビスマウスインスリン S キット (WAKO) を用いて、添付のプロトコルに従って行った。回収した移植片、もしくはコントロールの脾臓は 75% EtOH /0.15 M HCl (Acid/EtOH) 中でホモジナイズし、4°C で 24 時間静置する。15 分間の遠心後、上清を抽出液 1 とし、-80°C で保存した。残ったペレットに Acid/EtOH を再度加え、同様の操作を繰り返したものを抽出液 2 とし、抽出液 1 及び 2 を測定用サンプルとした。



## 実験結果

### 1. マウス ES 細胞を用いた三胚葉系譜への分化誘導

#### ・ ES 細胞の神経外胚葉、中胚葉系譜への分化誘導

我々は M15 細胞を支持細胞として用いた分化誘導法として、ES 細胞より内胚葉を経て腭臓、もしくは肝臓系譜の細胞を効率的に誘導する方法を報告している<sup>5,6</sup>。この ES 細胞分化誘導系において、M15 細胞上の ES 細胞は三胚葉の全ての細胞に分化できる能力を有している。図 1 A に分化誘導の概要と、その際に添加する液性因子について記す。中内胚葉、もしくは胚性内胚葉細胞はアクチビン及び bFGF の添加によって効率的に誘導される。p38 MAPK 阻害剤である SB203580 は神経外胚葉への分化を誘導する。BMP7 はアクチビンと競合し、中胚葉への分化を促進する。

フローサイトメトリー解析によって、それぞれの条件で分化誘導した中内胚葉、胚性内胚葉、中胚葉及び神経外胚葉細胞の定量を行った (図 1 B)。アクチビンと bFGF の添加により、培養 4 日目の時点で E-cadherin + /PDGFR $\alpha$  + の中内胚葉細胞<sup>41</sup>は、5%から 18%へと増加した。同様に、培養 5 日目の時点で E-cadherin + /CXCR4 + の内胚葉細胞<sup>29</sup>は、11%から 52%へと増加した。しかし、同条件下では、E-cadherin - /PDGFR $\alpha$  + /Flk1 - の沿軸中胚葉 (Paraxial mesoderm; PAM)、E-cadherin - /PDGFR $\alpha$  - /Flk1 + の側板中胚葉 (Lateral plate mesoderm; LPM)<sup>42</sup>の減少が観察された。BMP7 の添加は PAM および LPM の割合を 18%から 51%へと増加させるが、胚性内胚葉の割合は 4%へと減少した。*Sox1* プロモーター下で GFP を発現する ES 細胞<sup>43,44</sup>を用いて、神経外胚葉への分化を定量した。SB203580 を添加した結果、5 日目における *Sox1*/GFP 陽性神経外胚葉細胞は 3%から 81%へと増加した。この *Sox1*/GFP 陽性細胞は SSEA1 - /Flk1 - /PDGFR $\alpha$  - の分画に 95%が濃縮されていた。これらの結果は、培養条件の調整により ES 細胞の三胚葉への分化が高効率で誘導されている事を意味する (図 1 C)。

#### ・ 神経への分化

分化誘導した各胚葉の細胞におけるマーカー遺伝子の発現を、RT-PCR により解析した (図 1 D)。オーガナイザーのマーカーである *Foxa2*、*Gsc* の発現は

アクチビン、bFGF 条件で誘導した細胞のみで確認された。対して、中胚葉マーカーである *Flk1*、*Tal1* の発現は BMP7 条件のみで確認された。神経外胚葉マーカーの *Pax6*、*Zic1* は SB203580 条件のみで観察され、これらの結果はそれぞれの条件において各胚葉の細胞が効率的に誘導されている事を示している。

次に、上記条件で誘導した神経外胚葉細胞において、前後軸、もしくは背腹軸に沿って特異的に発現する各種神経細胞マーカーの発現を解析した<sup>45</sup> (図 2 A, B, C)。その結果、*Fozg1*、*Otx1*、*Gsh2*、*Dlx2* といった前脳から中脳にかけてのマーカー、*Pax2*、*Hoxb1*、*Hox2*、*Hoxb4* などの後脳マーカー、*Hoxc4*、*Hoxc6* などの頭側脊髄マーカーの全ての発現を確認した。また、背側マーカーである *Pax3*、*Pax6*、*Pax7* や腹側前脳マーカーの *Nkx6.1*、*Olig2*、*Nkx2.2*、神経堤細胞マーカーの *Slug* についてもそれぞれ発現が確認された。これらの結果は、本法によって誘導した神経外胚葉細胞中には、前後、背腹軸にかけて非常に広範囲の細胞が誘導されている事を示唆している。

続いて、誘導した細胞の各神経細胞への分化能を解析した。培養 5 日目の時点で培地を NeuroCult™ NSC proliferation medium に切り替え、20 日目まで培養した。免疫細胞化学染色による解析の結果、培養 5 日目には初期の  $\beta$ III-tubulin 陽性分裂終了細胞が出現し、8 日目にかけて増加していた (図 2 D)。Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性のアストロサイト (図 2 E)、O4 陽性のオリゴデンドロサイト (図 2 F) も出現し、Tyrosine-hydroxylase (TH) 陽性カテコールアミン (ドーパミン) 神経についても培養 14 日目において観察された (図 2 G)。これらの結果は M15 細胞が、ES 細胞からアストロサイトやオリゴデンドロサイト、ドーパミン神経などへの分化能を有する神経前駆細胞への誘導を促進している事を示唆している。

#### ・ 中胚葉系譜への分化

BMP7 添加によって中胚葉系譜への誘導を促した細胞における、各種マーカー遺伝子の発現解析を行った (図 3 A)。RT-PCR 解析の結果、LPM マーカーである *Kdr*、*Tal*、*Vecd*、*Pdgfra*、*Pdgfrb*、*Pecam* の発現が確認され、血管前駆細胞の特性を持つ細胞が誘導されている事が示唆された。*Fst*、*Mesp2*、*Msx1* の発現も同様に確認され、PAM の分化を示唆している。また、心臓前駆細胞のマーカーである *Acta1*、*Hand1* 及び *Hand2* の発現も確認できる。免疫細胞化学染色による解析の結果、同条件下で誘導した細胞において Myosin 陽性、

$\alpha$ -actin 陽性の筋細胞、Platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM) 陽性の血管細胞の出現を確認した (図 3 B)。

続いて、誘導した中胚葉細胞の分化能を確認するため、脂肪細胞、骨細胞への分化をそれぞれ試みた<sup>46, 47</sup>。その結果、培養 20 日目の時点において Alizarin red S 陽性骨細胞 (図 3 C)、Oil red O 陽性脂肪細胞 (図 3 D) への分化がそれぞれ観察された。骨細胞への誘導を行ったサンプルでは *Spp1*、*Bglap1*、*Bglap2* などの特異的なマーカー遺伝子の発現も観察された (図 3 E)。

### ・ ES 細胞由来各種前駆細胞の純化、解析

ES 細胞由来の各種胚葉細胞をフローサイトメーターによってそれぞれ純化し、マイクロアレイによる解析を行った。細胞表面抗原の発現を指標として、以下のように各胚葉の細胞を分取した。

細胞分画	表面抗原	培養条件
中内胚葉細胞	4 日目、E-cadherin + /PDGFR $\alpha$ + /CXCR4	100 ng/ml Activin 50 ng/ml bFGF
胚性内胚葉細胞	5 日目、E-cadherin + /PDGFR $\alpha$ - /CXCR4 +	20 ng/ml Activin 50 ng/ml bFGF
LPM	5 日目、E-cadherin - /PDGFR $\alpha$ - /Flk1 +	25 ng/ml BMP7
PAM	5 日目、E-cadherin - /PDGFR $\alpha$ + /Flk1 -	5 ng/ml BMP7
神経外胚葉細胞	5 日目、SSEA1 - /PDGFR $\alpha$ - /Flk1 -	10 nM SB203580

図 4 A に ES、中内胚葉、神経外胚葉及び PAM 系譜のそれぞれにおいて強発現されている遺伝子のクラスタリング解析結果を示す。ES と中内胚葉ではオーバーラップが見られるのに対して神経外胚葉と PAM では異なる発現プロファイルを示しており、それぞれの分化段階を明確に表している。図 4 B には代表的な各胚葉特異的遺伝子の発現を示しており、それぞれに対応している事が分かる。図 4 C のベン図には神経外胚葉、PAM、LPM のそれぞれにおいて、ES と比較して 10 倍以上発現の低い遺伝子の分布を示している。このうち、109 遺伝子については ES 細胞の分化に伴い、共通して発現が低下しており、未分化な ES 細胞において特異的に発現していることを示している (Table. 1)。多分化能の維持に関連する *Klf4*、*Nanog*、*Pou5f1/Oct3/4* や、*Fgf4*、*Fbxo15*、*ecat5/Eras*、

*Zfp296*, *Zfp42/rex1*, *Utf1*, *Nr0b1/Dax-1*, *Rex2*などもこれに含まれる<sup>48</sup>。

ESと比較して、中内胚葉では64遺伝子の発現が10倍以上上昇している (Table. 2)。ノードやオーガナイザーでの発現が確認されている *Fgf8*, *Foxa2*, *Gsc*, *Otx2* などがここに含まれる。他にも、*Fgf5*, *Cer1*, *Eomes*, *Sox17*, *T* などの初期オーガナイザーで発現する遺伝子や、*Dkk1*, *Wnt8b*, *Lhx1*, *Frzb*, *Amot*, *Bmp2* などの背腹、前後軸を形成する遺伝子についても、ここに含まれている。

図4Dに示すベン図には5日目の各胚葉において10倍以上発現が上昇している遺伝子の分布を示している。神経外胚葉において149遺伝子、PAMで140遺伝子、LPMで85遺伝子、PAM及びLPMで共通に上昇しているものが76遺伝子、神経外胚葉、PAM及びLPMで共通に上昇しているものとして32遺伝子が確認された。

神経外胚葉において発現が上昇している遺伝子をリストアップしたところ、*Zic1*, *Hes5*, *Asxl1*, *Pax6* などの神経発生に関わる遺伝子と同様に、*Neurog1*, *Neurod4*, *Dll1*, *Dtx4* など Notch シグナルに関わる遺伝子についても抽出された (Table. 3)。ここには Sox ファミリー遺伝子のような神経関連遺伝子や、*Hoxa2*, *Hoxa3*, *Hoxb4*, *Hoxc4* などの前後軸特異的に発現する遺伝子、*Pax3*, *Pax6*, *Pax7* のような背腹軸特異的に発現する遺伝子も含まれている。

PAMで特異的に発現が上昇している遺伝子としては *Pdgfra* や *Pdgfrb*, *Msx1*, *Runx2*, *Twist2*, *Tbx4*, *Tbx20* などがリストアップされる (Table. 4)。*Hoxa10*, *Hoxl1*, *Hoxb6*, *Hoxc10*, *Hoxd1* など PAM の前後軸に沿って発現するマーカーや、*Hand1*, *Dok4*, *Collagen* についてもここに含まれる。LPMで発現が上昇しているものとしては、*Evx1*, *Flt1*, *Flt4*, *Tel*, *Kdr*, *Tal1* などの血管形成に関わる遺伝子や、*Klf7*, *Mixl1*, *Foxc2*, *Eomes*, *Claudin5*, *snai2*, *Vav3* などがリストアップされる (Table. 5)。

## 2. 擬似基底膜を用いた新規膵分化誘導法の確立

### ・ M15 からの膵前駆細胞誘導は Lama5 を介して行われる

以前、我々は M15 細胞が ES 細胞を内胚葉、膵前駆細胞へと分化誘導する能力がある事を報告した<sup>6</sup>。固定した M15 細胞はその誘導能を維持しており、M15 細胞によって形成される細胞外マトリックスに分化誘導を促す能力がある事が示唆されていた。そこで、M15 細胞中で発現している基底膜構成成分を詳細に解析したところ、*laminin α5 (Lama5)* が高レベルで発現している事を見出した (図 5 A)。その発現量は OP9、PA6 といった内胚葉誘導能を持たない、他の支持細胞と比較しても非常に高い値を示している (図 5 B)。ラミニンは主要な基底膜構成因子の一種であり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖により構成される三量体の糖タンパク質である。特に、*Lama5* は初期胚の基底膜構成成分に多く含まれ、成体膵島内の血管細胞においても発現する事が知られている<sup>49</sup>。これらの事項をふまえ、我々は M15 細胞からの膵臓分化誘導が *Lama5* を介して行われているのではないかと推測し、M15 細胞における *Lama5* のノックダウン実験を行った。*Lama5* ノックダウン M15 細胞 (*Lama5* KD M15) は *Lama5* に対する shRNA を発現するレトロウィルスを、M15 細胞に感染させる事で作製した。Real-time PCR による解析の結果、*Lama5* KD M15 における *Lama5* の発現は、ネガティブコントロール用のレトロウィルスを感染させた M15 細胞 (Non-silencing M15, NS M15) に比べて減少していた (図 5 C)。これらの細胞上に *Pdx1* 発現下で GFP を発現するマウス ES 細胞株、SK 7 を播き、培養 8 日目に出現する E-cadherin & CXCR4 両陽性胚性内胚葉細胞と *Pdx1*/GFP 陽性細胞の割合を、フローサイトメーターを用いて解析した。その結果、*Lama5* KD M15 上で培養した細胞では、胚性内胚葉の割合には変化がないものの、*Pdx1*/GFP 陽性細胞の割合が著しく減少した (図 5 D, E)。これらの結果より、M15 細胞で発現される *Lama5* は、胚性内胚葉から膵臓細胞への領域化に関与している事が示された。

### ・ sBM 上において、ES 細胞は胚性内胚葉へと分化する

M15 細胞を用いた分化実験の結果より、基底膜の構成成分が膵臓の分化に深く関わっている事が明らかになった。このことより、基底膜を含む細胞外環境を試験管内に再現する事が出来れば、支持細胞を必要としない、新規の膵臓分化誘導系を確立できると予測した。そこで共同研究者である持立克身博士のグ

ループが報告した擬似基底膜 (synthesized basement membrane, sBM) に着目した<sup>36,37</sup>。sBM はヒトの Lama5、 $\beta 1$  及び  $\gamma 1$  からなるリコンビナントラミニン 10 (LN10, laminin 511) を過剰発現させた 293 細胞株、hLN-293 細胞<sup>50</sup> を用いて作製される (図 6 A)。まず hLN-293 細胞をカルチャーインサート上に播いて培養し、基底膜を構成させる。この後、細胞を界面活性剤によって除去したものを sBM とし、これに ES、iPS 細胞を播き込んで検討を行った。

先ず胚性内胚葉の分化について検討した。以前の報告でアクチビンと bFGF の添加が胚性内胚葉の分化を促進させる事を見出しており、その効果を期待して sBM 上での培養にも両因子を添加した。培養 8 日目における E-cadherin & CXCR4 両陽性胚性内胚葉細胞の割合をフローサイトメーターによって解析したところ、全分化細胞の 27.6%が胚性内胚葉に分化している事を確認した (図 5 B)。また、他の胚性内胚葉マーカーである *Sox17*、*Foxa2* の発現も上昇しており、これに対して未分化細胞のマーカーである *Pou5f1* (*Oct3/4*) の発現は著しく減少していた (図 6 C)。これらの結果より、マウス ES 細胞は sBM 上において胚性内胚葉へと分化する事が明らかとなった。

#### ・ sBM 上において、ES 細胞は膵臓系譜の細胞へと分化する

次に sBM を用いた膵臓細胞の誘導について検討した。M15 細胞に関する報告において、M15 細胞がレチノイン酸の合成酵素である *Aldh1a1* (*Raldh1*) を高レベルに発現し、更にレチノイン酸シグナルの阻害が膵臓分化を妨げる事を確認していた<sup>6</sup>。以上の結果より、膵臓系譜への誘導にはレチノイン酸シグナルが重要であると考え、培養 10-13 日目の間にレチノイン酸を添加した (図 7 A)。SK7 細胞を用いた検討の結果、*Pdx1*/GFP の発現は培養 10 日目より観察され始め、15 日目の時点でピークに達した (図 7 B)。その時点では *Pdx1* mRNA の発現も検出され (図 7 C)、*Pdx1*/GFP を発現する細胞は全分化細胞の 20.7%を占めていた (図 7 D)。15 日目以降、*Pdx1*/GFP 陽性細胞は凝集していき、培養 28 日目には立体構造を形成していた (図 7 B)。更に、*Insulin1* (*Ins1*) 発現下で GFP を発現するマウス ES 細胞株、ING112 を用いて、膵 $\beta$ 細胞への分化を検討した。*Ins1*/GFP 陽性細胞は培養 26 日目から観察され始め、28 日目にかけて増加していた (図 7 E)。以上の結果より、sBM を用いた培養系は膵前駆細胞のみならず、膵 $\beta$ 細胞の誘導系としても非常に有効である事が示唆された。

sBM 上での培養期間中における膵分化遺伝子の発現を確認するため、RT-PCR による解析を行った (図 8)。レポーター遺伝子の発現に対応し、15 日目には *Pdx1*、28 日目には *Ins1* の発現がそれぞれ確認できる。M15 細胞上で分化させた細胞と各遺伝子の発現を比較すると、他の内分泌 (*Gcg*、*Sst*) や外分泌 (*Amy*、*Ptf1a*) は双方で発現しているのに対し、*Ins1* の発現は sBM 上で培養したサンプルのみで認められた (図 8 A)。未熟な $\beta$ 細胞マーカー (*Neurod1*、*Nkx2-2*、*Pax6*) や成熟 $\beta$ 細胞マーカー (*Nkx6-1*、*Isl1*、*Glut2*、*Iapp*) の発現も確認できるが、その発現レベルは胎生 13.5 日目胎仔膵のそれと比較しても低い (図 8 B)。以上の点から、sBM 上においてマウス ES 細胞は胚性内胚葉、膵前駆細胞を介し、インスリン陽性膵 $\beta$ 細胞へと分化する事が出来るものの、その成熟度は十分ではない事が予想された。我々はマウス iPS 細胞についても同様の検討を行った。結果、培養 16 日目に *Pdx1*、28 日目に *Ins1* の発現が ES 細胞の際と同様に観察され、sBM を用いた培養系が iPS 細胞にも有効である事が示された (図 8 C)。

次に sBM のもつ膵臓分化誘導能のメカニズムに着目した。本研究において、M15 細胞で発現する *Lama5* が内胚葉から膵への領域化に関連している事を示した。加えて、sBM を構成するラミニン 10 はその構成成分として *Lama5* を含んでいる。以上の点から、sBM 中の *Lama5* が膵臓分化を誘導している事を推測した。しかし、ラミニンは基底膜の主要構成成分であり、これを含まない sBM を作る事は不可能である。そこでラミニンと相互作用するインテグリンに着目した。インテグリンは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖よりなる二量体の細胞膜在タンパク質である。特にその構成要素の一つである *Integrin  $\beta$ 1* (*Itgb1*) は膵 $\beta$ 細胞にも発現が認められる<sup>49</sup>。そこで *Itgb1* に対する shRNA を発現するレンチウイルスを用いて、sBM 上で分化誘導中の細胞における *Itgb1* のノックダウン実験を行った。特に内胚葉から膵前駆細胞への分化過程における *Itgb1* の役割を観察するため、ウイルスは培養 10 日目の時点で添加し、培養 15 日目における *Itgb1* の発現及び *Pdx1*/GFP 陽性細胞の割合を解析した (図 9 A)。結果、ネガティブコントロールのウイルスを感染させたサンプル (Non-silencing, NS) と比較し、*Itgb1* をノックダウンさせたサンプル (*Itgb1* KD) では *Itgb1* mRNA の減少と、*Pdx1*/GFP 陽性細胞の減少が確認された (図 9 B, C)。以上の結果から、sBM からの膵分化誘導シグナルが分化細胞の *Itgb1* を含むインテグリンを介して伝達される事が示唆された。

### ・ヘパラン硫酸プロテオグリカンが膵臓分化に関わる

*Lama5*、*Itgb1*ノックダウン実験の結果から、これらのシグナルが膵臓の分化誘導に関わる事が明らかとなった。しかしこれらの分子を抑制する事による膵臓分化への影響は部分的であり、ラミニン-インテグリンシグナル以外にも膵臓分化を促す要因がある事を推測した。そこで、我々はヘパラン硫酸プロテオグリカン (Heparan sulfate proteoglycan, Hspg) の働きに着目した。Hspgのうち、基底膜中に存在する主なHspgにはパールカン (Perlecan, Hspg2) が知られている。Hspgは様々な液性因子を保持、修飾することで、隣接する細胞の増殖や分化に影響を与える事が知られている<sup>51, 52</sup>。そこで、*Hspg2*ノックダウンES細胞と、ヘパラン硫酸の糖鎖を分解するヘパリチナーゼを用いて、これらの分子が膵臓分化に与える影響を検討した。まず*Hspg2*に対するshRNAを発現するレンチウイルスをSK7に感染させ、*Hspg2*ノックダウンES細胞株 (*Hspg2* KD) を樹立した (図10A)。これらの細胞とネガティブコントロールのウイルスを感染させて作製したES細胞 (Non-silencing, NS) をそれぞれsBM上に播き、これにヘパリチナーゼ処理を併用するものとししないもので、培養15日目における*Pdx1*/GFP陽性細胞の割合を比較した (図10B)。ヘパリチナーゼ処理はsBM中に元々存在するHspgsの影響を除外するために、前処理として細胞を播く前のsBMを処理した。加えて、分化中の細胞が発現しているHspgsの影響を除外するため、培養10日-15日の期間においても処理を行った。結果、*Hspg2* KD群と、ヘパリチナーゼ処理したNS群では*Pdx1*/GFP陽性細胞の割合が減少し、*Hspg2* KDとヘパリチナーゼ処理を並行した群では相乗的に*Pdx1*/GFP陽性細胞の割合が減少した (図10C)。これらの結果より、Hspgは内胚葉から膵臓への領域化の過程に関わっている事が示唆された。

### ・sBM上で分化した細胞は生体内において成熟膵臓細胞へと分化する

RT-PCR解析の結果より、sBM上でマウスES細胞は膵臓細胞へと分化するものの、その成熟度は低い事が示唆されていた。成熟度の低い細胞を更に分化させる方法としては、分化細胞を生体内に移植する方法が広く用いられている<sup>6, 32</sup>。そこでsBM上で分化誘導した細胞の移植実験を行った。成熟度を容易に観察するため、実験にはING112細胞株を使用した。ES細胞はsBM上で28日間培養した後、免疫不全マウス (severe combined immunodeficient, SCIDマウス) の腎被膜下に移植した。4週間後、レシピエントマウスより移植片を



回収して *Ins1*/GFP の発現を確認したところ、移植片内では多くの GFP 陽性クラスターが観察された (図 1 1 A)。この移植片を RT-PCR により解析したところ、膵内分泌マーカー (*Ins1*, *MafA*, *Ppy*, *Sst*)、外分泌マーカー (*Amy*) の発現が移植前の細胞と比較して大きく上昇していた (図 1 1 B)。特に *Ins1* と *Amy* の上昇は劇的であり、胎仔膵の各発現量と比較しても大きく上回っていた (図 1 1 C)。抗体染色の結果、観察された GFP 陽性細胞は Insulin、C-peptide とともに共染されており、更に Insulin 陽性細胞では成熟β細胞マーカー (*MafA*, *Nkx6-1*) の発現も確認された (図 1 1 D-a, b, c, d)。GFP 陽性細胞の周囲には成体の膵組織におけるβ細胞と同様に、*Amy* 陽性外分泌細胞が存在する (図 1 1 D-e)。加えて、他の内分泌マーカー (*Gcg*, *Sst*, *Ppy*) や導管マーカー (*DBA*) の発現も確認された (図 1 1 D-e, f, g, h)。ELISA 法による移植片内のインスリン含有量測定を行ったところ、特に GFP の蛍光が強かった移植片では約膵島一個分 (100 – 140 ng) にも相当する含有量が検出された (図 1 1 E)。以上の結果より、sBM 上で分化した細胞は生体内において成熟膵臓細胞へと分化する能力を有し、さらに膵島様の構造を形成する能力をも有している事が示された。

## 考察

### 1. M15 細胞を用いた三胚葉系譜への分化誘導

ES 細胞由来の三胚葉細胞を純化し、その大規模遺伝子発現解析を行った報告は、これが初となる。M15 細胞を支持細胞として使用する事で、ES 細胞を神経外胚葉細胞、中内胚葉細胞、中胚葉細胞または内胚葉細胞へと分化誘導出来る事が確認された。

以前の報告で、我々は M15 細胞が発現している分泌因子のプロファイリングについて言及していた<sup>6</sup>。神経外胚葉の形成と、さらに分化した各種神経前駆細胞の形成には、おそらく M15 細胞が高レベルで発現している *gremlin* や *chordin* などの BMP アンタゴニストや、*aldehyde dehydrogenase (Aldh1a1; Raldh1)* などのレチノイン酸合成酵素の影響が考えられる。また、レチノイン酸を特異的に分解する *Cyp26a1* の発現が低い点についても注目される。M15 細胞は相当量の *Wnt5a* や *Wnt11*、*frizzled* ホモログを発現しているのに対し、*Shh* や *Ihh* の発現は見られない。神経外胚葉における背腹、前後軸の決定は *noggin* やレチノイン酸、*Wnt*、*Shh* などの分泌因子に影響される事が知られている<sup>45, 53</sup>。*Wnt3a* や *BMP4* は神経堤細胞の分化を促進する事が報告されている<sup>54</sup>。M15 細胞より分泌される液性因子に対応し、M15 細胞上で誘導された神経外胚葉や神経細胞は頭尾、背腹軸に沿った広い範囲の神経細胞としての特性を有している。更に、神経堤細胞と同様に、全ての領域特異的な神経細胞への分化が観察されている。

中内胚葉では内胚葉の形成について報告のある、T-box 転写酵素である *eomesodermin (Eomes)*<sup>55</sup> を含む、64 遺伝子の発現が上昇していた。*Dkkopf-1 (Dkk1)* は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制する分泌因子として知られている。*Dkk1* の欠失は前方の胚葉における異所的な Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化を引き起こし、マウスの原腸貫入における内胚葉の移動を阻害する<sup>56</sup>。

神経外胚葉においては、発生期のパターン形成に関わるとされる *Iroquois* 遺伝子群を含む、149 遺伝子の発現上昇が認められた。特に、これらはショウジョウバエや脊椎動物における前神経遺伝子の発現をコントロールするプレパターン遺伝子として働く<sup>57</sup>。*Eph-ephrin* 相互作用は、原腸形成期の収束による細胞運動を同期させることで、胚構造の組織化に関与している<sup>58</sup>。*Eph* ファミリー遺伝子群 (*Epha3*、*Epha7*) や *ephrin B2* は神経外胚葉で発現していた。

Zinc-finger タンパクである Zic ファミリーは神経発生において決定的な役割を果たす<sup>59</sup>。

中胚葉分画において発現している遺伝子としては、*Docking protein 4 (Dok 4)* (心内膜細胞で優位に発現<sup>60</sup>) や *RUNX2* (骨格形成、造骨発生に必須の細胞運命決定因子<sup>61</sup>) などが挙げられる。多様な動物を用いた機能的、遺伝学的解析により、心臓発生において T-box 転写因子群 (*Tbx11*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5*, *Tbx18*, *Tbx20*) の決定的な役割が示されている<sup>62</sup>。

## 2. 擬似基底膜を用いた新規膵分化誘導法の確立

これまでの多くの報告より、ES 細胞から胚性内胚葉を分化誘導するにはアクチビンや bFGF など、液性因子を添加するだけで充分である事は既に示されていた。しかし、トランスフィルターや固定した M15 細胞を用いた分化実験の結果より、胚性内胚葉から膵前駆細胞の領域化には M15 との直接の相互作用が重要であることが示唆されていた<sup>6</sup>。同時に、これらの結果は細胞外環境とそれを構成する構成因子が細胞運命の決定に重要である事を示している。

マイクロアレイ解析の結果より、M15 細胞は基底膜の構成因子である IV 型コラーゲンと *Lama5* を高レベルで発現していることが明らかになった。M15 細胞によって形成される基底膜が細胞の運命決定に重要であることを確かめるために、M15 細胞における *Lama5* のノックダウン実験を行った。その結果、*Lama5* をノックダウンした M15 細胞上では膵前駆細胞への分化が著しく阻害され、*Lama5* が膵臓の領域化において重要な役割を果たしている事が示唆された。

これら M15 細胞を用いた実験結果を元に、基底膜を含む細胞外環境を試験管内に再構成する事で、支持細胞を用いない新規の分化誘導系を確立しようと試みた。これまでも基底膜の構成成分を用いた分化誘導法として、IV 型コラーゲンコートディッシュを用いた胚性内胚葉の誘導<sup>29, 41</sup> や、I 型コラーゲン、もしくはラミニンコートディッシュを用いた肝細胞の誘導法<sup>63</sup> が報告されている。また、我々の共同研究者である持立克身博士らのグループは上皮細胞を試験管内で培養する事で基底膜を作製し、その上で気管原基細胞を繊毛細胞へと終分化させる方法を報告している<sup>36, 37</sup>。我々はこの報告中に用いられている新規の培養基質、sBM に着目し、本研究において sBM が ES 細胞から膵臓系譜の細胞を誘導するのに有効であるかを検討した。M15 細胞分化誘導系において *Lama5* は膵前駆細胞分化における細胞外のシグナルを ES 細胞に伝える役割を果たし

ている。このことから、構成因子として Lama5 及び Laminin  $\beta 1$ 、 $\gamma 1$  を含むリコンビナントヒトラミニン 10 を強制発現させた HEK293 細胞、hLN10-293 を用いて sBM の作製を行った。この基質を用いた結果、マウス ES 細胞及び iPS 細胞は胚性内胚葉から膵前駆細胞、更にはインスリン産生 $\beta$ 細胞へと正常発生に沿った形で分化した。sBM 上で分化誘導した細胞を生体内に移植したところ、これらの細胞は膵内分泌、外分泌、導管細胞といった成熟膵臓細胞へと分化し、膵島様の構造を形成した。回収した移植片は ELISA 法で検出できる程度のインスリンを含有していたものの、グルコース濃度に対応したインスリンの放出能については確認されなかった。正常発生においてグルコース応答性は出生後獲得される機構であり、機能的な解析のためには成熟化のための更なる検討が必要であると考えられる。

sBM からの膵臓分化誘導メカニズムについては、これを構成している Lama5 からの誘導が考えられる。成体の膵島では、膵島内を走行する血管内皮細胞がラミニン 8 (Laminin 411)、ラミニン 10 を含む基底膜を形成しており、これらの分子は $\beta$ 細胞で発現するインテグリンを介してインスリン産生を制御する事が知られている<sup>49</sup>。ラミニンのレセプターであるインテグリンの構成分子、*Itgb1* の発現抑制は膵前駆細胞分化を有意に阻害した。この結果はラミニン-インテグリンシグナルが成体膵の機能だけでなく、膵臓分化においても重要な役割を担っている事を示唆している。

膵分化を促すその他の因子として、次に Hspgs に着目した。Hspgs には syndecan、glypican のように細胞膜表面上に存在するタイプのもものと、Hspg2 のように基底膜中に存在するものとが確認されている。中でも Hspg2 は主要な基底膜構成成分の一つであり、その影響と Hspgs の糖鎖の働きを考慮し、*Hspg2* のノックダウン実験及び、ヘパラン硫酸鎖の分解実験を行った。結果、*Hspg2* の発現抑制とヘパラン硫酸鎖の分解は相乗的な膵臓分化の抑制を引き起こし、それぞれの分子が基底膜上における膵分化誘導において重要である事が示唆された。ヘパラン硫酸鎖はその特性として様々な液性因子をトラップし、これを修飾する働きを持つ事が知られている<sup>51, 52</sup>。特に FGF については FGF 分子とその受容体、そして Hspg が複合体を形成する事で、リガンド-受容体の特異的相互作用を支持している事が報告されている<sup>64</sup>。また、VEGFs についても Hspg と相互作用し、これが血管の成長や形態形成に重要である事が報告されている<sup>65</sup>。FGF、VEGF などの分子は膵臓分化にも重要である事が報告されており<sup>21, 23</sup>、

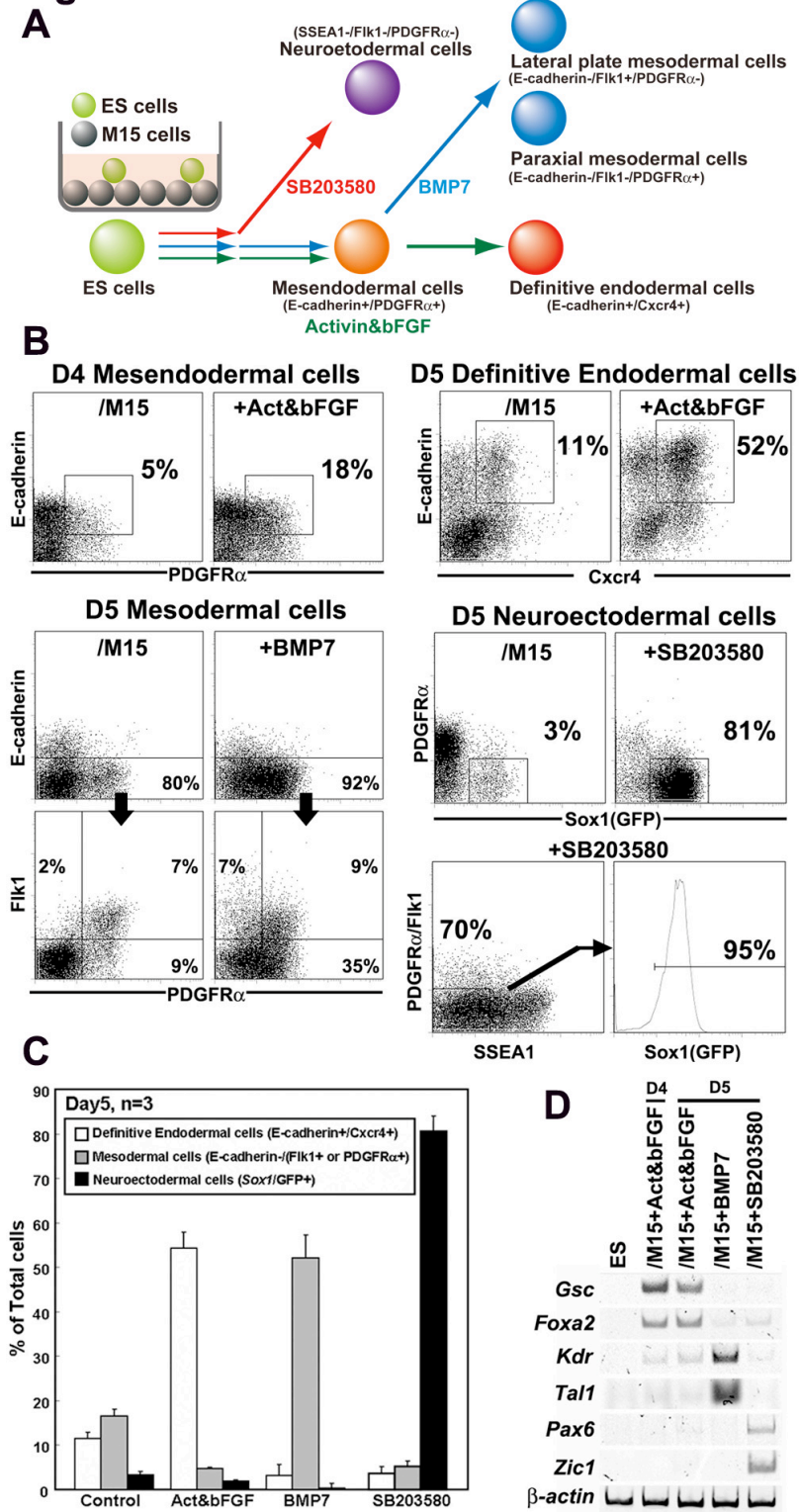
ヘパラン硫酸鎖を分解する事による腭分化の抑制は、おそらくこれらのシグナルが ES 細胞に上手く伝達されない事による影響であると考えられる。加えて、ヘパラン硫酸鎖の分解が依然部分的である事を考慮すると、基底膜中の Hspg2 分子自体が持つ機能についても言及する必要がある。Hspg 2 分子自体が腭分化誘導シグナルに関与しており、その発現抑制とヘパラン硫酸鎖の分解が起こった事で、相乗的な腭分化の抑制が生じたものと考えられる。以上の点より、基底膜中に存在する Hspg2 分子、そして基底膜、細胞膜上に存在するその他の Hspg は腭臓分化を直接、あるいは間接的に亢進する役割をもつことが推測される。

## 結語

本研究により、M15 細胞を用いる事により ES 細胞を三胚葉の細胞へと分化誘導し、これが初期発生における遺伝子発現解析にも有効である事を示した。各分画における遺伝子の発現は、通常の胚発生において時空間的に協調して活性化される、各種マーカー遺伝子のそれに対応していた。これらの結果は ES 細胞を用いた分化誘導系が初期胚発生機構を解明するために有用である事を示し、将来的に再生医療へと応用可能な細胞を産生できる事を示唆している。

また、本研究において新規の腭臓分化誘導法として sBM を用いる方法を確立した。更に、基底膜からの腭臓分化誘導シグナルに Lama5 を含むラミニン分子が重要な働きを持つ事を示し、そのシグナルが Itgb1 を含むインテグリンを通じて伝達される事を見出した。加えて、基底膜中の Hspg2 及び他の Hspg 群についても、腭臓分化において重要な役割を果たす事を見出した (図 1 2)。これらの結果は我々の確立した sBM 分化誘導系が、腭及び胚性内胚葉の分化に関わる因子を検討するための系として非常に優れていることを示している。支持細胞を用いない本分化誘導法は、将来的な再生医療への応用を考える上でも非常に有効である事が考えられる。

Figure 1

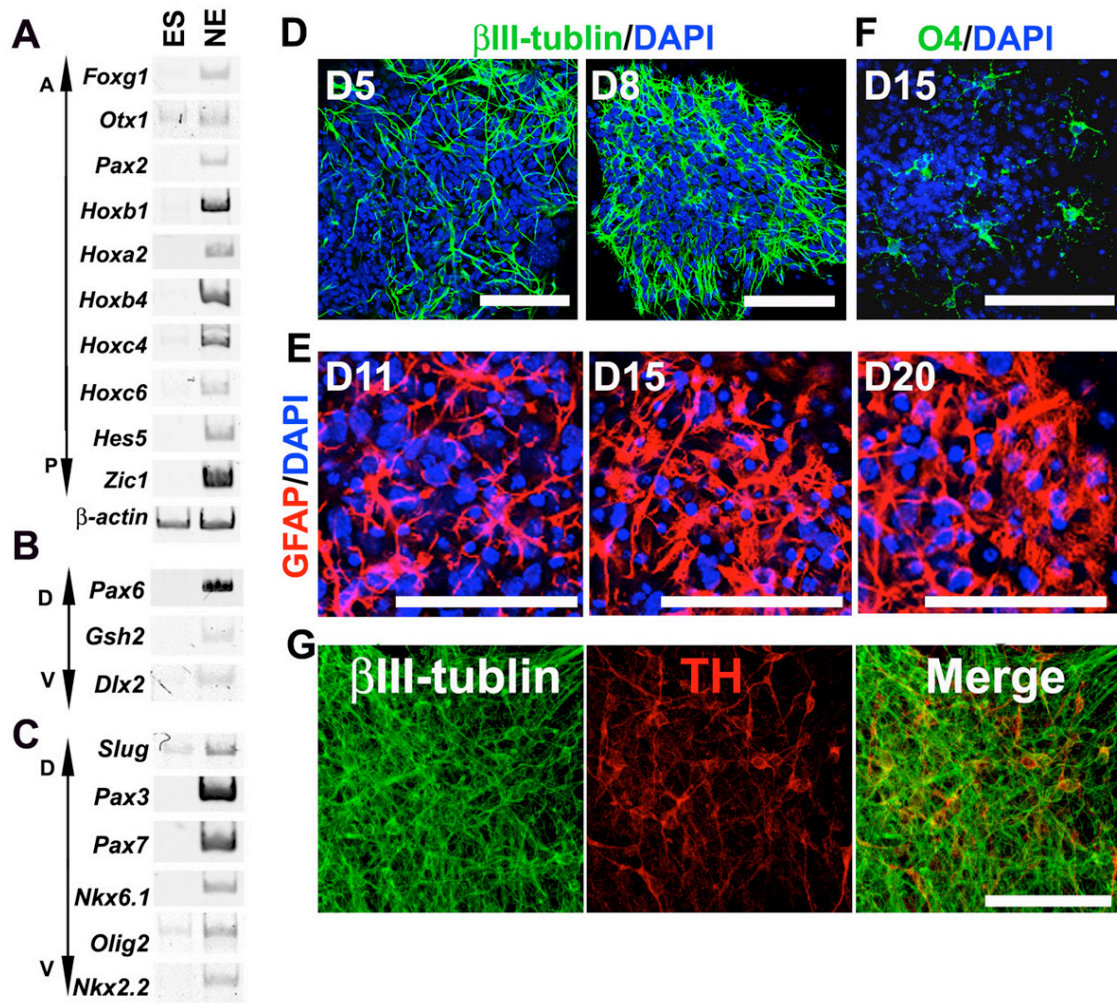


## 図. 1 ES 細胞の三胚葉への誘導

- A) ES 細胞を用いた各胚葉細胞への分化誘導の概要。各胚葉において特異的に発現している細胞表面抗原について記す。
- B) SK7 ES 細胞由来の 4 日目中内胚葉、5 日目胚性内胚葉、5 日目中胚葉と、*Sox1*/GFP ES 細胞由来 5 日目神経外胚葉のフローサイトメトリー解析。M15 単独での誘導（左展開図）に対し、各種液性因子を加えた際の結果（右展開図）を記す。
- C) 各分化誘導条件下における、三胚葉細胞の分化効率の比較。全ての結果は平均値±平均標準誤差（Standard error of mean, SEM）で表す（n=3）。
- D) 各種液性因子添加条件下で 4 日間（D4）、もしくは 5 日間（D5）培養した細胞における胚葉特異的なマーカー遺伝子の発現。



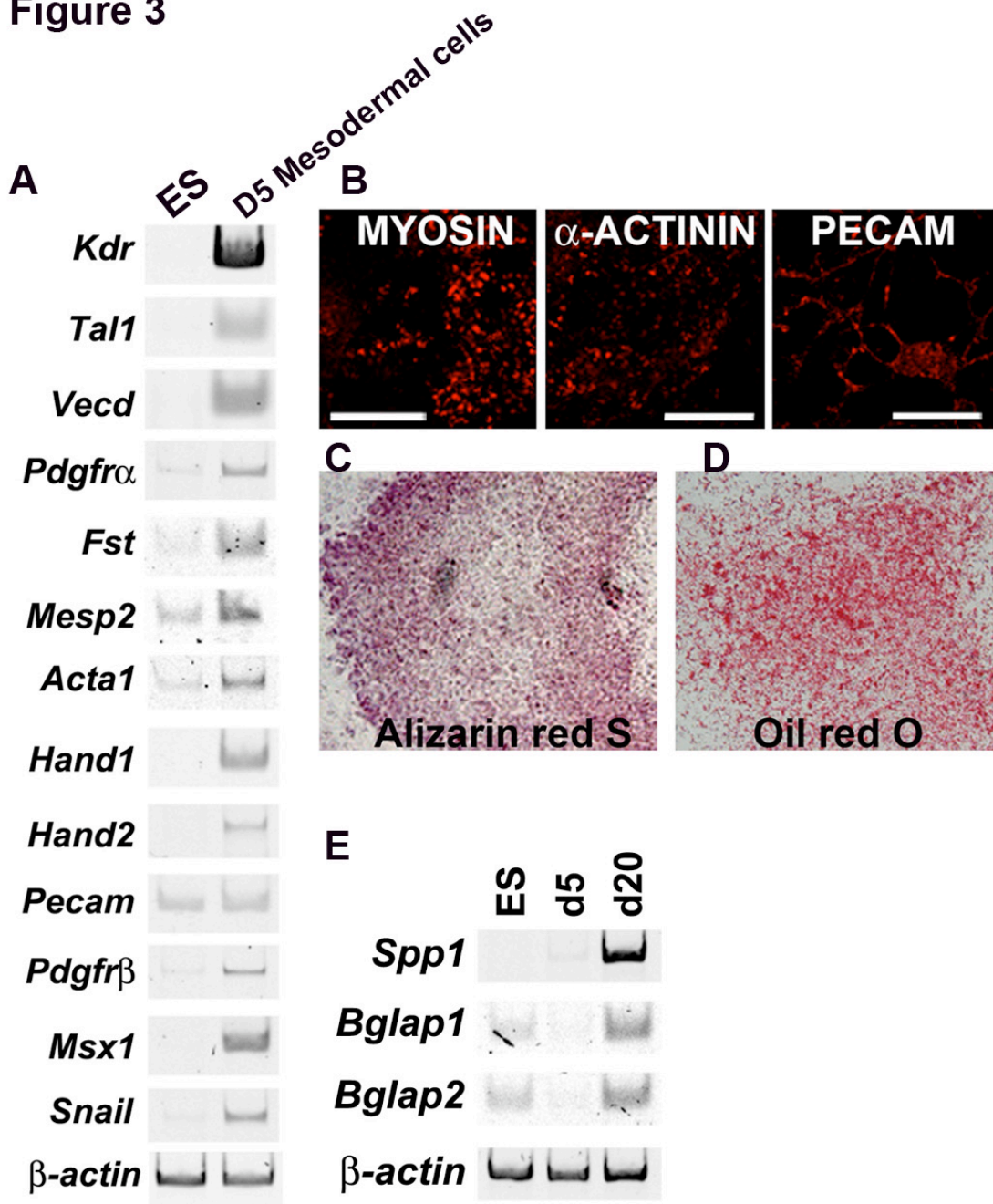
**Figure 2**



## 図. 2 ES 細胞の神経外胚葉への分化

- A) 前後軸に沿った領域特異的神経マーカー遺伝子の RT-PCR による発現解析。
  - B) 背腹軸に沿った前脳-中脳にかけてのマーカー遺伝子の発現解析。
  - C) 背腹軸に沿った後脳-脊髄にかけてのマーカー遺伝子の発現解析。
  - D) 培養 5 日目、8 日目における  $\beta$ III-tubulin 陽性ニューロンの抗体染色による解析。
  - E) 培養 11 日目、15 日目、20 日目における GFAP 陽性アストロサイトの解析。
  - F) 培養 15 日目における O4 陽性オリゴデンドロサイトの解析。
  - G) 培養 14 日目における TH 陽性ドーパミンニューロンの解析。
- \*D-F 中のスケールバーは全て 100 $\mu$ m を表す。

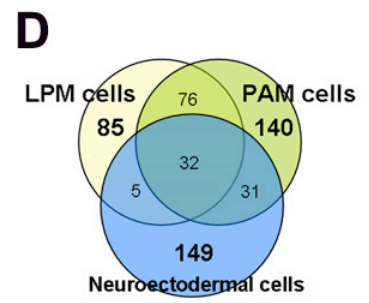
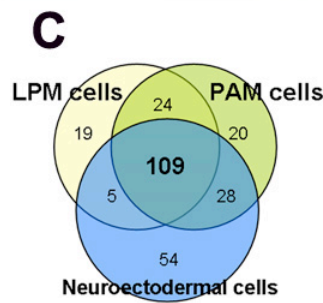
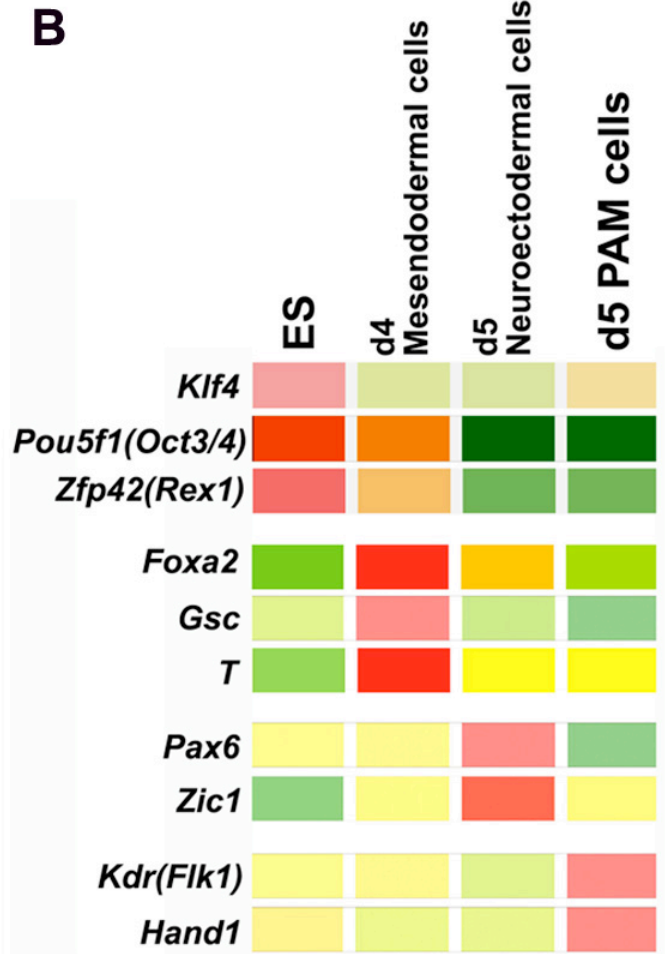
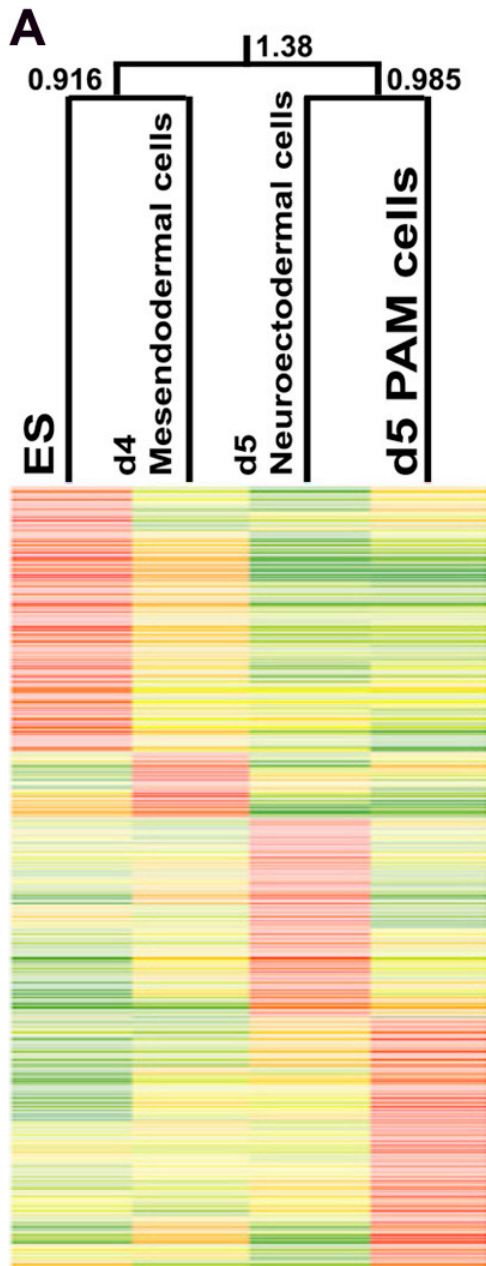
Figure 3



### 図. 3 ES 細胞の中胚葉細胞への分化

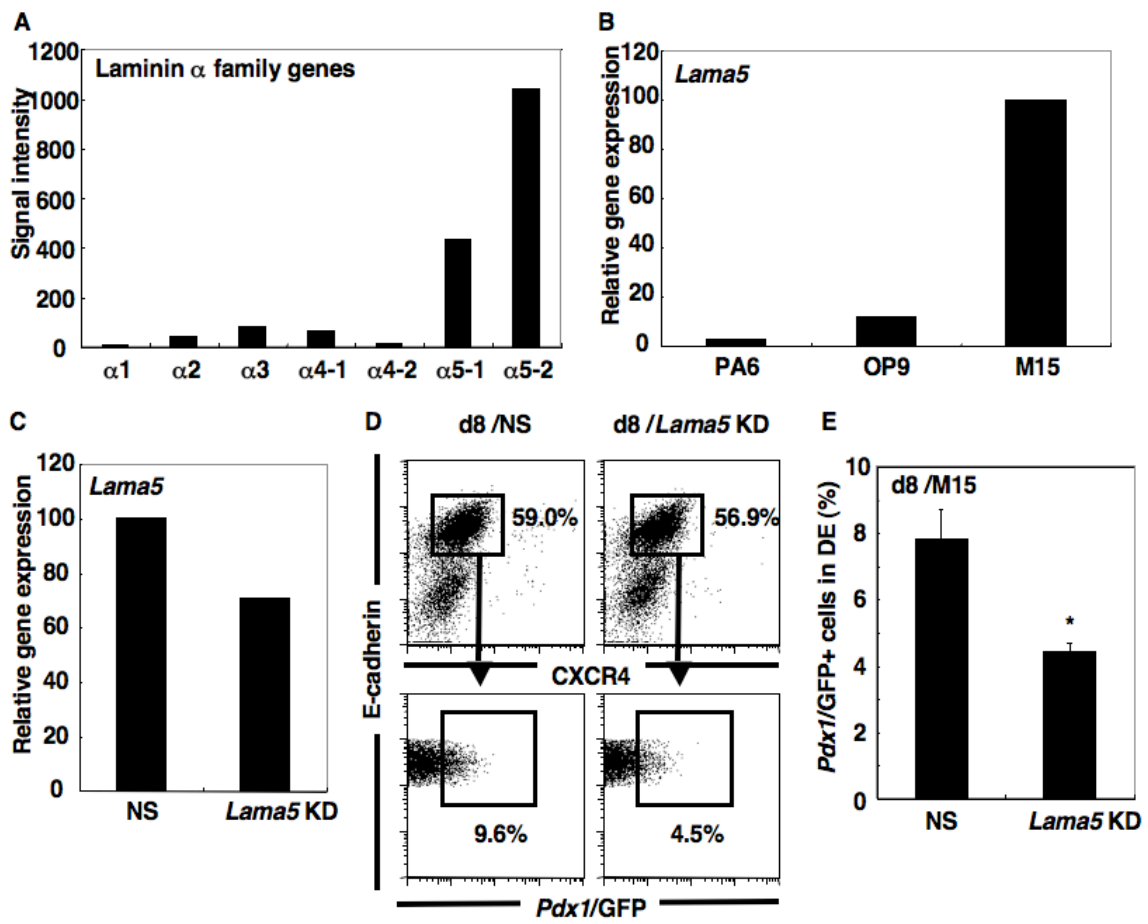
- A) LPM、PAM マーカー遺伝子の RT-PCR による発現解析。
- B) 培養 8 日目における Myosin、 $\alpha$ -actin、PECAM の抗体染色による発現解析。  
スケールバーは 100 $\mu$ m を表す。
- C) 骨分化誘導を促した ES 細胞の培養 20 日目における Alizarin red S 染色。
- D) 脂肪分化誘導を促した ES 細胞の培養 20 日目における Oil red O 染色。
- E) 骨分化誘導を促した ES 細胞における、骨分化マーカー遺伝子の発現解析

**Figure 4**



**図. 4 ES 細胞、中内胚葉細胞、神経外胚葉細胞、LPM 細胞及び PAM 細胞の遺伝子発現プロファイル**

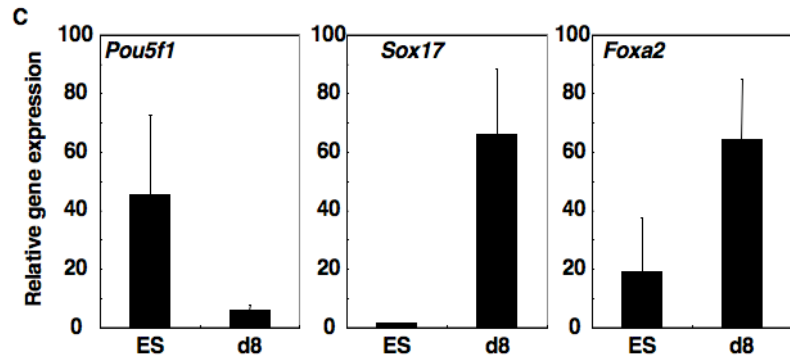
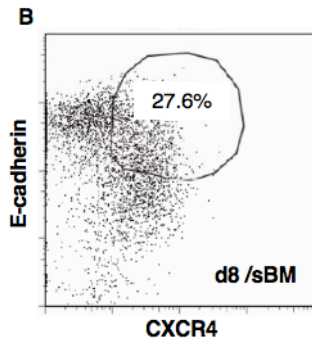
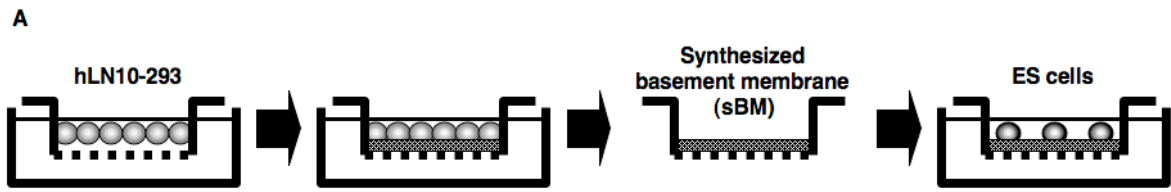
- A) ES 細胞、中内胚葉細胞、神経外胚葉細胞、PAM 細胞肝における発現遺伝子のクラスタ解析。2 群間の K バリュー値を図中に記す。K バリューは 2 群間の全遺伝子発現を比較した際の類似性の値で、値が小さい程、2 群間の類似性が高い事を示す。
- B) 分化した各細胞分画において発現が減少（緑色）もしくは上昇（赤色）した代表的な遺伝子。
- C) ES 細胞と比較して、各胚葉において 10 倍以上発現が減少している遺伝子のベン図。数字は遺伝子数を表す。
- D) ES 細胞と比較して、各胚葉において 10 倍以上発現が上昇している遺伝子のベン図。数字は遺伝子数を表す。



## 図 5. *Lama5* は腭前駆細胞の分化を誘導する

- A) M15 細胞におけ laminin  $\alpha$ ファミリー発現のマイクロアレイ解析。縦軸は各プローブの蛍光強度を示す。
- B) Real-time PCR による細胞株間での *Lama5* 発現量の比較。M15 の発現量を 100 とした際の OP9、PA6 の発現量を示す。値は $\beta$ -アクチン発現量で補正されている。
- C) ネガティブコントロール (NS ; Non silencing)、あるいは *Lama5* ノックダウン (*Lama5* KD) ウィルスに感染させた M15 細胞における、*Lama5* 発現解析。NS M15 の発現量を 100 とした際の発現量を示す。値は $\beta$ -アクチン発現量で補正されている。
- D) NS もしくは *Lama5* KD M15 細胞上で分化誘導を行った SK7 ES 細胞における、培養 8 日目 E-cadherin/CXCR4 両陽性胚性内胚葉、及び胚性内胚葉中の *Pdx1*/GFP 陽性細胞のフローサイトメトリ-解析。
- E) NS もしくは *Lama5* KD M15 細胞上で分化誘導を行った SK7 ES 細胞における、8 日目胚性内胚葉中の *Pdx1*/GFP 陽性細胞の定量化。\*二群間には  $P < 0.05$  の有意差が認められる。全ての結果は平均値  $\pm$  平均標準誤差 (Standard error of mean, SEM) で表す (n=3)。





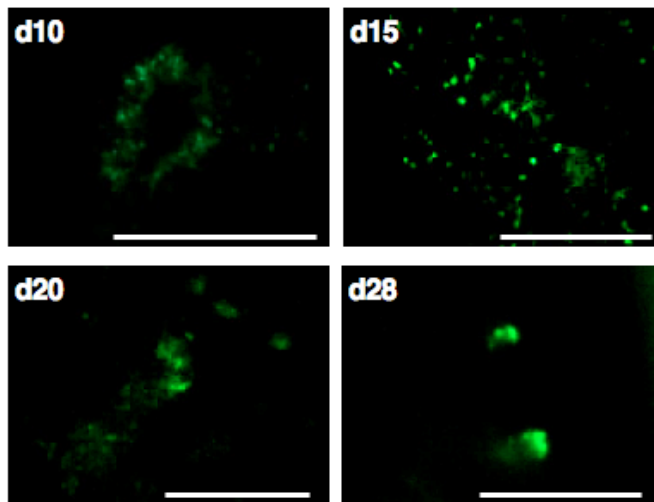
## 図 6. 擬似基底膜上において ES 細胞は胚性内胚葉へと分化する

- A) sBM 作製の概要。リコンビナントヒトラミニン 10 を過剰発現させた 293 細胞をカルチャーインサート上にまき、基底膜の構成を促す。基底膜の完成後、293 細胞は界面活性剤を用いて取り除き、これを sBM とする。培養の際にはこの上に ES、もしくは iPS 細胞を播いて実験を行う。
- B) sBM 上で分化誘導した SK7 ES 細胞における、培養 8 日目胚性内胚葉のフローサイトメトリー解析
- C) sBM 上で分化誘導した SK7 ES 細胞の Real-time PCR 解析。未分化 ES 細胞をネガティブコントロールとし、培養 8 日目における *Pou5f1* (*Oct3/4*)、*Foxa2*、*Sox17* の発現を比較した。値は $\beta$ -アクチン発現量で補正されている。全ての結果は平均値 $\pm$ 平均標準誤差 (Standard error of mean, SEM) で表す (n=3)。

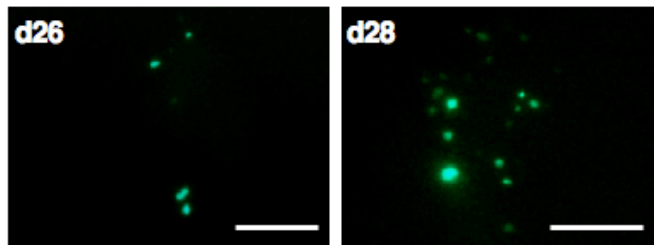
**A**

d0	d10	d13	d28
20ng/ml activin A 50ng/ml bFGF	20ng/ml activin A 50ng/ml bFGF 1 $\mu$ M RA		10mM nicotinamide 10nM GLP1

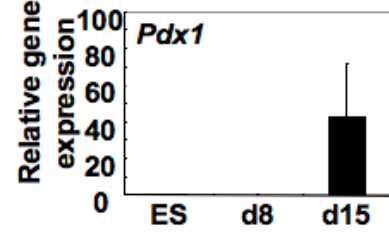
**B**



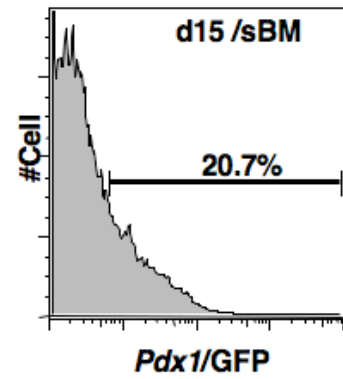
**E**



**C**

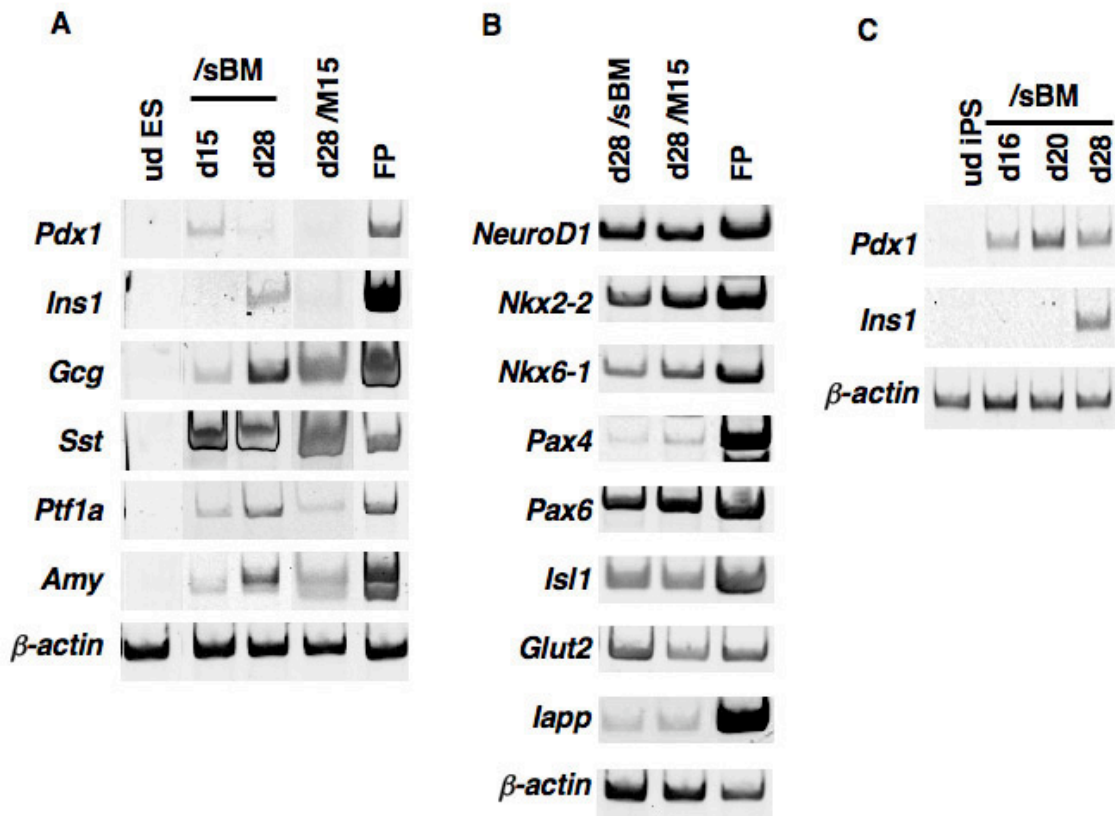


**D**



## 図 7. 擬似基底膜上において ES 細胞は膵臓系譜に分化する

- A) 分化誘導に用いた培地の概要。培養基間を通じて、無血清培地を使用している。培養 0 日-10 日目には液性因子として 20 ng/ml のアクチビンと、50 ng/ml の bFGF をそれぞれ添加し、10-13 日目の期間には 1 $\mu$ M のレチノイン酸をこれに添加している。13 日目以降は培地のグルコース濃度を 4500 mg/L から 1000 mg/L に変更し、液性因子として 10 mM のニコチンアミドと 10 nM の GLP-1 を添加している。
- B) sBM 上で培養した SK7 ES 細胞における、*Pdx1*/GFP の発現解析。*Pdx1*/GFP の発現は培養 10 日目より始まり、15 日目に最多となる。15 日目以降、GFP 陽性細胞は集積して三次元構造を形成し、28 日目にはクラスター状の構造において強い発現がみられる。
- C) Real-time PCR による *Pdx1* 発現解析。未分化 ES 細胞、培養 8 日目、15 日目の細胞における *Pdx1* 発現を比較し、値を $\beta$ -アクチン発現量で補正した。全ての結果は平均値 $\pm$ 平均標準誤差 (Standard error of mean, SEM) で表す (n=3)。
- D) 15 日目における *Pdx1*/GFP 陽性細胞の定量化。
- E) sBM 上で培養した ING112 ES 細胞における、*Ins1*/GFP の発現解析。蛍光は 26 日目以降に確認され始める。(Bar=100 $\mu$ m)



## 図 8. 擬似基底膜上で培養したマウス ES、iPS 細胞における膵分化マーカーの発現解析

- A) 膵内分泌、外分泌細胞細胞マーカーの発現。未分化 ES 細胞 (ud ES)、胎生 13.5 日目胎仔膵 (FP) をコントロールとして使用した。sBM 上で 15 日 (d15)、もしくは 28 日間 (d28) 培養した SK7 ES 細胞より RNA を抽出し、逆転写を行ってこれをサンプルとした。比較対象として、M15 細胞上で 28 日間培養した細胞のサンプル (M15 d28) を使用した。使用した cDNA 量は  $\beta$ -アクチン発現量で補正している。 *Pdx1*, *Pancreatic duodenum homeodomain 1*; *Ins1*, *Insulin1*; *Gcg*, *Glucagon*; *Sst*, *Somatostatin*; *Ptf1a*, *pancreas specific transcription factor 1a*; *Amy*, *Amylase*
- B) 未熟 (*NeuroD1*, *Nkx2-2*, *Nkx6-1*, *Pax4*, *Pax6*) 及び成熟膵  $\beta$  細胞マーカー遺伝子 (*Isl1*, *Glut2*, *Iapp*) の発現解析。 *NeuroD1*, *neurogenic differentiation 1*; *Nkx2-2*, *NK2 transcription factor related locus 2*; *Nkx6-1*, *NK6 homeobox 1*; *Pax4*, *paired box gene 4*; *Pax6*, *paired box gene 6*; *Isl1*, *ISL1 transcription factor*; *Glut2*, *Glucose transporter type 2*; *Iapp*, *islet amyloid polypeptide*
- C) sBM 上で分化誘導した iPS 細胞における膵分化マーカーの発現。未分化 iPS 細胞をネガティブコントロールとして使用し、培養 16、20、28 日目における各マーカー遺伝子の発現を確認した。

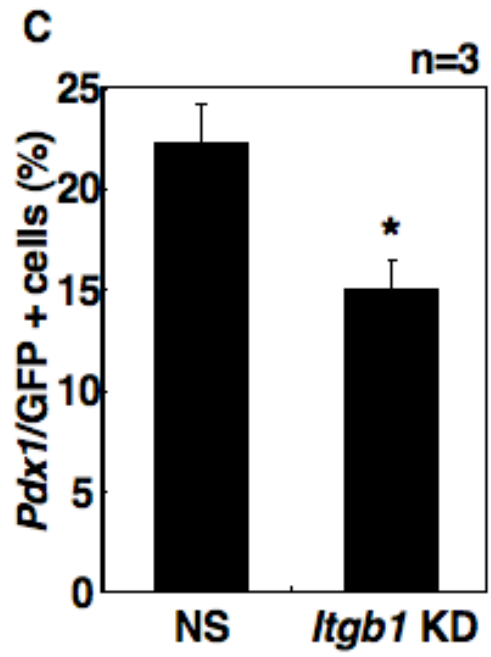
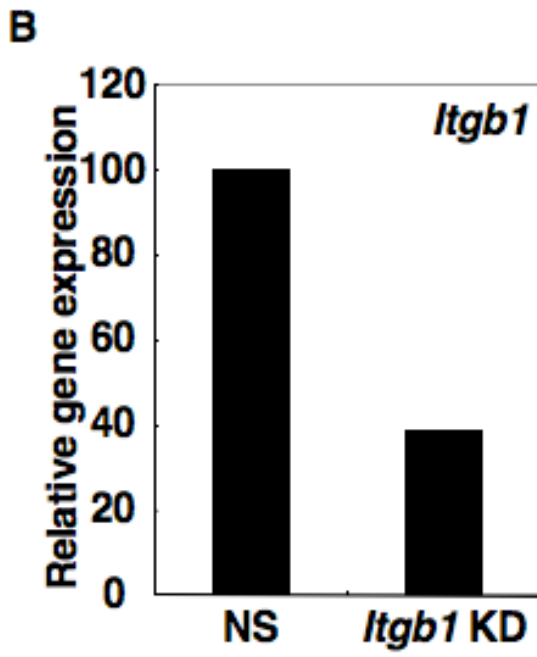
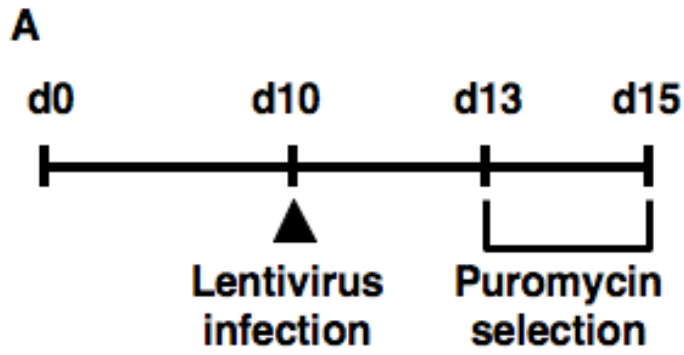
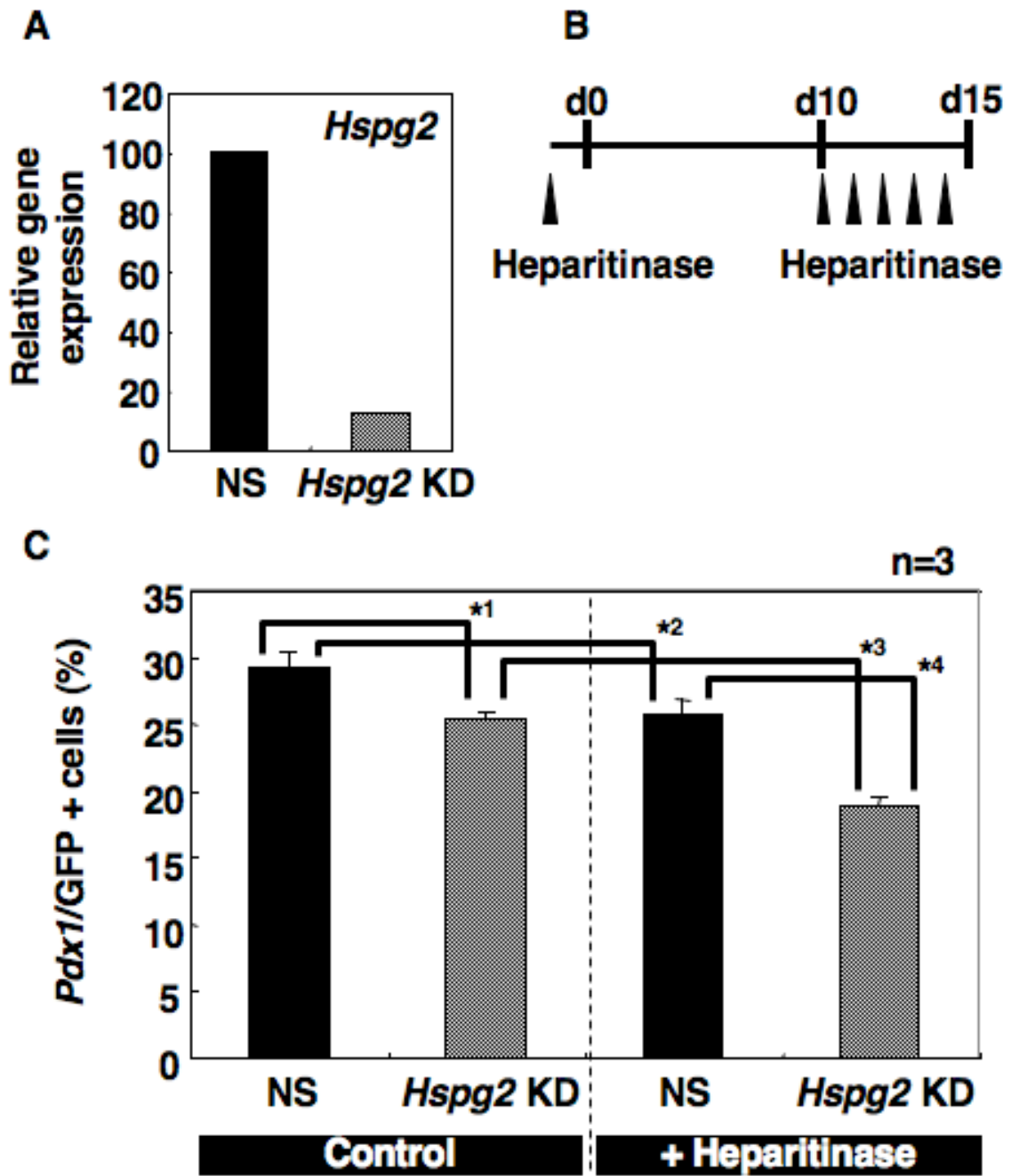


図 9. *Itgb1* 発現抑制は *Pdx1* 発現細胞の分化を阻害する

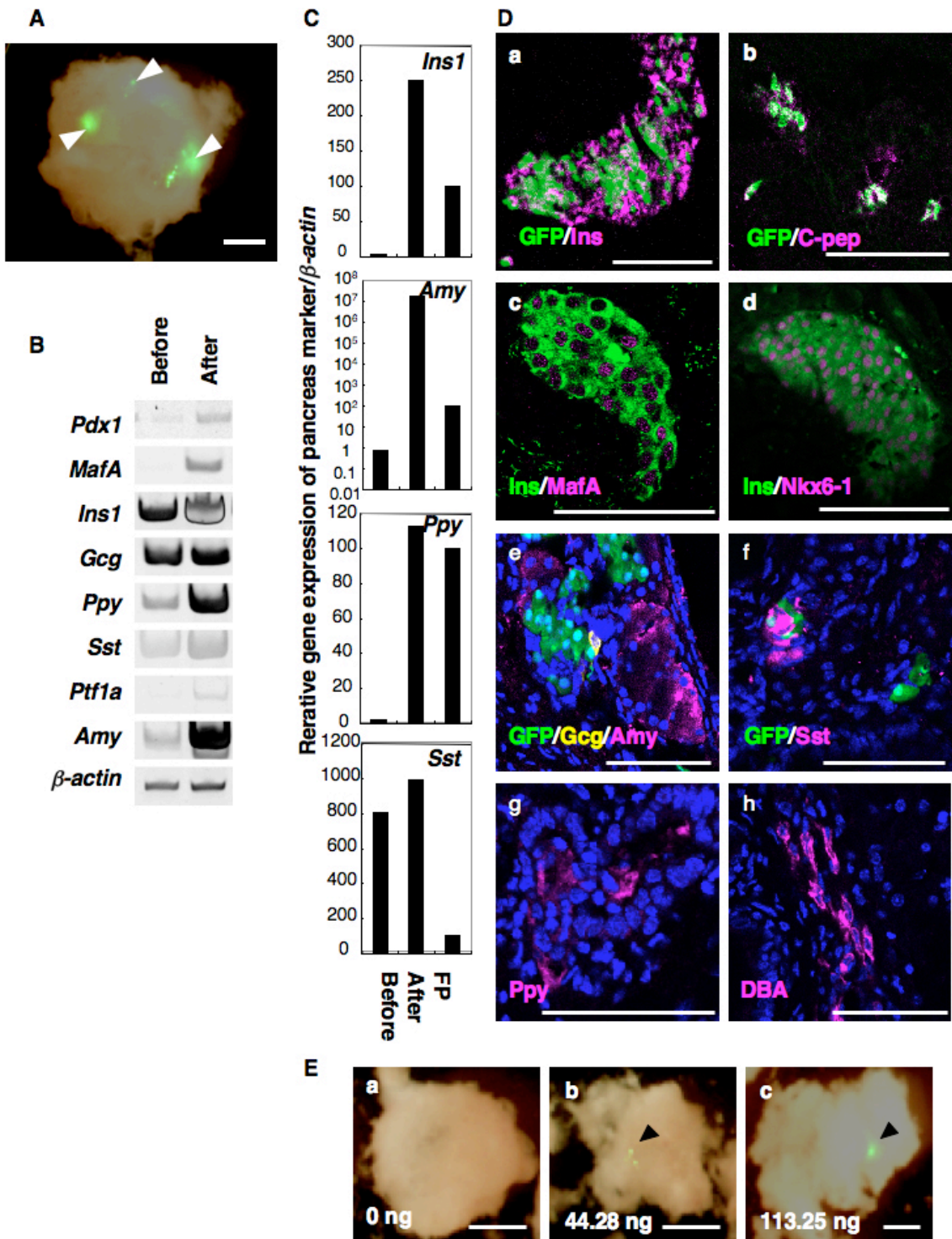
- A) 実験概要。培養 10 日目の時点で、ネガティブコントロール (NS; non silencing) もしくは *Itgb1* ノックダウン (*Itgb1* KD) レンチウイルスを sBM 上で分化誘導中の SK7 細胞に感染させた。その後、未感染細胞の除去を目的に 13-15 日目にかけて Puromycin による薬剤選択を行い、15 日目の時点で *Itgb1* の発現、*Pdx1*/GFP 陽性細胞の定量化を行った。
- B) Real-time PCR による *Itgb1* 発現解析。培養 15 日目の各群より RNA を抽出して解析を行った。値は $\beta$ -アクチン発現量で補正し、NS における発現量を 100 として表している。
- C) 培養 15 日目における *Pdx1*/GFP 陽性細胞の定量化。\*二群間には  $P < 0.05$  の有意差が認められる。全ての結果は平均値 $\pm$ 平均標準誤差 (Standard error of mean, SEM) で表す (n=3)。





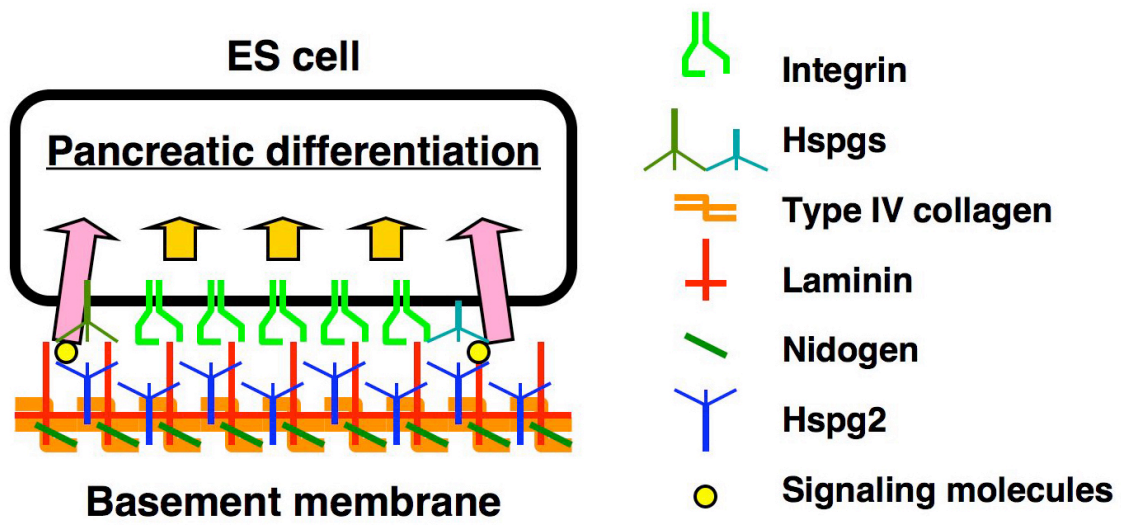
### 図 1 0 . Hspgs は *Pdx 1* 発現細胞の分化に関与する

- A) ネガティブコントロール (NS ; non-silencing) もしくは *Hspg 2* ノックダウン (*Hspg 2* KD) レトロウィルスを感染させて株化した各 SK7 ES 細胞における、*Hspg2* 発現解析。値は $\beta$ -アクチン発現量で補正し、NS における発現量を 100 として表している。
- B) 実験概要。NS、もしくは各 *Hspg2* KD ES 細胞株をそれぞれ sBM 上に播き、培養 1 5 日目における *Pdx1*/GFP 陽性細胞の割合を定量化する。ヘパリチナーゼ処理群では、細胞を播く前の前処理と、1 0 - 1 5 日目にかけての期間で酵素処理を行った。1 0 - 1 5 日にはヘパリチナーゼを分化培地に加え、毎日培地交換を行った。
- C) 培養 1 5 日目における *Pdx1*/GFP 陽性細胞の定量化。全ての結果は平均値 $\pm$ 平均標準誤差 (Standard error of mean, SEM) で表す (n=3)。\*以下に記す全ての二群間で、 $P < 0.05$  の有意差が認められる。). \*1; NS vs. *Hspg2* KD, \*2; NS vs. NS+heparitinase, \*3; *Hspg2* KD vs. *Hspg2* KD+heparitinase, \*4; NS+heparitinase vs. *Hspg2* KD+heparitinase



## 図 1 1 . 擬似基底膜上で分化誘導した ES 細胞の移植実験

- A) 回収後グラフトの蛍光観察写真。ING112 ES 細胞を実験に使用しているため、緑色蛍光の発現はインスリンのそれと対応する (図中矢頭)。(Bar=1 mm)
- B) RT-PCR による成熟膵内分泌、外分泌マーカー遺伝子の発現解析。移植前の細胞 (Before) と回収後グラフト (After) における各発現を比較している。各サンプルの cDNA 量は $\beta$ -アクチン発現量で補正している。MafA, *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene protein A*; Ppy, *pancreatic polypeptide*
- C) Real-time PCR による成熟膵内分泌、外分泌マーカー遺伝子の発現解析。コントロールとして胎生 13.5 日目胎仔膵 (FP; fetal pancreas) を使用している。値は  $\beta$ -アクチン発現量で補正し、FP における各マーカーの発現を 100 として表している。
- D) 回収後グラフトの免疫染色による解析。GFP (a, b, e, f; green) と Ins (a; magenta) 及び C-peptide (C-pep, b; magenta) の共染結果より、GFP の発現がインスリンと対応している事が分かる。又、Ins 陽性細胞 (c, d; green) は MafA (c; magenta)、Nkx6-1 (d; magenta) とも重なる。成体膵の構造と同様に、GFP 陽性細胞の周囲には Amy 陽性細胞 (e; magenta) が確認できる。Gcg (e; yellow)、Sst (f; magenta)、Ppy (g; magenta)、DBA (h; magenta) 陽性細胞も確認された。e-h については DAPI (blue) との共染写真を示している。(Bar=100  $\mu$ m)
- E) 移植片内におけるインスリン含有量。写真中の値は ELISA 法で検出されたそれぞれのインスリン含有量を示す。(Bar=100 mm)



## 図 1 2 . 基底膜からの分化誘導シグナルの概要

本研究において明らかになった、基底膜からの腭分化誘導シグナルについて示す。基底膜構成因子の一つである **Lama5** は分化細胞で発現している **Itgb1** と相互作用し、このシグナルが腭分化を誘導する。基底膜中の **Hspg2** 分子はそれ自体が腭分化を促す。また、**Hspg 2** や他の **Hspg** が有するヘパラン硫酸鎖には多様なシグナル因子がトラップされ、これらが直接、または間接的に分化中の細胞に作用して腭分化を促進させている。

**Table.1** 分化に伴って発現が減少している遺伝子 (109遺伝子)

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
1190002H23Rik	RIKEN cDNA 1190002H23 gene
1190003J15Rik	RIKEN cDNA 1190003J15 gene
1700012H05Rik	RIKEN cDNA 1700012H05 gene
1700019D03Rik	RIKEN cDNA 1700019D03 gene
2410003J06Rik	RIKEN cDNA 2410003J06 gene
2410004A20Rik	RIKEN cDNA 2410004A20 gene
2410007B07Rik	RIKEN cDNA 2410007B07 gene
2410012M07Rik	RIKEN cDNA 2410012M07 gene
2410076I21Rik	RIKEN cDNA 2410076I21 gene
2410116G06Rik	RIKEN cDNA 2410116G06 gene
2410146L05Rik	RIKEN cDNA 2410146L05 gene
4930424G05Rik	RIKEN cDNA 4930424G05 gene
4930517K11Rik	RIKEN cDNA 4930517K11 gene
4933425K02Rik	RIKEN cDNA 4933425K02 gene
5830405N20Rik	RIKEN cDNA 5830405N20 gene
Aard	alanine and arginine rich domain containing protein
Aass	aminoadipate-semialdehyde synthase
AB211064	cDNA sequence AB211064
Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant
AF067061	cDNA sequence AF067061
AI467606	expressed sequence AI467606
Aurkc	aurora kinase C
BC050188	cDNA sequence BC050188
Calca	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
Crisp1	cysteine-rich secretory protein 1
Cxxc6	CXXC finger 6
Cyct	cytochrome c, testis
D7Ertd143e	DNA segment, Chr 7, ERATO Doi 143, expressed
Dazl	deleted in azoospermia-like
Ddx4	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4
Dhrs10	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 10

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Dmrt1	doublesex and mab-3 related transcription factor 1
Dnmt3l	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like
Dppa2	developmental pluripotency associated 2
Dppa3	developmental pluripotency-associated 3
Dppa5	developmental pluripotency associated 5
Eif1a	eukaryotic translation initiation factor 1A
Enpp3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
Eras	ES cell-expressed Ras
Esgp	embryonic stem cell- and germ cell-specific protein
Esrrb	estrogen related receptor, beta
Eva1	epithelial V-like antigen 1
Fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Fbxo15	F-box protein 15
Fgf4	fibroblast growth factor 4
Fkbp6	FK506 binding protein 6
Fmr1nb	fragile X mental retardation 1 neighbor
Folr1	folate receptor 1 (adult)
Gdf3	growth differentiation factor 3
Gm397	gene model 397, (NCBI) finger and SCAN domain containing 4
H2-B1	histocompatibility 2, blastocyst
Hsf2bp	heat shock transcription factor 2 binding protein
Hspb1	heat shock protein 1
Icam1	intercellular adhesion molecule
Ipp	IAP promoted placental gene
Klf2	Kruppel-like factor 2 (lung)
Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)
Klf5	Kruppel-like factor 5
Klf9	Kruppel-like factor 9
Laptm5	lysosomal-associated protein transmembrane 5
Lefty1	left right determination factor 1
LOC195531	Similar to reduced expression 2



<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
LOC245128	similar to solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3
LOC435970	hypothetical LOC435970
LOC627488	similar to THO complex subunit 4 (Tho4)
LOC630963	similar to spectrin alpha 1
Lrrc34	leucine rich repeat containing 34
Mael	maelstrom homolog (Drosophila)
Manba	mannosidase, beta A, lysosomal
Morc1	microrchidia 1
Mylpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle
Nalp4f	NACHT, leucine rich repeat and PYD containing 4F
Nanog	Nanog homeobox
Ndg2	Nur77 downstream gene 2
Ndp52	nuclear domain 10 protein 52
Nr0b1	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
Pla2g1b	phospholipase A2, group IB, pancreas
Pnma5	paraneoplastic antigen family 5
Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1
Prdm14	PR domain containing 14
Prg1	proteoglycan 1, secretory granule
Psm8	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 8
Pycard	PYD and CARD domain containing
Rex2	reduced expression 2
Rhox5	reproductive homeobox 5
Rnf17	ring finger protein 17
Serpina3m	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3M
Sh3gl2	SH3-domain GRB2-like 2
Slc27a2	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2
Slc35f2	solute carrier family 35, member F2
Spp1	secreted phosphoprotein 1
Stra8	stimulated by retinoic acid gene 8
Sycp3	synaptonemal complex protein 3

Tacstd1	tumor-associated calcium signal transducer 1
Tcfap2c	transcription factor AP-2, gamma
Tcfcp2l1	transcription factor CP2-like 1
Tcl1	T-cell lymphoma breakpoint 1
TdGF1	teratocarcinoma-derived growth factor
Tdh	L-threonine dehydrogenase
Tex19	testis expressed gene 19
Tm4sf1	transmembrane 4 superfamily member 1
Tmem40	transmembrane protein 40
Trap1a	tumor rejection antigen P1A
Ube1y1	ubiquitin-activating enzyme E1, Chr Y 1
Utf1	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
Wdt2	whn-dependent transcript 2
Zfp296	zinc finger protein 296
Zfp42	zinc finger protein 42
Zhx1	zinc fingers and homeoboxes protein 1

**Table.2** 中内胚葉で発現が上昇する遺伝子 (64遺伝子)

<b>Gene Symbol</b>	<b>Description</b>
1110019K23Rik	RIKEN cDNA 1110019K23 gene
8430417A20Rik	RIKEN cDNA 8430417A20 gene
Agtrl1	angiotensin receptor-like 1
Amot	angiomin
AW548124	expressed sequence AW548124
B130021B11Rik	RIKEN cDNA B130021B11 gene
Bmp2	bone morphogenetic protein 2
C230098O21Rik	RIKEN cDNA C230098O21 gene
Cdh11	cadherin 11
Cdh2	cadherin 2
Cdx2	caudal type homeo box 2
Cer1	cerberus 1 homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Cyp26a1	cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1
D0H4S114	DNA segment, human D4S114
Dcn	decorin
Dkk1	dickkopf homolog 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
Eomes	omesodermin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
F5	coagulation factor V
Fabp7	fatty acid binding protein 7, brain
Fgf5	fibroblast growth factor 5
Fgf8	fibroblast growth factor 8
Foxa1	forkhead box A1
Foxa2	forkhead box A2
Frzb	frizzled-related protein
Fst	Follistatin (Fst), mRNA
Fzd2	frizzled homolog 2 ( <i>Drosophila</i> )
Gm784	gene model 784, (NCBI)
Gpm6a	glycoprotein m6a
Gpm6b	glycoprotein m6b

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Gsc	goosecoid
Has2	hyaluronan synthase 2
Hoxa9	homeo box A9
Hoxb2	homeo box B2
Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5
Irs4	insulin receptor substrate 4
Itgb8	PREDICTED: integrin beta 8 [Mus musculus], mRNA sequence
Krt2-8	keratin complex 2, basic, gene 8 ; similar to cytokeratin EndoA - mouse
Lhx1	LIM homeobox protein 1
MGI:2662729	ES neuronal differentiation 2
MGI:3580254	diacylglycerol kinase kappa
Mix11	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)
Mrg1	myeloid ecotropic viral integration site-related gene 1
Nkx1-2	NK1 transcription factor related, locus 2 (Drosophila)
Otx2	orthodenticle homolog 2 (Drosophila)
Pcdh7	protocadherin 7
Pcdh8	protocadherin 8
Pdzrn3	PDZ domain containing RING finger 3
Pitx2	paired-like homeodomain transcription factor 2
Rbmx	RNA binding motif protein, X chromosome
Ror1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
Rspo3	R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)
Slc39a8	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8
Sox17	SRY-box containing gene 17
Sp5	trans-acting transcription factor 5
Sp8	trans-acting transcription factor 8
Sprr2a	small proline-rich protein 2A
T	brachyury
Tnfrsf19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19
Tnrc9	trinucleotide repeat containing 9
Trh	thyrotropin releasing hormone

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Wnt8a	wingless-related MMTV integration site 8A
Zfp608	zinc finger protein 608

**Table.3 神経外胚葉で発現が上昇する遺伝子 (149遺伝子)**

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
1110019K23Rik	RIKEN cDNA 1110019K23 gene
2610017I09Rik	RIKEN cDNA 2610017I09 gene
2900092D14Rik	RIKEN cDNA 2900092D14 gene
4631426J05Rik	RIKEN cDNA 4631426J05 gene
4930423H22Rik	RIKEN cDNA 4930423H22 gene
6430547I21Rik	RIKEN cDNA 6430547I21 gene
A230057G18Rik	RIKEN cDNA A230057G18 gene
A830059I20Rik	RIKEN cDNA A830059I20 gene
A930038C07Rik	RIKEN cDNA A930038C07 gene
AI851523	expressed sequence AI851523
Ascl1	achaete-scute complex homolog-like 1 (Drosophila)
B130021B11Rik	RIKEN cDNA B130021B11 gene
BC068157	cDNA sequence BC068157
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
Boc	biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes binding protein
C030036D22Rik	RIKEN cDNA C030036D22 gene
C130071C03Rik	RIKEN cDNA C130071C03 gene
C230027N18Rik	RIKEN cDNA C230027N18 gene
C230098O21Rik	RIKEN cDNA C230098O21 gene
C530008M17Rik	RIKEN cDNA C530008M17 gene
C85317	expressed sequence C85317
Ccnd2	cyclin D2
Cdh2	cadherin 2
Col2a1	procollagen, type II, alpha 1
Crabp1	cellular retinoic acid binding protein I
Crabp2	cellular retinoic acid binding protein II
Ctnnd2	catenin (cadherin associated protein), delta 2
Cxxc4	CXXC finger 4
Cyr61	cysteine rich protein 61
D0H4S114	DNA segment, human D4S114

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
D1Ert471e	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 471, expressed
D930050A07Rik	RIKEN cDNA D930050A07 gene
Dach1	dachshund 1 (Drosophila)
Dach2	dachshund 2 (Drosophila)
Dbn1	drebrin 1
Dcc	deleted in colorectal carcinoma
Dclk1	doublecortin-like kinase 1
Dcx	doublecortin
Dll1	delta-like 1 (Drosophila)
Dmt2	dorso-medial telencephalon gene 2
Dpysl4	dihydropyrimidinase-like 4
Dpysl5	dihydropyrimidinase-like 5
Dtx4	deltex 4 homolog (Drosophila)
Ebf2	early B-cell factor 2
Ebf3	early B-cell factor 3
Ednrb	endothelin receptor type B
Efnb2	ephrin B2
EG544888	predicted gene, EG544888
Elavl4	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4 (Hu antigen D)
Emid1	EMI domain containing 1
Eml1	echinoderm microtubule associated protein like 1
Epha3	Eph receptor A3
Epha7	Eph receptor A7
Fabp7	fatty acid binding protein 7, brain
Fat4	FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)
Fjx1	four jointed box 1 (Drosophila)
Fzd10	frizzled homolog 10 (Drosophila)
G3bp	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein
Glcci1	glucocorticoid induced transcript 1
Gli3	GLI-Kruppel family member GLI3
Glr1	glycine receptor, alpha 1 subunit

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Gm1568	gene model 1568, (NCBI)
Gpm6b	glycoprotein m6b
Gpr177 G	protein-coupled receptor 177
Gpr56 G	protein-coupled receptor 56
Hdgfrp3	hepatoma-derived growth factor, related protein 3
Hes5	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila)
Hipk2	homeodomain interacting protein kinase 2
Hoxa2	homeo box A2
Hoxa3	homeo box A3
Hoxb3	homeo box B3
Hoxb4	homeo box B4
Hoxc4	homeo box C4
Insm1	insulinoma-associated 1
Irx2	Iroquois related homeobox 2 (Drosophila)
Irx3	Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)
Irx5	Iroquois related homeobox 5 (Drosophila)
Kbtbd11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11
Lbxcor1	ladybird homeobox 1 homolog (Drosophila) corepressor 1
Lfng	lunatic fringe gene homolog (Drosophila)
Ly6h	lymphocyte antigen 6 complex, locus H
Marcks	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
Megf10	multiple EGF-like-domains 10
Meis1	myeloid ecotropic viral integration site 1
Mfsd2	major facilitator superfamily domain containing 2
Mn1	meningioma 1
Msx3	homeo box, msh-like 3
Mtap2	microtubule-associated protein 2
Mycl1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)
Mylk	myosin, light polypeptide kinase
Ncald	neurocalcin delta
Ndn	necdin



<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Nedd9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9
Nes	nestin
Neurod4	neurogenic differentiation 4
Neurog1	neurogenin 1
Neurog2	neurogenin 2
Nhlh2	nescient helix loop helix 2
Nnat	neuronatin
Nr2f1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1
Nr2f2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
Nrarp	Notch-regulated ankyrin repeat protein
Nrcam	neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule
Olig3	oligodendrocyte transcription factor 3
Pax3	paired box gene 3
Pax6	paired box gene 6
Pax7	paired box gene 7
Pcdh8	protocadherin 8
Pcdhac1,2; a2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12	protocadherin alpha subfamily C, 1,2; protocadherin alpha 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
Pcdhb16	protocadherin beta 16
Peg12	paternally expressed 12
Pik3r3	phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 3 (p55)
Pkia	protein kinase inhibitor, alpha
Plagl1	pleiomorphic adenoma gene-like 1
Plxna2	plexin A2
Pogk	pogo transposable element with KRAB domain
Pou3f3	POU domain, class 3, transcription factor 3
Ptf1a	pancreas specific transcription factor, 1a
Ptn	pleiotrophin
Ptprd	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D
Punc	putative neuronal cell adhesion molecule

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Rarb	retinoic acid receptor, beta
Rbmx	RNA binding motif protein, X chromosome
Rfx4	regulatory factor X, 4 (influences HLA class II expression)
Rgs2	regulator of G-protein signaling 2
Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3
Scg3	secretogranin III
Scg5	secretogranin V
Shh	sonic hedgehog
Slc35f1	solute carrier family 35, member F1
Snx26	sorting nexin 26
Sox11	SRY-box containing gene 11
Sox21	SRY-box containing gene 21
Sox9	SRY-box containing gene 9
Spsb4	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 4
Srgap3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3
Sst	somatostatin
St8sia1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
St8sia2	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2
Tcfap2a	transcription factor AP-2, alpha
Tcfap2b	transcription factor AP-2 beta; synonyms
Tox3	TOX high mobility group box family member 3
Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16
Zeb2	zinc finger E-box binding homeobox 2
Zfhx4	zinc finger homeodomain 4
Zfp60	zinc finger protein 60
Zfp608	zinc finger protein 608
Zfp629	zinc finger protein 629
Zic1	zinc finger protein of the cerebellum 1

**Table. 4** 沿軸中胚葉（PAM）で発現が上昇する遺伝子（140遺伝子）

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
1700109F18Rik	RIKEN cDNA 1700109F18 gene
2210023G05Rik	RIKEN cDNA 2210023G05 gene
2610008E11Rik	RIKEN cDNA 2610008E11 gene
2610528A11Rik	RIKEN cDNA 2610528A11 gene
3321401G04Rik	RIKEN cDNA 3321401G04 gene
3526402J09Rik	RIKEN cDNA 3526402J09 gene
4631422O05Rik	RIKEN cDNA 4631422O05 gene
6330403K07Rik	RIKEN cDNA 6330403K07 gene
8430436O14Rik	RIKEN cDNA 8430436O14 gene
Actc1	actin, alpha, cardiac
Adamts2	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2
Adamts20	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 20
Ahnak	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)
AK220484	cDNA sequence AK220484
Amot	angiominin
Ar	androgen receptor
Bgn	biglycan
Bmp5	bone morphogenetic protein 5
C76566	expressed sequence C76566
Capn6	calpain 6
Cav2	caveolin 2
Ccdc80	coiled-coil domain containing 80
Cd44	CD44 antigen
Cd82	CD82 antigen
Cdc42ep1	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1
Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
Cdx2	caudal type homeo box 2
Cfh	complement component factor h
Cobl1	Cobl-like 1

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Col1a1	procollagen, type I, alpha 1
Col1a2	procollagen, type I, alpha 2
Col23a1	procollagen, type XXIII, alpha 1
Col3a1	procollagen, type III, alpha 1
Col4a5	procollagen, type IV, alpha 5
Col4a6	procollagen, type IV, alpha 6
Col5a1	procollagen, type V, alpha 1
Col5a2	procollagen, type V, alpha 2
Col6a1	procollagen, type VI, alpha 1
Col6a2	procollagen, type VI, alpha 2
Cp	ceruloplasmin
Creb3l2	cAMP responsive element binding protein 3-like 2
Crispld2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2
Ctso	cathepsin O
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1
Cyr61	cysteine rich protein 61
D12Erttd647e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 647, expressed
D5Erttd593e	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 593, expressed
Dok4	docking protein 4
Dsp	desmoplakin
E430024C06Rik	RIKEN cDNA E430024C06 gene
Efna1	ephrin A1
Egfr	epidermal growth factor receptor
Egr3	early growth response 3
Emp2	epithelial membrane protein 2
Fbxo39	F-box protein 39
Fosl2	fos-like antigen 2
Foxf1a	forkhead box F1a
Frzb	frizzled-related protein
Gent1	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2
Gpr64	G protein-coupled receptor 64

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Grem1	gremlin 1
Gucy1b3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3
H19	H19 fetal liver mRNA
H2-T23	histocompatibility 2, T region locus 23
Hand1	heart and neural crest derivatives expressed transcript 1
Hist1h1c	histone cluster 1, H1c
Hoxa10	homeo box A10
Hoxa11	homeo box A11
Hoxb6	homeo box B6
Hoxc10	homeo box C10
Hoxd1	homeo box D1
Hoxd10	homeo box D10
Ifi204; Ifi205	interferon activated gene 204; interferon activated gene 205
Ifit1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4
Igsl1	immunoglobulin superfamily, member 11
Il33	interleukin 33
Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier
Islr	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
Leprel1	leprecan-like 1
Lgals3bp	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
Lhfpl2	lipoma HMGIC fusion partner-like 2
LOC545386	interferon activated gene 203; isoform 2 is encoded by transcript variant 2
Lypd6	LY6/PLAUR domain containing 6
Maged2	melanoma antigen, family D, 2
MGI:1889205	plasma glutamate carboxypeptidase; Plasma glutamate carboxypeptidase
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1
Mmp2	matrix metalloproteinase 2
Mmp3	matrix metalloproteinase 3

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Ms4a4d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4D
Msx1	homeo box, msh-like 1
Nfix	nuclear factor I/X
Odz3	odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)
Papss2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2
Pcdh7	protocadherin 7
Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
Pdlim4	PDZ and LIM domain 4
Pdxdc1	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1
Peg3	paternally expressed 3
Phldb2	pleckstrin homology-like domain, family B, member 2
Pitx1	paired-like homeodomain transcription factor 1
Plekhg2	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2
Postn	periostin, osteoblast specific factor
Prickle1	prickle like 1 (Drosophila)
Prrx1	paired related homeobox 1
Prrx2	paired related homeobox 2
Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
Rbms3	RNA binding motif, single stranded interacting protein
Rgs5	regulator of G-protein signaling 5
Rps9	ribosomal protein S9
Rspo2	R-spondin 2 homolog (Xenopus laevis)
Rtp4	receptor transporter protein 4
Runx2	runt related transcription factor 2
Scarf2	scavenger receptor class F, member 2
Sema3a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
Serpinb6b	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b
Serpinb9	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 9
Sertad4	SERTA domain containing 4

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Slit3	slit homolog 3 (Drosophila)
Snai2	snail homolog 2 (Drosophila)
Stch	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, human homolog
Tbx20	T-box 20
Tbx4	T-box 4
Tcf21	transcription factor 21
Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3
Tmem119	transmembrane protein 119
Tmem176a	transmembrane protein 176A
Trf	transferrin
Twist2	twist homolog 2 (Drosophila)
Ube2h	ubiquitin-conjugating enzyme E2H
Ugt1a2	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A2
Unc5c	unc-5 homolog C (C. elegans)
Xist	inactive X specific transcripts
Zfp9	zinc finger protein 9

**Table. 5 側板中胚葉 (LPM) で発現が上昇する遺伝子 (85遺伝子)**

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
1810011O10Rik	RIKEN cDNA 1810011O10 gene
2900093B09Rik	RIKEN cDNA 2900093B09 gene
4732435N03Rik	RIKEN cDNA 4732435N03 gene
6230427J02Rik	RIKEN cDNA 6230427J02 gene
6330442E02Rik	RIKEN cDNA 6330442E02 gene
Adam12	a disintegrin and metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha)
Afap111	actin filament associated protein 1-like 1
Agtr11	angiotensin receptor-like 1
Asb4	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 4
Atf3	activating transcription factor 3
BC054438	cDNA sequence BC054438
Bmp1	bone morphogenetic protein 1
Bmper	BMP-binding endothelial regulator
Calcr1	calcitonin receptor-like
Cald1	caldesmon 1
Cd40	CD40 antigen
Cdgap	Cdc42 GTPase-activating protein
Cldn5	claudin 5
Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha
Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta
Ctsh	cathepsin H
Cyp26a1	cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1
Dusp2	dual specificity phosphatase 2
E030004N02Rik	RIKEN cDNA E030004N02 gene
Edil3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
Egr2	early growth response 2
Elk3	ELK3, member of ETS oncogene family
Eng	endoglin
Eomes	eomesodermin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
Erg	avian erythroblastosis virus E-26 (v-ets) oncogene related
Ets1	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain



<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Etv2	ets variant gene 2
Evx1	even skipped homeotic gene 1 homolog
Fli1	Friend leukemia integration 1
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
Flt4	FMS-like tyrosine kinase 4
Foxc2	forkhead box C2
Gimap4	GTPase, IMAP family member 4
Gja4 gap	junction membrane channel protein alpha 4
Gng11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11
Gpr116	G protein-coupled receptor 116
Hapln1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1
Hey1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
Hoxd8	homeo box D8
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4
Itpkb	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B
Kdr	kinase insert domain protein receptor
Klf7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)
Klhl6	kelch-like 6 (Drosophila)
Lmo2	LIM domain only 2
LOC546142	similar to LOC363091 protein
Magi3	membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 3
Mall	mal, T-cell differentiation protein-like
Mef2a	myocyte enhancer factor 2A
Mix11	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)
Mmp9	matrix metalloproteinase 9
Mmrn2	multimerin 2
Mogat2	monoacylglycerol O-acyltransferase 2
Morc4	microrchidia 4
Mum111	melanoma associated antigen (mutated) 1-like 1
Nrp2	neuropilin 2
Pcdh12	protocadherin 12

<b>Gene symbol</b>	<b>Description</b>
Pcdh18	protocadherin 18
Plcl2	phospholipase C-like 2
Plxnd1	plexin D1
Ppp1r16b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B
Prkar2b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta
Prtg	protogenin homolog (Gallus gallus)
Ptpre	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
Ramp2	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2
Rasgrp3	RAS, guanyl releasing protein 3
Rbms1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1
Rcsd1	RCSD domain containing 1
Rhoj	ras homolog gene family, member J
Sox18	SRY-box containing gene 18
Sox7	SRY-box containing gene 7
Tal1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
Tek	endothelial-specific receptor tyrosine kinase
Tgfbr3	transforming growth factor, beta receptor III
Tnfaip2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
Tnfrsf19	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19
Tspan18	tetraspanin 18
Vav3	vav 3 oncogene
Vcan	versican
Vldlr	very low density lipoprotein receptor

**Table 6. PCRプライマー**

Gene	Forward primer	Reverse primer
Acta1	TTATCGGTATGGAGTCTGCGGG	CACAGCACGATTGTCGATTGTGG
Afp	TCGTATTCCAACAGGAGG	AGGCTTTTGCTTACCAG
Amy	CAGGCAATCCTGCAGGAACAA	CACTTGCGGATAACTGTGCCA
$\beta$ -actin	GTGATGGTGGGAATGGGTCA	TTTGATGTCACGCACGATTTCC
Bglap1	GAGGACCATCTTTCTGCTCACTCT	GACATGAAGGCTTTGTCAGACTCA
Bglap2	GCGCTACCTTGAGCTTCAG	CATACTGGTTTGATAGCTCGTCACA
Dlx2	GCAGAGTTTGTAATAAGGGTGTCTG	CTACGTCGCAGCTTTCACAAC
Foxa2	TGGTCACTGGGGACAAGGGAA	GCAACAACAGCAATAGAGAAC
Foxg1	AAAACCTCGCTGGGCAACAAC	CAGGGGTTGAGGGAGTAGGT
Fst	GGGCAGATCCATTGGATTAGC	CCTTGGAATCCCATAGGCATT
Gcg	ACTCACAGGGCACATTCACC	CCAGTTGATGAAGTCCCTGG
Glut2	ACAGAGCTACAATGCAACGTGG	CAACCAGAATGCCAATGACGAT
Gsh2	CACTACCTACAACATGTCGGAC	CAGGTTTAGGTATGTCGCGATC
Hand1	CCGGCGAGAAGAGGATTA	TCAAATGACATTGCACGTGC
Hand2	TACAGTATGGCCCTGTCCTA	TCCAGGGCCCAGACGTGCTG
Hes5	TCCTCTGGATGTGGGAAGAC	TCGCAGAAGTCACTTGCTGA
Hoxa2	AAGTGGAGGAAGACGAGGAAG	TTAGGAACAGTGGGTGACTGG
Hoxb1	CCGGACCTTCGACTGGATG	GGTCAGAGGCATCTCCAGC
Hoxb4	TGCGCAAAGTTCACGTGAGCAC	GTGTTGGGCAACTTGTGGTC
Hoxc4	AGCAAGCAACCCATAGTCTACC	ATAACCTGGTGATGTCTCTGC
Hoxc6	CCGTCCCTATAACCATCTAGTTCC	GGAACCTGAAACACGACATTTCTCC
Hspg2	CAGGTCCTAATGTGGCGGTCAACAC	ATGGGCAGGACAAGGGGATTG
Iapp	GATTCCCTATTTGGATCCCC	CTCTCTGTGGCACTGAACCA
Ins1	CAGCCCTTAGTGACCAGCTA	ATGCTGGTGCAGCACTGATC
Isl1	GACTGAGAGGGTCTCCAGCTC	AGCAAGAACGACTTCGTGATG
Itgb1	TTGGGATGATGTGCGGGAC	AATGTTTCAGTGCAGAGC
Kdr	CACCTGGCACTCTCCACCTTC	GATTTTCATCCCACTACCGAAAG
Lama5	GCCCAAGTCTTCAACTGCTC	CTGCTTGGAAGTGCTAGGG
MafA	TTTCCTCGGCAGCGTCCACTTGTA	GGGGGTTCTCCGGGTTTCTAAT
Mesp2	AGAGGGTCTGTTCCATACTCC	TCCTTTGTCCTCCACACTCA
Msx1	ACCCCTTGCTACACACTTCC	AAGCAGCTGATGGAGTCTCA

Gene	Forward primer	Reverse primer
Neurod	GGAGTAGGGATGCACCGGGAA	CTTGGCCAAGAAGACTACATCTGG
Nkx2-2	AACCGTGCCACGCGCTCAAA	AGGGCCTAAGGCCTCCAGTCT
Nkx6.1	TACTTGGCAGGACCAGAGAG	CGCTGGATTTGTGCTTTTTTC
Olig2	CAAGTCATCTTCTCCAGCAC	GTAGATCTCGCTCACCAGTCG
Otx1	GAAAACCAAGCCCGAGTTCC	GAGGAGACGGACTGCCTTAC
Pax2	CTGTTTCCAGCGCCTCTAAC	GACGCTCAAAGACTCGATCC
Pax3	GTTGCGTCTCTAAGATCCTG	GCGCCCTTGAGCAATTTGTC
Pax4	AACAGAAGAGCCAAATGGCG	TGAGCAATGGGTTGATGGCA
Pax6	CAGTCACAGCGGAGTGAATC	CGCTTCAGCTGAAGTCGCAT
Pax7	AATGGCCTGTCTCCTCAGGT	TCTCCTGGCTTGATGGAGTC
Pdgrf $\alpha$	AATCCTGCAGACGAGAGCAC	GCCACCAAGGGAAAAGATTT
Pdgrf $\beta$	GTCTGGTCTTTTGGGATCCT	AAGGCTGGTTACAGTTTGGC
Pdx1	CCAAAACCGTCGCATGAAGTG	CTCTCGTGCCCTCAAGAATTTTC
Pecam	GTCATGGCCATGGTCGAGTA	CTCTCGGCATCTTGCTGAA
Pou5f1	GAGGAAGCCGACAACAATGAGAACCTTCAG	TTCTGGCGCCGGTTACAGAACCATACTCGA
Ppy	AGGATGGCCGTCGCATACTG	CTGAAGGACCTCACGTCGAG
Ptfla	TGCAGTCCATCAACGACGC	GGACAGAGTTCTTCCAGTTC
Slug	AAGAGGAAGAGAGTCTGCCAGAC	TGTCTTTCCCTCCTCTTCCAAGG
Snail	CTCCACAAGCACCAAGAGTCTG	TCCAGTAACCACCCTGCTGAG
Sox17	GAACAGTTGAGGGGCTACAC	GTTTAGGGTTTCTTAGATGC
Spp1	GCTGTGTCCTCTGAAGAAAAGG	AGACTTGGTTCATCCAGCTGAC
Sst	CCGTCAGTTTCTGCAGAAGT	CAGGGTCAAGTTGAGCATCG
Tal1	CCCACCAGACAAGAACTAAGCA	GGCCAGGAAATTGATGTACTTCA
Vecd	CCTGTCTTCCAGCGACACTTCT	TGCCGATCAGAGGTTTCT
Zic1	TCGTGTCTCCACAACAGAC	GGGGTGTCTCGAGTTTCAGG

## 参考文献

1. Keller, G. M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 7, 862-9 (1995).
2. Nakagawa, M. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101-6 (2008).
3. Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2, 3081-9 (2007).
4. Shiraki, N. et al. Differentiation and characterization of embryonic stem cells into three germ layers. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 694-9 (2009).
5. Shiraki, N. et al. Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. *Genes Cells* 13, 731-46 (2008).
6. Shiraki, N. et al. Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem Cells* 26, 874-85 (2008).
7. Wells, J. M. & Melton, D. A. Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 393-410 (1999).
8. Lawson, K. A., Meneses, J. J. & Pedersen, R. A. Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer. *Dev Biol* 115, 325-39 (1986).
9. Rodaway, A. & Patient, R. Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell* 105, 169-72 (2001).
10. Kimelman, D. & Griffin, K. J. Vertebrate mesendoderm induction and patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10, 350-6 (2000).
11. Tremblay, K. D., Hoodless, P. A., Bikoff, E. K. & Robertson, E. J. Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development* 127, 3079-90 (2000).
12. Lowe, L. A., Yamada, S. & Kuehn, M. R. HoxB6-Cre transgenic mice express Cre recombinase in extra-embryonic mesoderm, in lateral plate and limb mesoderm and at the midbrain/hindbrain junction.

- Genesis 26, 118-20 (2000).
13. Ciruna, B. & Rossant, J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 1, 37-49 (2001).
  14. Henry, G. L., Brivanlou, I. H., Kessler, D. S., Hemmati-Brivanlou, A. & Melton, D. A. TGF-beta signals and a pattern in *Xenopus laevis* endodermal development. *Development* 122, 1007-15 (1996).
  15. David, N. B. & Rosa, F. M. Cell autonomous commitment to an endodermal fate and behaviour by activation of Nodal signalling. *Development* 128, 3937-47 (2001).
  16. Conlon, F. L. et al. A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120, 1919-28 (1994).
  17. Schier, A. F. Nodal signaling in vertebrate development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 589-621 (2003).
  18. Derynck, R., Zhang, Y. & Feng, X. H. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95, 737-40 (1998).
  19. Germain, S., Howell, M., Esslemont, G. M. & Hill, C. S. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev* 14, 435-51 (2000).
  20. Kikuchi, Y. et al. The zebrafish bonnie and clyde gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors. *Genes Dev* 14, 1279-89 (2000).
  21. Kim, S. K., Hebrok, M. & Melton, D. A. Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* 124, 4243-52 (1997).
  22. Hebrok, M., Kim, S. K. & Melton, D. A. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12, 1705-13 (1998).
  23. Lammert, E., Cleaver, O. & Melton, D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294, 564-7 (2001).

24. Offield, M. F. et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983-95 (1996).
25. Kawasaki, H. et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40 (2000).
26. Kodama, H., Nose, M., Niida, S., Nishikawa, S. & Nishikawa, S. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol* 22, 979-84 (1994).
27. Kubo, A. et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 131, 1651-62 (2004).
28. Gadue, P., Huber, T. L., Paddison, P. J. & Keller, G. M. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16806-11 (2006).
29. Yasunaga, M. et al. Induction and monitoring of definitive and visceral endoderm differentiation of mouse ES cells. *Nat Biotechnol* 23, 1542-50 (2005).
30. D'Amour, K. A. et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23, 1534-41 (2005).
31. D'Amour, K. A. et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-401 (2006).
32. Kroon, E. et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443-52 (2008).
33. Kleinman, H. K., Philp, D. & Hoffman, M. P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 14, 526-32 (2003).
34. Taipale, J. & Keski-Oja, J. Growth factors in the extracellular matrix. *Faseb J* 11, 51-9 (1997).
35. Yurchenco, P. D. & Schittny, J. C. Molecular architecture of basement membranes. *Faseb J* 4, 1577-90 (1990).
36. Furuyama, A. & Mochitate, K. Assembly of the exogenous

- extracellular matrix during basement membrane formation by alveolar epithelial cells in vitro. *J Cell Sci* 113 (Pt 5), 859-68 (2000).
37. Hosokawa, T. et al. Differentiation of tracheal basal cells to ciliated cells and tissue reconstruction on the synthesized basement membrane substratum in vitro. *Connect Tissue Res* 48, 9-18 (2007).
  38. Gu, G. et al. Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development. *Development* 131, 165-79 (2004).
  39. Hara, M. et al. Transgenic mice with green fluorescent protein-labeled pancreatic beta -cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E177-83 (2003).
  40. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-7 (2007).
  41. Tada, S. et al. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* 132, 4363-74 (2005).
  42. Sakurai, H. et al. In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility. *Stem Cells* 24, 575-86 (2006).
  43. Ying, Q. L., 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* 115, 281-92 (2003).
  44. Stavridis, M. P. & Smith, A. G. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biochem Soc Trans* 31, 45-9 (2003).
  45. Okada, Y. et al. Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* 26, 3086-98 (2008).
  46. Kawaguchi, J., Mee, P. J. & Smith, A. G. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 36, 758-69 (2005).
  47. Dani, C. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cells Tissues Organs* 165, 173-80 (1999).



48. Mitsui, K. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-42 (2003).
49. Nikolova, G. et al. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell* 10, 397-405 (2006).
50. Doi, M. et al. Recombinant human laminin-10 (alpha5beta1gamma1). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 12741-8 (2002).
51. Izvolsky, K. I. et al. Heparan sulfate-FGF10 interactions during lung morphogenesis. *Dev Biol* 258, 185-200 (2003).
52. Wu, Z. L., Lech, M., Beeler, D. L. & Rosenberg, R. D. Determining heparan sulfate structure in the vicinity of specific sulfotransferase recognition sites by mass spectrometry. *J Biol Chem* 279, 1861-6 (2004).
53. Okada, Y., Shimazaki, T., Sobue, G. & Okano, H. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 275, 124-42 (2004).
54. Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A. & Jessell, T. M. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 110, 385-97 (2002).
55. Arnold, S. J., Hofmann, U. K., Bikoff, E. K. & Robertson, E. J. Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse. *Development* 135, 501-11 (2008).
56. Lewis, S. L. et al. Dkk1 and Wnt3 interact to control head morphogenesis in the mouse. *Development* 135, 1791-801 (2008).
57. Lecaudey, V., Anselme, I., Dildrop, R., Ruther, U. & Schneider-Maunoury, S. Expression of the zebrafish Iroquois genes during early nervous system formation and patterning. *J Comp Neurol* 492, 289-302 (2005).
58. Oates, A. C. et al. An early developmental role for eph-ephrin

- interaction during vertebrate gastrulation. *Mech Dev* 83, 77-94 (1999).
59. Aruga, J. The role of *Zic* genes in neural development. *Mol Cell Neurosci* 26, 205-21 (2004).
  60. Narumiya, H. et al. Endocardiogenesis in embryoid bodies: novel markers identified by gene expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 896-902 (2007).
  61. Ito, Y. *RUNX* genes in development and cancer: regulation of viral gene expression and the discovery of *RUNX* family genes. *Adv Cancer Res* 99, 33-76 (2008).
  62. Hoogaars, W. M., Barnett, P., Moorman, A. F. & Christoffels, V. M. T-box factors determine cardiac design. *Cell Mol Life Sci* 64, 646-60 (2007).
  63. Teratani, T. et al. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* 41, 836-46 (2005).
  64. Rodgers, K. D., San Antonio, J. D. & Jacenko, O. Heparan sulfate proteoglycans: a GAGgle of skeletal-hematopoietic regulators. *Dev Dyn* 237, 2622-42 (2008).
  65. Ruhrberg, C. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. *Bioessays* 25, 1052-60 (2003).