

ヒト胚の巨視的パターンの模倣による in vitro 催奇形性テスト法の開発

長岡技術科学大学技術科学イノベーション専攻

大沼 清

Safety is one of the most fundamental criteria that cosmetics must fulfill. People, who may become pregnant, are concerned about the safety of themselves and the fetus. Recently, human pluripotent stem cells have gained attention for developing in vitro tests of teratogenicity and malformation because using animals for testing cosmetics is prohibited now. However, the effect of toxicity on the whole body (teratogenicity) is not easy to assess because it is difficult to form a macroscopic spatial pattern from human pluripotent stem cells (hPSCs). The cause of the difficulty is that the movement of morphogens, which are responsible for the cell-cell interaction and cell differentiation, cannot be controlled by a standard culture dish. We previously applied unidirectional-microfluidics to control the advection-diffusion of the morphogen and succeeded in making a macroscopic pattern where the upstream cells differentiated but downstream cells did not. However, the mechanism is not well understood.

We made an "in vitro organizer formation hypothesis" and tested it. In vivo, the organizer secretes inhibitors of mesoderm induction signal, which form a concentration gradient of signal, resulting in a macroscopic differentiation pattern. To test the hypothesis, we measured the signaling inhibitors in the supernatant of the cultured hPSCs. We found that the cells secrete a BMP inhibitor, Noggin, secreted from the organizer. However, the concentration of secreted Noggin is too low to inhibit BMP action. Thus, we assumed that diffusion on the cell surface is slow because proteoglycans such as heparan sulfate bind Noggin and BMP. Based on this assumption, experimental results could be explained by the reaction advection-diffusion model, supporting our hypothesis. Moreover, using a potent teratogen, thalidomide, we found that many genes, including cardiomyocyte marker ACTC1, were up- and down-regulated, suggesting these genes could be used as teratogenicity markers.

Our findings may use to develop in vitro tools that help the safety test of cosmetics.

1. 緒言

安全性は、化粧品の満たすべき基本条件である。特に、妊娠の可能性のある女性にとっては、自身はもちろんのこと、胎児への影響も気になる。したがって、妊娠の可能性のある女性にも安心して使用してもらうためには、成人に対してだけでなく胎児や胚に対しても、材料となる成分の毒性(催奇形性)テストが必要となる。ところが近年、動物愛護の点から化粧品の動物実験は禁止されている。そこで、胎児の体になる部分(胚盤葉上層)に近い性質をもつヒトの胚性幹細胞や人工多能性幹(induced pluripotent stem: iPS)細胞などの多能性幹(pluripotent stem: PS)細胞を用いて胚を模倣し、催奇形性のテストをする方法が注目されている¹⁾。ところが、ヒトPS細胞は、空間的な巨視的パターンができにくいという欠点がある。つまり、全身のパターン形成への影響がわからない。その原因は、通常の培養皿を用いては、細胞間の相互作用を担う分泌タンパクなどの移動拡散の制御ができない点にある。

近年、マイクロ加工技術によりヒトPS細胞を制御し、全身のパターン形成を模倣する研究が試みられている²⁾。我々もこれまで、ヒトiPS細胞を無血清培養やマイクロ流路で制御する手法を研究してきた³⁻⁵⁾。そして、一方向性のマイクロ流路を用いて、分化途中のヒトiPS細胞からの分泌タンパクの移動拡散を一方向化し、ヒトiPS細胞から巨視的な空間パターンをもって分化させることに成功した⁵⁾。そして以上の実験から我々は、以下の「in vitro オーガナイザー形成仮説」を考えている(図1)。この仮説ではまず、上流からBMPを流すと、上流のヒトiPS細胞が中胚葉に分化する。次に、中胚葉の細胞がBMP阻害剤である

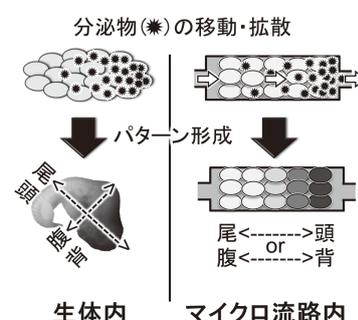


図1 「in vitro オーガナイザー形成仮説」概念図
細胞が中胚葉分化シグナルの阻害タンパク質を分泌することで、生体内では背腹・頭尾の軸が決定するように、マイクロ流路内でも巨視的パターンが出現する。
この現象を利用することで、マイクロ流路内で胚を模倣する“Embryo-on-a-chip”を構築することが可能となる。



Development of in vitro teratogenicity test method by imitating macroscopic pattern of the human embryo

Kiyoshi Ohnuma

Department of Science of Technology Innovation, Nagaoka University of Technology

Noggin、ChordinなどのBMP阻害剤を放出し、オーガナイザーとしての役割を担う。最後に、上流より分泌された阻害剤が、下流のヒトiPS細胞の分化を抑制する。つまり、生体内におけるオーガナイザーによる体軸形成と同様の現象が起きていると考えている。

本研究の目的は、大きく分けて2つある。1つ目は、仮説の検証である。細胞からの分泌物の実測と、シミュレーションとを行い、「in vitroオーガナイザー形成仮説」を検証する。2つ目は催奇形性テストの実証である。心筋分化実験と、サリドマイド添加を行い、催奇形性の試験に応用可能なことを実証する。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒトiPSCの培養hPSC細胞株201B7⁶⁾は、理研BRCセルバンク(HPS0063、つくば)から、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて入手した。細胞は、Y-27632(ロック阻害剤、最終濃度5 μ M、036-24023、フジフィルム和光純薬株式会社)および2.5 μ g/cm²ラミニン断片(iMatrix-511-シルク、タカラバイオ株式会社)を含む維持培地(StemFit AK02 N、味の素、東京)を用い、製造元のプロトコルに従って培養した。

2.2. 培養上清のEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

回収した培養上清(120 μ L)は凍結保存した。解凍した培養上清を、1000 \times gで2分間遠心分離し、Noggin測定用のELISAキット(SEC130Hu、Cloud Clone Corp.、ヒューズトン、米国)を製造元のプロトコルに従い測定した。吸光度の測定には、マイクロプレートリーダー(モデル680、Bio-Rad、カリフォルニア)を用いて450nmで測定した⁷⁾。

2.3. 免疫染色

細胞を4%パラホルムアルデヒド(163-20145、和光)で固定し、透過処理し、0.2% TritonXとおよび1%ウシ血清アルブミン(BSA)(019-27051、和光、大阪、日本)入りのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でブロックした。続いて、細胞をブロッキングバッファーで一次および二次抗体を薄めてから反応させた(補足表TS2)。細胞は、蛍光顕微鏡(BZ-8100、キーエンス、大阪)を用いて撮影した。

2.4. シミュレーション

BMP4とNogginは1対1で反応(BMP+Noggin \rightleftharpoons BMP-Noggin)することで、BMP4の不活性型であるBMP4-Noggin複合体(BMP4-Noggin)を生成しつつ、移流拡散する。BMP、Noggin、BMP4-Nogginの濃度をそれぞれ[B]、[N]、[BN]で表すと、以下の式となる。

$$\frac{\partial[N]}{\partial t} = D_N \nabla^2 [N] - \mathbf{q} \cdot \nabla [N] - k_1 [N][B] + k_2 [NB]$$

$$\frac{\partial[B]}{\partial t} = D_B \nabla^2 [B] - \mathbf{q} \cdot \nabla [B] - k_1 [N][B] + k_2 [BN]$$

$$\frac{\partial[BN]}{\partial t} = D_{NB} \nabla^2 [BN] - \mathbf{q} \cdot \nabla [BN] + k_1 [N][B] - k_2 [BN]$$

ここで、 t は時間、 D_N 、 D_B 、および D_{NB} はそれぞれ、Noggin、BMP4、およびBMP4-Noggin複合体の拡散係数であり、 \mathbf{q} は一方向の灌流マイクロチャンバーを使用したときの流速である。

細胞の分化は、細胞表面のBMP4が曝露された積算値[総曝露BMP](h ng/mL)が閾値を超えた時点で起こると仮定した。[総曝露BMP]は、最初($t=0$ s)でゼロとし、BMP4濃度(ng/m)の時間(h)で積分していき、閾値として定めた100h ng/mL BMP4を超えたときに、細胞の分化マーカータンパク質の発現が変化すると仮定した。培養上清中のNoggin濃度は、培地の下限(細胞表面の拡散の抑制構造の上部、 $y=y_{\min}$)から上限(培地表面、 $y=y_{\max}$)の間のNogginの空間平均した濃度($[N(y_{\min} < y < y_{\max})]$)として計算した。 x と y は、それぞれ培養容器の水平方向と垂直方向である^{7,8)}。

2.5. サリドマイドの添加

未分化のhiPSCを単一細胞に分離して播種した。未分化hiPSCの場合、播種の1日後からサリドマイドを添加し、4日目に回収した。中胚葉条件では、播種1日後に培地を50ng/mLアクチビン、3 μ M CHIR99021(R&D Systems)、およびY-27632を含むhESF6培地に交換した(図2A)。1日目にCHIR99021を除去し、3日目にY-27632を除去し、0日目に0.1%ジメチルスルホキシド(DMSO)で調製したサリドマイドで細胞を処理した。5日目に細胞を回収した⁹⁾。

2.6. RT-qPCRアレイ分析

採取した細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成した後、RT2SYBRGreen ROX qPCR Mastermix(330404、Qiagen)の混合物をRT2 Profiler PCRアレイヒト人工多能性幹細胞(PAHS-092ZE-4、Qiagen)に添加し、7900HT FastReal-TimePCR(Applied Biosystems、CA、USA)で解析した。45個のhiPSC遺伝子、16個のESC遺伝子、4個の内胚葉遺伝子、6個の中胚葉遺伝子、9個の外胚葉(神経幹細胞を含む)遺伝子などを含む84個の遺伝子を標的とした⁹⁾。

3. 結果

3.1. 細胞からの分泌物の実測

BMP4の添加により分化誘導した細胞の培養上清に分泌されるNogginをELISAを用いて定量した。Nogginを含まない無血清・フィーダーフリー条件下で、BMP4添加・無添加の状態、低細胞密度播種条件 (1×10^4 cells/cm²) と高細胞密度播種条件 (5×10^4 cells/cm²) でhPSCを培養し、1日ごとに培養上清を回収して測定し、3日目に免疫染色して細胞状態を確認した。BMP4は低細胞密度播種条件で細胞分化を誘導したが(SSEA-1陽性)、高細胞密度播種条件で未分化(SOX2陽性)のままであった(図2AB)。この結果は、細胞が分化阻害剤を分泌しており、高細胞密度ではその分化阻害剤が細胞分化を抑えるのに十分な濃度に達したことを示唆している⁵⁾。

そこで、高細胞密度播種条件のときに上清中へと分泌されたNogginをELISA測定した結果、Nogginの平均濃度はBMP4の有無にかかわらず6つの条件すべての平均値は0.69ng/mLであることがわかった(図2C)。6つの条件の平均値の間に有意差はなかった(P=0.54~0.99、スチューデントt検定)。したがって、BMP4の有無に関係なく、細胞は常に約0.69ng/mLのNogginを分泌していたことを示唆している。

このNogginの濃度は、予想を大きく下回るものであった。添加したBMP4は50ng/mLに対して、0.69ng/mLのNogginしか検出されていないため、濃度差が70倍もある。以前の実験では、BMP4の濃度が10ng/mLでも同じ

ような結果が得られているが、それでも14倍の差がある。BMP4とNogginは1対1で反応してBMP4が不活性化状態になる(BMP4-Noggin)場合、このNogginの放出量は非常に低く、BMP4による分化を抑えることは難しいと予想される。実際、シミュレーションしてみても、やはり分化を抑えるためには、Nogginの放出量が数十倍足りないことが明らかとなった⁷⁾。したがって、われわれが以前に報告したような高細胞密度での分化の抑制や一方向性のマイクロ流路による下流の分化の抑制などの実験結果は⁵⁾、単純なBMPとNogginの単純な反応・拡散を仮定しては説明がつかない。

3.2. 静置培養における拡散障壁の影響

分化抑制現象を説明するのに必要なNogginの分泌量が足りない問題に対処するため、細胞表面で拡散が遅くなる現象に着目した。細胞の表面は、ヘパラン硫酸を含む様々な糖タンパク質が密集しており、BMPやNogginを含む多くのシグナル伝達分子はこれらに結合する¹⁰⁾。このNogginとHSPBの結合は生理的塩濃度では非常に強いが、少しずつ乖離・結合を繰り返すことで、結果としてNogginがゆっくりと拡散する¹¹⁾。ヘパリンを修飾したビーズ表面でNogginの拡散係数は、水中と比較して1/400 (0.2μm/s²) に低下することが報告されている¹¹⁾。更に、ヒトPS細胞の円形コロニーを用いてやはりNogginによる分化抑制効果を調べているグループも、現象を説明するためには拡散速度を水中の1/10に減らすと良いとの報告をしている¹²⁾。そこで我々は、「HSPGなどの細胞表面の高

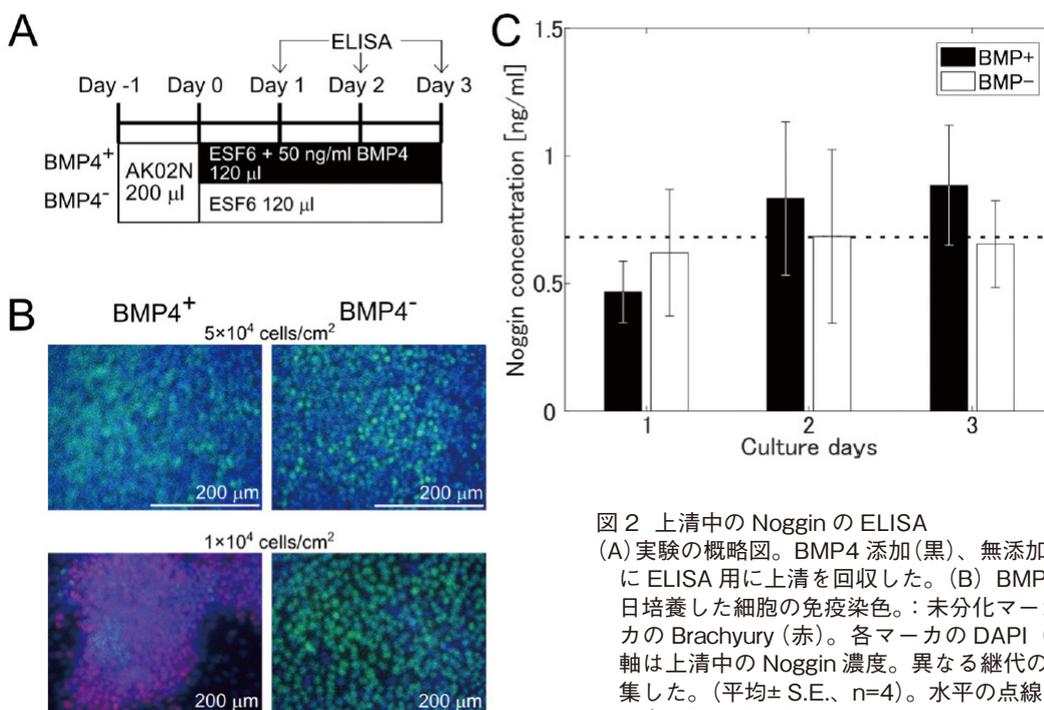


図2 上清中のNogginのELISA

(A) 実験の概略図。BMP4 添加(黒)、無添加(白)の条件で、1、2、3日目にELISA用に上清を回収した。(B) BMP4 添加(左)、無添加(右)で3日培養した細胞の免疫染色。: 未分化マーカーのSOX2 (緑)。中胚葉マーカーのBrachyury (赤)。各マーカーのDAPI (青)。(C) ELISAの結果。縦軸は上清中のNoggin濃度。異なる継代の異なる細胞培養から上清を収集した。(平均±S.E., n=4)。水平の点線は、全データの平均(0.69ng/mL)を示している。

分子が拡散の抑制構造として働くことで、細胞から分泌されたNogginは細胞表面付近長く・高濃度でとどまるため、BMP4による細胞分化を抑制するとともに培養上清中のNoggin濃度が低くなる(図3A)」との作業仮説を新たに立てた。

この仮説を検証するために、2つの仮定を新たに加えてシミュレーションをした。一つ目の仮定は、Noggin、BMP4、およびNoggin-BMP4複合体の拡散係数が細胞表面で1/400になるとした。2つ目の仮定は、前培養(Day-1)ではBMP4を含まない培地で細胞を培養したため、分化開始時(Day 0)においては、拡散の抑制構造内にはNogginのみが存在してBMP4は存在してないとした。この新しい2つの仮定を追加して計算をした。横軸は細胞表面がBMP4が曝露された積算値([総曝露BMP]=100h ng/mL以上で細胞が分化する)、縦軸はバリアより上の培地内におけるNogginの濃度の平均値([N(barrier thickness<y<y_{max})] =0.69がELISA結果)として、計算結果をプロットした(図3B)。未分化・分化の閾値の垂直線(総露出BMP4=100h ng/mL)との交点は、バリアがないときは約70ng/mLだったが、バリアが高くなるに従い低下して、160μmバリアにおいてはELISA結果(0.69ng/mL)とほぼ同じ値となった(図3B)。したがって仮説通り、細胞表面のHSPGなどにより拡散が制限されれば、分泌されたNogginによりBMP4による分化を抑制できる可能性が示唆された。

3.3. 灌流培養における、細胞表面の拡散抑制の効果

前節で仮説を、一方向灌流マイクロチャンバーを使用し

た実験でも検証してみた。私たちは、ヒトPS細胞をタンパク質が一方向に輸送される一方向灌流培養チャンバー内でBMP4とともに培養した結果、上流の数ミリメートル以内の細胞が分化し、下流の分化が阻害することを示した⁵⁾。この結果を、拡散の抑制構造を含む反応・移流拡散の仮説で説明できるかを計算した(図4AB)。静培養の計算で使用した2つの仮定に加えて、HSPG内でのNogginの流速も水の1/400に減少するという仮定を新たに追加した。この仮定については文献がなかったため、拡散と同様減少するとした(バクレ数が一定)。細胞からのNoggin分泌速度は、静置培養の結果から 2×10^{-4} から 2×10^{-3} amol/cell/s とした。

その結果、拡散の抑制構造がない場合は、 2×10^{-4} amol/cell/sのNoggin分泌速度のときはすべての領域が分化したが、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 2×10^{-3} amol/cell/sのNoggin分泌速度のときは上流の細胞の約5、2、1mmが分化した(図4CD)ため、広範囲のNoggin分泌速度で実験結果が定性的に再現できることを示唆している。それに対して、拡散の抑制構造が20μm、40μm、160μmと厚くなるにしたがって、Noggin分泌速度が少し変化するだけで、分化する部分の長さが大きく変化するとともに上流の狭い範囲内に限定された(図4CD)。ヒト胚の大きさが数百μmであり、その中に様々な細胞が分化・配置されることを考えると、この急激な変化はむしろ生体内に近い変化を示していることとなる。

3.4. サリドマイドを用いた、心筋分化への影響

サリドマイドは優れた鎮静剤として販売されたが、催奇形性が高いため、1960年代に使用が中止された¹³⁾。最近、ヒ

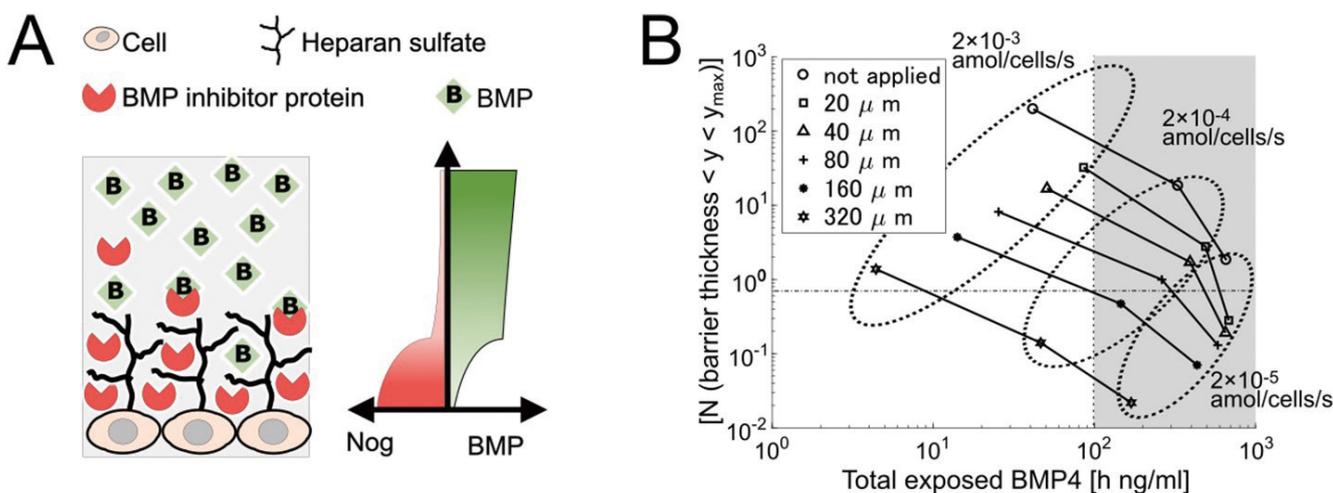


図3 拡散バリアを備えた静的培養のシミュレーション

(A) ヘパラン硫酸などのバリア構造の概念図。細胞表面はヘパラン硫酸により覆われており、Noggin、BMP4、およびNoggin-BMP4の拡散定数は、ヘパラン硫酸の中では1/400に設定した。(B) 縦軸はヘパラン硫酸などのバリア構造の上にある培地内の平均Noggin濃度で、水平の点線はELISAでの測定値(0.69ng/mL)を表す。横軸は細胞が10ng/mLのBMP4に72時間曝露された積算値で、垂直の点線は、細胞分化の閾値を示しており、その右側では細胞が分化する。ヘパラン硫酸などの厚さは、0、40、80、160、320μmとした。

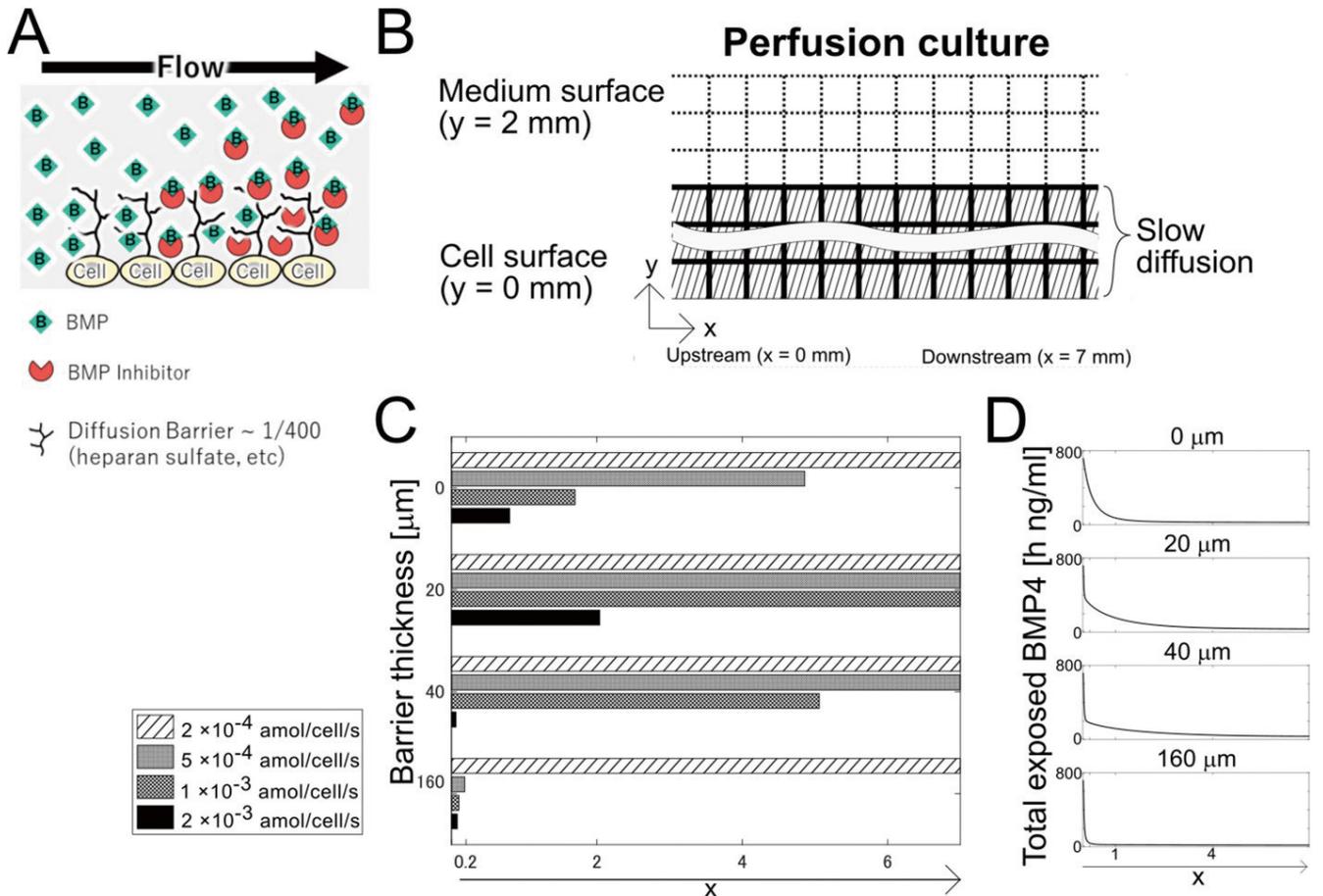


図4 拡散の抑制を使用した一方灌流培養のシミュレーション

(A) HSPG を使用したバリア構造のスキーム。(B) 灌流培養のシミュレーションの概略図。下部に配置された細胞 ($y = 0$) は培地で覆われている ($y > 0$)。媒体は $x=0$ で流入し、 x 方向に流入する。各正方形は $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ 。影付きの領域は、拡散と流れが $1/400$ であった拡散の抑制領域を示している。(C) 上流からの分化した細胞の面積が示されている。縦軸は拡散の抑制の厚さ (0 (未適用)、 20 、 40 、 $160\mu\text{m}$)。横軸は分化した細胞の面積。(D) $t=72$ 時間での総曝露 BMP4。縦軸は総露出 BMP4。横軸は上流からの距離。

トのサリドマイドの催奇形性をテストするために、多くのグループがヒト PS 細胞を使用している¹⁴⁾。我々も以前、サリドマイドが未分化のヒト PS 細胞と中胚葉(心筋への分化の前段階)のアポトーシスを増加させることを示しました^{15,16)}。今回は、RT-qPCR アレイを使用して、ヒト PS 細胞の多能性幹細胞マーカーと初期分化マーカーを含む 84 個の遺伝子の発現を調べ、どの遺伝子発現を目安に催奇形性を調べると良いかを検討した。

その結果、未分化維持条件で大きく (4 倍以上) 変化した遺伝子として、上方制御されたのは *LEFTY2* (初期発生に重要な TGF- β の抑制タンパク質) と *SOX17* (初期の内胚葉分化マーカー) の 2 つであり (図 5A)、下方制御されたのは *FABP7* (脂肪酸結合タンパク質ファミリーのメンバーで、主に脳で発現し、レチノイン酸シグナルに関係し、神経発達に関与する) だった^{17,18)} (図 5B)。驚いたことに、*FABP7* はサリドマイドによって強く (平均で約 300 倍) 下方制御されており、サリドマイドが未分化 hiPSC での

FABP7 発現を強力に阻害することを示唆している。更に、中胚葉分化条件で大きく (4 倍以上) 変化した遺伝子として、上方制御されたのは *EMX2* (empty spiracles homolog 2 をエンコードする。脳の神経分化と細胞増殖、および四肢の形成に関連する) のみだったが、下方制御された遺伝子は *ACTC1* (心筋のアルファアクチン)、*FOXD3* (forkhead box protein D3, ヒト PS 細胞マーカーの一つである転写因子)、*FGF4* (線維芽細胞成長因子 4、肢芽の発達を含む発達に関連、ヒト PS 細胞マーカーの一つ)、*CDH1* (未分化ヒト PS 細胞の細胞間接着を担う E-カドヘリン発現の関連)、*FOXA2* (初期の内胚葉分化マーカー) であった。以上より、心筋関連の遺伝子で *ACTC1* が大きく下方制御されることが明らかとなった。

4. 考 察

今回の研究開発では、2 つの目標を定めていた。1 つ目の目標は、細胞からの分泌物の実測と、シミュレーショ

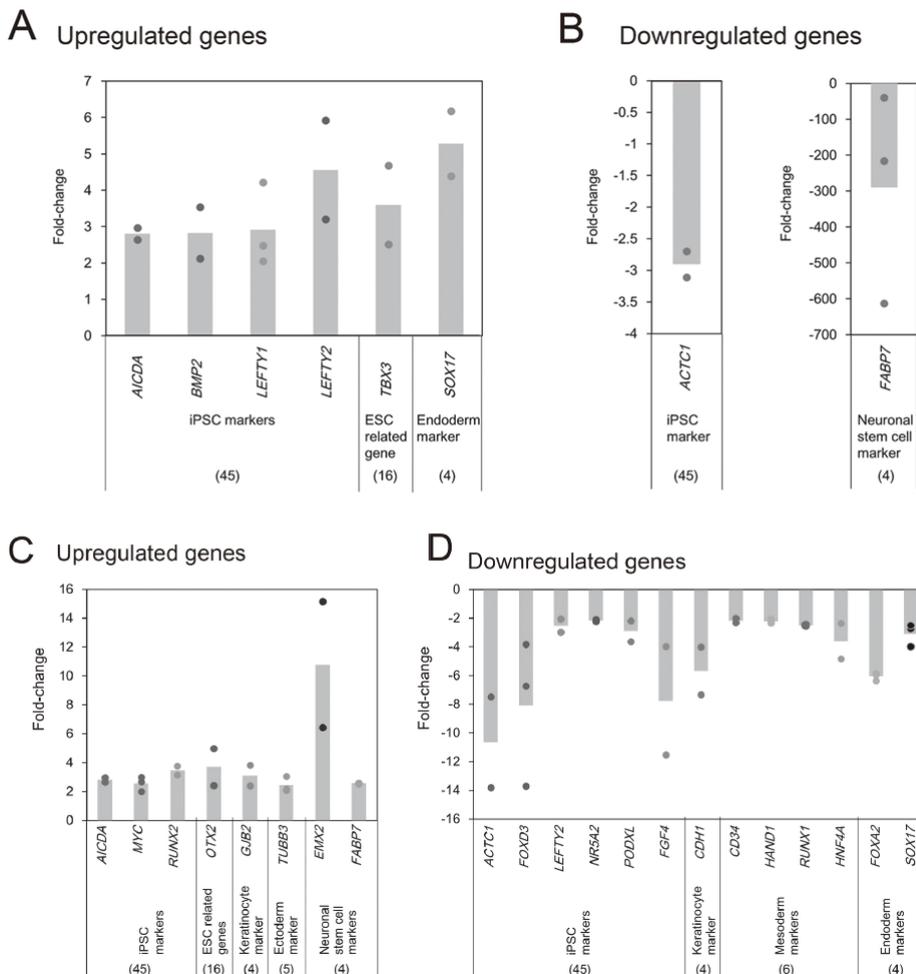


図5 サイドマイドによる未分化・分化マーカーの変化
未分化なヒト iPS 細胞(AB)と中胚葉分化した細胞(CD)において、上方制御された遺伝子(BC)および下方制御された遺伝子(BD)。

ンを行い、「in vitro オーガナイザー形成仮説」を検証することであった。ELISAにより分泌物を測定したところ、BMP4抑制シグナルとし最も有力なNogginが検出された。しかしその濃度はBMP4の添加に関係なく0.69ng/mLであり、予想より数十倍低い濃度だった。そこで、細胞表面に拡散が遅い層(HSPGなどによる結合)があるとの仮説の下でシミュレーションした結果、実験結果を説明できることが明らかとなった。BMP4阻害分子に関しては、Noggin以外にも分泌している可能性があるため、それらの測定が必要となる。また、HSPGなどの細胞表面の拡散が遅い層に関しては、実際にどれだけの厚みがあるかの測定とともに、その中でのシグナル分子の拡散係数や移動速度が必要となる。これらの限界はあるために定量的な結果とはいえないが、定性的には胚発生過程において中胚葉分化に続いて中胚葉分化シグナルの阻害剤が分泌されるオーガナイザーが形成されることと同様のことが培養皿内で起っていること、つまり「in vitro オーガナイザー形成仮説」

を支持しているといえる。

2つ目の目標は、催奇形性テストであった。強い催奇形性をもつサリドマイドを心筋分化初期(中胚葉分化)に添加することで、催奇形性の試験に使えるような大きく発現が変化する遺伝子を探索した。その結果、心筋分化に関する遺伝子として、ACTC1が大きく下方制御されることが明らかとなった。今回の報告書には掲載しなかったが、ヒトiPS細胞から心筋分化をしたところBMP4分化と似た現象が観察されている^{19,20}。心筋の分化には、Wntシグナルの活性化とそれに続く抑制が必要であるが、私たちは細胞がWntシグナルの阻害タンパク(DKK1, DKK4, CER1)を分泌していることと、それが心筋分化を促進していることを明らかにした。今後は、上述のマイクロ流路において心筋分化をし、その過程でACTC1などの発現を指標にすれば、分化初期における催奇形性を調べる良い系となることが予想される。

5 総括

本研究では、マイクロ流路とヒトiPS細胞を利用して胚を模倣して催奇形性のテストをする方法の研究・開発をした。そして、マイクロ流路ないのヒトiPS細胞のふるまいが「in vitro オーガナイザー形成仮説」で説明できること、つまり、胚発生における体軸形成と同様の現象が起きていることを明らかにした。また、強い催奇形性をもつサリドマイドを添加したときに、様々な遺伝子が変化することを明らかにした。胚の状態を模倣し、催奇形性をテストできるシステム“Embryo-on-a-chip”の実現に一步近づけた。本研究を継続し「すべての人に安全・安心なコスメトロジー」の実現の一助としたい(図6)。

(引用文献)

- 1) Genschow, E. *et al.* The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *ATLA-NOTTINGHAM* **30**, 151-176 (2002).
- 2) Shahbazi, M. N., Siggia, E. D. & Zernicka-Goetz, M. Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development. *Science* **364**, 948-951 (2019).
- 3) Yoshimitsu, R. *et al.* Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **111**, 937-947, (2014).
- 4) Kondo, Y. *et al.* Compartmentalized microfluidic perfusion system to culture human induced pluripotent stem cell aggregates. *J Biosci Bioeng* **124**, 234-241, (2017).
- 5) Tashiro, S. *et al.* High cell density suppresses BMP4-induced differentiation of human pluripotent stem cells to produce macroscopic spatial patterning in a unidirectional perfusion culture chamber. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **126**, 379-388 (2018).
- 6) Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, (2007).
- 7) Nakatani, E., Okajima, R. & Ohnuma, K. Slow diffusion on the monolayer culture enhances auto/paracrine effects of Noggin in differentiation of human iPS cells induced by BMP. *Biochemistry and biophysics reports* **29**, 101195, (2022).
- 8) Nakatani, E., Yamazaki, W., Sugiura, S., Kanamori, T. & Ohnuma, K. Modeling of differentiation pattern formation in human induced pluripotent stem cells mediated by BMP4 and its inhibitor noggin secreted from cells. *Biochemical Engineering Journal* **176**, 108159, (2021).
- 9) Shimizu, M. *et al.* Thalidomide affects limb formation and multiple myeloma related genes in human induced pluripotent stem cells and their mesoderm differentiation. *Biochemistry and biophysics reports* **26**, 100978, (2021).
- 10) Häcker, U., Nybakken, K. & Perrimon, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 530-541 (2005).
- 11) Nesterenko, A. M. *et al.* Affinity of the heparin binding motif of Noggin1 to heparan sulfate and its visualization in the embryonic tissues. *Biochemical and biophysical research communications* **468**, 331-336 (2015).
- 12) Etoc, F. *et al.* A Balance between Secreted Inhibitors and Edge Sensing Controls Gastruloid Self-Organization. *Developmental Cell* **39**, 302-315 (2016).
- 13) Melchert, M. & List, A. The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1489-1499, (2007).
- 14) Xing, J., Toh, Y. C., Xu, S. & Yu, H. A method for human teratogen detection by geometrically confined cell differentiation and migration. *Sci Rep* **5**, 10038, (2015).
- 15) Tachikawa, S., Nishimura, T., Nakauchi, H. & Ohnuma, K. Thalidomide induces apoptosis in undifferentiated human induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **53**, 841-851, (2017).
- 16) Tachikawa, S., Shimizu, M., Maruyama, K. & Ohnuma, K. Thalidomide induces apoptosis during early mesodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **54**, 231-240 (2018).
- 17) Storch, J. & Thumser, A. E. Tissue-specific functions

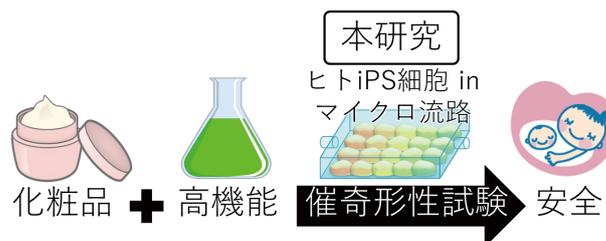


図6 本研究の最終目標
ヒトiPS細胞由来の各種細胞とマイクロ流路を組み合わせ、催奇形性試験を行うシステムを開発することで、すべての人に安心・安全なコスメトロジーの発展に貢献する。

- in the fatty acid-binding protein family. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 32679–32683 (2010).
- 18) Sharifi, K. *et al.* FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochemistry and cell biology* **136**, 501 (2011).
- 19) Le, M. N. T., Takahi, M., Maruyama, K., Kurisaki, A. & Ohnuma, K. Cardiac differentiation at an initial low density of human-induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **54**, 513–522 (2018).
- 20) Le, M. N. T., Takahi, M. & Ohnuma, K. Auto/paracrine factors and early Wnt inhibition promote cardiomyocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells at initial low cell density. *Scientific Reports* **11**, 21426, (2021).