

日本におけるヒト ES、iPS 細胞研究標準化：その 1

古江一楠田 美保

独・医薬基盤研究所・生物資源研究部門・細胞資源研究室
京都大学再生医科学研究所・附属幹細胞医学研究センター・細胞プロセッシング

要旨 1998年にヒト胚性幹 (ES) 細胞が樹立され、発生過程におけるメカニズムの解明や再生医療応用などの目的で、国際的にはさかんに研究が進められている。一方、日本においては種々の問題から、多くの研究者がヒト ES 細胞を使用して研究を進められているという現状ではない。2007年にヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞が開発され、日本においてもにわかにヒト幹細胞の培養に携わる研究者が増加してきた。ヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞様の形質を有しており、ES 細胞用のプロトコールのほとんどを iPS 細胞に応用することが可能である。この総説では、ヒト ES についての基本的な培養について紹介する。

キーワード： ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞、フィーダー細胞

序 文

1998年 Thomson らにより¹⁾、ヒト ES 細胞が樹立されて10年の月日が過ぎようとしている。当時、Thomson 教授からヒト ES 細胞の供与をうけた多くの研究者がその培養ができず、たびたび Thomson 教授に再送を求めるため、ジャクソン研究所でヒト ES 細胞のトレーニングが始まったと聞く。この話は、ヒト ES 細胞の培養が従来の細胞培養とはかなり異なっていることを意味するのではないだろうか。現在、ヒト ES 細胞は、国際的には発生過程におけるメカニズムの解明や再生医療研究などにさかんに使用されている。一方、日本に

においては2004年に中辻らのグループにより^{2,3)} ヒト ES 細胞株が樹立されたが、種々の問題から多くの研究者がヒト ES 細胞を使用して研究を進めているという現状ではない。2006年に山中らのグループにより、マウス人工多能性幹 (iPS) 細胞の開発が発表された⁴⁾。多くの研究者達はヒト iPS 細胞の開発までにはまだまだ時間がかかるだろうと予想していた。しかし、その予想を大きく裏切って、2007年にヒト iPS 細胞の作成が発表された⁵⁾。その後は次々と世界中から新しいヒト iPS 細胞作成の報告されている⁶⁻⁹⁾。日本国内においても、各研究室で新規の iPS 細胞の作製が行われ、当 JCRB 細胞バンク (厚生労働省研究資源事業) に新規のヒト iPS 細胞が寄託されて、現在、分譲の準備を行っている。ヒト ES 細胞は株間の差が大きいことが知られている。一つの研究室で樹立された細胞であっても、株間によって増殖速度や分化傾向も異なり¹⁰⁾、また、継代方法を変える必要がある場合

連絡者：古江一楠田美保

独立行政法人 医薬基盤研究所 生物資源研究部門 細胞資源研究室
〒567-0085 茨木市彩都あさぎ1-6-8
TEL:072-641-9811 内線 (3210)、FAX:072-641-9851
E-mail: mkfurus@nibio.go.jp

も多い。英国シェフィールド大学 Andrews 教授がリーダーとして推進している International human ES cell initiatives (ISCI) プロジェクトでは、日本を含めた世界11カ国の研究者らが共同で60株近くのヒト ES 細胞株の特徴を比較し、ヒト ES 細胞研究の標準化が進められている^{11,12)}。ヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞様の特徴を有しており、同じ細胞株から作製された iPS 細胞であっても、クローン間の差が認められる。ES 細胞を用いた培養プロトコルのほとんどを iPS 細胞に応用することが可能である。ヒト ES 細胞研究が一般的でなかった日本においてヒト iPS 細胞を用いた研究を行うためには、ヒト ES 細胞を基準とした標準化研究を行う必要があるだろう。まず、ヒト ES、iPS 細胞について論文に記載されないような内容も含めて基礎的な培養方法について紹介する。

1. フィーダー細胞

ES 細胞を未分化状態に保持するために、一般的にはマウス胎児由来初代培養線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) がフィーダー細胞として用いられている¹³⁾。線維芽細胞といっても純粋な線維芽細胞ではなく、実際には多くの細胞が混ざっている。マウスの系統は、各種細胞の樹立者が使用したものをを使うのが望ましい。MEF はマイトマイシン C あるいは γ 線照射により有糸分裂を不活性化して使用する。最近では、各社からマイト

マイシンあるいは γ 線照射処理済みの MEF が供給されている (表 1)。各自で初代培養を行って MEF を作成すると安価のように思えるが、ES 細胞の未分化性を維持できるかどうかなどのチェックを含めると、ロット管理にかなり手間がかかる。MEF ではなく、樹立された STO 細胞株を使用する場合もある¹⁴⁾。STO 細胞 (ATCC, CRL-1503) は、Dr. Alan Bernstein により分離された SIM マウス線維芽細胞のチオグアニンおよびウアバイン抵抗性亜系で、奇形癌腫 (EC) やマウス ES 細胞のフィーダーとして用いられている。STO 細胞は容易に細胞を増やすことが可能であり、ほぼ MEF と同様に問題なく培養できる場合もあるが、ES 細胞との相性の問題があったり、4 日間以上の培養には耐えられないなど、難しい点もある。しかし、相性よく培養できる場合には、取り扱いが簡単で安価である。ネオマイシン抵抗性 (neor) 発現ベクターおよび LIF 発現ベクターを安定的に組み込んだ STO 細胞 (SNL 細胞、あるいは SNL 76/7 STO 細胞、ECACC 07032801) は、山中らのグループによるヒト iPS 細胞培養に使用されている。また、動物由来細胞を使用せず、ヒト化培養条件を目指して様々なヒト組織由来細胞が試みられている^{15,16)}。

2. 培 養 液

Thomson らにより樹立された当時は Dulbecco's

表 1 JCRB において使用しているフィーダー細胞の種類

細胞名	処 理	入手先	カタログ番号	細胞数 /25 cm ²
Primary mouse embryo fibroblast				
Strain CF-1	マイトマイシン処理済	ミリポア	PMEF-CF*	2.4 × 10 ⁵
Hygro Resistant Strain C57/BL6	マイトマイシン処理済	ミリポア	PMEF-HL*	2 × 10 ⁵
ICR	マイトマイシン処理済	リプロセル	RCHEFC003*	2 × 10 ⁵
STO 細胞		ATCC	CRL-1503	
SNL 76/7 STO 細胞		ECACC	07032801	

* のあるものは、当バンクで使用可能であることを確認済み。

modified Eagle's medium、あるいは DMEM と F12 を 1:1 に混合した DM/F12、と 20% 牛血清が使用されていた¹³⁾。しかし、血清成分にはヒト ES 細胞の分化因子も含まれていることから改良され、近年は、線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) と KnockOut Serum Replacement™ (KSR, Invitrogen) と KnockOut DMEM (Invitrogen) が使用されている¹⁷⁾。DM/F12、あるいは KnockOut DM/F12 (Invitrogen) も基礎培地として使用されている (表 1)。KSR は、serum-free とされているが、動物由来成分を含み、ロット差があるためにロットチェックが必要となる。また、解凍して 2 週間以上たったものは品質が保証されていない。HEPES を含まない培地を使用することが多い。HEPES はもともと一般的な培養細胞に対して毒性があり、ロット差も多いことが知られている。一方、HEPES を使用しない場合には緩衝作用が弱くなり、pH の変化も大きくな

る。幹細胞は、弱酸性には強いがアルカリ性には弱いので、注意が必要である¹⁸⁾。

3. 細胞分散法

ヒト ES、iPS 細胞の培養において細胞分散法がもっとも難しいと言えるだろう。シングルセルにしてしまうと、ほとんどの細胞がアポトーシスにより生存できないため、コロニーを 50~100 個ぐらいの細胞集団にして継代を行う^{1,19)}。継代時の細胞分散は、機械的方法と酵素による方法に大別される¹³⁾。酵素による方法は、均一に細胞分散でき、簡便である。一方、分散方法によっては分化しなくなる、あるいは、染色体異常となるなど、細胞分散方法による様々な現象がヒト ES 細胞研究者の間では知られている。特に、酵素処理によってシングルセルが多くでてしまうような操作により、染

表 2 ヒト ES 用培地^{25, 26)}

最 終 濃 度	ス ト ッ ク	GIBCO 番号
80% Knockout DMEM (あるいは DMEM/F12)*		10829-018 (Sigma D6421)
20% GIBCO Knockout SR		10828-028
1% non-essential amino acid solution	100 x MEM non-essential amino acid solution	11140-035
1 mM L-glutamine	0.146 g in 10 ml PBS	21-51-016
0.1 mM β -mercaptoethanol	14.3 M β -mercaptoethanol	Sigma M-7154
4 mg/ml human bFGF**	2 μ g/ml in PBS with 0.1% BSA	13256-029

【手順】

- L-glutamine / β -mercaptoethanol 液の作成
10 ml の CMF-PBS に、0.146 g の L-glutamine を 15 ml チューブに入れる。
7 μ l の β -mercaptoethanol を入れてよく混ぜる。
- フィルターユニットに、以下を入れる。
Knockout DMEM 160 ml
GIBCO Knockout SR 40 ml
L-glutamine / β -mercaptoethanol 液 2 ml
100 x non-essential amino acid solution 2 ml
human bFGF 400 μ l
- フィルターする。
- 4 °C にて保存し、1 週間以内に使用する。

* : JCRB 細胞バンクでは HEPES を含まない GIBCO11965、11765 を混ぜて使用している。

** : 研究室によって使用濃度は少しずつ異なっているため、実際に培養を開始する際には、その細胞に添付されているプロトコルを参照のこと。

表3. JCRB におけるヒト ES、iPS 細胞の継代の手順

	手 順	時 間
準 備	<p>25 cm² フラスコ^①に0.1%ゼラチン溶液を 2 ml ずつ入れる^②。 37°Cインキュベーターに静置。 MEF 用培地を作成^③。 ゼラチン液を吸引。PBS にて洗浄。 各フラスコに MEF 用培地を 4 ml ずつ入れる。 15 ml チューブに MEF 培地を 9 ml 入れる。 N₂ に入れたまま MEF をクリーンベンチ近くに持ってくる。 バイアルの蓋をクリーンベンチ内で開けてバイアルの N₂ を抜く。 37°Cウォーターバスに入れて溶解。半分以上凍った状態でクリーンベンチ内へ移動する。MEF 培地でピペッティングしながら溶解。MEF 浮遊液を 15 ml チューブに入れる。 1000 rpm 遠心 新しい MEF 用培地に MEF を浮遊させる。 MEF 細胞浮遊液を 1 ml ずつ各フラスコに入れる。 MEF を CO₂ インキュベーターに入れて、培養。 MEF 用培地からES用培地 (FGF-2 なし) に交換し、培養^④。</p>	<p>30 min</p> <p>できるだけ短い時間で行う。 2 min</p> <p>24 h 24 h</p>
継 代	<p>ヒト ES、iPS 細胞を培養しているフラスコの培地を吸引。 1 unit/ml Dispase^⑤ (Roche/ 解凍後 3 日以内に使用) を 1 ml 入れる。 37°C・CO₂ インキュベーターに入れてインキュベーション。 Dispase を吸引。 hES 培地 10 ml を入れて、10 ml ピペットをつけたピペットエイド (強にする) で培地を吹きかけるようにしてコロニーをはがす (できるだけ回数を少なくする。2 回程度のピペッティングでコロニーをはがれないような場合は、セルスクレーパーを使用してコロニーをはがす)。 顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する。 15 ml チューブに細胞浮遊液を入れて、300 rpm にて遠心 (大きいコロニーのみを回収する)。 新しい hES 培地を入れて細胞浮遊液とする (ピペッティングはしない)。 MEF の培地を吸引。 各フラスコに細胞浮遊液を入れる (Slit の割合は株による) 顕微鏡でコロニーの分散状態を確認。 CO₂ インキュベーターに入れて培養。</p>	<p>3~10 min^⑥</p> <p>2 min</p> <p>24 h</p>
培 地 交 換	<p>接着率が悪い株の場合、翌日の培地交換は行わない場合もある 培地交換に必要な hES 培地をチューブに分取し、FGF-2 を入れる。 37°Cウォーターバスで培地を温める。 細胞の状態を顕微鏡でチェック。 温めた培地をクリーンベンチに持ってくる。 フラスコの培地を吸引。 温めた培地を入れる。 細胞の状態をチェック^⑦。 CO₂ インキュベーターに入れて、培養。 基本的に毎日培地交換を行う^⑧。</p>	<p>(24 h)</p> <p>5 min</p>

- ① メーカーによって細胞の生着率や継代時のディスペーゼの処理時間なども変わってくる。当バンクではコーニングを使用している。
- ② 成育医療センター樹立 iPS 細胞は、C57/BL6 マウスの MEF を使用して樹立されている。市販のものでは、Hygro Resistant Strain C57/BL6 (ミリポア) が使用可能であることを確認している。MEF バイアル 1 本を30枚の 25 cm² フラスコに播種している。ただし、ロット差があるため、新しいロットの際には、密度を変えて播種してチェックする必要がある。
- ③ high glucose, L-glutaminem, 15%牛胎児血清 (ES グレード) 含有 DMEM
- ④ MEF は播種してから24時間後では十分に広がっていないため、2 日後以降に使用の方が望ましい。継代する前に、事前にヒト ES 用培地に交換をしておき、MEF をヒト ES 培地になじませておくことよい。
- ⑤ Dispase の活性は解凍後 3 日以後は急激に低下する。細胞分散の処理時間を一定にするためには、用事解凍して使用するのが望ましい。また、提示されている酵素活性が同様であっても、会社によって微妙にその活性は異なる。当セルバンクでは Roch・Dispase 1 unit/ml で使用できることは確認している。
- ⑥ Dispase に対する感受性は株によって異なる。新しいロットのディスペーゼあるいは新しい細胞株の場合には、まず、3分37°Cで処理して顕微鏡でコロニーの状態を確認する。ES、iPS 細胞のコロニーのエッジが光って、少しだけ丸くカールしていたら、すぐにディスペーゼを除く。コロニーが巻きあがるようにカールしている場合には処理時間が長すぎる。その場合、簡単に揺らしただけでコロニーがはがれてしまう可能性があるため、ディスペーゼは吸引せずに、培地を加えて遠心してディスペーゼを除く。2~3 回培地で洗った方が生着率が良い。
- ⑦ 培地の調整でよく間違えるのが 2-ME の濃度である。2-ME の濃度が高い場合、培地交換してすぐに細胞が死んでいく。
- ⑧ 平日は毎日培地交換を行うが、週末は土曜日か日曜日のどちらか 1 回のみに行っている。ただし、その場合、コンフルエントでない状態にしておく必要がある。

色体異常が誘導されると報告されている^{20,21)}。操作者による差も大きく、今後改良がもっとも必要な事項であると考えられる。

① 機械的

機械的、いわゆる mechanical による継代方法¹⁾が、染色体変異が少なく、分化能や未分化性の維持がもっとも良いと、ヒト ES 細胞研究者の間では信じられている。顕微鏡下で、形のよいコロニーを探し、まず、その周りのフィーダーを先の細いプラスチックパスツールで除き、コロニーを50～100程度の細胞集団になるようにプラスチックパスツールで小さく刻んでからピックアップし、新しいMEFの上に播種する。この手法は熟練と時間を要し、また、大容量での培養は難しい³⁾。最近、インビトロジェンから専用のスクレーパー (StemPro EZPassage) が発売された。時間と熟練は要さずに継代できるがコストは高くなる。

② コラゲナーゼ

0.1% コラゲナーゼ IV¹³⁾ とセルスクレーパーを用いる方法が一般的に使用されている。培地を除き、0.1% コラゲナーゼ IV を 1 ml 加えて37°Cのインキュベーターに入れて約10分程度処理する。時間は酵素活性によるが、時々、顕微鏡下で観察し、フィーダーとコロニーの間に間隙ができる程度になったら、コラゲナーゼを吸引し、新しい培地を2～3 ml 加えてからセルスクレーパーで細胞をはがす。培地をさらに7 ml 程度加えてフィーダーとコロニーを引き離すように、ピペッティングを数回行う。シェフィールド大学では、コラゲナーゼとガラスビーズを使用している。

③ EDTA

0.1～0.2% EDTA で処理すると、適度な大きさにコロニーが分散され、未分化なコロニーだけが回収できる。分化した細胞集団から未分化なコロ

ニーを選択する際に使用できる。しかし、EDTA に対する感受性は細胞株によって異なり、シングルセルになる細胞株もあり、すべての細胞株に使用できるわけではない。

④ トリプシン/EDTA

ヒト ES 細胞はトリプシンに弱く、0.05% trypsin / 1 mM EDTA を使用する。通常の継代に使用されている細胞株もあるが、FACS による解析の際にシングルセルにするために使用されることが多い。

⑤ トリプシン/コラゲナーゼ (CTK)

日本国内では末盛ら³⁾ により開発された $[Ca^{2+}]$ で活性を弱めたトリプシンとコラゲナーゼとの混合液 CTK が使用されていることが多い。処理時間も短く簡便であるが、均一で適度な大きさのコロニーにするためには若干の熟練を要する。

⑥ ディスパーゼ

合同酒精が自然界より分離選択したバチルス属の菌株の培養液より精製したプロテアーゼで、トリプシンやコラゲナーゼより穏やかに細胞を分散できる。Thomson らによる樹立時には、機械的方法かディスパーゼが用いられている。当セルバンクにおいては、現在、iPS 細胞の継代にはディスパーゼを使用している。

⑦ アクユターゼ™

ミリポアから販売されているプロテアーゼ、コラーゲン分解酵素による細胞剥離剤とされているが組成は明らかにされていない。ヒト ES 細胞は通常シングルセルとなると増殖できないが、この分散液を使用した場合には、シングルセルにしても細胞が増殖できる。クローナルアッセイなどの場合に使用されている。

⑧ ROCK インヒビター

細胞分散液ではないが、シングルセルにした際のアポトーシスを阻害する薬剤として、笹井ら²²⁾により報告された。遺伝子導入後のクローニングなど、シングルセルにする必要がある際に使用されている。

4. 未分化性の同定法について

未分化なヒト ES 細胞に発現するマーカー分子や表面抗原などが報告されているが、未分化性を同定する決定的なマーカー分子は見つかっていない。現状では、形態からの判断がもっとも確実であると言われている。

① 形 態

細胞質がほとんどなく、丸い核を持った細胞がコンパクトに集合したコロニーを形成し、細胞間境が明瞭でない特徴的な様相を呈する¹⁷⁾ (図1)。

② アルカリフォスファターゼ活性の同定

未分化なマウス、サル、ヒトの ES 細胞は、組織非特異的アルカリフォスファターゼ活性を示すことが知られている。その機能については、明らかとなっていない。

③ FACS による細胞表面抗原の同定

ヒト Embryonal carcinoma (EC) に発現する糖脂質である stage specific embryonic antigen (SSEA)-3、

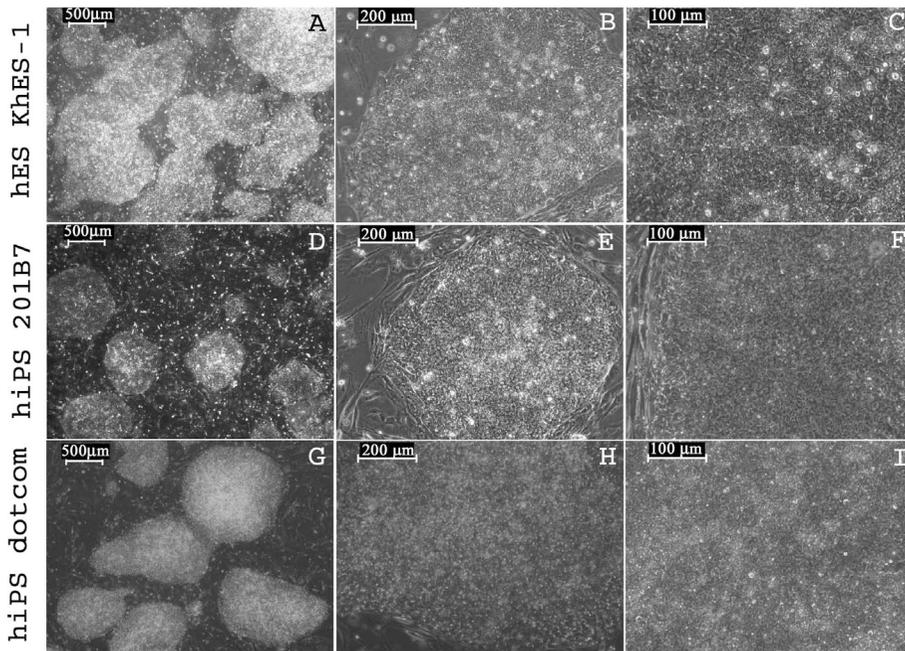


図1：

A~C：hES khES-1 京都大学再生医科学研究所 により分配されたヒト ES 細胞 khES-1。

D~F：hiPS 201B7;物質—細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター／再生医科学研究所・山中伸弥教授から共同研究契約により提供されたヒト iPS 細胞 201B7 clone。

G~I：hiPS Dotcom; 国立成育医療センター生殖医療研究部梅澤明弘部長より寄託されたヒト iPS 細胞 dotcom clone。

SSEA-4、糖タンパクである Tra-1-60、Tra-1-81 が広く使用されている²³⁾。SSEA-1 は、マウスにおいては未分化な ES 細胞において発現するが、ヒトにおいては、分化した ES 細胞において発現する。SSEA-3、SSEA-4 は、未分化なヒト ES 細胞にも発現するが、赤血球にも発現する。一般的には、SSEA-1 と、SSEA-3 あるいは SSEA-4 が調べられている。しかし、SSEA-3 が発現しているからといって SSEA-4 が発現しているとは限らないため、これらの抗体をセットで解析することが望ましい。

④ RT-PCR による遺伝子発現の解析

現在、多くの転写因子が未分化性維持に機能していることが報告されている。なかでも、OCT3/4、NANOG、SOX2 はマウスならびにヒト ES 細胞の未分化マーカー遺伝子として認識されている²⁴⁾。そのほかに、REX-1、TGDF、FGF-4、LIN28、LEFTB など未分化なヒト ES 細胞に発現することが報告されている。ヒト ES 細胞研究 Initiative project による世界で樹立された59株のヒト ES 細胞における遺伝子発現解析の結果が報告されているので¹²⁾、参照されたい。

5. 培養の実際

ヒトES、iPS 細胞は、継代ごとに、あるいは、操作者により細胞の状態が異なってしまうことはよく見られ、大変扱いが難しい。操作者の腕が問われる細胞である。油断をすると、ほとんどの細胞が分化してしまう。実験をする上でも、毎回同じ結果を得ることが難しいため、指導する研究者は間違いが起きないように十分に監督する必要があるだろう。株によって相当に特徴が異なるため、あまり扱いにくいようであれば、株を変えることをお勧めする。以上、簡単ではあるが、ヒト ES、iPS 細胞の培養方法についての概要をまとめてみた。本総説が、多くの研究者によるより良い成果産出

の一助となることを願う。

謝 辞

ヒト ES、iPS 細胞の培養に関与している独・医薬基盤研のすべての皆様に感謝します。なお、ヒト ES、iPS 細胞に関する本研究は、厚生労働省科学研究費補助金によりサポートされています。

文 献

- 1) Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147, 1998.
- 2) Suemori, H.: [Establishment of human embryonic stem cell lines and their therapeutic application]. *Rinsho Byori*, 52, 254–258, 2004.
- 3) Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N. and Nakatsuji, N.: Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 926–932, 2006.
- 4) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663–676, 2006.
- 5) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861–872, 2007.
- 6) Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. and Thomson, J. A.: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917–1920, 2007.
- 7) Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W. and Daley, G. Q.: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451, 141–146, 2008.
- 8) Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W. and Melton, D. A.: Induction of pluripotent stem cells from

- primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008.
- 9) Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E. and Eggan, K.: Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321, 1218–1221, 2008.
 - 10) Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R. J., Fitz-Gerald, C. S., Sato, Y., Cowan, C. A., Chien, K. R. and Melton, D. A.: Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 26, 313–315, 2008.
 - 11) Andrews, P. W., Benvenisty, N., McKay, R., Pera, M. F., Rossant, J., Semb, H. and Stacey, G. N.: The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nat Biotechnol*, 23, 795–797, 2005.
 - 12) Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K. G., Choo, A. B., Churchill, G. A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J. S., Dvorak, P., Emanuelson, K., Fleck, R. A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P. J., Hamilton, R. S., Hampl, A., Healy, L. E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M. P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J. L., Jones, M., Kee, K., King, B. L., Knowles, B. B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B. S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R. D., Michalska, A. E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S. L., Moore, H. D., Mummery, C. L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C. M., Oh, S. K., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K. Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M. F., Piekarczyk, M. S., Pera, R. A., Reubinoff, B. E., Robins, A. J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T. C., Semb, H., Sherrer, E. S., Siemen, H., Stacey, G. N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T. A., Young, L. A. and Zhang, W.: Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*, 2007.
 - 13) Hoffman, L. M. and Carpenter, M. K.: Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 23, 699–708, 2005.
 - 14) Park, S. P., Lee, Y. J., Lee, K. S., Ah Shin, H., Cho, H. Y., Chung, K. S., Kim, E. Y. and Lim, J. H.: Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Hum Reprod*, 19, 676–684, 2004.
 - 15) Skottman, H. and Hovatta, O.: Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction*, 132, 691–698, 2006.
 - 16) Mallon, B. S., Park, K. Y., Chen, K. G., Hamilton, R. S. and McKay, R. D.: Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1063–1075, 2006.
 - 17) Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N., Gokhale, P. J. and Andrews, P. W.: Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 13, 325–336, 2004.
 - 18) Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A. and Thomson, J. A.: Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*, 24, 185–187, 2006.
 - 19) Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. and Bongso, A.: Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18, 399–404, 2000.
 - 20) Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T. P., Thomson, J. A. and Andrews, P. W.: Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 22, 53–54, 2004.
 - 21) Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S. and Schulz, T. C.: Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev*, 13, 585–597, 2004.
 - 22) Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K. and Sasai, Y.: A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 25, 681–686, 2007.
 - 23) Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel, S., Thomson, J. A., Moore, H. and Andrews, P. W.: Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, 20, 329–337, 2002.
 - 24) Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. and Young, R. A.: Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947–956, 2005.

25) Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J. and Thomson, J. A.: Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture.

Dev Biol, 227, 271–278, 2000.
26) Sheffield, T. U. o.: Center for Stem Cell Biology Training Course in Human Embryonic Stem Cell Culture 2007 Protocol Handbook. 2007.
(Accepted 21 January 2009)

Standardization of human embryonic stem (ES) cell and induced pluripotent stem (iPS) cell research in Japan

Miho Kusuda Furue

Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka 567-0085, Japan, Laboratory of Cell Processing, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

Abstract

In 1998, human embryonic stem (ES) cells have been established. Since then, the human ES cells have been used as a tool for understanding the mechanisms in human development and regeneration application research in the world. However, in Japan, not so many searchers have used human ES cells. It is caused from several issues. In 2007, human induced pluripotent stem (iPS) cells have been developed. The situation in Japanese stem cell research have been changing. As the characteristics of Human iPS cells are quite similar to those of human ES cells, researcher can use the protocols of human ES cells for iPS cell research. In this review, I have summarized the culture and characteristics of human ES and iPS cells.

Key Words:

human ES cells, human iPS cells, feeder cells