

ヒト歯胚由来間葉系細胞からの iPS 細胞の樹立と
初期化機序の解析

小田 泰昭
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 分子神経分化制御学講座
(中島 欽一 教授)

平成 22 年 10 月 27 日提出

推薦教員	分子神経分化制御学講座 中島 欽一 教授		
氏名	小田 泰昭	提出	平成 22 年 10 月 27 日
題目	ヒト歯胚由来間葉系細胞からの iPS 細胞の樹立と初期化機序の解析		

要旨

我々ヒトの受精卵は細胞分裂を続けて増殖し、受精後 5～6 日後に胚盤胞と呼ばれる構造になる。胚盤胞の内部に存在する内部細胞塊を適切な条件下で培養することにより、ヒト胚性幹 (embryonic stem ; ES) 細胞を樹立することができる。ES 細胞は理論上、体を構成する全ての細胞へと分化する能力を持つことから、糖尿病やパーキンソン病、脊髄損傷など様々な疾患や外傷に対する細胞移植医療への応用が期待されている。しかし、ES 細胞の樹立には受精卵を犠牲にしなければならないため、ヒトでは倫理的問題を払拭できない。このような背景の中、京都大学の山中伸弥教授と高橋和利講師は *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の 4 遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いてマウスの線維芽細胞へ導入することで、ES 細胞に類似した人工多能性幹 (induced pluripotent stem ; iPS) 細胞の樹立に成功し、世界に大きな衝撃をもたらした。さらに彼らは、同様の 4 遺伝子でヒト線維芽細胞からのヒト iPS 細胞樹立にも成功した。iPS 細胞の誕生により、新薬の開発や薬効の検証、難病の病態解明や細胞移植医療への応用など、再生医療の実用化がより現実味を帯びてきた。しかし、iPS 細胞の樹立に用いられる *c-Myc* 遺伝子が、生体内で再活性化されることによりガン化を引き起こすことがマウスの研究で明らかになった。その後、*c-Myc* 遺伝子を用いなくても、マウスおよびヒト iPS 細胞の樹立が可能であると報告されたが、効率が著しく低下するのが欠点であった。原ガン遺伝子である *c-Myc* を用いずに効率よく iPS 細胞を樹立することができれば、ガン化の懸念を低減することができると期待される。

ヒトの場合、iPS 細胞の樹立に用いる細胞の条件としては、細胞の採取が容易で患者の負担が小さいこと、もしくは、治療などの際に廃棄される組織を用いることができれば理想的ではないかと考えられる。私は、一般的に医療廃棄物として廃棄される親知らず由来の歯胚 (歯の発達初期の過程) 組織から iPS 細胞を樹立できないかと考えた。そこで本研究では、ヒト歯胚由来間葉系細胞からの iPS 細胞の樹立と、初期化機序の解明を目的とした。我々の研究室では以前に歯科医との共同研究を行っており、歯科矯正手術において親知らずの歯胚を抜去した患者さんに対し、歯科医から十分なインフォームドコンセントを行ってもらい、歯胚組織を提供して頂いた。同意の得られた 10 歳女性、13 歳男性、16 歳女性の 3 人の提供者由来の歯胚間葉系細胞を凍結したもの研究に用いた。3 人の提供者の歯胚

間葉系細胞に、レトロウイルスベクターを用いて *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* の 3 遺伝子を導入して 30 日間培養することで、ヒト iPS 細胞の樹立に成功した。その樹立効率は、10 歳女性 > 13 歳男性 ≒ 16 歳女性の順であった。歯胚間葉系細胞は、歯の発達初期に由来する雑多で不均一な細胞集団であるため、詳細な解析を行うことが困難である。そこで、より詳細な解析を行うため、iPS 細胞樹立効率が最も高い 10 歳女性 (10F) の歯胚間葉系細胞を単一細胞へとクローン化し、それぞれのクローンを増殖させて 5 株 (10F-5, 10F-8, 10F-15, 10F-101, 10F-107) の歯胚クローンを樹立した。これら 5 株の歯胚クローンと、比較として市販のヒト線維芽細胞 (human dermal fibroblast ; HDF) を用いた計 6 種類の細胞から、上述と同様に 3 遺伝子で iPS 細胞の樹立を行った。その結果、iPS 細胞の樹立効率は 10F-15 > 10F-5 > 10F-8 ≧ 10F-101 > HDF > 10F-107 の順であった。10F-107 では iPS 細胞を樹立することができず、10F-101 は HDF より数倍高い程度であった。一方、10F-15, 10F-5, 10F-8 の 3 株に関しては、HDF よりも 100 倍以上高い効率で iPS 細胞を樹立することができた。樹立した iPS 細胞を未分化ヒト ES 細胞のマーカーである SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, OCT3/4, NANOG の抗体で免疫染色するといずれも陽性であった。さらに、樹立した iPS 細胞は、複数の未分化ヒト ES 細胞マーカー遺伝子を発現していることが明らかとなった。次に、生体外における多分化能を検証するため、胚様体を介した分化誘導を行った。樹立した iPS 細胞は内胚葉マーカーである SOX17、中胚葉マーカーである α -SMA、外胚葉マーカーである β III-tubulin を発現していることから、多分化能を持つことが確認された。さらに、生体内における多分化能を検証するため、樹立した iPS 細胞を重度免疫不全マウスの精巣内に移植し、9 週間後に組織を摘出して組織学的解析を行った。内胚葉組織である腸管様上皮、中胚葉組織である軟骨、外胚葉組織である神経管が観察されたことから、生体内においても多分化能を持つことが明らかとなった。最後に、歯胚クローンの一部において極めて高効率で iPS 細胞を樹立できる原因を調べるために、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。iPS 細胞樹立効率の高い細胞群 (10F-15, 10F-5, 10F-8) と低い細胞群 (10F-101, 10F-107, HDF) 間で遺伝子発現を比較したところ、前者の細胞群では histone methyltransferase 複合体の構成因子の 1 つである *PAXIP1* 遺伝子の発現が有意に高いことが明らかとなった。

以上のように、歯胚クローンから極めて高効率でヒト iPS 細胞を樹立することに成功し、樹立した iPS 細胞はヒト未分化 ES 細胞のマーカーを発現しており、生体外・生体内において分化多能性を持つことを証明した。さらに、iPS 細胞樹立効率が高い株では *PAXIP1* 遺伝子の発現が高いことを明らかにした。本研究の成果より、歯胚組織がヒト iPS 細胞樹立のための有用な細胞源として期待されるとともに、*PAXIP1* 遺伝子と細胞の初期化機序の関連をさらに研究することで、基礎および臨床を含めた再生医療研究へ貢献できると期待している。

序論

我々ヒトの体は、210 種類あまりの細胞から構成されると言われているが、その始まりはたった 1 つの受精卵に由来する。受精卵は細胞分裂を繰り返し、マウスでは受精後 3~4 日後に、ヒトでは 5~6 日後に胚盤胞と呼ばれる細胞塊になる。胚盤胞は、将来的に胎盤を形成する栄養外胚葉と、体を構成する全ての細胞を作り出す内部細胞塊の 2 つに分けることができる。この内部細胞塊を取り出して適切な条件下で培養することにより、胚性幹(embryonic stem; ES)細胞を樹立することができる。1981 年にはマウス ES 細胞が樹立され(1,2), 1998 年にはヒト ES 細胞が樹立された(3)。ES 細胞は理論上、体を構成する全ての細胞へと分化する能力を持つことから、ES 細胞を目的とする細胞へ分化させ、糖尿病やパーキンソン病、脊髄損傷など様々な疾患や外傷に対する細胞移植医療に応用できると期待されている。しかし、自分と同じ遺伝子情報を持つ ES 細胞を樹立することはできないため、移植する場合は拒絶反応を回避するために免疫抑制剤の投与が不可欠となる。また、ES 細胞の樹立には受精卵を犠牲にしなくてはならないため、ヒトでは倫理的問題を払拭できない。

このような問題を解決する方法の 1 つとして、患者自身の細胞から ES 細胞のような多能性幹細胞を作り出すことが考えられる。分化した細胞(例えば皮膚の細胞など)が ES 細胞のような多能性を獲得する現象は初期化、あるいは再プログラム化と呼ばれ、いくつかの方法がこれまでに報告されている。代表的な例として、①核移植と、②細胞融合によるものが挙げられる。核移植は未受精卵の細胞核を除去し、体細胞の細胞核をこの脱核した未受精卵に移植する。この核移植された受精卵は、体細胞由来の核を持つため、もともとの受精卵の遺伝子情報ではなく、体細胞由来の遺伝子情報を有する。つまり、治療を行いたい患者の体細胞核を、脱核した未受精卵に移植することで、患者の遺伝子情報を持った幹細胞を作り出すことができる。1997 年に Wilmut らが、羊の乳腺細胞の核を脱核した未受精卵に移植することで、クローン羊・ドリーを作製したニュースは世界中で話題となった(4)。細胞融合は、ES 細胞と体細胞を交流ならびに直流電流で刺激することで、2 つの細胞が融合する現象である。ES 細胞と融合した体細胞は、ES 細胞の性質を獲得することが知られている(5,6)。しかし、細胞融合によって得られた細胞は、ES 細胞由来の遺伝子情報を含むため、このまま移植すると拒絶反応の恐れがある。この問題を解決するために、ES 細胞由来の遺伝子情報を全て除く技術についても精力的に研究が行われている。しかし、核移植、細胞融合いずれの技術も、多能性幹細胞を作製することができるものの、核移植は未受精卵、細胞融合は ES 細胞を用いなければならないことから、ヒ

トに応用するには倫理的問題を回避することができず、更なる革新的手法の開発が期待される。

これに対し、生体内に存在する体性幹細胞は患者自身から採取可能な幹細胞であるため、ES細胞のような倫理的問題がないのが利点である。さらに、自家移植であれば拒絶反応を回避できるのも大きな利点である。分化能や増殖能に関してはES細胞に劣るものの、これまでに様々な組織の体性幹細胞が報告されている。代表的なものとして、骨髄中や臍帯血中に存在し、血液系の様々な細胞に分化する造血幹細胞や、骨髄中に存在し、主に骨・軟骨・脂肪などに分化する間葉系幹細胞が挙げられる。私が現在所属する産業技術総合研究所 健康工学研究部門 組織・再生工学研究グループでは、複数の大学病院と提携して、骨関連疾患を中心に患者自己間葉系幹細胞を用いた治療をこれまでに約 80 症例実施してきた(7-10)。体性幹細胞には利点が多いものの、ES細胞とは異なり増殖能には限りがあるため、大量の細胞を調製することは困難である。実際、我々も患者間葉系幹細胞は個人間で増殖能や骨分化能が大きく異なることを経験している(11)。この問題を解決するために、我々はES細胞の未分化維持に必須な因子である NANOG および SOX2 に注目した。増殖能や分化能の低下した患者間葉系幹細胞に、NANOG 遺伝子を導入、あるいは SOX2 遺伝子を導入して塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) を添加することで、増殖能や骨分化能を著しく向上させることに成功した(12)。しかし、どちらの条件においても、数ヶ月にわたる長期的な増殖能や分化能の維持は困難であった。このように体性幹細胞は有用な細胞である一方、増殖能に限りがあり、ヒトでは採取が困難なものも存在するため、体性幹細胞を用いた治療にも限界がある。拒絶反応や倫理的問題がなく、ES細胞のような増殖能と多分化能を兼ね備えた、患者由来の多能性幹細胞を樹立することが求められていた。

このような背景の中、2006年に京都大学の高橋 和利 特任助手(当時)と山中 伸弥 教授により、マウスの体細胞に4つの遺伝子「*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*」を導入することで、ES細胞に類似した多能性幹細胞である、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell ; iPS細胞) の樹立に成功したことが報告され、世界中を驚嘆させた(13)。さらに彼らは、2007年にヒトの体細胞に同様の4遺伝子を導入することで、ヒト iPS細胞の樹立にも成功した(14)。また、ウィスコンシン大学のグループからも、*OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28*の4遺伝子でヒト iPS細胞を樹立できることがほぼ同時に発表された(15)。樹立された iPS細胞は、細胞の形態、遺伝子発現、細胞表面抗原、ゲノム DNA やヒストンのエピジェネティックな状態、生体内および生体外における3胚葉分化能など、ヒト ES細胞と様々な点で酷似してお

り、世界各国の研究者から相次いで報告された(13-24)。iPS 細胞の樹立は、患者自身に由来する多能性幹細胞の樹立が可能になったことを意味し、これまでヒトでの解析が困難であった病気の発生のメカニズム解明や、新薬の開発、細胞移植医療への応用が期待されている(25-28)。

しかし、iPS 細胞を医療へ応用するには、現段階の技術には大きく 3 つの問題点が挙げられる。1 つ目に、患者への負担を考えた場合、少量の体細胞からの iPS 細胞樹立が求められるが、ヒト体細胞（特に線維芽細胞）からのリプログラミング効率が非常に低いことが問題となる。2 つ目に、iPS 細胞を樹立する際に使用するレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターはゲノムに挿入されてしまうため、ゲノム改変によるガン化の懸念がある(29-31)。3 つ目に、iPS 細胞樹立に用いる遺伝子の 1 つである *c-MYC* が生体内で再活性化することにより、ガン化を招いてしまう懸念がある(21)。*c-MYC*を除いた 3 遺伝子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*) でも iPS 細胞樹立は可能であるが、効率が著しく低下してしまう欠点がある(32)。これまでに、国内外の様々な研究グループからヒト iPS 細胞樹立が報告されているが、その細胞の起源は、新生児や成人の皮膚の線維芽細胞(14-17,19,20,32)、肺由来の線維芽細胞(15,16)、角化細胞(18)など、様々な組織に由来している。皮膚の線維芽細胞はバイオプシー（生検）により容易に採取することができるが、細胞の老化や増殖能の低下などにより、iPS 細胞を樹立できないというケースも存在する(16)。

臨床応用を見据えたヒト iPS 細胞を樹立する場合、どの組織由来の細胞を選択するかが重要なポイントとなる。由来する組織により、iPS 細胞の効率も大きく異なることが知られており、採取が容易であることも重要な条件である。また、増殖能が高く、老化が進んでいない細胞がより望ましいと考えられる。細胞を採取する際にできるだけ患者の負担を少なく、もしくは、治療などの際に廃棄される細胞から iPS 細胞から、効率よく iPS 細胞を樹立できれば最も理想的と考えられる。私が現在所属する産業技術総合研究所の組織・再生工学研究グループでは、通常は医療廃棄物として処分されている、生えてくる前の未熟な親知らず（歯胚）に由来する間葉系細胞が、骨髓由来の間葉系細胞に比べ高い増殖能を示すことを以前報告した(33)。他の研究グループからも同様の報告が行われている(34, 35)。最近、コロンビア大学のグループから、廃棄された歯の組織に由来する間葉系細胞や前駆細胞である、剥脱乳歯由来幹細胞、歯根端乳頭由来幹細胞、歯髄幹細胞に *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* の 4 遺伝子、もしくは *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28* の 4 遺伝子を導入することでヒト iPS 細胞を樹立したことが報告された(36)。しかし、*c-MYC* 遺伝子の導入はガン化の懸念があり(21)、*LIN28*

の過剰発現はガン抑制に働く *micro RNA* の一種である *let-7* を抑制し、その結果として *c-MYC* を含む *let-7* の標的遺伝子の抑制が解除されてしまうため、ガン化を促進することが報告されている(37)。

そこで本研究では、増殖能が高いことで知られる、ヒトの親知らずの歯胚に由来する間葉系細胞を用いて、原ガン遺伝子である *c-MYC* を用いずに *iPS* 細胞を樹立することを目的とした。3 人の提供者 (10 歳, 13 歳, 16 歳) の歯胚由来間葉系細胞に *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* の 3 遺伝子を導入することで、ヒト *iPS* 細胞の樹立に成功した。より詳細な解析を行うため、最も *iPS* 細胞樹立効率が高い 10 歳由来の歯胚由来間葉系細胞を単一クローン化し、得られた 5 株の歯胚クローン細胞に 3 遺伝子を導入して *iPS* 細胞樹立を試みた。その結果、ヒト皮膚線維芽細胞 (*human dermal fibroblast*; *HDF*) に比べ、100 倍以上も高効率で *iPS* 細胞を樹立できる歯胚クローン細胞が 3 株存在することが明らかとなった。樹立した歯胚クローン由来 *iPS* 細胞は、従来の報告と同様に、ヒト *ES* 細胞と酷似した形態や遺伝子発現を示し、生体内および生体外において 3 胚葉分化能を持つことが明らかとなった。さらに、これらの歯胚クローン細胞の網羅的遺伝子発現を解析したところ、リプログラミング効率が高い 3 株の歯胚クローン細胞では、ヒストンメチルトランスフェラーゼである *PAXIP1* 遺伝子の発現が有意に高いことが明らかとなった。これらの結果をもとに、歯胚細胞における初期化機序についても考察する。

材料と方法

1. 本研究の倫理面における配慮

本研究で用いられたヒトの親知らず由来の歯胚細胞は、主治医である歯科医から提供者に対して研究計画についての十分な説明を行い、同意が得られたもののみを使用した。また、本研究は独立行政法人 産業技術総合研究所の倫理委員会において承認を得た後に研究を開始した。

2. プラスミドの作製

本研究で用いた pMXs レトロウイルスベクターは、東京大学医科学研究所の北村俊雄教授から分与して頂いた(38)。pMXsレトロウイルスベクターの EcoRI サイトに Reading frame cassette A (Invitrogen)を挿入し、pMXs-gw ベクターを作製した。ヒト胎児の脳由来 RNA (Takara)からヒト *OCT3/4 (POU5F1 isoform-1)*, *SOX2*, *KLF4* 遺伝子の open reading frame (ORF)を ReverTra Ace α - (TOYOBO)を用いて RT-PCR で増幅した。これらの遺伝子の ORF を pENTR/D-TOPO (Invitrogen)にクローニングした。また、pMXs レトロウイルスベクターの感染効率を確認するために、pIRES2-DsRed-Express ベクター (clontech)から DsRed-Express の ORF を PCR で増幅し、pENTR/D-TOPO にクローニングした。それぞれの遺伝子の ORF を含む pENTR/D-TOPO ベクターと pMXs-gw ベクターを、LR clonase II (Invitrogen)を用いた Gateway system による組換え反応をマニュアルに従って行い、目的とするそれぞれの ORF を pMXs レトロウイルスベクターに寄せ換えたものを、iPS 細胞樹立用ならびに pMXs レトロウイルスベクター導入効率の検討に用いた。

3. Total RNA の抽出と逆転写反応

ToTal RNA の抽出は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてマニュアルに従って行った。抽出後の total RNA を TURBO DNA-free (Applied Biosystems) で処理することで、ゲノム DNA の除去を行った。1 μ g の total RNA を用いて、ReverTra Ace α - (TOYOBO)のマニュアルに従い逆転写反応を行って cDNA を調製した。PCR 反応を行う際は、ExTaq HS (Takara)のマニュアルに従って行った。各遺伝子特異的なプライマーの配列を表 1 に示した。

表1. RT-PCR および bisulfite sequencing に用いた Primer の配列

Primer	Sequence (5' to 3')	Applications
hOCT4-S842	CTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCCAGCAG	OCT3/4 endo and transgene RT-PCR
hOCT4-AS1283	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC	Endo OCT3/4 RT-PCR
hSOX2-S1430	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG	Endo SOX2 RT-PCR
hSOX2-AS1555	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	
hSOX2-S1004	CAGATGCAGCCCATGCACCGCTACGACGTG	SOX2 transgene RT-PCR
hKLF4-S1457	ACGATCGTGGCCCCGGAAGGACC	KLF4 endo and transgene RT-PCR
hKLF4-AS1826	TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC	Endo KLF4 RT-PCR
pMXs-AS3201	TAAATCTTTTATTTTATCGTCGACCACTG	Transgene RT-PCR
hMYC-S253	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC	c-MYC RT-PCR
hMYC-AS555	TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG	
hNANOG-S968	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC	NANOG RT-PCR
hNANOG-AS1334	CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC	
hREX1-S	CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT	REX1 RT-PCR
hREX1-AS	GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA	
hUTF1-S832	CCGTCGCTGAACACCGCCCTGCTG	UTF1 RT-PCR
hUTF1-AS979	CGCGCTGCCAGAATGAAGCCAC	
hGDF3-S243	CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG	GDF3 RT-PCR
hGDF3-AS850	GTGCCAACCAGGTCCCGGAAGTT	
hDPPA2-S85	CCGTCCCCGCAATCTCCTTCCATC	DPPA2 RT-PCR
hDPPA2-AS667	ATGATGCCAACATGGCTCCCGGTG	
hDPPA4-S532	GGAGCCGCCTGCCCTGGAATTC	DPPA4 RT-PCR
hDPPA4-AS916	TTTTCTGATATTCTATTCCCAT	
hDPPA5-S40	ATATCCCGCCGTGGGTGAAAGTTC	DPPA5 RT-PCR
hDPPA5-AS259	ACTCAGCCATGGACTGGAGCATCC	
hAFP-S948	GAATGCTGCAAAGTACCACGCTGGAAC	AFP RT-PCR
hAFP-AS1201	TGGCATTCAAGAGGGTTTTCAGTCTGGA	
hFOXA2-S208	TGGGAGCGGTGAAGATGGAAGGGCAC	FOXA2 RT-PCR
hFOXA2-AS398	TCATGCCAGCGCCACGTACGACGAC	
hBRACHYURY-S1292	GCCCTCTCCCTCCCCTCCACGCACAG	BRACHYURY RT-PCR
hBRACHYURY-AS1540	CGGCGCCGTTGCTCACAGACCACAGG	
hTnTc-S524	ATGAGCGGGAGAAGGAGCGGCAGAAC	TnTc RT-PCR
hTnTc-AS730	TCAATGGCCAGCACCTTCCTCCTCTC	
hMAP2-S5401	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGAGTG	MAP2 RT-PCR
hMAP2-AS5587	CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG	
hPAX6-S1206	ACCCATTATCCAGATGTGTTTGCCCGAG	PAX6 RT-PCR
hPAX6-AS1497	ATGGTGAAGCTGGGCATAGGCGGCAG	
human beta-actin F	AGAAAATCTGGCACCACAC	β -actin RT-PCR
human beta-actin R	CTCCTTAATGTCACGCACG	
mehOCT3/4-F-S	GAGGTTGGAGTAGAAGGATTGTTTTGGTTT	Bisulfite sequencing
mehOCT3/4-F-AS	CCCCCTAACCCATCACCTCCACCACCTAA	
mehNANOG-F-S	TGGTTAGGTTGGTTTTAAATTTTG	Bisulfite sequencing
mehNANOG-F-AS	AACCCACCCTTATAAATTCTCAATTA	

4. 細胞培養と継代

十分なインフォームドコンセントの後に3人の提供者(10歳女性, 13歳男性, 16歳女性)から歯胚組織の提供を受け, 歯胚由来間葉系細胞の増殖と凍結を行った。この方法については現所属の研究グループが過去に報告したが(33), 以下にその方法を記載する。まず, 歯科医が外科的手術によって摘出した提供者の歯胚組織(約 0.4 g)を Phosphate-Buffered Salines (PBS; Invitrogen)に浸し, これを氷上に静置した状態で研究室へと持ち帰り, 4 mg/ml の collagenase (和光純薬)と, 終濃度が 1 mM となるよう CaCl_2 を加え, 37°C で 30 分間, 振とうした。これを 400×g, 4°C で 10 分間遠心分離して上清を除去した。沈殿した細胞塊に, 40 ml の間葉系細胞用培地 (Eagle's alpha minimal essential medium (α -MEM; Invitrogen)に 15%ウシ胎児血清(Invitrogen), 100 units/ml のペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン(Invitrogen)を含む)を加え, 培養表面処理加工された T225 フラスコ (BD Falcon) に播種して, 1 日おきに培地交換を行いながら培養を行った。細胞が 80~90% confluent な状態に増殖した時に, トリプシン/EDTA (0.05%トリプシン, 0.53mM EDTA・4Na; Invitrogen)を用いて細胞を剥離し, 新たな T225 フラスコへ播種した。この時の継代数を 1 とした。継代数 4 の時に, トリプシン/EDTA で細胞を剥離し, 細胞凍結保存液であるセルバンカー(十慈フィールド)を加えて-80°C で保存した。iPS 細胞の樹立に用いた歯胚細胞は, いずれも凍結保存から 3 年以上が経過したものをを用いた。

ヒト線維芽細胞 (human dermal fibroblast; HDF) は Cell Applications から購入した。レトロウイルス産生用のパッケージング細胞である Platinum-A (Plat-A)細胞は Cell BioLabs から購入した(39)。iPS 細胞のフィーダー細胞として用いた SNL76/7 フィーダー細胞 (Large T 抗原を導入することで不死化されており, さらに neomycin 耐性遺伝子と leukemia inhibitory factor (LIF) 遺伝子が導入された細胞株)は, European Collection of Cell Cultures から購入した。フィーダー細胞として用いる場合には, フィーダー細胞が増殖することを避けるため, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマイトマイシン C (Roche)を加えて 37°C のインキュベーターで 3 時間処理した。その後, PBS で 3 回 wash して剥離剤で細胞を回収し, 1×10^7 cells/ml/tube となるように分注して-80°C で保存した。iPS 細胞からの直接的な神経細胞誘導に用いた NC3T3-G2/PA6 細胞 (PA6 細胞)は, 理化学研究所バイオリソースセンターから購入した(40)。

歯胚由来間葉系細胞ならびに歯胚クローン細胞は, 上述の間葉系細胞用培地で培養した。HDF, Plat-A, および SNL フィーダー細胞の培地は, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen)に 10%ウシ胎児血清, 100 units/ml のペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを加えたものをを用いた。歯胚由来間葉系細胞, 歯胚クローン細胞, HDF, Plat-A および SNL フィーダー細胞

胞の継代は、それぞれ 100 mm dish でコンフルエントになったものを 10 ml の PBS で 1 回 wash し、1 ml の 0.05% trypsin/0.53mM EDTA(Invitrogen)を加えて 37℃で 5 分間処理した。次に、それぞれの培地を 9 ml ずつ加えて十分にピペッティングを行い、細胞を単離させた。継代の比率は、歯胚由来間葉系細胞、歯胚クローン細胞、HDF が 1:3, Plat-A および SNL フィーダー細胞は 1:10 で継代した。培地交換は 2 日に 1 回行った。

iPS 細胞の培養は、DMEM/F-12 培地 (GlutaMAX-I 含有, Invitrogen) に 20% KnockOut Serum Replacement (KSR; Invitrogen), 0.1mM non-essential amino acids (Invitrogen), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen), 100 units/ml のペニシリン, 100 µg/ml のストレプトマイシン, 5 ng/ml bFGF (和光純薬)を含む培地を用いた。iPS 細胞の剥離剤には、滅菌水に 0.25% trypsin (Invitrogen), 0.1 mg/ml collagenase type IV (Invitrogen), 10 mM CaCl₂ (和光純薬), 20% KSR を含有するものを用いた。iPS 細胞の継代は、100 mm dish でコンフルエントになった iPS 細胞を 10 ml の PBS で 1 回 wash し、1 ml の剥離剤を加え 25℃で 1 分間インキュベートした。フィーダー細胞のみが剥がれるので、直ちに 10ml の PBS で 2 回 wash して剥離したフィーダー細胞を除去した。Dish に接着したままの iPS 細胞に 10 ml の培地を加え、セルスクレイパー (イワキ) で iPS 細胞のコロニーを物理的に剥離させた。10 ml のピペットを用いて数回ピペッティングを行い、iPS 細胞のコロニーを数十～百細胞程度の細胞塊に解離させた。前日に、0.1%ゼラチン溶液 (Sigma) でコートした 100mm dish に 2×10^6 cells/dish となるよう SNL フィーダー細胞を播種しておき、これを 10 ml の PBS で 1 回 wash して、ピペッティングして碎いた iPS 細胞のコロニーを 1:3 の比率で継代した。培地交換は毎日行った。

PA6 細胞の培養には、Glasgow MEM (Invitrogen)に 10%ウシ胎児血清, 100 units/ml のペニシリン, 100 µg/ml のストレプトマイシンを含む培地を用いた。継代は歯胚由来間葉系細胞と同様に行った。

5. 細胞の凍結

歯胚由来間葉系細胞、歯胚クローン細胞、HDF, Plat-A および SNL フィーダー細胞を継代の時と同様の方法で剥離させ、9 ml の培地を加えて 15 ml のチューブに回収し、1,000 rpm, 4℃で 5 分間遠心した。上清を除いて 1 ml のセルバンカーを加え、クライオバイアルに移して-80℃で保管した。

iPS 細胞の凍結には、1.43 ml の Dmethyl sulfoxide (Sigma), 1 ml の 10 M acetamide (和光純薬), 2.2 ml の propylene glycol (和光純薬)に 5.37 ml の iPS 細胞培地を加えた凍結保護剤を用いた。使用直前まで-80℃で保存した。100 mm dish でコンフルエントになった iPS 細胞を 10 ml の PBS で 1 回 wash

し、1 ml の剥離剤を加えて 25℃で 1 分間インキュベートした。10 ml の PBS で 2 回 wash して 5 ml の iPS 細胞培地を加え、セルスクレイパーで iPS 細胞のコロニーを剥離させた。5 ml のピペットを用いて、iPS 細胞のコロニーを碎かないように留意しながら 15 ml チューブに移し、1,000 rpm, 4℃で 5 分間遠心した。上清を除いて 200 μ l の凍結保護剤を加え、iPS 細胞のコロニーを碎かないように留意しながらクライオバイアルに移し、15 秒以内にクライオバイアルを液体窒素に浸して液体窒素タンク内で保管した。

6. レトロウイルスの産生と pMXs レトロウイルスベクターの感染効率の検証

Plat-A パッケージ細胞を 8×10^6 cells/100 mm dish となるように播種し、一晩培養した。翌日、*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *DsRed-Express* の ORF をコードした pMXs レトロウイルスベクターを FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Roche) を用いて Plat-A 細胞に導入し、その翌日に培地を交換した。レトロウイルス上清は pMXs レトロウイルスベクターのトランスフェクションから 48 時間、72 時間後にそれぞれ回収し、0.45 μ m pore size のセルロースアセテート製のフィルター (Sartorius) を用いて濾過し、4 mg/ml となるよう Polyblene (Sigma) を添加した。標的細胞 (iPS 細胞を樹立したい元となる細胞) にこれらのウイルス上清を *OCT3/4*: *SOX2*: *KLF4* = 1:1:1 となるように調製した (終量は 10ml / 100 mm dish)。ウイルス上清を感染させた日を day0 とし (トランスフェクションから 48 時間後のウイルス上清), day1 (トランスフェクションから 72 時間後のウイルス上清) にもウイルス上清を感染させた。

pMXs レトロウイルスベクターの感染効率の確認には、Plat-A に感染させた pMXs-DsRed-Express のウイルス上清 (48 時間後および 72 時間後) 2 ml を 6 well plate で培養している歯胚クローンおよび HDF へ day0 と day1 に感染させた。その後、day3 まで歯胚クローンは間葉系細胞用の培地で、HDF は HDF 用の培地で毎日培地交換を行った。Day4 に、ウイルス感染細胞を 0.25% Trypsin/1mM EDTA \cdot 4Na (Invitrogen) で処理して、FACS Calibur (BD Biosciences) を用いて DsRed 陽性細胞の割合を測定した。

7. iPS 細胞の樹立方法と樹立効率 (リプログラミング効率) の算出

iPS 細胞樹立の方法は、参考文献 14 に従って行った。一部、改変を加えているため、以下に詳細を記載する。まず、歯胚由来間葉系細胞、歯胚クローン細胞および HDF を 5×10^5 cells/ 100mm dish となるよう播種し、一晩培養した (Day 0)。翌日、3 遺伝子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*) のウイルス上清をそれぞれの細胞に感染させ (Day 1), その翌日にも fresh なウイルス上清を同様に感染させた (Day 2)。その後、Day 4 までそれぞれの細胞用の培地で毎日培地交換を行った。Day 3 の

日に、0.1%ゼラチン溶液(Sigma)でコートした 100mm dish に SNL フィーダー細胞を 2×10^6 cells/dish となるように播種した。Day4 にウイルス感染細胞を 0.25% Trypsin/1mM EDTA・4Na で処理して、前日に準備した SNL フィーダー細胞上に 5×10^4 cells/100mm dish となるように播種した。その翌日から iPS 細胞用の培地で 1 日おきに培地交換を行った。細胞種によって数日～10 日程度時期が異なるが、Day25～30 で iPS 細胞のコロニーが得られるため、典型的なヒト ES/iPS 細胞様の形態を示すコロニーを顕微鏡で観察しながら、10 μ l チップをつけた P10 のピペットマンで物理的に pick up し、SNL フィーダー細胞を播種済みの 24 well plate に継代した。24well plate でコンフルエントになった iPS 細胞を継代数 1 とした。その後、適切なスケールでの継代を行い、それぞれの実験に十分な量の iPS 細胞を増殖させた。

それぞれの細胞からの iPS 細胞の樹立効率(reprogramming efficiency)は、「1 枚の 100mm dish から得られた iPS 細胞の総コロニー数」÷「播種したウイルス感染細胞の数 (5×10^4 cells)」で算出した。

8. 細胞増殖能の検討

それぞれの歯胚クローン細胞ならびに HDF を、 1×10^4 cells/6well plate となるように播種し(Day0)、1 日おきに培地交換を行った。通常は、歯胚クローンは 15%ウシ胎児血清含有の培地(基本培地は α -MEM)、HDF は 10%ウシ胎児血清含有の培地(基本培地は D-MEM)で培養を行うが、血清濃度と基本培地を揃えるため、この実験に限って、基本培地 D-MEM に 15%ウシ胎児血清を添加して培養を行った。Day5 でそれぞれの細胞を剥離剤で回収し、NucleoCounter (Chemometec)を用いて細胞数を計数した。

9. Alkaline phosphatase (ALP) 染色と免疫染色

ALP 染色は leukocyte alkaline phosphatase kit (Sigma)を用いてマニュアルに従って行った。まず、6 well plate で培養した各細胞に 1 ml の 4%パラホルムアルデヒド溶液(和光純薬)を加えて室温で 10 分間固定し、PBS で 3 回 wash した。1.5 ml チューブに 250 μ l の Sodium Nitrite Solution と、250 μ l の FRV-Alkaline Solution を混ぜて転倒混和させ、室温で 2 分間放置した。15 ml チューブに 11.25 ml のミリ Q 水、先程の混合液 500 μ l を加え、250 μ l の Naphthol AS-BI Alkaline Solution を加えて転倒混和で均一にした。この Alkaline-dye 混合液を、固定した 6 well plate の細胞に 1 ml ずつ加え、遮光して 37°C で 30 分間インキュベートした。30 分後、細胞を PBS で 3 回 wash して顕微鏡で観察した。

免疫染色を行うにあたり、12 well plate で培養した iPS 細胞に 500 μ l の 4%パ

ラホルムアルデヒド溶液を加えて室温で 10 分間固定し, PBS で 3 回 wash した。核内因子の免疫染色を行う場合は, PBS の洗浄後に 500 μ l の 0.1% Triton X-100 / PBS 溶液で 10 分間透過処理を行い, PBS で 3 回 wash した。PBS 洗浄後の細胞を, 500 μ l の 1% bovine serum albumin (Sigma)/ PBS 溶液で 10 分間, 室温で処理した。次に, 1% bovine serum albumin / PBS 溶液を用いて下記の比率で希釈した 300 μ l の一次抗体を加え, 4℃で一晩インキュベートした。一次抗体には, stage-specific embryonic antigen (SSEA)-3 (1:100, MAB4303, Millipore), SSEA-4 (1:100, MAB4304, Millipore), tumor-related antigen (TRA)-1-60 (1:100, ab16288-200, Abcam), TRA-1-81 (1:100, ab16289-200, Abcam), OCT4 (1:100, ab19857-100, Abcam), NANOG(1:50, ab21624, Abcam), SOX17 (1:200, AF1924, R&D Systems), α -fetoprotein (1:200, MAB1368, R&D Systems), desmin (1:200, RB-9014, Lab Vision), α -smooth muscle actin (prediluted, N1584, Dako), β III-tubulin (1:200, CBL412, Millipore), および tyrosine hydroxylase (1:200, AB152, Millipore)を用いた。翌日, PBS で 3 回 wash して, 1% bovine serum albumin / PBS 溶液を用いて下記の比率で希釈した 300 μ l の二次抗体を加え, 25℃で 1 時間インキュベートした。二次抗体は, Alexa Fluor 488 donkey antimouse IgG (1:200, A21202), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200, A11031), Alexa Fluor 568 goat antimouse IgM (1:200, A21043), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM (1:200, A21042), Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (1:200, A11011), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:200, A11034), Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (1:200, A11055), および Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgM (1:200, A21212) (全て Invitrogen から購入)を用いた。その後, 核を染色するために, 0.2 mg/ml の Hoechst 33342 (Invitrogen)を 300 μ l の PBS に加え, 25℃で 10 分間インキュベートした。その後, PBS で 3 回 wash して蛍光顕微鏡で観察した。

10. ゲノム DNA の抽出

培養細胞からのゲノム DNA の抽出は, Gentra Puregene Cell Kit (Qiagen) を用いて行った。まず, 100 mm dish で培養してコンフルエントになった iPS 細胞を 10 ml の PBS で wash して剥離液を 1 ml 加え, 室温で 1 分間インキュベートした。PBS で 2 回 wash してフィーダー細胞を除去し, 3 ml の Cell lysis solution を加え, 室温で 1 分間インキュベートさせて細胞を溶解させた。細胞溶解液を 1.5 ml チューブ 3 本に分注し, それぞれのチューブに 330 μ l の Protein precipitation solution を加え, 室温で 30 秒間転倒混和した。15,000 rpm,

25℃で 5 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。上清と等量のイソプロパノールを加え、室温で 1 分間、転倒混和した。15,000 rpm, 25℃で 5 分間遠心し、ペレットを吸わないように注意深く上清を除いて、70%エタノールを 1 ml 加え、15,000 rpm, 25℃で 1 分間遠心した。ピペットマンを用いて上清を丁寧に除いて、ペレットを 1 分間風乾させた。ピペットマンを用いて 100 μ l の DNA Hydration Solution を加え、5 分間緩やかにタッピングして室温で一晩静置したものをゲノム DNA 溶液とした。

11. Bisulfite sequencing

ゲノム DNA の bisulfite 処理は、EpiTect bisulfite kit (Qiagen)を用いて行った。0.2 ml チューブに 85 μ l の Bisulfite Mix, 35 μ l の DNA Protect Buffer, 1 μ g のゲノム DNA 溶液を加え、終量が 140 μ l となるよう RNase-free water でメスアップした。反応液の入ったチューブをサーマルサイクラーにセットし、95℃, 5 分間, 60℃, 25 分間, 95℃, 5 分間, 60℃, 85 分間, 95℃, 5 分間, 60℃, 175 分間反応させ、20℃で一晩インキュベートした。Bisulfite 処理反応後の反応液を、1.5 ml チューブに移し、10 μ g/ml のキャリア RNA を含む、用事調整した 560 μ l の Buffer BL を加えた。EpiTect スピнкаラムとコレクションチューブをセットし、全反応液をスピнкаラムに加え、15,000rpm, 25℃で 1 分間遠心し、溶出液を捨てた。スピнкаラムに 500 μ l の Buffer BW を加え、15,000rpm, 25℃で 1 分間遠心し、溶出液を捨てた。スピнкаラムに 500 μ l の Buffer BD を加え、25℃で 15 分間インキュベートした。15 分後、15,000rpm, 25℃で 1 分間遠心し、溶出液を捨てた。スピнкаラムに 500 μ l の Buffer BW を加え、15,000rpm, 25℃で 1 分間遠心し、溶出液を捨てた。この工程をもう 1 度繰り返し、溶液が入っていない状態のスピнкаラムを 15,000rpm, 25℃で 1 分間遠心して風乾させた。蓋を開けた新しい 1.5 ml チューブにスピнкаラムを置き、ヒートブロックで 56℃, 5 分間加熱して水分を蒸発させた。20 μ l の Buffer EB を加え、15,000rpm, 25℃で 1 分間遠心して精製ゲノム DNA を回収した。

ヒト *OCT3/4* および *NANOG* のプロモーター領域のメチル化状態を調べるため、上述の bisulfite 処理後のゲノム DNA 溶液 1 μ l を template にして、表 1 にある primer (*OCT3/4* 用の primer set : mehOCT3/4-F-S および mehOCT3/4-F-AS, *NANOG* 用の primer set : mehNANOG-F-S および mehNANOG-F-AS), ExTaq HS を用いて終量が 10 μ l になるよう調整して PCR を行った。反応条件は、94℃・2 分間, (94℃・10 秒, 72℃・40 秒) × 40 サイクル, 72℃・2 分間反応後に 20℃でインキュベートした。PCR 産物は pCR2.1/TOPO ベクター (Invitrogen) にサブクローニングし、大腸菌に形質転換してプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドを M13 forward および reverse primer で sequence し

た。得られたデータを DNA シーケンスアセンブルソフトウェア SEQUENCHER (日立ソリューションズ) で解析し、上述のプロモーター領域のメチル化の有無を確認した。

12. Telomerase 活性の検出

Telomerase 活性の検出は、TRAPeze telomerase detection kit (Millipore) を用いてマニュアルに従って行った。iPS 細胞を継代の時と同様に剥離して、5 ml の PBS でコロニーを回収して 15 ml チューブに移し、1,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心した。上清を除き、200 μ l の 1 \times CHAPS Lysis buffer/10⁶ cells となるように加え、氷上で 30 分間インキュベートした。サンプルを 15,000 rpm, 4°C, 20 分間遠心し、160 μ l の上清を新しい 1.5 ml チューブに移してタンパク質の濃度を測定した。一部のサンプルは-80°Cで凍結保存し、残りのサンプルを解析に用いた。

0.2 ml チューブに、5 μ l の 10 \times TRAP Reaction Buffer, 1 μ l の 50 \times dNTP Mix, 1 μ l の TS primer, 1 μ l の TRAP Primer Mix, 0.4 μ l の ExTaq HS, 39.6 μ l のミリ Q 水を加え、最後に上述の調製した 2 μ l の細胞抽出液 (200 ng/ 2 μ l) を加えて終量を 50 μ l とした。また、細胞抽出液の一部を 85°Cで 10 分間処理して、heat-inactivated control (内部コントロールのバンドしか検出されない) とした。これらをサーマルサイクラーを用いて 30°Cで 30 分間インキュベートし、その後、(94°C-30 秒, 59°C-30 秒, 72°C-1 分間) \times 30 サイクル反応させた。反応後のサンプルを Tris-borate-EDTA (TBE) ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色してテロメラーゼ活性の検出を行った。

13. iPS 細胞の *in vitro* での分化誘導

胚様体を形成させるために、樹立したそれぞれの iPS 細胞を剥離液で処理し、超低接着性の培養皿である PrimeSurface (住友ベークライト) に iPS 細胞の細胞塊を播種した。胚様体形成の実験に用いる iPS 細胞培地は、通常の iPS 細胞培地から bFGF を除いたものを用いた。培地は 1 日おきに交換した。浮遊培養を 8 日間行った後に、得られた胚様体を数個~10 個程度ずつ 0.1%ゼラチンコートした 12well plate に播種した。ゼラチンコートした plate に播種した日から 1 日おきに培地交換を行い、接着した胚様体の自発的な分化が起こるまで 10 日間ほど培養した。

PA6 細胞は ES 細胞や iPS 細胞から直接的にドーパミン産生ニューロンへと分化誘導させることができるフィーダー細胞として広く用いられている。PA6 細胞を 6well plate に播種し、over confluent になるまで培養することで contact inhibition を促し、これをフィーダー細胞として用いた。iPS 細胞を継代と同様の方法で剥離し、それぞれの iPS 細胞のコロニーを PA6 細胞上に播種して 20 日間

程度培養してドーパミン産生ニューロンへの分化誘導を行った。

14. 実験動物

本研究では，7 週齢のオスの重度免疫不全（Severe combined immunodeficiency；SCID）マウス（型番：FOX CHASE SCID® C.B-17/lcr-scid/scidJcl）を日本クレアから購入し，奇形腫形成の検証に用いた。iPS 細胞の移植は，納入から 1 週間以上飼育した後に行った。

15. 奇形腫の形成

6well plate のフィーダー細胞上で培養している iPS 細胞の 1well 分を剥離して，50 μ l の iPS 細胞培地を加えた細胞懸濁液を調製した。このうちの 25 μ l の iPS 細胞懸濁液を SCID マウスの片方の精巣に注入した。もう一方の精巣にも同様に注入した。およそ 9 週間後に得られた奇形腫を 4%パラホルムアルデヒド/PBS 溶液で固定し，組織切片を作成して hematoxylin-eosin 染色を行い，奇形腫組織を観察した。

16. 核型解析

iPS 細胞の染色体 G-band 解析ならびに multicolor-FISH 解析は，日本遺伝子研究所への外注で行った。SNL フィーダー細胞を播種した T25 フラスコに核型解析用の iPS 細胞を播種した。翌日に，T25 フラスコ内に iPS 細胞用の培地を満たして空気を追い出し，配送時に細胞が剥離しないようにした。その後，クール宅急便で日本遺伝子研究所へ発送して解析を依頼した。

17. DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイは GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 gene expression arrays (Affymetrix)を用いた。実際の手順は Affymetrix のマニュアルに従って行った。マイクロアレイのデータは，GeneSpring GX10 ソフトウェアを用いて解析した。Heat map 解析には，我々の実験で得られたデータと，GEO データベースに登録されているヒト ES 細胞株 (BG01 および H9 株) のデータを用いて比較を行った (GEO367061, および GEO367062)。

18. 統計学処理

マイクロアレイにより得られたデータは，Student's *t* test を用いてそれぞれの遺伝子発現を評価した。さらに，false discovery rate (FDR) を Benjamini-Hochberg 法で算出した(41)。比較群間で FDR < 0.05 の差が見られた遺伝子を統計学的な有意差ありと判定した。

19. リアルタイム PCR

リアルタイムPCRのPCR反応液の調製は, TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems)のマニュアルに従って行い, StepOnePlus real-time PCR System (Applied Biosystems)で解析を行った。TaqMan probe には, *β -actin* (Hs99999903_m1), *KLF4* (Hs00358836_m1), *TP53* (Hs99999147_m1)を用いた。

結果

1. 歯胚由来間葉系細胞からの iPS 細胞の樹立

我々のグループは、ヒトの親知らずに由来する歯胚間葉系細胞が、高い増殖能と間葉系細胞系譜への分化能を持つことをこれまでに報告している(42)。そこで、3人の提供者(10歳女性:10F, 16歳女性:16F, 13歳男性:13M)由来の歯胚由来間葉系細胞を、それぞれ 5×10^5 cells/100 mm dish に継代し、この日を day 0 とした。ヒトの OCT3/4, SOX2, KLF4 の open reading frame をそれぞれ持つ pMXs レトロウイルスベクターを PLAT-A パッケージング細胞へ導入した(38,39)。導入から 48 時間後、および 72 時間後にそれぞれのウイルス上清を回収して歯胚細胞へ感染させた(day 1 および day 2)。Day 4 にウイルスを感染させた歯胚細胞をトリプシン処理して、マイトマイシン C 処理済みの SNL フィーダー細胞上へ 5×10^4 cells/100 mm dish となるように播種した。翌日から 1 日おきに iPS 細胞用の培地で培地交換を行った。およそ Day 25 になると、ヒト ES 細胞と酷似した形態を示した iPS 細胞のコロニーが観察された(図 1A)。Day 30 でそれぞれの歯胚細胞のリプログラミング効率を算出すると、10F = 0.0302%, 16M = 0.0042%, 13M = 0.0026% であった(図 1B)。

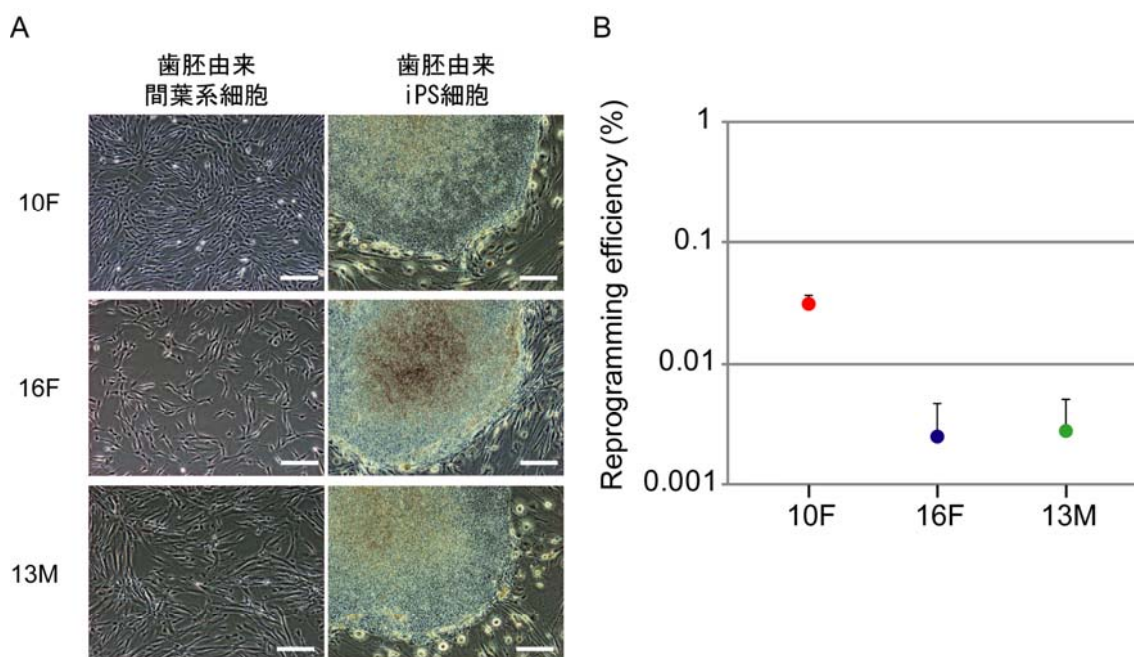


図1. 歯胚由来間葉系細胞からの iPS 細胞の樹立

(A) 3人の提供者の歯胚由来間葉系細胞と、歯胚由来間葉系細胞から樹立した iPS 細胞の形態を示した。スケールバーは 100 μm を示した。

(B) 3人の提供者の歯胚由来間葉系細胞から樹立した iPS 細胞の樹立効率の比較した。

2. 歯胚クローン細胞からの iPS 細胞樹立

歯胚細胞は歯が発生する過程の未熟な細胞であり、幹細胞が含まれている可能性が考えられた。実際、発生過程の歯から数種類の幹細胞の報告がなされている(34,35)。我々のグループでも、親知らず由来の歯胚間葉系細胞が骨芽細胞や神経細胞、肝細胞へと分化する能力を持つ幹細胞を含んでいることを報告している(33)。そこで、iPS 細胞樹立効率が最も高かった 10 歳女性由来の歯胚細胞を単一細胞にクローン化して、5 株の歯胚クローン細胞を作製した(10F-5, 10F-8, 10F-15, 10F-101, 10F-107)。これら 5 株の歯胚クローン細胞を用いて、*in vitro* で骨分化誘導を行ったところ、10F-5, 10F-8, 10F-15 は骨分化能を示すものの、10F-101, 10F-107 は骨分化能を持たないことが確認された。

これら 5 株の歯胚クローン細胞と HDF を用いて、上述の方法で *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* の 3 遺伝子を pMXs レトロウイルスベクターで導入し、iPS 細胞の樹立を行った。歯胚クローン細胞および HDF は間葉系に由来する細胞であるが、両者の細胞の形態は酷似しており(図 2A)、それぞれの歯胚クローン細胞や HDF から樹立した iPS 細胞の形態は、ヒト ES 細胞および過去に報告されたヒト iPS 細胞の形態と酷似していた(図 2A)。また、樹立した iPS 細胞は、ヒト ES/iPS 細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の活性を示すことが確認された(図 2A)。遺伝子導入を行った 30 日後の各細胞の培養皿(100 mm dish)を ALP 染色して観察すると、10F-15 では非常に多くの ALP 陽性の iPS 細胞のコロニーが観察され、10F-5, 10F-8 の培養皿でも多数のコロニーが確認された。一方、10F-101 や HDF ではごくわずかなコロニーしか観察されず、10F-107 の歯胚クローンでは ALP 陽性のコロニーは確認されなかった(図 2B)。5 株の歯胚クローンならびに HDF の iPS 細胞樹立効率(reprogramming efficiency)を比較すると、10F-15, 10F-5, 10F-8, 10F-101, 10F-107, HDF の順に、0.205%, 0.079%, 0.043%, 0.002%, 0%, 0.0003% であった(図 2C)。

iPS 細胞の樹立効率が pMXs レトロウイルスベクターの導入効率の違いによるものかを検討するために、pMXs レトロウイルスベクターに赤色蛍光タンパクである *DsRed-Express* の open reading frame を挿入し、それぞれの歯胚クローンと HDF に導入した。iPS 細胞樹立時にウイルス感染細胞を feeder 細胞上に再播種するタイミングに合わせ、ウイルス感染 4 日後の細胞を用いてフローサイトメリーで DsRed 陽性の細胞を確認した。DsRed 陽性細胞の割合を比較する限りでは、iPS 細胞の樹立効率と遺伝子(*DsRed*)の導入効率に相関は見られなかった(図 3A)。次に、歯胚クローンと HDF の細胞増殖能を比較するため、各細胞を 1×10^4 cells / 6 well plate で播種して培養し、5 日後の細胞数を計数した。10F-5, 10F-8, 10F-15 は HDF の 4~6 倍ほどの高い増殖能を示したが、10F-101, 10F-107 の 2 株はヒトの皮膚細胞(human dermal fibroblast ; HDF)の 2 倍以

下であった(図 3B)。

以後の研究は, 10F-15, 10F-101 および HDF の親株と, それぞれから樹立した iPS 細胞を中心に解析を行った。

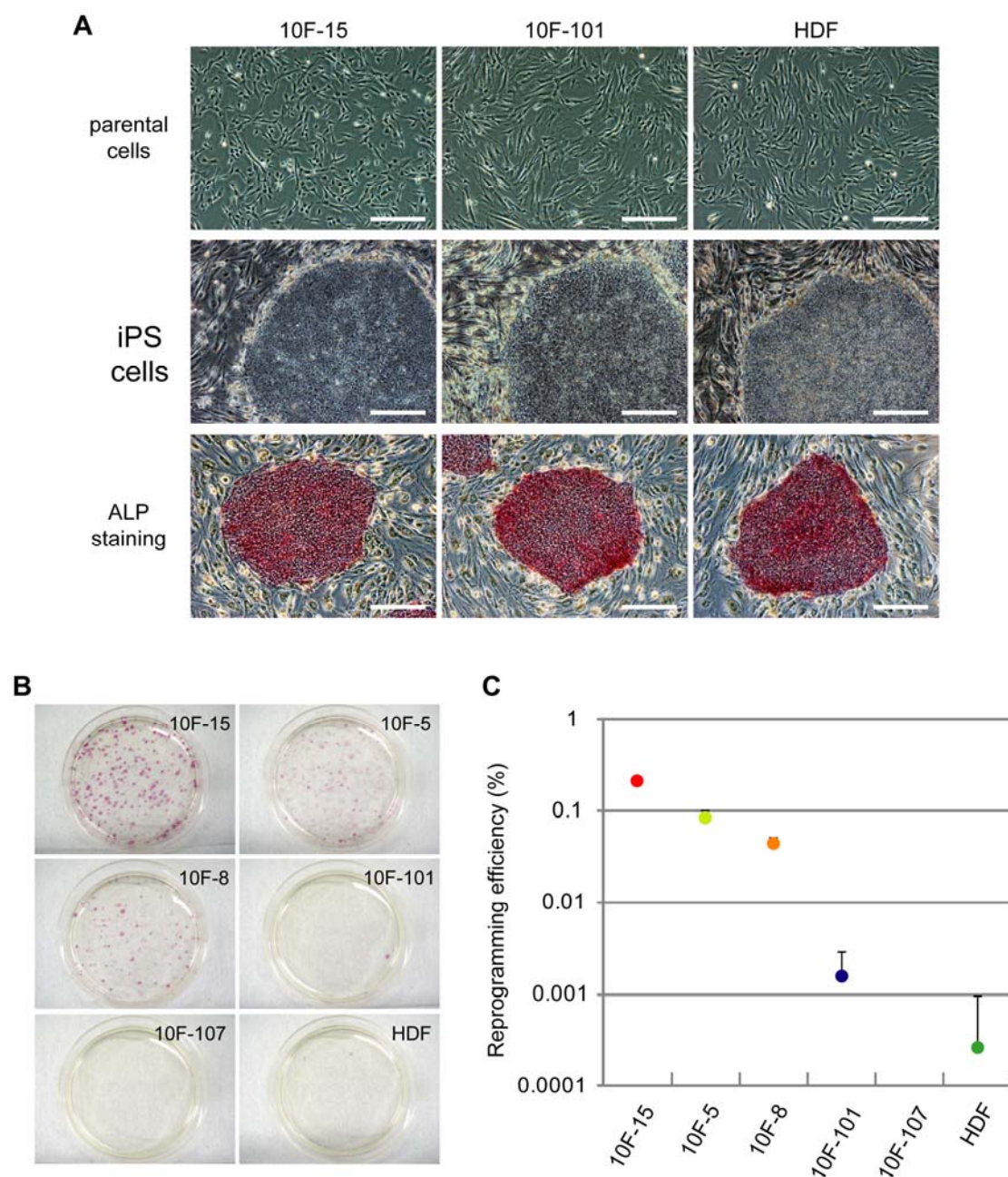


図2. 歯胚クローン細胞およびヒト線維芽細胞 (HDF) からの iPS 細胞の樹立

- (A) 歯胚クローン (10F-15, 10F-101) および HDF (上段: parental cells) に pMXs レトロウイルスベクターを用いて hOCT3/4, hSOX2, hKLF4 を導入し (day0), day4 に SNL フィーダー細胞上に 5×10^4 cells/100 mm dish で播種して Day30 までヒト ES/iPS 細胞用培地で培養した。それぞれの細胞から樹立した iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と酷似した形態を示していた (中段)。これらの iPS 細胞は未分化 ES/iPS 細胞の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を示すことが確認された (下段)。
- (B) Day30 で得られたヒト iPS 細胞のコロニーを ALP 染色し、各歯胚クローンおよび HDF 間で比較を行った。
- (C) Day30 で得られたヒト iPS 細胞のコロニーを計数して、リプログラミング効率を算出した。

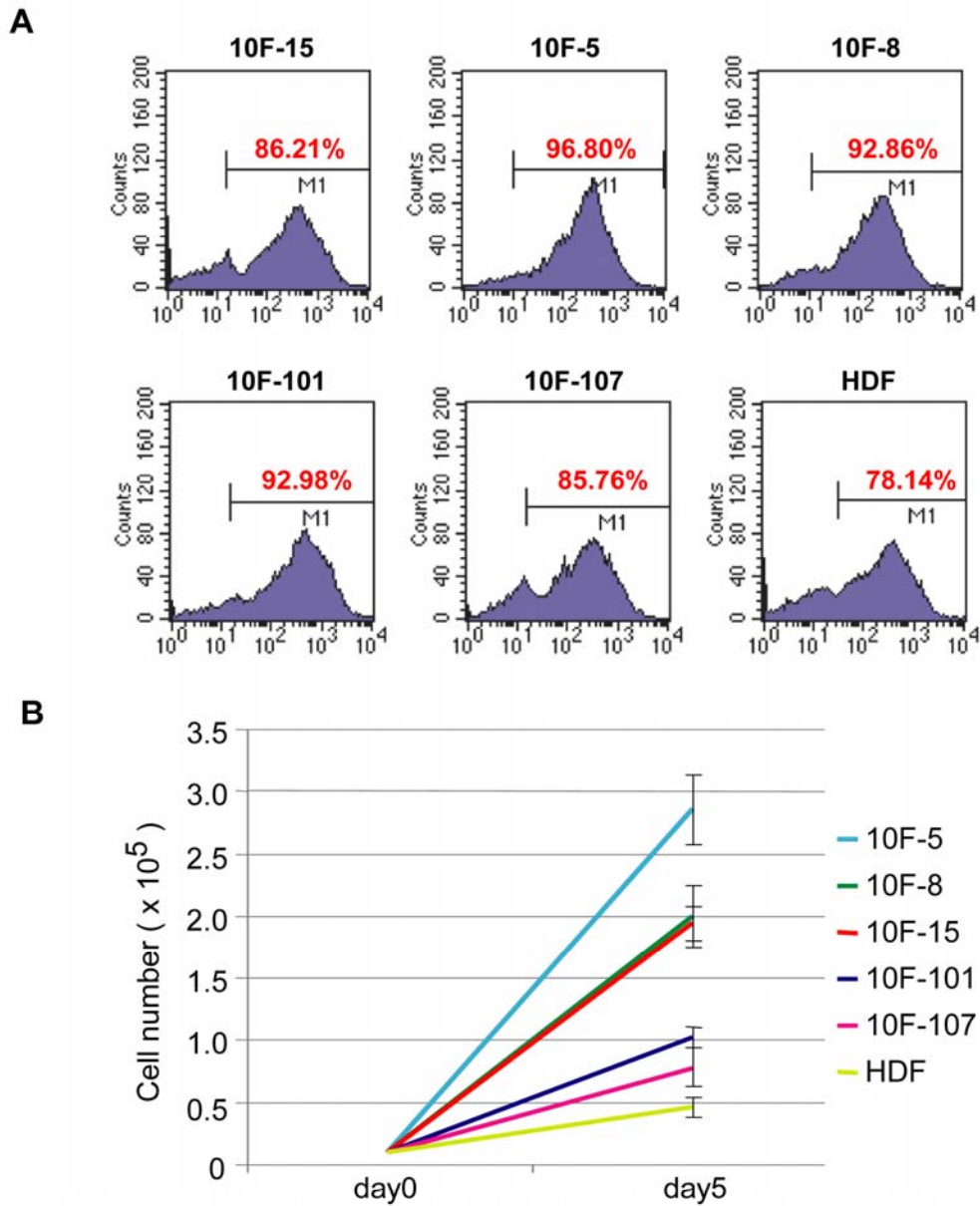


図3. 歯胚クローン細胞およびヒト線維芽細胞(HDF)のウイルス感染効率と細胞増殖能の比較
 (A) 各歯胚クローンおよびHDFに、pMXsレトロウイルスベクターを用いてDsRedを導入した。ウイルス感染4日後の細胞を剥離して、フローサイトメトリーを用いてDsRed陽性の細胞をカウントした。DsRed陽性の細胞の割合を赤色で示した。
 (B) 各歯胚クローンとHDFを 1×10^4 cells/6 well plateに播種し(day0), 15%FBSを含むD-MEM培地で5日間培養して細胞数を計数した。

3. 歯胚クローン細胞から樹立した iPS 細胞の特性解析

歯胚クローンならびに HDF から樹立した iPS 細胞の特性解析を行うため、ヒト ES/iPS 細胞マーカーの免疫染色, DNA メチル化状態の解析, ヒト ES/iPS 細胞

の未分化マーカー遺伝子の RT-PCR, およびテロメラーゼ活性について検証した。歯胚クローンならびに HDF から樹立した iPS 細胞は, 未分化ヒト ES/iPS 細胞の表面マーカーである Stage Specific Embryonic Antigen-3 (SSEA-3), SSEA-4, Tumor Rejection Antigen (TRA) -1-60, TRA-1-81 がいずれも陽性であった。また, 未分化ヒト ES/iPS 細胞の転写因子である OCT3/4 および NANOG が発現していることが確認された(図 4A)。親株 (parental cells) ならびに iPS 細胞のゲノム DNA を用いて, *OCT3/4* および *NANOG* のプロモーター領域における DNA メチル化状態を bisulfite sequencing 法で解析した。親株ではいずれの細胞においても *OCT3/4* のプロモーターが高度にメチル化されており, *NANOG* に関しては 10F-101 でメチル化が多く見られたが, 10F-15 と HDF では比較的少なかった。一方, 樹立した iPS 細胞では親株を問わず *OCT3/4* と *NANOG* のプロモーター領域のメチル化は非常に少なくなっていることが確認された(図 4B)。未分化ヒト ES/iPS 細胞のマーカー遺伝子の発現を RT-PCR で確認したところ, *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *reduced expression 1 (REX1)*, *undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (UTF1)*, *growth differentiation factor 3 (GDF3)*, *developmental pluripotency-associated 2 (DPPA2)*, *DPPA4*, *DPPA5* のいずれもが発現していることが明らかとなった。*KLF4* および *c-MYC* は iPS 細胞だけでなく, 親株でも発現していることが確認された。一方, レトロウイルスに由来する transgene (Tg) の発現は, *Tg-OCT3/4*, *Tg-SOX2*, *Tg-KLF4* のいずれもほぼ検出できなかった。これらの結果から, 樹立した iPS 細胞では transgene のサイレンシングが起きていることが確認された(図 4C)。増殖能の高い細胞は, 強い telomerase 活性を示すことが知られているため, 親株と樹立した iPS 細胞における telomerase 活性を比較した。いずれの親株でも telomerase 活性は殆ど検出されなかったが, iPS 細胞では非常に強い telomerase 活性が認められた(図 4D)。

以上の結果より, 歯胚クローンおよび HDF から樹立した iPS 細胞は, 過去の報告と同様に多数の未分化ヒト ES/iPS 細胞マーカーを発現していること, *OCT3/4*, *NANOG* の promoter 領域が低メチル化状態であること, 高い telomerase 活性を示すことが明らかとなった。

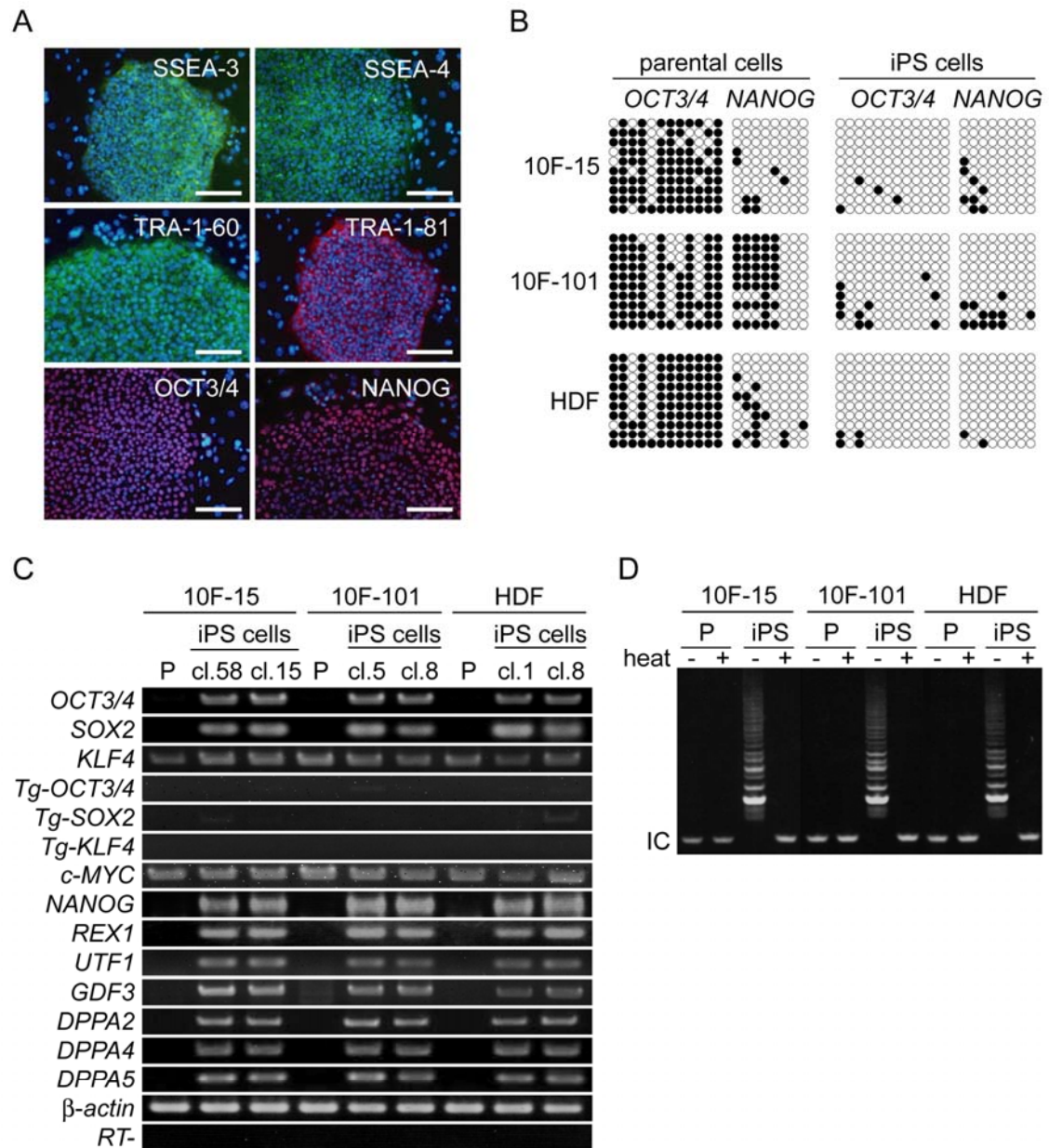


図4. 歯胚クローン細胞およびHDFから樹立したiPS細胞の特性解析

- (A) 樹立したiPS細胞を未分化ヒトES/iPS細胞の各種マーカーで染色した。細胞表面抗原のSSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, 転写因子であるOCT3/4, NANOGを発現していることが確認された。スケールバーは100 μ mを示した。
- (B) 歯胚クローン細胞およびHDFのゲノムDNAを用い、親株とiPS細胞におけるOCT3/4, NANOG遺伝子のプロモーター領域のCpGメチル化を調べた。メチル化されていないCpGを○で、メチル化されているCpGを●で示した。
- (C) 歯胚クローン細胞およびHDFの親株ならびにiPS細胞における、未分化ヒトES/iPS細胞のマーカー遺伝子の発現をRT-PCRで確認した。Pは親株を、cl. はiPS細胞のクローン番号を示した。
- (D) 歯胚クローン細胞およびHDFの親株、iPS細胞でのテロメラーゼ活性をTRAP assayで検出した。熱処理したサンプルをheat+, 未処理のサンプルをheat-で示した。また、internal controlはICと示した。

4. 胚様体を介した *in vitro* での iPS 細胞の多分化能検証

樹立した iPS 細胞の *in vitro* における多分化能を検証するため、胚様体 (embryoid body ; EB) を介した iPS 細胞の自発的な分化誘導を行った。まず、培養皿表面に細胞非接着処理を施された培養皿で、iPS 細胞を 8 日間浮遊培養させて胚様体を作製した (図 5A)。その後 8 日間はゼラチンコートした培養皿で 8 日間培養を行った。接着した細胞は自発的な分化を示し、内胚葉マーカーである SOX17 (図 5B) や α -fetoprotein (図 5C 緑色)、中胚葉マーカーである desmin (図 5C 赤色) や α -smooth muscle actin (図 5D)、外胚葉マーカーである β III-tubulin (図 5E) 陽性の細胞が確認された。さらに、iPS 細胞から直接的に神経細胞を誘導するために、iPS 細胞を PA6 フィーダー細胞上に播種して、神経培養用の培地で 18 日間分化誘導を行った。その結果、 β III-tubulin (図 5F 赤色) と tyrosine hydroxylase (図 5F 緑色) 陽性細胞が確認された。

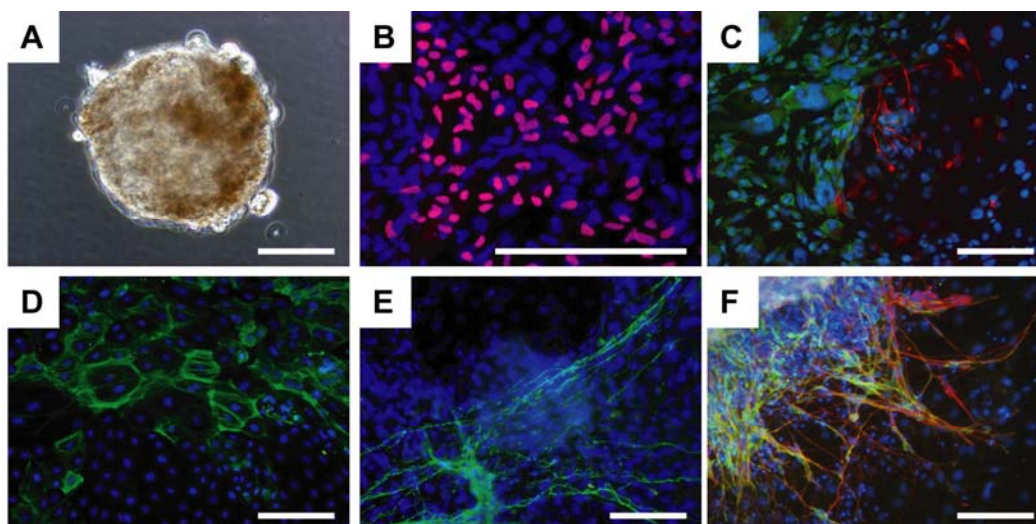


図5. 歯胚クローン細胞およびHDFから樹立したiPS細胞の*in vitro*における多分化能検証

- (A) 非接着性の培養皿で8日間浮遊培養した胚様体の形態を示した。
(B-E) (A)で作製した胚様体を接着させて8日間培養を行うことで自発的に分化させた各細胞を、各種マーカーで免疫染色した。細胞核をHoechst 33342で染色した。スケールバーは100 μ mを示した。(B) SOX17陽性細胞、(C) AFP (緑色) およびDesmin (赤色) 陽性細胞、(D) α -smooth muscle actin陽性細胞、(E) β III-tubulin陽性細胞。
(F) 未分化iPS細胞から直接的に神経細胞誘導を行うため、PA6細胞上に播種して神経分化培地で18日間培養した。Tyrosine hydroxylase (緑色) および β III-tubulin (赤色) 陽性細胞。細胞核をHoechst 33342で染色した。スケールバーは100 μ mを示した。

胚様体を形成し、8 日間接着させて得られた様々な細胞の RNA を回収し、内胚葉、中胚葉、外胚葉のマーカー遺伝子の RT-PCR を行った。胚様体を介した細胞は、内胚葉マーカーである α -fetoprotein (AFP) や *FOXA2*, 中胚葉マーカーである *brachyury* や *TnTc*, 外胚葉マーカーである *MAP2* や *PAX6* を発現していることが確認された (図 6)。これらの結果より、歯胚クローンおよびHDFから樹

立した iPS 細胞が *in vitro* において多分化能を示すことが明らかとなった。

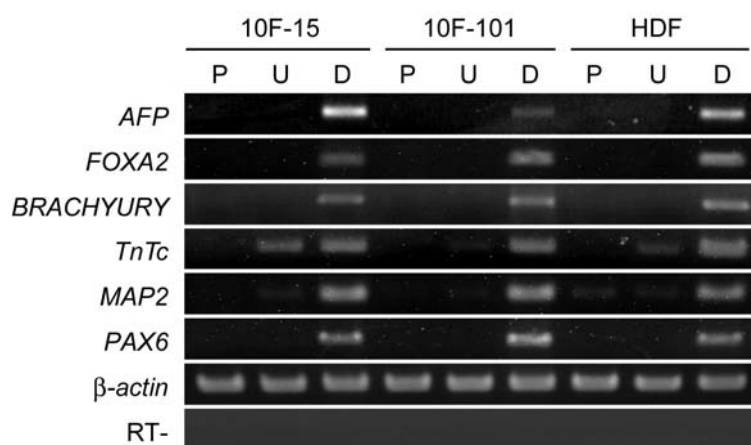


図6. 歯胚クローン細胞およびHDFから樹立したiPS細胞の*in vitro*における多分化能検証

歯胚クローン細胞およびHDFの親株(P), 未分化iPS細胞(U), EBを介した分化細胞(D)のRNAを用いて, 3胚葉の分化マーカー遺伝子の発現を確認した。

5. 奇形腫による *in vivo* での iPS 細胞の多分化能検証

樹立した iPS 細胞の *in vivo* における多分化能を検証するため, 重度免疫不全マウス(severe combined immunodeficient mice)の精巣内に iPS 細胞を注入し, 9 週間飼育して奇形腫を作製した。

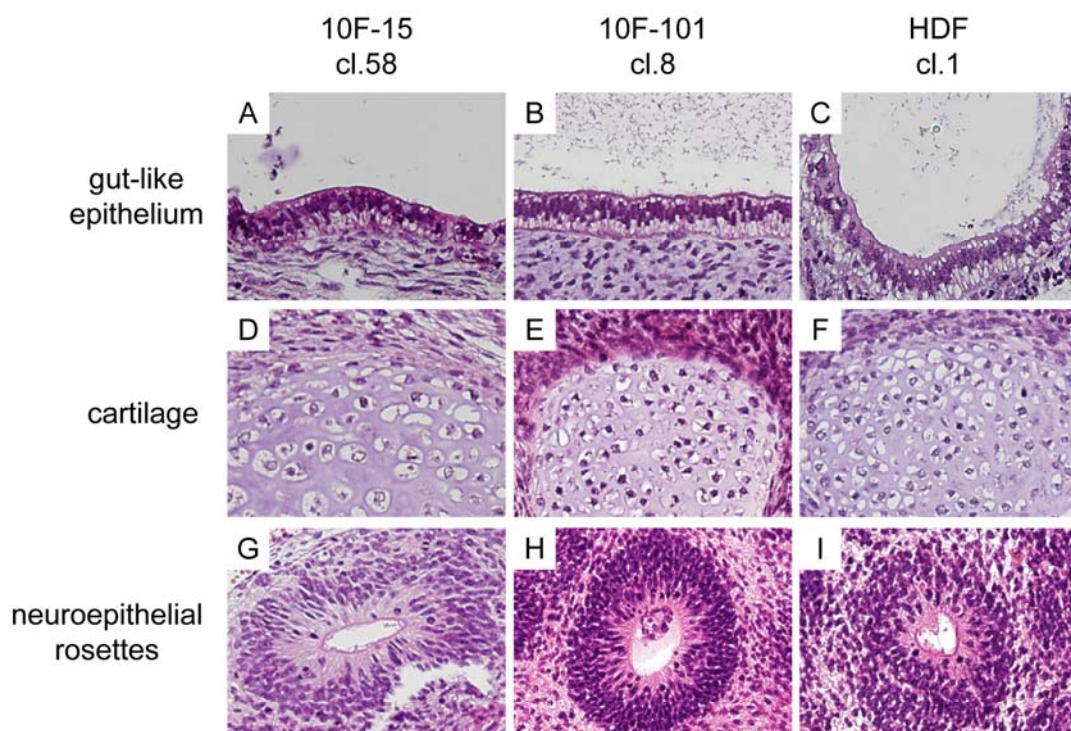


図7. 歯胚クローン細胞およびHDFから樹立したiPS細胞の*in vivo*における多分化能検証 (A-I) 未分化iPS細胞を重度免疫不全マウスの精巣内に移植し, 9週間後に摘出した組織を脱水後にパラフィン包埋した。組織のパラフィン切片を作製してhematoxylin-eosin染色を行った。(A-C) 腸管様組織(内胚葉), (D-F) 軟骨組織(中胚葉), (G-I) 神経管(外胚葉)。

作製した奇形腫の切片を作製して、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った後に組織切片を観察した。奇形腫内には内胚葉である腸管様の組織 (gut-like epithelium), 中胚葉である軟骨組織 (cartilage), および神経管 (neuroepithelial rosettes) の形成が認められた (図 7A-7I)。これらの結果より、歯胚クローンおよび HDF から樹立した iPS 細胞が *in vivo* において多分化能を示すことが明らかとなった。

6. iPS 細胞の核型解析

ES 細胞や iPS 細胞は、長期間にわたって増殖能と分化能を維持する反面、培養過程においてまれに核型異常が生じることが知られている。歯胚クローンおよび HDF から樹立した iPS 細胞が核型異常を示すか確認するために、G-band 法による解析を行った。10F-101 から樹立した 2 株の iPS 細胞 (clone 5 および clone 8) では、いずれも 16 番染色体の同じ箇所に染色体の増加が認められた (図 8 の赤矢印部分)。同一箇所への変異が確認されたため、親株である 10F-101 歯胚クロンの核型も確認したところ、やはり同じ箇所に変異が確認された (データ非公表)。一方、10F-15 歯胚クローンと HDF から樹立した各 2 株の iPS 細胞には核型異常は認められなかった (図 8)。

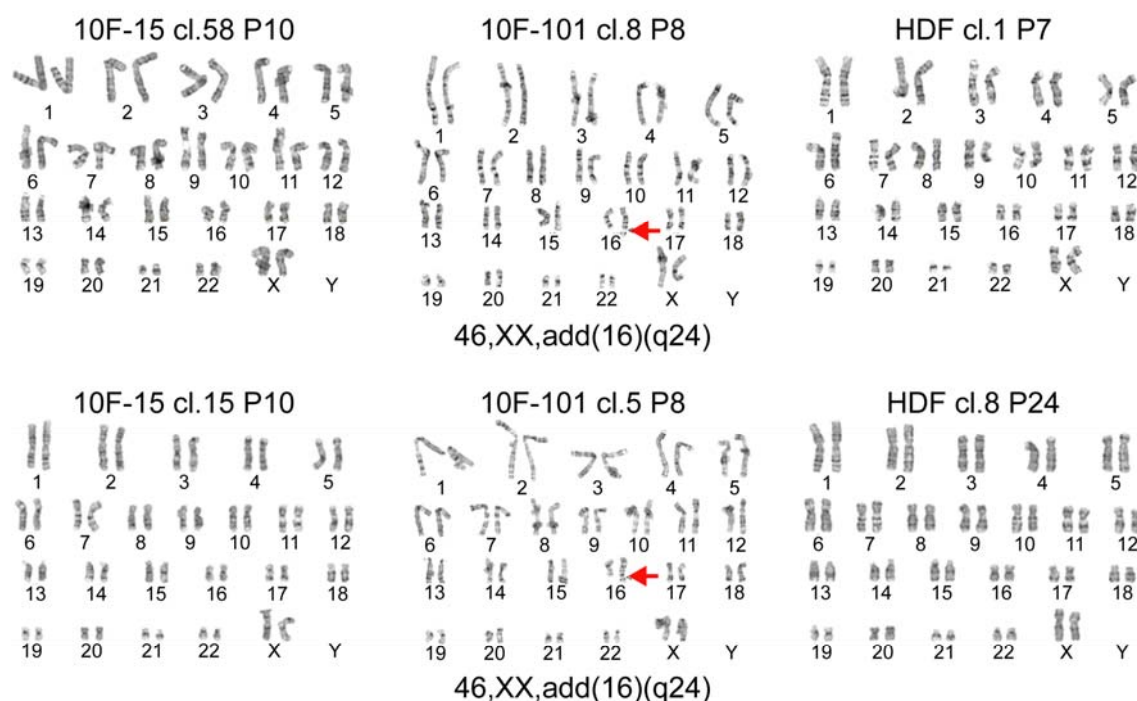


図8. 歯胚クローン細胞およびHDFから樹立したiPS細胞の核型解析

10F-15, 10F-101, HDFから樹立したそれぞれ2株のiPS細胞のゲノムを用いて、G-band法による核型解析を行った。10F-15, HDF由来のiPS細胞は2株とも正常であったが、10F-101から樹立したiPS細胞は16番染色体の一部に増幅 (赤矢印部分) が認められた。

7. 親株 vs iPS 細胞間での網羅的遺伝子発現の比較

これまでに、リプログラミングファクター (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *NANOG*, *LIN28*, *UTF1*) の発現や *TP53* のノックダウンにより iPS 細胞の樹立効率が向上することが報告されている (14, 15, 20)。そこで、親株 (10F-15, 10F-101, HDF) と iPS 細胞間での遺伝子発現を比較するために、マイクロアレイによる解析を行った。樹立した iPS 細胞では親株に比べ、リプログラミングファクターである *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *LIN28* および *UTF1* の mRNA レベルでの発現が著しく高いことが確認された (図 9)。一方、*c-MYC* と *TP53* の発現量は親株と iPS 細胞ではほぼ同程度であった (図 9)。ところが、*KLF4* の発現は 10F-15 の親株において他の 1/10 ほどであり、それ以外の親株および iPS 細胞では発現量に大きな差は見られなかった (図 9)。さらに、リプログラミングファクターとして機能する *KLF5* の発現は、10F-15 の親株において他の 3 倍ほど高く、それ以外の親株および iPS 細胞では発現量に大きな差は見られなかった (図 9)。

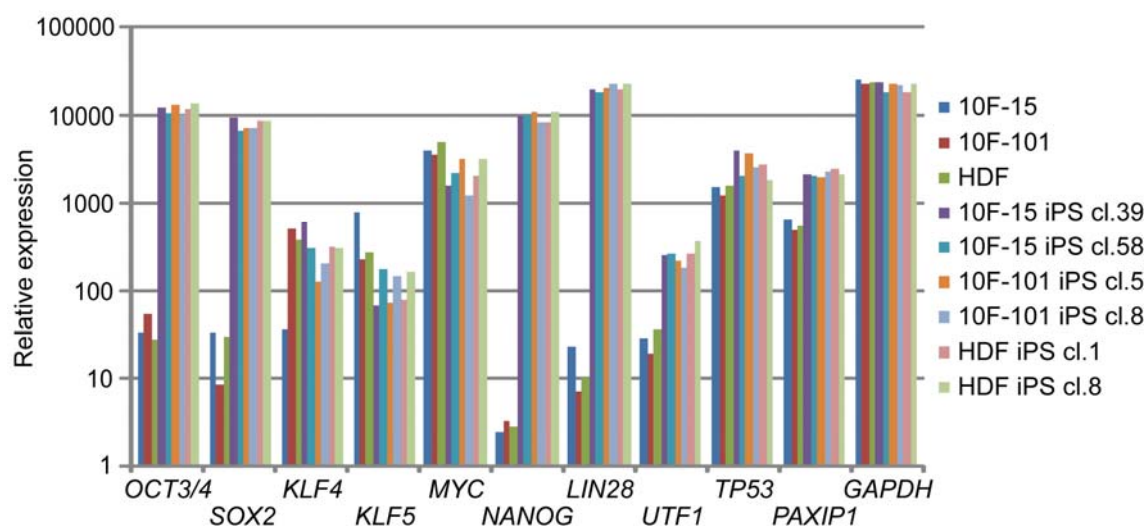


図9. 歯胚クローン細胞およびHDFの親株、iPS細胞での網羅的遺伝子発現解析
歯胚クローン細胞およびHDFの親株ならびにiPS細胞間における、リプログラミングファクターの発現レベルの比較を比較した。マイクロアレイの解析により得られる数値をグラフ化した。

それぞれの親株と iPS 細胞の遺伝子の発現を scatter plot で比較すると、未分化 ES/iPS 細胞のマーカーとして知られる *OCT3/4*, *NANOG*, *LIN28*, *sal-like 4* (*SALL4*), *teratocarcinoma-derived growth factor 1* (*TDGF1*) の発現が iPS 細胞で高かった (図 10A)。それぞれの親株と iPS 細胞、ならびにヒト ES 細胞の全遺伝子発現を heat map 解析で比較した。10F-15 および 10F-101 歯胚クローンと HDF は由来が異なるものの遺伝子発現が似通っており、樹立した iPS 細胞は由来によらずヒト ES 細胞と遺伝子発現が酷似していることが確認された (図

10B)。

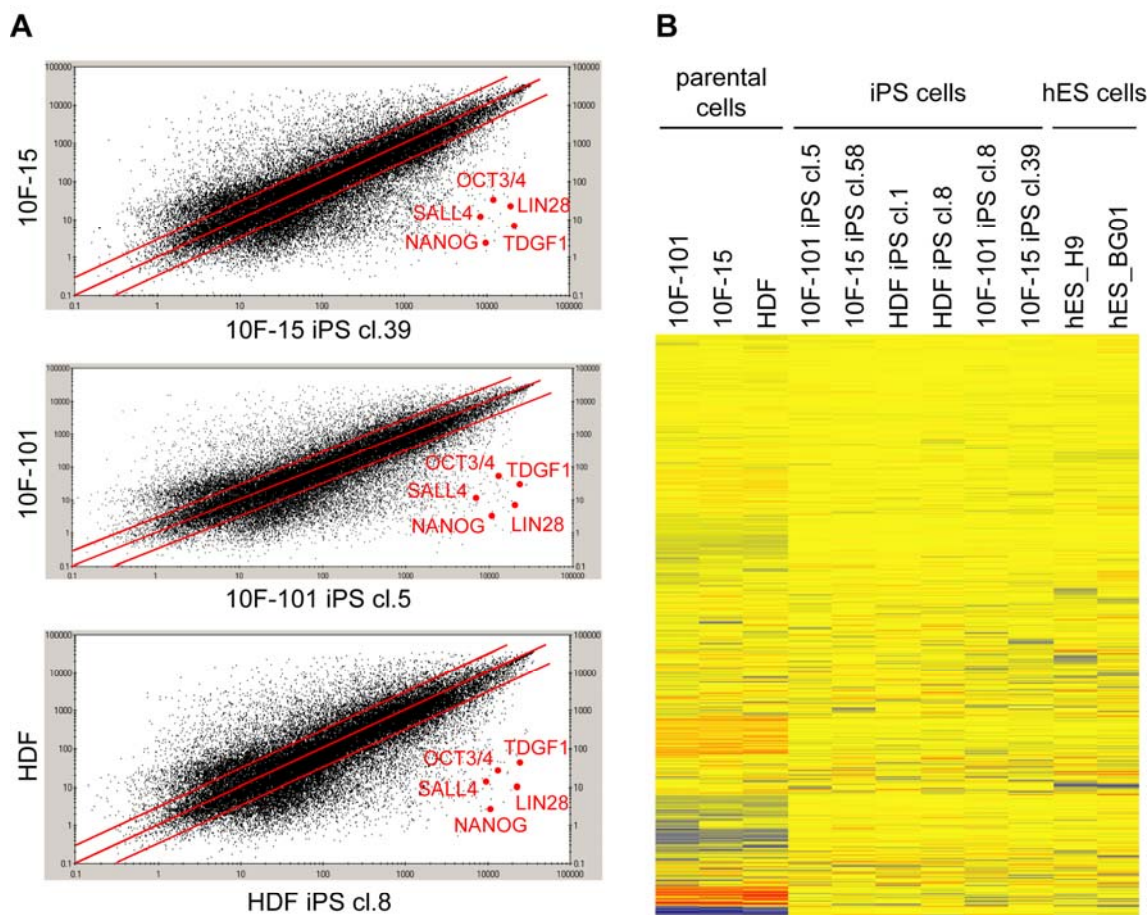


図10. 歯胚クローン細胞およびHDFの親株，iPS細胞での網羅的遺伝子発現解析

- (A) Scatter plotによる，歯胚クローン細胞およびHDFの親株ならびにiPS細胞間での網羅的遺伝子発現を比較した。未分化ヒトES/iPS細胞のマーカー遺伝子の一部を赤色で示した。
- (B) 歯胚クローン細胞およびHDFの親株，iPS細胞，ヒトES細胞間での網羅的遺伝子発現をheat map解析で比較した。ヒトES細胞のデータはデータベース (GEO) より引用した。

8. 高リプログラミング歯胚クローン vs 低リプログラミング歯胚クローンおよびHDFでの網羅的遺伝子発現の比較

歯胚クローンにおいてiPS細胞樹立効率に差が見られたことから，高リプログラミング細胞(10F-15, 10F-5, 10F-8)と低リプログラミング細胞(10F-101, 10F-107, HDF)の2つに大別して，両者間での遺伝子発現の差をマイクロアレイで解析し，リプログラミングに関与する pathway または遺伝子の探索を試みた。マイクロアレイの raw data を直接比較すると，実験ごとに生じる誤差により正しい結果が得られないため，z 変換と呼ばれる統計処理法を用いて raw data の標準化を行った(43)。まず，iPS細胞の樹立効率を向上させるリプログラミングファクターとして報告

されている遺伝子について解析した(14, 15, 20, 32, 44-48)。いずれの親株においても *KLF4*, *KLF2*, *KLF5*, *c-MYC*, *TP53*, *TBX3*, *CHD1* は殆ど発現しているものの、統計学的な有意差は認められなかった(表 2A)。その他のリプログラミングファクターである *OCT3/4*, *SOX family*, *KLF1*, *MYC family*, *NANOG*, *LIN28*, *UTF1*, *ESRRB*, *SALL4*, *NR5A2* に関しては、親株での発現は見られなかった(表 2B)。マイクロアレイの解析では *KLF4* の発現に有意差は認められなかったものの、リアルタイム PCR では高リプログラミング細胞(10F-15, 10F-5, 10F-8)において *KLF4* の発現量が少ない傾向が認められた(図 11)。また、*TP53* の発現は歯胚クローン間では差が見られないものの、HDF ではやや高い傾向が見られた。しかし、iPS 細胞の樹立効率との相関は見られなかった(図 2C, 図 11)。

既知のリプログラミングファクターでは、歯胚クローンにおける iPS 細胞樹立効率のメカニズムを説明できなかったため、新規のリプログラミングファクターが存在する可能性について検討した。上述と同様に、マイクロアレイの row data を z 変換したものをを用い、高リプログラミング細胞(10F-15, 10F-5, 10F-8)と低リプログラミング細胞(10F-101, 10F-107, HDF)間で統計学的に有意差が認められた遺伝子についてリストを作成した(表 3)。高リプログラミング細胞で最も有意差が高い *PAXIP1* 遺伝子は、ヒストン H3 の 4 番目のリジン(K4)に特異的な、H3K4 methyltransferase として知られている。H3K4 のメチル化は転写促進に作用することから、*PAXIP1* 遺伝子の発現量が iPS 細胞へのリプログラミングに寄与しているのではないかと推測された。

表2. 高/低リプログラミング細胞の親株におけるリプログラミング関連遺伝子の発現プロファイル

(A) Reprogramming factors (high expression)

Gene Symbol	Entrez Gene ID	high reprogramming efficiency			low reprogramming efficiency		
		10F-15	10F-5	10F-8	10F-101	10F-107	HDF
KLF4	9314	0.0147	0.8949	0.8336	1.3495	1.2233	1.1946
KLF2	10365	0.7445	0.7847	0.8437	0.9879	0.7950	0.7977
KLF5	688	0.6309	0.1666	-0.1746	0.2346	-0.0313	0.2354
MYC	4609	1.3461	1.1272	1.2736	1.2829	1.1100	1.4302
TP53	7157	0.9159	0.8767	0.8707	0.8312	0.7919	0.9312
TBX3	6926	0.8928	0.5922	0.5553	0.5152	0.3628	0.3587
CHD1	1105	0.8119	0.8251	0.7489	0.7906	0.6735	0.7012

The raw data from microarray was transformed using Z score

(B) Reprogramming factors (low or none expression)

Gene Symbol	Entrez Gene ID	high reprogramming efficiency			low reprogramming efficiency		
		10F-15	10F-5	10F-8	10F-101	10F-107	HDF
OCT3/4	5460	-0.8060	-0.5595	-0.4712	-0.5256	-0.8647	-0.8896
SOX2	6657	-0.6677	-0.6728	-0.6596	-0.7692	-0.6297	-0.8542
SOX1	6656	-0.7232	-0.9383	-0.7290	-0.8932	-0.5641	-1.2238
SOX3	6658	-0.5919	-1.0355	-0.7646	-1.4954	-1.0049	-1.0781
SOX15	6665	0.0829	-0.0334	-0.1173	-0.0025	-0.0636	-0.0608
SOX18	54345	-1.9652	-1.0187	-1.4050	-1.8754	-1.3481	-1.5931
KLF1	10661	-0.9286	-1.2140	-0.7523	-1.8351	-0.5587	-0.9298
MYCN	4613	-1.4334	-1.3217	-1.5696	-1.2165	-1.2319	-1.3063
MYCL1	4610	-0.6735	-0.6613	-0.6443	-0.3479	-0.5217	-0.6577
NANOG	79923	-1.9994	-1.9866	-1.1147	-1.7215	-1.7134	-1.9101
LIN28	79727	-0.9852	-1.2175	-1.1071	-1.3944	-1.7181	-1.3299
UTF1	8433	-0.8885	-0.7159	-1.4258	-0.9694	-0.6086	-0.7677
ESRRB	2103	-0.7405	-0.9970	-1.0530	-0.8235	-0.7467	-0.6018
SALL4	57167	-1.0624	-0.7215	-1.2258	-1.1854	-1.4339	-1.1739
NR5A2	2494	-0.8120	-0.8317	-0.9937	-0.7544	-0.7284	-0.4789

The raw data from microarray was transformed using Z score

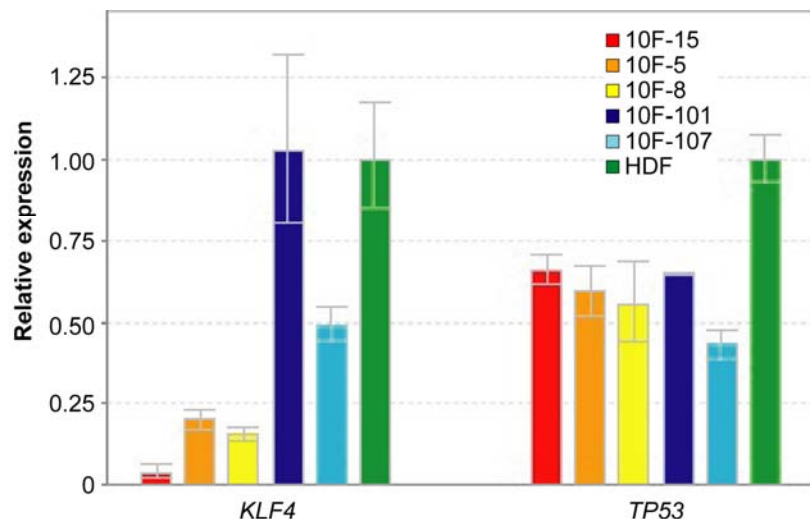


図11. 歯胚クローン細胞およびHDFの親株における、KLF4とTP53遺伝子の定量PCRによる発現量比較
各歯胚クローンとHDF間でのKLF4ならびにTP53遺伝子の発現量を定量PCRで比較した。HDFでの発現量を1とした。標準誤差をerror barで示した。

表3. 高および低リプログラミング効率の細胞間で統計的有意差があった遺伝子群のリスト

Up-regulated genes in high reprogramming cells

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Description	z-value
PAXIP1	22976	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	5.669606
CCDC66	285331	coiled-coil domain containing 66	5.477616
CNDP2	55748	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	5.407082
PTMA	5757	prothymosin, alpha	4.932709
PLS1	5357	plastin 1	4.633279
AP1S2	8905	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	4.551948
B3GNT5	84002	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5	4.395989
FAM76B	143684	family with sequence similarity 76, member B	4.313848
FAM60A	58516	family with sequence similarity 60, member A	4.242073
RNPS1	10921	RNA binding protein S1, serine-rich domain	4.220004
PIF1	80119	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)	4.0737
SNRPE	6635	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E	4.03011
MCM3APAS	114044	MCM3AP antisense RNA (non-protein coding)	3.785206

Down-regulated genes in high reprogramming cells

Gene Symbol	Entrez Gene ID	Description	z-value
LPPR2	64748	lipid phosphate phosphatase-related protein type 2	-3.749353
STUB1	10273	STIP1 homology and U-box containing protein 1	-3.751098
ZNF2	7549	zinc finger protein 2	-3.757753
HISPPD2A	29023	histidine acid phosphatase domain containing 2A	-3.792065
CHCHD7	79145	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7	-3.931943
RABGAP1L	9910	RAB GTPase activating protein 1-like	-3.936
TPRG1L	127262	tumor protein p63 regulated 1-like	-3.947231
H2BFS	54145	H2B histone family, member S	-3.950943
NFE2L1	4779	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	-4.115595
TMEM179B	374395	transmembrane protein 179B	-4.116468
RRAS	6237	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	-4.14366
TSPAN10	83882	tetraspanin 10	-4.160053
FOXC1	2296	forkhead box C1	-4.192583
MMAA	166785	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblA type	-4.331715
KIF3B	9371	kinesin family member 3B	-4.376272
HIST1H2BI	8346	histone cluster 1, H2bi	-4.413127
HIST1H2BC	8347	histone cluster 1, H2bc	-4.413127
HIST1H2BF	8343	histone cluster 1, H2bf	-4.413127
HIST1H2BE	8344	histone cluster 1, H2be	-4.413127
HIST1H2BG	8339	histone cluster 1, H2bg	-4.413127
ATOX1	475	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)	-4.511699
ZNF622	90441	zinc finger protein 622	-4.65044
RBPJ	3516	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J regi	-4.984668
GOSR2	9570	golgi SNAP receptor complex member 2	-5.231265
ANXA7	310	annexin A7	-5.401765
MFSD11	79157	major facilitator superfamily domain containing 11	-5.661247
IGF2R	3482	insulin-like growth factor 2 receptor	-5.786654
RBMX2	51634	RNA binding motif protein, X-linked 2	-6.88987
TMEM127	55654	transmembrane protein 127	-8.179562
HIST2H2AA4	723790	histone cluster 2, H2aa4	-10.28228
HIST2H2AA3	8337	histone cluster 2, H2aa3	-10.28228
S100A13	6284	S100 calcium binding protein A13	-15.49457

考察

本研究では、患者に負担が少なく採取が容易な組織から、効率よくヒト iPS 細胞を樹立することを目的に研究を行った。そこで、従来は歯科矯正手術の過程において医療廃棄物として処分されていた、親知らず由来の歯胚細胞に着目した。3 人の提供者 (10F, 16F, 13M) の親知らず由来の歯胚細胞から iPS 細胞を樹立したところ、10F > 16F > 13M の順に樹立効率が高いことが明らかとなった (図 1)。親知らずが口腔内に萌出する時期には個人差があるが、18 歳～25 歳頃と言われている。しかし、それより以前から歯の発生は始まっており、7～9 歳頃に初期の石灰化が、12～16 歳頃にかけて歯の発生が進むと言われている。10F からの iPS 細胞樹立効率が最も高い要因として、13M, 16F の提供者の歯胚より、より未熟であった可能性も考えられるが、上述の通り個人差が大きいので、厳密な解析は困難である。また、歯胚にも様々な細胞が含まれるため、雑多な細胞集団のままではリプログラミングのメカニズムの解明は困難である。

より詳細な解析を行うため、iPS 細胞樹立効率が最も高かった 10F 由来の歯胚細胞をクローン化して、5 株の歯胚クローン細胞 (10F-5, 10F-8, 10F-15, 10F-101, 10F-107) を作製した。これら 5 株から iPS 細胞樹立を試みたところ、10F-107 以外の全ての歯胚クローンから iPS 細胞の樹立に成功した (図 2)。また、細胞の増殖能と iPS 細胞の樹立効率には相関が認められた (図 2B, 2C, 図 3B)。一方、DsRed を導入して遺伝子の導入効率を比較したが、歯胚クローン間で大きな差は見られなかった (図 3A)。これらの歯胚クローン細胞を、dexamethasone を含む骨分化誘導培地で培養すると、高リプログラミング細胞である 10F-5, 10F-8, 10F-15 では骨分化が起こるのに対し、10F-101 および 10F-107 では殆ど骨分化が起こらないことが確認された (データ非公開)。高リプログラミング細胞 (10F-5, 10F-8, 10F-15) と HDF 間で iPS 細胞樹立効率 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* の 3 遺伝子の場合) を比較すると、100 倍以上の樹立効率の差が見られた。また、10F-15 とクローン化前の 10F 由来歯胚細胞での樹立効率を比較すると、クローン化により効率が 7 倍向上していることが明らかとなった (図 1B, 図 2C)。これらの結果より、10F 歯胚由来細胞において iPS 細胞樹立効率が高い要因は、10F-15, 10F-5, 10F-8 歯胚クローンのような幹細胞様の細胞が含まれていることによると推察された。今後は 13M や 16F に関してもクローン化を行い、これらの可能性を検証したいと考えている。

これまでに、マウスの神経幹細胞からの iPS 細胞を樹立すると効率が高いことが報告されており、内在性の *Sox2* 遺伝子が高発現していることに起因すると考えられている (49)。さらに、Sox family (*Sox1*, *Sox2*, *Sox3*, *Sox15*, *Sox18*) や KLF family (*KLF1*, *KLF2*, *KLF4*, *KLF5*), Myc family (*c-Myc*, *l-Myc*, *n-Myc*) も

マウス線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立を促進すると報告されている(32)。また、*UTF1* の導入や *TP53* のノックダウンがヒト iPS 細胞の樹立を促進するとの報告もある(20)。そこで、高リプログラミング細胞である 10F-15、低リプログラミング細胞である 10F-101 および HDF でのこれらの遺伝子の発現に注目した。マイクロアレイのデータでは *OCT3/4*, *SOX2*, *c-MYC*, *NANOG*, *LIN28*, *UTF1*, *TP53* の発現には親株間で差が見られなかった(図 9)。しかし、10F-15 は 10F-101 や HDF に比べると、*KLF4* の発現が 1/10 ほどしかなく、*KLF5* の発現は 3 倍ほど高い結果が得られた(図 9)。その他の *SOX*, *KLF*, *MYC* family 遺伝子の発現には差は見られなかった。これまでの報告では、*KLF4* はリプログラミングファクターとして最も重要な遺伝子の 1 つであるが、今回の我々の結果はこれと全く逆のデータであった。*KLF4* はもともと小腸で発現する遺伝子として報告され、*growth-arrest* を起こした細胞や終末分化した細胞で高発現する遺伝子としても知られている(50,51)。前述の通り、歯胚クローンのうち 10F-5, 10F-8, 10F-15 は 10F-101 および 10F-107 と異なり、骨分化能や高い増殖能に加え、iPS 細胞樹立効率が高いことが明らかになっている。このことから、少なくとも歯胚細胞においては、*KLF4* の発現量が低い細胞ほど iPS 細胞樹立に適している可能性を示唆している。他の可能性として、*KLF4* 以外の因子がより強力にリプログラミングを促進している可能性も考えられる。

既知のリプログラミングファクターでは、10F-5, 10F-8, 10F-15 のリプログラミング効率を説明できないため、未知の因子の存在も予想された。そこで、高リプログラミング細胞(10F-15, 10F-5, 10F-8)と低リプログラミング細胞(10F-101, 10F-107, HDF)の 2 つに大別して、両者間での遺伝子発現の差をマイクロアレイで解析し、リプログラミングに関与する未知の pathway または遺伝子の探索を試みた。これらの細胞間で、遺伝子発現に統計的な有意差が見られた遺伝子のリストを表 3 に示した。このリストの中で、我々は特に *PAXIP1*(*PTIP1* と呼ばれる)遺伝子に注目した。*Ptip1*^{-/-} マウス ES 細胞では *Oct3/4* の発現が低下し、栄養外胚葉のマーカー遺伝子である *Hand1* の発現が上昇することが知られている(52)。*PAXIP1* は histone H3 lysine four (H3K4) の methyltransferase 複合体の 1 つとして機能することが知られている(53, 54)。ヒストンのアセチル化や H3K4 のメチル化は転写促進に働くことが広く知られている。Histone deacetylase inhibitor の 1 つである, valproic acid はマウスおよびヒト線維芽細胞から iPS 細胞へのリプログラミングを促進することが報告されている(19, 55)。ごく最近、マウスの体細胞の核をカエルの脱核した卵に移植すると、H3K4 のメチル化が引き起こされ、その結果として多能性遺伝子として知られる *Oct3/4*, *Sox2*, *Sall4* の発現が誘導されることが報告された(56)。これらの知見は、*PAXIP1* 遺伝子の発現が高い歯胚クローン(10F-15, 10F-5, 10F-8)でのリプログラミングの促進に寄与している可能性が考

えられる。今後は、*PAXIP1* 遺伝子とリプログラミングの関連について、さらに詳細に解析を行う予定である。

本研究では、ヒトの親知らず由来の歯胚間葉系細胞ならびに歯胚クローンに *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* の 3 遺伝子を導入することにより、非常に高効率で iPS 細胞を樹立できることを証明した。過去の報告と異なり、*c-MYC* や *LIN28* を用いなくても効率よく iPS 細胞を樹立できることから、これらの **transgene** の再活性化によるガン化の懸念を低減することが可能になるのではないかと期待される。これまでは、歯胚は医療廃棄物として処分される組織であったが、歯胚由来の間葉系細胞を増殖して凍結ストックを細胞バンク化することで、iPS 細胞樹立のための有用な **cell source** として用いることも可能になると期待される。また、歯胚クローンでは 3 遺伝子でも容易にヒト iPS 細胞を樹立できることから、プラスミド(57)やタンパク質(58, 59), microRNA(60)や化合物などを用いた、**genome integration free** な iPS 細胞の樹立にも適しているかも知れない。歯胚クローンにおける iPS 細胞へのリプログラミングのメカニズムを明らかにすることができれば、歯胚のみならず、皮膚や血液など、より患者の負担が少ない組織からの iPS 細胞樹立を容易にすることが可能になると期待される。今後は、歯胚クローンやその他の細胞種における *PAXIP1* 遺伝子と iPS 細胞へのリプログラミングの関与について詳細な解析を行いたい。

謝辞

本研究の審査員を務めて頂きました, 中島 欽一 教授, 川市 正史 教授, 河野 憲二 教授, 別所 康全 教授に深く御礼申し上げます。また, 大学院在籍時の所属研究室である京都大学 iPS 細胞研究所の山中 伸弥 教授, 高橋 和利 講師, 中川 誠人 講師, 沖田 圭介 講師, 山中研究室の皆様, 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 分子神経分化制御学講座の研究室の皆様に深謝致します。

本研究を行うにあたり, ご指導・ご鞭撻を賜りました産業技術総合研究所 健康工学研究部門 組織・再生工学研究グループの大串 始 招聘研究員, 弓場 俊輔 研究グループ長に御礼申し上げます。また, 本研究の共著者である同グループの大西 弘恵 博士, 吉村 康秀 博士, 田所 美香 研究員, 勝部 好裕 研究員, 笹尾 真理 研究員, 久保 陽子 研究員, 組織・再生工学研究グループの皆様に感謝申し上げます。本研究で行ったマイクロアレイの統計解析をご担当頂いた, 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 生体ネットワークチームの堀本 勝久 研究グループ長, 齊藤 秀 研究員に感謝申し上げます。

本研究で iPS 細胞樹立に用いた pMXs レトロウイルスベクターを分与して下さいました, 東京大学医科学研究所の北村 俊雄 教授に御礼申し上げます。

最後に, 本研究に関してお世話になった大勢の皆様, そして, 私の研究を陰からずっと支え続けてくれた母と兄, 妻と息子に心から感謝致します。

参考文献

- 1) Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) *Nature*, **292**(5819), 154-156
- 2) Martin, G. R. (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **78**(12), 7634-7638
- 3) Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998) *Science* **282**(5395), 1145-1147
- 4) Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell K.H. (1997) *Nature* **385**(6619), 810-813
- 5) Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001) *Curr. Biol.* **11**(19), 1553-1558
- 6) Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., Eggan, K. (2005) *Science* **309**(5739), 1369-1373
- 7) Ohgushi, H., and Caplan, A.I. (1999) *J. Biomed Mater Res.* **48**(6), 913-927
- 8) Ohgushi, H., Kotobuki, N., Funaoka, H., Machida, H., Hirose, M., Tanaka, Y., and Takakura, Y. (2005) *Biomaterials* **26**(22), 4654-4661
- 9) Morishita, T., Honoki, K., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Matsushima, A., and Takakura, Y. (2006) *Artif Organs* **30**(2), 115-118

- 10) Kawate, K., Yajima, H., Ohgushi, H., Kotobuki, N., Sugimoto, K., Ohmura, T., Kobata, Y., Shigematsu, K., Kawamura, K., Tamai, K., and Takakura, Y. (2006) *Artif Organs* **30**(12), 960-962
- 11) Kotobuki, N., Hirose, M., Machida, H., Katou, Y., Muraki, K., Takakura, Y., and Ohgushi, H. (2005) *Tissue Eng.* **11**(5-6), 663-673
- 12) Go, M. J., Takenaka, C., and Ohgushi, H. (2008) *Exp Cell Res.* **314**(5), 1147-1154
- 13) Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) *Cell* **126**(4), 663-676
- 14) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) *Cell* **131**(5), 861-872
- 15) 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.I., and Thomson, J.A. (2007) *Science* **318**(5858), 1917-1920
- 16) 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. (2008) *Nature* **451**(7175), 141-146
- 17) Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**(8), 2883-2888
- 18) Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M.,

- Boué, S., and Belmonte, J.C. (2008) *Nat Biotechnol.* **26**(11), 1276-1284
- 19) Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008) *Nat Biotechnol.* **26**(11), 1269-1275
- 20) Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., Liu, Y., Yong, J., Zhang, P., Cai, J., Liu, M., Li, H., Li, Y., Qu, X., Cui, K., Zhang, W., Xiang, T., Wu, Y., Zhao, Y., Liu, C., Yu, C., Yuan, K., Lou, J., Ding, M., and Deng, H. (2008) *Cell Stem Cell* **3**(5), 475-479
- 21) Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007) *Nature* **448**(7151), 313-317
- 22) Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007) *Nature* **448**(7151), 318-324
- 23) Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., and Hochedlinger, K. (2007) *Cell Stem Cell* **1**(1), 55-70
- 24) Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008) *Science* **321**(5889), 699-702
- 25) Yamanaka, S. (2007) *Cell Stem Cell* **1**(1), 39-49
- 26) 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. (2008) *Science*

321(5893), 1218-1221

- 27) Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008) *Cell* **134**(5), 877-886
- 28) Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F. Jr, Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009) *Nature* **457**(7227), 277-280
- 29) Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., de Saint, Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2003) *Science* **302**(5644), 415-419
- 30) Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B.H., Wintergerst, U., Velez, M.C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulffraat, N., Blanche, S., Bushman, F.D., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2008) *J Clin Invest.* **118**(9), 3132-3142
- 31) Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2007) *J Clin Invest.* **117**(6), 1456-1465

- 32) Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008) *Nat Biotechnol.* **26**(1), 101-106
- 33) Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., Tadokoro, M., Katsube, Y., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Go, M.J., Adachi, H., Yokota, Y., Kirita, T., and Ohgushi, H. (2008) *Differentiation* **76**(5), 495-505
- 34) Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(25), 13625-13630
- 35) Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Shi, S. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**(10), 5807-5812
- 36) Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R.S., Shi, S., and Huang, G.T. (2010) *Stem Cells Dev.* **19**(4), 469-480
- 37) Viswanathan, S.R., Powers, J.T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T.L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L.A., Lockhart, V.L., Shah, S.P., Tanwar, P.S., Mermel, C.H., Beroukhi, R., Azam, M., Teixeira, J., Meyerson, M., Hughes, T.P., Llovet, J.M., Radich, J., Mullighan, C.G., Golub, T.R., Sorensen, P.H., and Daley, G.Q. (2009) *Nat Genet.* **41**(7):843-848
- 38) Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003) *Exp Hematol.* **31**(11), 1007-1014
- 39) Morita, S., Kojima, T., and Kitamura T. (2000) *Gene Ther.* **7**(12), 1063-1066

- 40) Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I., and Sasai, Y. (2000) *Neuron* **28**(1), 31-40
- 41) Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) *J. Royal Stat. Soc. B* **57**, 289–300
- 42) Ikeda, E., Hirose, M., Kotobuki, N., Shimaoka, H., Tadokoro, M., Maeda, M., Hayashi, Y., Kiritani, T., and Ohgushi, H. (2006) *Biochem Biophys Res Commun.* **342**(4), 1257-1262
- 43) Cheadle, C., Vawter, M.P., Freed, W.J., Becker, K.G. (2003) *J Mol Diagn.* **5**(2), 73-81
- 44) Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Heng, J.C., Chan, Y.S., Yaw, L.P., Zhang, W., Loh, Y.H., Han, J., Vega, V.B., Cacheux-Rataboul, V., Lim, B., Lufkin, T., and Ng, H.H. (2009) *Nat Cell Biol.* **11**(2), 197-203
- 45) Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2009) *Genes Cells* **14**(6), 683-694
- 46) Heng, J.C., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Orlov, Y.L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T., Lim, B., and Ng, H.H. (2010) *Cell Stem Cell* **6**(2), 167-174
- 47) Han, J., Yuan, P., Yang, H., Zhang, J., Soh, B.S., Li, P., Lim, S.L., Cao, S., Tay, J., Orlov, Y.L., Lufkin, T., Ng, H.H., Tam, W.L., and Lim, B. (2010) *Nature* **463**(7284), 1096-1100
- 48) Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Polesso, F., Sridharan, R., Mason,

- M.J., Heidersbach, A., Ramalho-Santos, J., McManus, M.T., Plath, K., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2009) *Nature* **460**(7257), 863-868
- 49) Shi, Y., Do, J.T., Desponts, C., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008) *Cell Stem Cell* **2**(6), 525-528
- 50) Shields, J.M., Christy, R.J., and Yang, V.W. (1996) *J Biol Chem* **271**(33), 20009-20017
- 51) Conkright, M.D., Wani, M.A., Anderson, K.P., and Lingrel, J.B. (1999) *Nucleic Acids Res* **27**(5), 1263-1270.
- 52) Kim, D., Patel, S.R., Xiao, H., and Dressler, G.R. (2009) *Stem Cells* **27**(7), 1516-1523
- 53) Cho, Y.W., Hong, T., Hong, S., Guo, H., Yu, H., Kim, D., Guszczynski, T., Dressler, G.R., Copeland, T.D., Kalkum, M., and Ge, K. (2007) *J Biol Chem.* **282**(28), 20395-20406
- 54) Patel, S.R., Kim, D., Levitan, I., and Dressler, G.R. (2007) *Dev Cell* **13**(4), 580-592
- 55) Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008) *Nat Biotechnol.* **26**(7), 795-797
- 56) Murata, K., Kouzarides, T., Bannister, A.J., and Gurdon, J.B. (2010) *Epigenetics Chromatin* **3**(1), 4
- 57) Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008) *Science* **322**(5903), 949-953
- 58) Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S.,

- Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H.R., Duan, L., and Ding, S. (2009) *Cell Stem Cell* **4**(5), 381-384
- 59) Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., and Kim, K.S. (2009) *Cell Stem Cell* **4**(6), 472-476
- 60) Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., and Blelloch, R. (2009) *Nat Biotechnol.* **27**(5), 459-461

論文目録

推薦教員	分子神経分化制御学講座 中島 欽一 教授		
氏 名	小田 泰昭	提 出	平成 22 年 10 月 27 日
<p>学位論文の主たる部分を公表した論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)</p> <p>題 名 : Induction of Pluripotent Stem Cells from Human Third Molar Mesenchymal Stromal Cells.</p> <p>全著者名 : <u>Oda Y</u>, Yoshimura Y, Ohnishi H, Tadokoro M, Katsube Y, Sasao M, Kubo Y, Hattori K, Saito S, Horimoto K, Yuba S, Ohgushi H.</p> <p>公表時期 : 2010 年 9 月 27 日</p> <p>雑誌名 : The Journal of biological chemistry</p> <p>巻 : 285</p> <p>頁 : 29270–29278</p>			
<p>参考論文 (題名、全著者名、公表時期、雑誌名、巻、ページ)</p> <p>題名 : Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC.</p> <p>全著者名 : Aoki T, Ohnishi H, <u>Oda Y</u>, Tadokoro M, Sasao M, Kato H, Hattori K, Ohgushi H.</p> <p>公表時期 : 2010 年 7 月</p> <p>雑誌名 : Tissue engineering. Part A</p> <p>巻 : 16</p> <p>頁 : 2197-2206</p>			
<p>題 名 : Evolutionarily conserved non-AUG translation initiation in NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2).</p> <p>全著者名 : Takahashi K, Maruyama M, Tokuzawa Y, Murakami M, <u>Oda Y</u>, Yoshikane N, Makabe KW, Ichisaka T, Yamanaka S.</p> <p>公表時期 : 2005 年 3 月</p> <p>雑誌名 : Genomics</p> <p>巻 : 85</p> <p>頁 : 360-371</p>			