



## NIH Report June 2001

### Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions

翻訳 古川修平

#### < Chapter2: THE EMBRYONIC STEM CELL >

#### 第 2 章 胚幹細胞

[01]

As stated in the first chapter, an embryonic stem cell (ES cell) is defined by its origin. It is derived from the blastocyst stage of the embryo. The blastocyst is the stage of embryonic development prior to implantation in the uterine wall. At this stage, the preimplantation embryo of the mouse is made up of 150 cells and consists of a sphere made up of an outer layer of cells (the trophectoderm), a fluid-filled cavity (the blastocoel), and a cluster of cells on the interior (the inner cell mass).

[02]

Studies of ES cells derived from mouse blastocysts became possible 20 years ago with the discovery of techniques that allowed the cells to be grown in the laboratory. Embryonic-like stem cells, called embryonic germ (EG) cells, can also be derived from primordial germ (PG) cells (the cells of the developing fetus from which eggs and sperm are formed) of the mouse and human fetus.

[01]

第 1 章で述べたように、胚幹細胞(ES 細胞)という呼び名はその出所・起源からきている。この細胞は、胚盤胞(ハイバンホウ)と呼ばれる胚の成長過程の 1 段階で得られる。胚盤胞は、胚が子宮の壁に着床する手前の成長段階で現れる。この着床手前の成長段階の胚、すなわち胚盤胞は、マウスの場合では 150 個の細胞からなる球体で、外側の細胞層(栄養外胚葉)と、液体で満たされた空洞(胞胚腔)、およびその空洞内に存在する細胞の塊(内部細胞塊)とで構成される。

[02]

マウスの胚盤胞から取り出した胚幹細胞(ES 細胞)の研究は、細胞を実験室で培養する技術の発見により 20 年前に可能となった。胚生殖細胞(EG 細胞)と呼ばれる胚幹細胞に似た細胞も、マウスとヒトの胎児に存在する原始生殖細胞(PG 細胞)から取り出すことができる。原始生殖細胞とは、発育中の胎児の細胞で、分化して卵子と精子に成長する。

In this chapter the discussion will be limited to mouse embryonic stem cells. Chapter 3 describes the human embryonic stem cell.

[03]

DO EMBRYONIC STEM CELLS

ACTUALLY OCCUR IN THE EMBRYO?

Some scientists argue that ES cells do not occur in the embryo as such. ES cells closely resemble the cells of the preimplantation embryo, but are not in fact the same. An alternative perspective is that the embryos of many animal species contain stem cells. These cells proliferate extensively in the embryo, are capable of differentiating into all the types of cells that occur in the adult, and can be isolated and grown ex vivo (outside the organism), where they continue to replicate and show the potential to differentiate.

[04]

For research purposes, the definition of an ES cell is more than a self-replicating stem cell derived from the embryo that can differentiate into almost all of the cells of the body. Scientists have found it necessary to develop specific criteria that help them better define the ES cell. Austin Smith, whose studies of mouse ES cells have contributed significantly to the field, has offered a list of essential characteristics that define ES cells.

本章では、マウスの胚幹細胞に限定して説明する。ヒト胚幹細胞については、第 3 章で述べる。

[03]

胚幹細胞は、胚の中で発生するのか？

一部の研究者は、ES 細胞と呼ばれる細胞は胚の中で生まれるのではないと主張している。ES 細胞は、着床前の胚の細胞に非常に似ているが、実際には同じものではない。別の見方をすれば、多くの動物の胚には幹細胞が含まれているということが出来る。この幹細胞は胚の中で活発に増殖し、成体内で作られるすべての種類の細胞に分化・成長可能であり、分離して生体外で（生体組織の外部で）培養可能で、生体外でも自己複製を続け、分化の能力を発揮する。

[04]

ES 細胞は、胚から取り出された自己複製力を有する幹細胞で、身体を構成するほとんどすべての細胞に分化可能であると定義されるが、この定義は研究目的からすれば不十分である。研究者は、ES 細胞をうまく定義するための具体的な基準を作成する必要に気がついた。マウスの ES 細胞の研究でこの分野に大きな貢献をしたオースチン・スミスは、ES 細胞を定義するのに不可欠な特性の一覧を提示している。

[05] DEFINING PROPERTIES OF AN EMBRYONIC STEM CELL

[05-1]

Derived from the inner cell mass/epiblast of the blastocyst.\*

[05-2]

Capable of undergoing an unlimited number of symmetrical divisions without differentiating (long-term self-renewal).\*

[05-3]

Exhibit and maintain a stable, full (diploid), normal complement of chromosomes (karyotype).

[05-4]

Pluripotent ES cells can give rise to differentiated cell types that are derived from all three primary germ layers of the embryo (endoderm, mesoderm, and ectoderm).

[05-5]

Capable of integrating into all fetal tissues during development. (Mouse ES cells maintained in culture for long periods can still generate any tissue when they are reintroduced into an embryo to generate a chimeric animal.)\*/\*\*

[05-6]

Capable of colonizing the germ line and giving rise to egg or sperm cells.\*/\*\*

[05]

胚幹細胞の特性

[05-1]

胚盤胞の内部細胞塊(原外胚葉)から取り出されたものであること。\*

[05-2]

分化することなく対称的な分裂を無限に繰り返す(=長期自己更新)ことが可能であること。\*

[05-3]

完全な(二倍体の)安定した正常な染色体セット(核型)を保持していること。

[05-4]

多能性 ES 細胞は、胚の 3 つの原始生殖細胞層(内胚葉、中胚葉、外胚葉)から生まれるすべての種類の細胞に分化・成長可能であること。

[05-5]

成長中のどの時点でもすべての胎児組織と一体化できること。(長期にわたって培養中のマウス ES 細胞を、キメラ動物を作製するために胚に戻すと、相変わらずどのような組織でも作り出すことができる。)\*/\*\*

[05-6]

生殖細胞系のクローニングが可能で、卵細胞および精子細胞をつくりだせること。

\*/\*\*

[05-7]

Clonogenic, that is a single ES cell can give rise to a colony of genetically identical cells, or clones, which have the same properties as the original cell.\*

[05-8]

Expresses the transcription factor Oct-4, which then activates or inhibits a host of target genes and maintains ES cells in a proliferative, non-differentiating state.

[05-9]

Can be induced to continue proliferating or to differentiate.

[05-10]

Lacks the G1 checkpoint in the cell cycle. ES cells spend most of their time in the S phase of the cell cycle, during which they synthesize DNA.

Unlike differentiated somatic cells, ES cells do not require any external stimulus to initiate DNA replication.

[05-11]

Do not show X inactivation. In every somatic cell of a female mammal, one of the two X chromosomes becomes permanently inactivated. X inactivation does not occur in undifferentiated ES cells.

[ \*Not shown in human EG cells. \*\*Not shown in human ES cells. All of the criteria have been met by mouse ES cells.]

[05-7]

クローン化能力を有すること。すなわち 1 個の ES 細胞が遺伝的に同一で、元の細胞と同じ性質を持つ細胞の集合体を形成できること。\*

[05-8]

転移因子 Oct-4 を発現した後、多数の標的遺伝子の発現を活性化ないしは抑止し、ES 細胞を分化せずに増殖する状態に維持できること。

[05-9]

増殖を続けるか分化するかのいずれかに誘導できること。

[05-10]

細胞サイクル内に G1 チェックポイントを欠いていること。ES 細胞は、DNA が合成される細胞サイクルの S 期中でほとんどの時を過ごす。分化済みの体幹細胞と違って、ES 細胞は DNA 複製を開始するのに外部の刺激を必要としない。

[05-11]

X 不活性化を起こさない。哺乳類のメスのすべての体細胞では、2 つの染色体の一方が永久的に不活性化される。X 不活性化は未分化の ES 細胞では起こらない。

(\*ヒト EG 細胞では見られない。 \*\*ヒト ES 細胞では見られない。マウス ES 細胞は、上のすべての特性を示す)

[06]

## ARE EMBRYONIC STEM CELLS TRULY PLURIPOTENT?

Pluripotency—that is the ability to give rise to differentiated cell types that are derived from all three primary germ layers of the embryo, endoderm, mesoderm, and ectoderm—is what makes ES cells unique. How do we know that these cells are, indeed, pluripotent? Laboratory-based criteria for testing the pluripotent nature of ES cells derived from mice include three kinds of experiments. One test is conducted by injecting ES cells derived from the inner cell mass of one blastocyst into the cavity of another blastocyst. The “combination” embryos are then transferred to the uterus of a pseudopregnant female mouse, and the progeny that result are chimeras. Chimeras are a mixture of tissues and organs of cells derived from both donor ES cells and the recipient blastocyst.

[06]

胚幹細胞が多能性であるのは事実か？

胚の3つの原始生殖細胞層(内胚葉、中胚葉、外胚葉)から生まれ出てくる細胞の全種類に分化・成長できる能力が多能性であるが、ES細胞の特色はまさにこの多能性である。しかしES細胞が多能性であるということを、どのようにして知ることができるのか。マウスから取り出したES細胞の多能性を試すための研究室レベルの基準とされるテストには、3つの実験がある。1つのテストは、1つの胚盤胞内の内部細胞塊から取り出したES細胞を別の胚盤胞の空洞に注入することで行われる。このES細胞を注入された「組み合わせ」胚盤胞を想像妊娠中のメスのマウスの子宮に移すと、産まれてくる仔はキメラマウスである。キメラは、供与されたES細胞とそれを受け入れた側の胚盤胞の両方の細胞でできた組織と器官を有する合体動物である。

[07]

This test has been extended in studies designed to test whether cultured ES cells can be used to replace the inner cell mass of a mouse blastocyst and produce a normal embryo. They can, but the process is far less efficient than that of using cells taken directly from the inner cell mass. Apparently, the ability of ES cells to generate a complete embryo depends on the number of times they have been passaged *in vitro*. A passage is the process of removing cells from one culture dish and replating them into fresh culture dishes. Whether the number of passages affects the differentiation potential of human ES cells remains to be determined. (For a detailed discussion of the techniques for maintaining mouse ES cells in culture, see Appendix B. Mouse Embryonic Stem Cells.)

[07]

このテストを拡大して、マウスの胚盤胞の内部細胞塊を、培養した ES 細胞で置き換え、正常な胚を作り出すことができるかどうかを調べるための研究に利用された。それは可能であるが、内部細胞塊から直接採取した細胞を利用する場合に比べてはるかに非効率的である。ES 細胞が完全な胚を作り出す能力は、生体外での継代培養の回数に左右されることは明らかである。「継代」とは、培養中の細胞を 1 つの培養皿から別の培養皿に移し変えることをいう。この継代培養の回数が、ヒトの ES 細胞の分化能力にも影響を及ぼすかどうかは未だ解明されていない(マウスの ES 細胞を培養皿で培養する方法についての詳細は、巻末付録 B「マウスの胚幹細胞」を参照)。

[08]

A second method for determining the pluripotency of mouse ES cells is to inject the cells into adult mice (under the skin or the kidney capsule) that are either genetically identical or are immune-deficient, so the tissue will not be rejected. In the host animal, the injected ES cells develop into benign tumors called teratomas. When examined under a microscope, it was noted that these tumors contain cell types derived from all three primary germ layers of the embryo—endoderm, mesoderm, and ectoderm. Teratomas typically contain gut-like structures such as layers of epithelial cells and smooth muscle; skeletal or cardiac muscle (which may contract spontaneously); neural tissue; cartilage or bone; and sometimes hair. Thus, ES cells that have been maintained for a long period *in vitro* can behave as pluripotent cells *in vivo*. They can participate in normal embryogenesis by differentiating into any cell type in the body, and they can also differentiate into a wide range of cell types in an adult animal. However, normal mouse ES cells do not generate trophoblast tissues *in vivo*.

[08]

マウス ES 細胞の多能性を調べる 2 つ目の方法は、ES 細胞を遺伝的に同じか、免疫不全を起こしている大人のマウス(の皮膚または腎被膜の下に)注入する。遺伝的に同じか免疫不全のマウスを使うのは、注入した ES 細胞に対して拒絶反応が起きないようにするためである。注入された ES 細胞は奇形腫とよばれる良性腫瘍をつくる。顕微鏡で調べると、奇形腫には胚の 3 つの原始生殖細胞層(内胚葉、中胚葉、外胚葉)から生まれるすべての種類の細胞が含まれていることが判明した。

典型的な奇形腫は様々な組織を含んでいる。たとえば、上皮細胞や平滑筋細胞の層で構成される腸のような組織、骨格筋や心筋(これは自発的な収縮をすることもある)、神経組織、軟骨や骨、時には毛髪まで含むこともある。このため生体外で長期間維持されている ES 細胞でも、生体内で多能性細胞としてふるまうことができる。すなわち体内のあらゆる種類の細胞に分化・成長することにより通常の胚形成に関与し、また大人のマウスに見られるさまざまな種類の細胞にも分化可能である。しかし、通常のマウスの ES 細胞は、生体内で栄養膜組織をつくることはない。

[09]

A third technique for demonstrating pluripotency is to allow mouse ES cells *in vitro* to differentiate spontaneously or to direct their differentiation along specific pathways. The former is usually accomplished by removing feeder layers and adding leukemia inhibitory factor (LIF) to the growth medium. Within a few days after changing the culture conditions, ES cells aggregate and may form embryoid bodies (EBs).

In many ways, EBs in the culture dish resemble teratomas that are observed in the animal. EBs consist of a disorganized array of differentiated or partially differentiated cell types that are derived from the three primary germ layers of the embryo—the endoderm, mesoderm, and ectoderm.

[10]

The techniques for culturing mouse ES cells from the inner cell mass of the preimplantation blastocyst were first reported 20 years ago, and versions of these standard procedures are used today in laboratories throughout the world. It is striking that, to date, only three species of mammals have yielded long-term cultures of self-renewing ES cells: mice, monkeys, and humans (see Appendix B. Mouse Embryonic Stem Cells).

[09]

ES細胞の多能性を立証する3つ目の方法は、マウスのES細胞を生体外で自発的に自然分化させるか、分化を特定の経路に沿って人為的に操作することである。前者は、フィーダー層を取り除いて、培養地に白血病制御因子(LIF)を加えることによって行うのが普通である。培養条件を変更後、数日以内にES細胞が集合して胚様体(EB)と呼ばれる胚もどきをつくることがある。培養皿の中の胚様体(EB)は、多くの点で動物に見られる奇形腫に似ている。EBには、3つの原始生殖細胞層(内胚葉、中胚葉、外胚葉)から発生するすべての種類の細胞に分化したものと部分的に分化したものが不規則に並んだ状態で存在する。

[10]

子宮壁に着床する前の胚盤胞から取り出した内部細胞塊からマウスES細胞を培養する技術は、20年前に初めて報告され、当時の標準的な手順に手を加えた方法が現在も世界中の研究室で用いられている。自己更新力(=自己複製力)のあるES細胞の長期培養に成功した哺乳類の動物は、これまでのところマウス、サル、ヒトの3種類に過ぎないのは驚きである(巻末付録B「マウスの幹細胞」参照)。

[11]

#### HOW DOES A MOUSE EMBRYONIC STEM CELL STAY UNDIFFERENTIATED?

As stated earlier, a true stem cell is capable of maintaining itself in a self-renewing, undifferentiated state indefinitely. The undifferentiated state of the embryonic stem cell is characterized by specific cell markers that have helped scientists better understand how embryonic stem cells—under the right culture conditions—replicate for hundreds of population doublings and do not differentiate. To date, two major areas of investigation have provided some clues. One includes attempts to understand the effects of secreted factors such as the cytokine leukemia inhibitory factor on mouse ES cells *in vitro*. The second area of study involves transcription factors such as Oct-4. Oct-4 is a protein expressed by mouse and human ES cells *in vitro*, and also by mouse inner cell mass cells *in vivo*. The cell cycle of the ES also seems to play a role in preventing differentiation. From studies of these various signaling pathways, it is clear that many factors must be balanced in a particular way for ES cells to remain in a self-renewing state. If the balance shifts, ES cells begin to differentiate. (For a detailed discussion of how embryonic stem cells maintain their pluripotency, see Appendix B. Mouse Embryonic Stem Cells.)

[11]

#### マウスの胚幹細胞はどのようにして未分化の状態を保つのか

既に述べたように、本物の幹細胞は未分化のままで自らを無限に自己複製する状態を維持することができる。胚幹細胞の未分化状態の特色は、細胞マーカーを利用することによって明らかにされている。研究者が、胚幹細胞は適切な条件の下ではどのようにして分化せずに分裂を何百回と繰り返すことができるのかを理解するのに、この細胞マーカーは非常に役立っている。これまでに2つの重要な研究分野でいくつかの手がかりが得られている。その1つは、サイトカイン白血病制御因子(LIF)のような分泌因子が生体外でマウス幹細胞におよぼす影響を解明しようとする試みである。もう1つは、Oct-4などの転写因子に関わる研究である。Oct-4は、生体外のマウスおよびヒトのES細胞および生体内のマウスの内部細胞塊で発現する蛋白である。ES細胞の細胞サイクルも細胞分化を防ぐ役割を担っているようである。このようなさまざまな信号経路に関する研究から、ES細胞が自己更新状態を維持するには多くの要因が特定の方法で均衡しなければならないことは明らかである。この均衡がくずれると、ES細胞は分化を開始する(胚幹細胞がどのようにして多能性を維持するかについては、巻末付録B「マウスの幹細胞」参照)。

[12]

CAN A MOUSE EMBRYONIC STEM CELL BE DIRECTED TO DIFFERENTIATE INTO A PARTICULAR CELL TYPE IN VITRO?

One goal for embryonic stem cell research is the development of specialized cells such as neurons, heart muscle cells, endothelial cells of blood vessels, and insulin secreting cells similar to those found in the pancreas. The directed derivation of embryonic stem cells is then vital to the ultimate use of such cells in the development of new therapies.

[13]

By far the most common approach to directing differentiation is to change the growth conditions of the ES cells in specific ways, such as by adding growth factors to the culture medium or changing the chemical composition of the surface on which the ES cells are growing. For example, the plastic culture dishes used to grow both mouse and human ES cells can be treated with a variety of substances that allow the cells either to adhere to the surface of the dish or to avoid adhering and instead float in the culture medium. In general, an adherent substrate helps prevent them from interacting and differentiating.

[12]

マウスの胚幹細胞を、人為的操作により体外で特定の種類の細胞に分化させることは可能か？

胚幹細胞研究の 1 つの目標は、幹細胞から神経細胞、心筋細胞、血管の内皮細胞、すい臓に見られるインスリン分泌細胞のような個別細胞を作り出すことである。胚幹細胞の分化を人為的に操作することは、最終的にこの細胞を新たな医療の開発に利用するには欠かすことができない。

[13]

幹細胞の分化を人為的に操作するこれまでの最も一般的なやり方は、ES 細胞の生育条件を一定の方法で変更することで、たとえば培養媒体に成長因子を加えたり、ES 細胞を育てている培養皿の表面の化学組成を変えることが試みられている。後者の場合は、マウスやヒトの幹細胞を育てるのに用いるプラスチック製の培養皿の表面を、幹細胞が接着しやすいような物質で処理したり、反対に接着を妨げる物質で処理して幹細胞を培養媒体中で浮遊させることが行われる。一般的に、接着性物質は、ES 細胞が相互に作用し合って分化するのを妨げる働きをする。

In contrast, a nonadherent substrate allows the ES cells to aggregate and thereby interact with each other. Cell-cell interactions are critical to normal embryonic development, so allowing some of these “natural” *in vivo* interactions to occur in the culture dish is a fundamental strategy for inducing mouse or human ES cell differentiation *in vitro*. In addition, adding specific growth factors to the culture medium triggers the activation (or inactivation) of specific genes in ES cells. This initiates a series of molecular events that induces the cells to differentiate along a particular pathway.

[14]

Another way to direct differentiation of ES cells is to introduce foreign genes into the cells via transfection or other methods. The result of these strategies is to add an active gene to the ES cell genome, which then triggers the cells to differentiate along a particular pathway. The approach appears to be a precise way of regulating ES cell differentiation, but it will work only if it is possible to identify which gene must be active at which particular stage of differentiation.

Then, the gene must be activated at the right time—meaning during the correct stage of differentiation—and it must be inserted into the genome at the proper location.

反対に、非接着性物質を使用すると、ES 細胞が集合しやすくなり、結果的に相互に作用し合うことになる。細胞対細胞の相互作用は、胚の正常な発育に不可欠であり、このため生体内で「自然に」起きる細胞間の相互作用を培養皿の内部で起きるようにすることは、マウスやヒトの ES 細胞を生体外で分化させるためには不可欠な方法である。さらに、培養媒体に特定の成長因子を加えると、ES 細胞内の特定の遺伝子が活性化(ないしは非活性化)される。この特定遺伝子の活性化・非活性化によって、細胞を一定の経路で分化させるための一連の分子現象が開始される。

[14]

ES 細胞の分化を人為的に操作するもう 1 つの方法は、トランスフェクション(形質移入)、その他の方法で ES 細胞に外部遺伝子を導入することである。この方法の目的は、ES 細胞のゲノムに活性遺伝子を加えることによって、ES 細胞の分化を特定の経路に沿って開始させることである。この方法は ES 細胞の分化を精確に制御する方法のように考えられているが、どの遺伝子を分化のどの段階で活性化させなければならないかが特定できる場合にのみ効果があるに過ぎない。そして、その遺伝子を適切な時点(すなわち適切な分化の段階)で活性化させようと、ゲノム中の適切な場所に挿入しなければならない。

[15]

Another approach to generate mouse ES cells uses cloning technology. In theory, the nucleus of a differentiated mouse somatic cell might be reprogrammed by injecting it into an oocyte. The resultant pluripotent cell would be immunologically compatible because it would be genetically identical to the donor cell.

[16]

All of the techniques just described are still highly experimental. Nevertheless, within the past several years, it has become possible to generate specific, differentiated, functional cell types by manipulating the growth conditions of mouse ES cells *in vitro*. It is not possible to explain *how* the directed differentiation occurs, however. No one knows how or when gene expression is changed, what signal-transduction systems are triggered, or what cell-cell interactions must occur to convert undifferentiated ES cells into precursor cells and, finally, into differentiated cells that look and function like their *in vivo* counterparts.

[15]

マウス ES 細胞を作り出すもう 1 つの方法は、クローン技術を利用することである。理論的には、分化を終えたマウスの体細胞の核を卵母細胞に注入すると、その細胞核は再プログラム化されると考えられている。これから生まれた多能性細胞は、核を提供した元の体細胞と遺伝的に同一であるので、免疫上も適合性があるはずである。

[16]

これまで述べた方法は、すべてまだ高度に実験的な手法に過ぎない。にもかかわらず、この数年間にマウスの ES 細胞の生体外での生育条件を人為的に操作することにより、具体的な機能を備えた個別細胞を分化・誘導させることが可能になった。しかし人為的な操作による細胞の分化がどのようにして起こるのかは説明できない。遺伝子の発現がいつどのようにして起こるのか、どのような信号変換システムが働くのか、また未分化の ES 細胞を前駆細胞に変え、さらに最終的には生体内におけるものと同じような形と機能を備えた分化済みの細胞に移行させるためにはどのような細胞対細胞の相互作用が必要であるのかは、解明されていない。

[17]

Embryonic stem cells have been shown to differentiate into a variety of cell types. For example, mouse ES cells can be directed *in vitro* to yield vascular structures, neurons that release dopamine and serotonin, and endocrine pancreatic islet cells. In all three cases, proliferating, undifferentiated mouse ES cells provide the starting material and functional, differentiated cells were the result. Also, the onset of mouse ES cell differentiation can be triggered by withdrawing the cytokine LIF, which promotes the division of undifferentiated mouse ES cells.

In addition, when directed to differentiate, ES cells aggregate, a change in their three-dimensional environment that presumably allowed some of the cell-cell interactions to occur *in vitro* that would occur *in vivo* during normal embryonic development.

Collectively, these three studies provide some of the best examples of directed differentiation of ES cells.

Two of them showed that a single precursor cell can give rise to multiple, differentiated cell types, and all three studies demonstrated that the resulting differentiated cells function as their *in vivo* counterparts do.

[17]

胚幹細胞は、さまざまな種類の細胞に分化することが知られている。たとえば、マウスのES細胞は、生体外での人的操作により血管組織、神経伝達物質のドーパミンやセロトニンを放出するニューロン(神経細胞)、すい臓の内分泌島状細胞に分化させることが可能である。このいずれの場合でも、ES細胞が出発物質であり、分化して具体的な働きを担うようになった個別細胞が結果である。また、未分化のマウスES細胞の分裂を促進するサイトカインLIFを取り除くと、ES細胞の分化を開始させることができる。さらに、人為的に分化を起こさせると、ES細胞は集合するが、これは生体内での正常な胚の成長過程で起きる細胞対細胞の相互作用の一部を、生体外で起きるのを可能にする3次元環境の変化であるとみられている。上の3つの研究が、全体としてES細胞の人為的操作による分化の最も優れた具体例を提供している。その内の2つの研究が、1個の前駆細胞が多種の細胞に分化できることを明らかにしており、またすべての研究において、分化によって生まれた細胞が生体内の同様の細胞と同じ働きをしていることが実証されている。

These two criteria—demonstrating that a single cell can give rise to multiple cell types and the functional properties of the differentiated cells—form the basis of an acid test for all claims of directed differentiation of either ES cells or adult stem cells.

Unfortunately, very few experiments meet these criteria, which too often makes it impossible to assess whether a differentiated cell type resulted from the experimental manipulation that was reported. (For a detailed discussion of the methods used to differentiate mouse embryonic stem cells, see Appendix B. Mouse Embryonic Stem Cells.)

1 個の細胞が多種類の細胞に分化可能であることの実証と、分化によって生まれた細胞の機能的な特性という 2 つの基準が、胚幹細胞ないしは成体幹細胞を人為的操作によって分化させることが可能であるとする主張の真価を問う試金石となる。残念ながらこれらの基準を満たす実験が非常に少ないために、分化したとされる細胞が、報告されているような実験的操作の結果として生まれたものかどうか判定するのが不可能な場合が多い(マウスの胚幹細胞を分化させるために用いられる方法の詳細については、巻末付録 B「マウス胚幹細胞」参照)。