

学位論文  
Doctoral Thesis

新型センダイウイルスベクターを用いたチンパンジー血液由来の  
人工多能性幹細胞の作製  
(Production of induced pluripotent stem cells derived from chimpanzee blood  
using a new Sendai virus vector)

藤江 康光  
Yasumitsu Fujie

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻幹細胞誘導学

指導教員

江良 択実 教授  
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻幹細胞誘導学

2015年3月

# 学 位 論 文

## Doctoral Thesis

論文題名 : 新型センダイウイルスベクターを用いたチンパンジー血液由来の人工多能性幹細胞の作製  
(Production of induced pluripotent stem cells derived from chimpanzee blood  
using a new Sendai virus vector)

著 者 名 : 藤 江 康 光  
Yasumitsu Fujie

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻幹細胞誘導学 江 良 沢 実 教授

審査委員名 :	細胞医学担当教授	中尾 光善
	腎臓発生学担当教授	西中村 隆一
	免疫識別学担当教授	西村 泰治

2015年3月

## 目次

1. 要旨 .....	1
2. 学位論文の骨格となる参考論文 .....	2
3. 謝辞 .....	3
4. 略語一覧 .....	4
5. 研究の背景と目的 .....	6
5.1 はじめに .....	6
5.2 iPS 細胞の作製における問題点 .....	6
5.3 センダイウイルス(SeV) .....	7
5.4 実験用チンパンジーについて .....	8
6. 実験方法 .....	9
6.1 実験用ヒトサンプルの取り扱いについて .....	9
6.2 実験用チンパンジー血液サンプルの取り扱いについて .....	9
6.3 チンパンジーの育成状態 .....	9
6.4 新型温度感受性 SeV ベクター(TS12KOS) .....	10
6.5 iPS 細胞の作製と維持培養 .....	12
6.6 DNA、RNA 抽出と RT-PCR .....	13
6.7 染色体の核型解析 .....	15
6.8 免疫染色とアルカリホスファターゼ染色 .....	15
6.9 サザンブロット法 .....	16
6.10 三胚葉細胞への分化 (in vitro) .....	16
6.11 テラトーマ形成 (in vivo) .....	17
6.12 マイクロアレイ解析 .....	17
7. 実験結果 .....	18
7.1 新型 SeV ベクターの開発とその iPS 細胞作製効率 .....	18
7.2 新型 SeV ベクターを用いて作製したヒト iPS 細胞の細胞生物学的特徴 .....	23
7.3 チンパンジーiPS 細胞の樹立 .....	26

8. 考察 .....	35
9. 結語 .....	38
10. 参考文献 .....	39

## 1. 要旨

〔目的〕 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) は、再生医療分野における様々なヒト臨床応用が期待される生体素材の 1 つである。しかし、iPS 細胞作製時に初期化 4 因子 (KLF4 (K), OCT3/4 (O), SOX2 (S) と c-MYC) が宿主細胞に導入されるため、腫瘍化が起こってしまう問題点がある。この問題を解決するため、宿主細胞のゲノムに挿入されずしかも自己増幅能を欠失させたセンダイウイルス (SeV) が用いられてきた。

本研究では、新たに 3 初期化因子 KOS を 1 つにまとめ、さらに温度感受性を強化した新型 SeV ベクターがディナベック株式会社の開発実験にて作製された。この新型 SeV ベクターを用いてヒト皮膚由来線維芽細胞やヒト末梢血、さらにヒトとチンパンジー特有の病体解明のためのリソースとしてチンパンジー血球細胞より iPS 細胞を作製し、従来型と比較検証した。

〔方法〕 まず新型と従来型の SeV ベクターを用いてヒト線維芽細胞と血液細胞より iPS 細胞の作製を行った (共同研究者の実験データを使用)。次に採取したチンパンジー血液をファクターで刺激した後、T リンパ球へと誘導した血球細胞に対して新型 SeV ベクター感染による初期化因子の導入を行った。感染後約 1 週間で最初のコロニー形成が見られ、iPS 細胞用培地に交換した後さらに 20 日ほど増殖培養を継続した。コロニーの直径が約 1 mm 程度の大きさに成長したものからピックアップし、温度シフト (37°C から 38°C) で SeV ベクターの除去後、in vitro (各胚葉マーカーによる免疫染色)、in vivo (テラトーマの Hematoxylin-Eosin 染色) での分化実験を行い、チンパンジー血液由来 iPS 細胞の樹立を行った。

〔結果〕 最初に初期化遺伝子の免疫染色と RT-PCR を行い、iPS 細胞であることを証明した。また、宿主細胞からの SeV 除去を nested PCR で確認できた。核型解析よりチンパンジー細胞由来であることを証明し、T Cell Receptor (TCR) プローブを用いたサザンブロット法を用いて、TCR の再構築が見られたため、血液由来の iPS 細胞であることが証明された。iPS 細胞への誘導効率は、Alkaline Phosphatase 陽性コロニー形成数/播種細胞数で従来型と比較した場合、4 倍近く上昇していた。作製した iPS 細胞の NOD/SCID マウス精巣への移植実験では、テラトーマが形成され、腫瘍内部に三胚葉由来の組織へ分化した細胞が存在した。最後に、DNA マイクロアレイ解析より、作製したチンパンジー iPS 細胞の全般的な遺伝子発現パターンが Embryonic Stem (ES) 細胞株と iPS 細胞株のそれらと類似することが示された。最終的に新型 SeV ベクターを用いてチンパンジーの血液より、iPS 細胞株を 4 クローン樹立した (C101, C201, C205, C402)。以上の結果は、新型ベクターを用いて、チンパンジー血液由来の iPS 細胞を安全かつ効率よく樹立できることを示した。

〔考察〕 今回用いた新型 SeV ベクターが先行研究と比較して、iPS 細胞をより効率よく作製できることを見いだした。また、チンパンジーというヒトとほぼ同等のゲノム一致率を持つ希少種の血液から作製した iPS 細胞は、ヒト/チンパンジー特有の病原体等への病態解析や進化発生学への応用、もしくは倫理面で問題になる異種間キメラ作製時の移植利用など、様々な用途への可能性が示唆される。

〔結論〕 新型 SeV ベクターを用いた iPS 細胞作製はヒトやチンパンジー細胞において、従来型よりその安全性と効率を向上させた。また、今回作製したチンパンジー血液由来の iPS 細胞はヒトの iPS 細胞に類似していることから、今後ヒト由来の細胞では実験不可能な生殖分野等での応用が期待される。

## 2. 学位論文の骨格となる参考論文

"New type of Sendai virus vector provides transgene-free iPS cells derived from chimpanzee blood."  
*PLOS ONE* 9: e113052, 2014.

### 3. 謝辞

本研究の実施にあたり、御懇篤なるご指導および御校閲を賜りました、熊本大学医学教育部  
医学専攻幹細胞誘導分野 江良沢実教授に深く感謝いたします。

チンパンジー血液は、京都大学霊長類学研究所の明里宏文氏に供与頂きました。

深く御礼申し上げます。

本論文で使用したセンダイウイルスベクターは、ディナベック株式会社より提供して頂きました。

深く感謝致します。新型センダイウイルスベクターの開発・提供に関し多大なご協力をして頂きました  
房木ノエミ氏に重ねて深く感謝いたします。

テラトーマ形成における移植実験、免疫染色やその他様々な解析のご協力をして頂きました、  
同研究室の片山朋彦氏、副島由美氏、曾我美南氏、濱崎誠氏に御礼申し上げます。

同研究室の梶原隆太郎氏、後藤瑞生氏、三輪裕幸氏には適切な指摘と助言を頂き、加えて様々な  
ご援助をして頂きました。深く感謝いたします。

また、熊本大学医学教育部幹細胞誘導分野の皆様には、研究室生活に当たり様々な面で多大な  
ご迷惑をおかけ致しました。この場を借りて深く陳謝致します。

これまで筆者を育て研究活動を支えて頂きました両親、様々な場面で色々とお世話になった岳父、  
丈母に感謝の意を表したいと思います。

最後に、筆者の大学院生活を公私共に支えてくれた妻朋子、息子太陽に感謝します。

2015年4月吉日

#### 4. 略語一覧

<b>*A</b>	:	Alanine
<b>ALP</b>	:	Alkaline phosphatase
<b>bFGF</b>	:	Basic Fibroblast growth factor
<b>*C</b>	:	Cysteine
<b>ConA</b>	:	Concanavalin A
<b>*D</b>	:	Aspartic acid
<b>DNA</b>	:	Deoxyribonucleic acid
<b>DNMT3B</b>	:	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta
<b>EB</b>	:	Embryoid body
<b>ESCs</b>	:	Embryonic stem cells
<b>F</b>	:	Fusion protein
<b>GDF3</b>	:	Growth differentiation factor 3
<b>Glis1</b>	:	Glis Family Zinc Finger 1
<b>*H</b>	:	Histidine
<b>hCONDELs</b>	:	human deletions that contain chimp conserved sequence
<b>HDAC</b>	:	Histone deacetylase
<b>HN</b>	:	Hemagglutinin-neuraminidase
<b>*I</b>	:	Isoleucine
<b>IL-2</b>	:	Interleukin-2
<b>iPSCs</b>	:	Induced pluripotent stem cells
<b>*K</b>	:	Lysine
<b>KLF4</b>	:	Kruppel-like factor 4
<b>KSR</b>	:	Knock-out serum replacement
<b>L</b>	:	Large protein
<b>*L</b>	:	Leucine
<b>M</b>	:	Matrix protein
<b>MEF</b>	:	Mouse embryonic fibroblast
<b>MMC</b>	:	Mitomycin C
<b>MNCs</b>	:	Mononuclear cells
<b>MOI</b>	:	Multiplicity of infection
<b>MYC</b>	:	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>NaB</b>	:	Sodium butyrate
<b>NANOG</b>	:	Nanog homeobox
<b>NEAA</b>	:	Nonessential amino acids
<b>NP</b>	:	Nucleoprotein
<b>OCT3/4</b>	:	POU5F1 (Pit-Oct-Unc class 5 homeobox 1)
<b>P</b>	:	Phosphoprotein
<b>PHA</b>	:	Phytohemagglutinin
<b>*R</b>	:	Arginine
<b>REX1</b>	:	RNA exonuclease 1 homolog
<b>RNA</b>	:	Ribonucleic acid
<b>RT-PCR</b>	:	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>SALL4</b>	:	Spalt-like transcription factor 4
<b>SeV</b>	:	Sendai virus



<b>SOX2</b>	:	SRY(sex determining region Y)-box containing gene 2
<b>SOX17</b>	:	SRY-box containing gene 17
<b>SSEA4</b>	:	Stage-Specific Embryonic Antigen 4
<b>TCR</b>	:	T cell receptor
<b>TRA-1-60</b>	:	Podocalyxin
<b>TS</b>	:	Temperature-sensitive
<b>*Y</b>	:	Tyrosine

## 5. 研究の背景と目的

### 5.1 はじめに

iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells: 人工多能性幹細胞)は、多種多様な細胞に分化できる (多能性を持つ)ことや、分裂増殖を繰り返しても多能性を維持した状態を維持できる (自己複製能を持つ)といった特徴を有し(Takahashi et al., 2006、2007)、疾患、遺伝病や創薬スクリーニングモデルとして有用なバイオリソースの1つとして知られている。患者に由来する iPS 細胞は、病因を解明する目的、患者由来の細胞を使つての薬の作用をみるために強力な道具となりうる。

iPS 細胞と並ぶ多能性幹細胞として ES 細胞 (Embryonic stem cells: 胚性幹細胞)があり、iPS 細胞が人工的に初期化 4 因子 (KLF4、OCT3/4、SOX2、そして c-MYC)を導入することで作製されるのに対し、ES 細胞は発生初期 (胚盤胞期) の胚の一部である内部細胞塊より作製される。

しかし ES 細胞は、ヒト胚 (受精卵) となるとその生命の萌芽を破壊して作製するため、倫理的な問題が生じる。また ES 細胞から派生した分化細胞においては、別個体への移植の際に拒絶反応を生じるといった問題が存在する。iPS 細胞は以上の ES 細胞の問題を解決できることから、再生医療分野における ES 細胞に代わる細胞として 2007 年以降、期待されている。

### 5.2 iPS 細胞の作製における問題点

画期的なバイオリソースである iPS 細胞であるが、下記のような問題点が存在する。iPS 細胞は ES 細胞とは異なり、人為的に操作を加えて体細胞を初期状態に戻しているため、その細胞の安全性が懸念される。具体的には、iPS 細胞の腫瘍化が挙げられ、2つの大きな問題点が存在する。1点は初期化因子の宿主細胞ゲノムへの挿入損傷による腫瘍化、そしてもう1点は初期化因子中の外来性 c-MYC の再活性化による腫瘍化の問題である。

今日までに哺乳類体細胞から人工的に作製した iPS 細胞は、マウス (Takahashi et al., 2006) やラット (Liao et al., 2008)、ブタ (Wu et al., 2009)、ヒト (Takahashi et al., 2007)、マーモセット (Tomioka et al., 2010)、アカゲザル (Liu et al., 2008) など多種多様な生物が挙げられ、作製手法としてレトロ／レンチ

ウイルス、トランスポゾン、エピソーマルプラスミドを用いた方法がある。

iPS 細胞は 4 つの転写制御因子である KLF4、OCT3/4、SOX2 そして c-MYC を細胞に強制発現させ樹立する。ヒト末梢血細胞から容易かつ迅速に iPS 細胞を作製するために、最近の研究動向では、プラスミド、もしくはセンダイウイルス(SeV)ベクターの使用の増加が見られる(Seki et al., 2010、Okita et al., 2013)。プラスミドを使用した方法は他の手法と比較して実行しやすく、導入遺伝子のホストゲノムへの挿入が少ないのでより安全である。しかし、iPS 細胞コロニー作製率は低い(～ 0.1%)という難点がある。一方センダイウイルスはウイルス除去に時間がかかるという問題を有する。

今回、私は温度感受性(TS)SeV を新しく初期因子すべてに活用した新型を用いてより安全で効率の良い iPS 細胞の作製を目指した。

### 5.3 センダイウイルス(SeV)

従来型のセンダイウイルス(SeV)ベクターは、感染に必須の F 遺伝子をゲノムから欠失した非伝播型ベクターをベースにアミノ酸を置換することで温度感受性(TS)を獲得させ、さらに iPS 細胞作製に必須の転写制御因子 KLF4(K), OCT3/4(O), そして SOX2(S) 遺伝子を1つのベクター上に1種ずつ挿入された構造を持つ(図 1)。

本ベクターの特徴として、

- (1)細胞質内のみで増殖し、核内染色体へ組み込まれない、
  - (2)温度感受性により温度変化で容易に細胞内からウイルスを除去できる、
- といった点などが挙げられる。

## 5.4 実験用チンパンジーについて

ヒト以外の霊長類で、元来チンパンジーは実験的に制限や限界が生じるため、適当なモデルではない。しかし、チンパンジーは、細胞の表面抗原において同じ抗体が使えるなど、ヒトと重要な生理的特徴を共有する(Mubiru et al., 2014、Rearden et al., 1986)。チンパンジーと人間は、一部の特殊な病原体(エボラウイルスや肝炎ウイルス・タイプ B など)に感染する。加えてこれまでに日本では、人獣感染症に関する実験において、チンパンジーの個体をもちいた医学実験が行われていた経緯がある(2006 年に終了)。

以上のことから、チンパンジーに由来するiPS細胞は、サル類-ヒト共通のウイルス感染症の研究や臨床応用のための強力な道具となり得る。

今回、稀少動物(しかも人間とのゲノム一致率が 98%)であるチンパンジーの血液から新型センダイウイルスベクターを用いて、iPS細胞を樹立した。本研究では、末梢血細胞からiPS細胞のコロニー形成を非常に効果的に誘導可能にし、かつ、温度シフトにより宿主細胞から効率良く除去できる新型SeVベクターを使用した。

## 6. 実験方法

### 6.1 実験用ヒトサンプルの取り扱いについて

ヒトサンプルに関する実験手順のすべては、熊本大学における『疫学・一般研究倫理委員会』、『ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会』と、『臨床研究・医療技術倫理委員会』(承認番号:318、153、1018)に従った(<http://www.medphas.kumamoto-u.ac.jp/research/rinri/>)。

研究内容を説明し同意して頂いた健康なボランティアの方々(以後、健常人と記す)には、同意書に署名して頂いた後に、皮膚生検と末梢血の採取が行われた。

### 6.2 実験用チンパンジー血液サンプルの取り扱いについて

実験中のチンパンジーの使用については、京都大学の霊長類研究所の『ヒト以外の霊長類の世話と利用のためのガイドライン(2010)』を厳守した。同大学の倫理委員会において、本研究における実験手順のプロトコルは承認済みである(許可証番号:2012-134)。

チンパンジーの血液サンプルは、2頭のメスのチンパンジー:アイ(ID:0273)とプチ(ID:0436)から麻酔下で獣医によって採取されたものであり、苦痛を最小限に押さえた状態で行われた。

### 6.3 チンパンジーの育成状態

京都大学の霊長類研究所のチンパンジーは、内部の部屋とつながった屋外の囲いの中で、2つの雌雄混合グループで生活している。チンパンジーは、いつでも屋外と内部の部屋に自由にアクセスできる状況下で飼育されている。屋外の囲いは2区画に分けられており、1区画は、700 m<sup>2</sup>あり、高さ15 mのジャングルジム、小川と多数の樹木で構成されている。また、もう一方の区画は、250 m<sup>2</sup>でジャングルジムと2本の小川が流れる環境となっている。飼育されているチンパンジーは、1日に3回のサル用の餌と一緒に果物と野菜を与えられ、食間に栄養強化食を数回与えられている。

## 6.4 新型温度感受性 SeV ベクター(TS1KOS)

SeV は日本で分離され、全長 15,384 塩基の全シーケンスが決定しているパラミクソウイルス科のウイルスである。このウイルスは一本鎖の非分節型マイナス鎖の RNA をゲノムに持ち、6 個の遺伝子が 3' 端から N 蛋白質(NP)遺伝子、リン酸化蛋白質(P)遺伝子、マトリックス蛋白質(M)遺伝子、膜融合蛋白質(F)遺伝子、赤血球凝集素／ノイラミニダーゼ(HN)遺伝子、そしてラージ蛋白質(L)遺伝子の順にコードされている。また SeV は外来遺伝子を染色体に挿入することなく発現できる非伝播型ベクターとしての特徴を持つ(出典:ウイルス 第 53 巻 第 2 号, pp.171-175, 2003. より一部引用)。

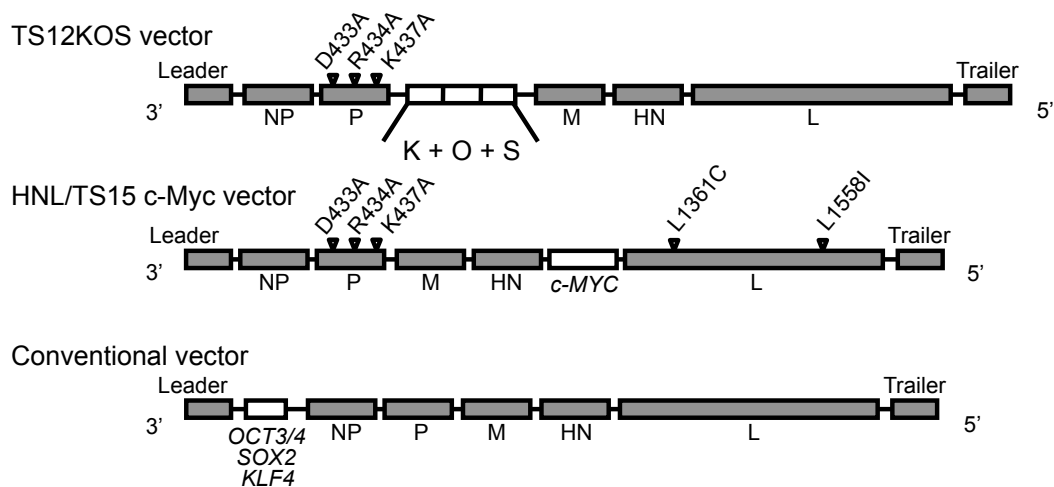
以前の研究報告では、温度感受性(TS)を獲得した SeV ベクターに初期化遺伝子(KLF4、OCT3/4、SOX2 と c-MYC)を個々に組み込んだ 4 種類を、ヒト皮膚由来線維芽細胞、新生児包皮細胞、成人の真皮細胞に混合感染させ、iPS 細胞を最高 1%の効率で作製できている(Fusaki et al., 2009)。

本実験では新たに開発された TS12KOS ベクターと HNL/TS15 c-MYC ベクターを使用した。

TS12KOS ベクターには RNA ポリメラーゼの小サブユニットである P 遺伝子領域内に\*D433A、\*R434A と\*K437A の 3 箇所の変異を含み、P と M 遺伝子領域間に初期化遺伝子(KLF4(K), OCT3/4(O), そして SOX2(S):KOS)が挿入されている。HNL/TS15 c-MYC ベクターは、P 遺伝子領域内に\*D433A、\*R434A と\*K437A の 3 箇所の変異を含むほか、宿主細胞への結合に関わる HN と RNA ポリメラーゼの大サブユニットである L 遺伝子領域間に c-MYC 遺伝子が挿入され、L 遺伝子領域内の\*L1361C と\*L1558I の 2 箇所に変異を含む構造をとる。従来型は初期化遺伝子(KLF4、OCT3/4、SOX2 と c-MYC)を NP 遺伝子領域の前に個々に組み込んだベクターである(図 1)。

尚、ベクターの開発実験はディナベック株式会社において、当時所属していた房木ノエミ氏(現:慶応大学医学部所属)を含む研究チームによって行われた。本研究で私はこれらのベクターを使用して、チンパンジー iPS 細胞作製への応用実験を行った。

\*ヒト iPS 細胞作製実験とデータ解析実験においては共同研究者の実験データを含みます。



(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Figure 1.)

**図 1: 新型 SeV ベクターと従来型 SeV ベクターの構造図**

新型 SeV ベクター(TS12KOS)は、温度感受性向上を目的とした、Phosphoprotein(P)内に 3 つの点変異を含む RNA である。KLF4(K)、OCT3/4(O)と SOX2(S)の順に持つ構造を持ち、各遺伝子間は隣接し、その間に他の遺伝子が入っていない。KOS はそれぞれ 1 つのタンパク質として発現する構造になっている。

NP: Nucleoprotein, P: Phosphoprotein, M: Matrix protein, HN: Hemagglutinin-neuraminidase, L: Large protein.

HNL/TS15 c-MYC ベクターは、HN と L の間に外因性 c-MYC 遺伝子が挿入されており、L 領域に 2 つの変異、L1361C と L1558I を持っている。

これに対し、Conventional vector は、NP 前にそれぞれ別個に 1 つずつ初期化因子をコードしている。

## 6.5 iPS 細胞の作製と維持培養

ヒト末梢血からの iPS 細胞の作製実験を参考に、本実験では iPS 細胞をヒトの皮膚由来の線維芽細胞と、ヒト／チンパンジーの末梢血の T リンパ球から作製した(Seki et al., 2010)。

まず、皮膚サンプルを細切した後、10%のウシ胎仔血清(FBS)を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM、Life Technologies)でヒト線維芽細胞を培養した。以降は iPS 細胞誘導に必要な細胞数を得るために順次拡大培養を行った。

次に末梢血から iPS 細胞を作製するため、単核細胞(MNCs)をフィコール遠心法によって分離精製した。この末梢血由来単核細胞は約 80%がリンパ球で構成される。T リンパ球の活性化とクローン性の増殖を行うため、抗-CD3 抗体(eBioScience)でコートしたディッシュ上で 10%の FBS と IL-2 を含む KBM502 培地(KOHJIN BIO)もしくは RPMI-1640 培地(Invitrogen)中で、MNCs を 5 日間培養した。

実験の種類によっては抗 CD3 抗体の代わりに 10  $\mu$ g/ml PHA (SIGMA)、または、1  $\mu$ g/ml ConA (SIGMA)を T リンパ球の活性化に用いた。

実際には、48 ウェルプレート(1 ウェルにつき  $1 \times 10^5$  細胞数の MNCs と、6 ウェルプレート(1 ウェルにつき  $5 \times 10^5$  個の線維芽細胞を1日前に播種し、翌日、感染多重度(MOI)が 3、10 と 30 の SeV ベクターを感染させた。線維芽細胞は 7 日間、MNCs は 2 日間培養した後、トリプシンによって回収した感染細胞を、あらかじめマイトマイシン C(MMC)で処理した MEF が撒かれた 60mm ディッシュ上に  $5 \times 10^4$  の細胞数で再播種した。翌日培地をヒト iPS 細胞用培地に変更し、60 mm ディッシュは 36°C で 1 週間培養を行った。感染後 18 日から 25 日の間で順次、形成されたコロニーをピックアップし、再度ヒト iPS 細胞用培地中で培養した。FGF2 濃度を 5 ng/ml と 30 ng/ml に分けて検討を行い、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である NaB は iPS 細胞誘導開始 2 日目より添加した(Mali et al., 2010)。SeV 除去は、iPS 細胞の継代の 1 回または 2 回目で行い、培養温度を 3 日間 37°C から 38°C へ上昇させた。



ヒトおよびチンパンジーiPS 細胞株は、下記の培地を用いて MMC で処理した MEF 上で培養した。

【ヒト iPS 細胞用培地】

DMEM/F12	(Sigma)
20% KSR	(Invitrogen)
2mM L-glutamine	(Life technologies)
0.1mM NEAA	(Sigma)
0.1mM 2-Mercaptoethanol	(Sigma)
0.5% penicillin and streptomycin	(Nacalai Tesque)
5 ng/ml(ヒト)、30 ng/ml(チンパンジー) bFGF	(WAKO)

## 6.6 DNA、RNA 抽出と RT-PCR

DNA はチンパンジーiPS 細胞株から先行論文を参考に抽出を行った(Kitagawa et al., 2012)。全 RNA は、Sepasol® Super G reagent (Nacalai Tesque)を用いて精製し、Superscript III(Invitrogen)と Random primers(Invitrogen)で逆転写反応することで cDNA を作製した。ゲノム PCR と RT-PCR は QuickTaq™ (TOYOBO)ポリメラーゼを使用した。

特に KLF4、OCT3/4、SOX2 と c-MYC 用のプライマーは、導入遺伝子のもので無く、内因性遺伝子の配列を増幅するように設計した。また、SeV ゲノムの有無を、一度増幅させた PCR 産物でさらに PCR 反応を行う nested RT-PCR で確認した。

尚、PCR に使用したプライマーの配列は表 1 に記載した。

表 1: 本研究に使用した PCR 用プライマー一覧

遺伝子	配列 (正鎖: F, 逆鎖: R)	アニーリング 温度 (°C)	サイクル数 (回)	サイズ (bp)
SeV	F: GGATCACTAGGTGATATCGAGC R: ACCAGACAAGAGTTTAAAGATATGTATC	58	30	181
Nested	F: TCGAGCCATATGACAGCTCG R: GAGATATGTATCCTTTTAAATTTTCTGTCTTCTTG	58	30	148
OCT3/4	F: GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG R: CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC	55	33	144
SOX2	F: GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG R: TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	55	33	151
KLF4	F: GATTACGCGGGCTGCGGCAAAACCTACACA R: TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC	56	35	357
c-MYC	F: GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC R: TTGAGGGGCATCGTCGCGGAGGCTG	56	33	328
NANOG	F: CAGCCCCGATTCTTCCACCACTCC R: CGGAAGATCCCAGTCGGGTTCACC	60	30	391
GDF3	F: CTTATGCTACGTAAGGAGCTGGG R: GTGCCAACCCAGGTCCCGAAGTT	56	35	631
REX1	F: CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT R: GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	55	30	306
SALL4	F: AAACCCCAGCACATCAACTC R: GTCATTCCCTGGGTGGTTC	58	30	138
DNMT3B	F: TGCTGCTCACAGGGCCGATACTTC R: TCCTTTCGAGCTCAGTGACACACAAAAC	55	33	242
β-ACTIN	F: CAACCGCGAGAAGATGAC R: AGGAAGGCTGGAAGAGTG	60	25	455
Chimp Chr 2a	F: ATTGGCCATCTCTTCATGCCCTGAG R: ACTTGCTAATGCATTCCCTGATGGG	57	30	Chimp 782 Human 203
Chimp Chr 11	F: TGATTCAAATGACCTTCGTGGGTGC R: ACCAGGAGTGGGATCTACTTTCTGG	57	30	Chimp 472 Human 245
Chimp Chr 12	F: TCACAAGAACTACAGTCCTCATCTC R: GGTATGTATCTGAACCTGATTAGGC	57	30	Chimp 504 Human 278
CB-1	F: CTTCGAATTCCAGAGACCTGAACAAGGTG R: CCACAAGCTTGCTCTACCCAGGCCCTCGGC	55	40	398
JB-1-1	F: GGGGGCTCCAAGCTTGACTCGGG R: AGATGAATTCATGAGCAGAGTTCTGTGCTGG	55	40	435
JB-1-2	F: CCATAAGCTTAAGCCTCAGAATCTATGCTAG R: CATAGAATTCAGGAATGAAAAGGATTGTCAACCAC	55	40	435

(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Supporting Information Table S1.)

## 6.7 染色体の核型解析

染色体の G バンド分染法による核型解析は、有限会社クロモソームサイエンスラボ（北海道札幌市）および、株式会社日本遺伝子研究所（宮城県仙台市）へ解析依頼し、各研究所のプロトコルに従って行われた。

## 6.8 免疫染色とアルカリホスファターゼ染色

サンプルは 4%のパラホルムアルデヒドを用いて 4℃で 30 分間固定した。核内に局在する分子の染色を行うため、サンプルを 0.2%の Triton X-100 を使用し、15 分間、室温 (RT) 下で透徹処理を行った。次に細胞を 2%の FBS を含む PBS で 3 回洗浄した後、各目的に応じて一次抗体を添加し、4℃で一晩インキュベートした。翌日、2%の FBS を含む PBS で 3 回洗浄後、蛍光標識された二次抗体を添加し、RT で 1 時間静置した。その後 2%の FBS を含む PBS で 3 回洗浄後、目的とする分子 (抗原) の存在を蛍光顕微鏡下で観察した。

アルカリホスファターゼ染色は、白血球アルカリホスファターゼキット (SIGMA) を使用した。

本実験で使用する一次および二次抗体のリストは、表 2 に示した。

**表 2: 免疫染色用抗体リストと染色条件**

抗体	由来	希釈率	販売元
Anti-Nanog	Goat	1:1000	R&D Systems
Anti-Oct3/4	Mouse	1:500	Santa Cruz
Anti-SSEA4	Mouse	1:500	MILLIPORE
Anti-TRA-1-60	Mouse	1:500	MILLIPORE
Anti-Sox17	Mouse	1:500	R&D Systems
Anti-Brachyury	Mouse	1:500	R&D Systems
Anti-β-III-tubulin	Mouse	1:500	MILLIPORE
Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG	Goat	1:1000	Invitrogen
Alexa 488-conjugated anti-goat IgG	Donkey	1:1000	Invitrogen

(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Supporting Information Table S2.)

## 6.9 サザンブロット法

ヒト末梢血単核細胞の cDNA の PCR 反応によって得た TCR プローブを BcaBEST labeling Kit (Takara Bio Co. Ltd) を用いて  $\alpha$   $^{32}$ P-dCTP 放射性ラベルを付加した。チンパンジー iPS 細胞から抽出したゲノムを Hybond-N+(GE Healthcare)メンブレンに吸着させ、 $\alpha$   $^{32}$ P-dCTP 放射性ラベルを付加した TCR プローブをハイブリダイズさせた。電気泳動によるゲノムのバンドパターンを調べる事で、T 細胞の再構築の有無を確認した。

## 6.10 三胚葉細胞への分化 (in vitro)

中胚葉細胞への分化については先行論文のプロトコルに従った(Sakurai et al., 2006)。胚様体(EB)形成のために、20%の KSR (Invitrogen)と 10 ng/ml の BMP4(R&D Systems)を含む DMEM/F12 (SIGMA)培地を用いて、iPS 細胞のコロニーを低接着ディッシュへと播種した。翌日、EB は 10% FBS、0.1mM 2ME、3ng/ml Activin A(R&D Systems)、10 ng/ml BMP4 と 5 ng/ml bFGF(WAKO)を添加した  $\alpha$ -MEM 培地を用いてコラーゲン IV でコートされた組織培養プレート(BD)上に播種した。

4 日間培養した後、中胚葉マーカーの抗体である Brachyury の発現を免疫染色によって検出した。

セミコンフルエント状態の iPS 細胞を 2% B27 (Life Technologies)、100 ng/ml Activin A(R&D Systems)と 1mM NaB (SIGMA)を含む RPMI1640 で構成される胚体内胚葉培地で培養すると、内胚葉細胞へと分化した。NaB 濃度は、2 日目に 0.5mM に変更し、培養 4 日目の細胞を内胚葉マーカーの抗体である Sox17 で染色した。

神経細胞誘導は、iPS 細胞を、Geltrex (Life Technologies)でコートしたプレートに撒き、24 時間後に、iPS 細胞用培地から Neurobasal Medium とヒト多能性幹細胞(PSC)神経誘導補助因子を含んでいる PSC Neural Induction Medium (Life technologies)へ変更した(Yan et al., 2013)。

誘導 7 日目に細胞を TrypLE express (Life technologies) で剥離し、Geltrex コートしたプレート上へ再播種した。その後 50% Neurobasal Medium、50% Advanced DMEM/F12、神経誘導補助因子と 5  $\mu$ M Rock Inhibitor ( Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 結合キナーゼ)阻害剤を含む神経幹

細胞用培地で、培養を継続した。培培養 14 日目に、外胚葉マーカーの抗体である  $\beta$ -III-tubulin で染色した。

#### 6.11 テラトーマ形成 (in vivo)

MMC で処理した MEF 上で増殖したチンパンジーiPS 細胞とヒト iPS 細胞を、コラゲナーゼ IV 処理によりiPS 細胞を選択的に集め、 $1 \times 10^6$  個の細胞を NOD-SCID マウスの精巣に移植した。触知可能な腫瘍は、移植のおよそ 12-16 週後に観察できた。摘出した腫瘍サンプルを 10%ホルマリン(WAKO)で固定した後、パラフィン包埋した。パラフィン包埋したサンプルからスライド切片を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、各組織の特徴を観察した。

#### 6.12 マイクロアレイ解析

チンパンジーiPS 細胞全株から mRNA を各 50ng ずつ抽出し、GeneChip 3' IVT Express Kit(Affymetrix)を用いて cDNA を合成した。次に合成した cDNA をビオチン標識し、Human Genome U133 Plus 2.0(Affimetric)にハイブリダイズさせ、GeneChip® Scanner 3000 (Affimetric)でスキャンした。

データは、GeneSpring GX 12.5 ソフトウェア(Agilent technologie)を使用して解析を行った。

## 7. 実験結果

### 7.1 新型 SeV ベクターの開発とその iPS 細胞作製効率

今までの私の研究室では、初期化遺伝子(KLF4(K)、OCT3/4(O)、SOX2(S)と c-MYC)を各々含む従来型 SeV ベクター、4種類を用いて iPS 細胞作製を行ってきた(Fusaki et al., 2009)。

本実験において、iPS 細胞の作製効率を上昇させるため、上記の初期化因子を、同一ベクター上に KLF4、OCT3/4 と SOX2 の順に一系列に配置し、宿主細胞より SeV ベクターを除去しやすくするため新たに温度感受性(TS)を高めた新型 SeV ベクター(TS12KOS)がディナベック株式会社による開発実験によって作製された。(図 1)。尚、ヒト iPS 細胞作製実験とデータ解析実験においては共同研究者の実験データを含みます。

TS12KOS ベクターは、リンタンパク質(P)(SeV RNA ポリメラーゼの構成要素)領域でアラニン残基(D433A、R434A と K437A)3 つの変異が生じている。これらの 3 つの変異を持つ SeV は、37°C で中程度の GFP 発現、38°C 以上の温度では弱い GFP 発現を示した(Ban et al., 2011)。

c-MYCを発現させるために以前の研究で作製した、HNとL領域の間にc-MYCを挿入したTS15 SeVベクター(HNL/TS15 c-MYC)は先述の3つの突然変異に加えて、巨大タンパク(L)領域に2つの他の変異(L1361C と L1558I)に持つベクターを用いた(図 1)。

HNL/TS15 c-MYC ベクターも温度感受性を持ち、以前の研究において、37°C より高い温度で弱い GFP 発現が見られることが分かっている。以上新型の TS12KOS ベクターと別個に1つずつ初期化因子(KLF4、OCT3/4 と SOX2)を持つ従来のベクターと HNL/TS15 c-MYC をそれぞれ併用し実験を行った。

まず始めに、私は健常人の皮膚由来線維芽細胞より iPS 細胞を作製する効率を、TS12KOS と従来型の SeV ベクターとで比較した(図 2-a)。

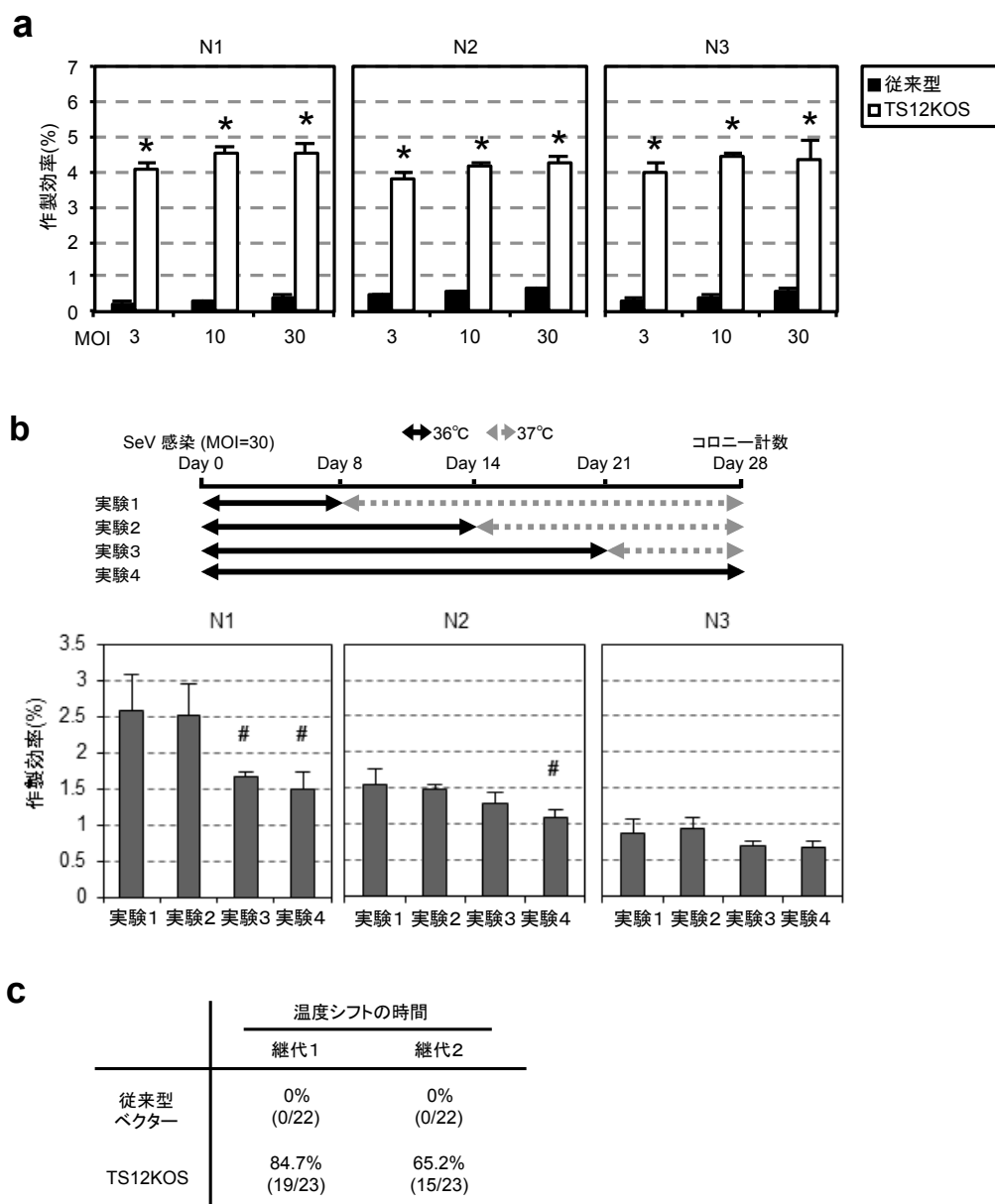
iPS 細胞誘導後 28 日目にアルカリホスファターゼ(ALP)陽性の染色を行い、ヒト ES 細胞様形態を示しているコロニー数を数え、効率を比較すると従来型ベクターより TS12KOS ベクターの方が高効率に iPS 細胞を作製することが示された(図 2-b)。

次に私は、温度シフトの iPS 細胞作製に対する効果をヒトの線維芽細胞を用いて調べた。

温度シフトを初期化因子感染の 2 週間後に 37°C から 36°C へと変化させた場合、コロニー作製効率は高いままであった。しかし、低温への温度シフトが感染後に 3 週間以上続いたとき、健常人のサンプルで作製効率は減少する傾向があった(図 2-b)。上記の結果より最初の 1 週間の温度シフトダウンを以下の実験で用いる事とした。

TS12KOS ベクターが作製した iPS 細胞から除かれたかどうか決定するために、ウイルス RNA を識別するプライマーを用いて RT-PCR 解析を行った。個々のコロニーを増殖させ 3 日間、37°C から 38°C へ温度シフトさせた。従来型 SeV 感染では、継代 1 または 2 での温度シフトで SeV 除去が全く出来なかった。これとは対照的に、新型 TS12KOS ベクターを感染させた細胞の温度シフトでは、継代 1 と 2 でそれぞれ 84%と 65%もの SeV が iPS 細胞株で除去されていた(図 2-c)。

以上の結果は、iPS 細胞の作製効率と iPS 細胞からの SeV の除去において、従来型 SeV ベクターより TS12KOS SeV ベクターが優れていることを示している。



(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Figure 1.)

## 図 2: ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞作製

(a) 誘導後 28 日目に (ES) 細胞のようなコロニー形態を確認し、ALP 陽性のコロニー数をカウントした。

N1、N2 と N3 は、それぞれ健康人サンプル。

\*有意確率  $P < 0.01$ , エラーバーは平均標準偏差 (standard deviation of the mean: SDM), 実験回数は 3 回。

(b) ヒト iPS 細胞作製における温度シフトの各条件と、各条件下での iPS 細胞作製効率。

実験 1 を基準とし、各々の実験と比較。

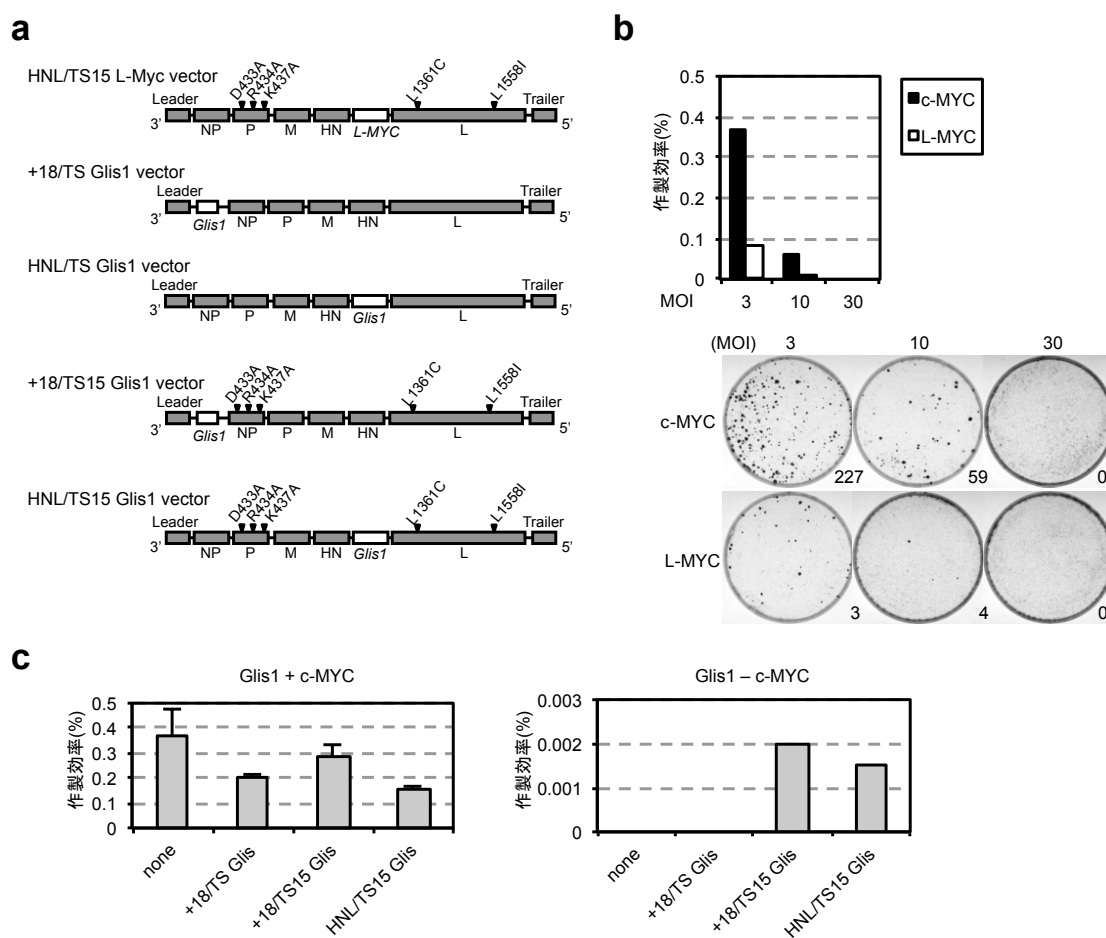
(c) ヒトの線維芽細胞由来 iPS 細胞作製時の 37°C から 38°C への温度シフト後の TS12KOS ベクター除去率。



ここで以前の研究結果から、c-MYC より L-MYC が腫瘍の発生率が低いことに基づいて、HNL/TS15 c-MYC SeV ベクターにおいて、c-MYC cDNA 配列を L-MYC cDNA 配列と入れ替えることによる影響を調べた(Nakagawa et al., 2010: 図 3-a)。ES 細胞形態を持つコロニーの ALP 陽性率は、L-MYC 遺伝子が正確に発現していたにもかかわらず、HNL/TS15 c-MYC ベクターより L-MYC ベクターを用いた結果の方が ALP 陽性率、コロニー形成率が低かった(図 3-b)。また、転写因子 Glis1 が iPS 細胞作製を促進することから、私は Glis1 配列を含む SeV ベクターを作製した(Maekawa et al., 2011: 図 3-a, c)。

予想外に、Glis1 発現は c-MYC の有無にかかわらず、ヒトの皮膚から派生した線維芽細胞から iPS 細胞コロニー作製を促進しなかった。

この結果から、Glis1 と新型 SeV ベクターとの併用では、iPS 細胞誘導において効率を上昇させないことが分かった(図 3-c)。



(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Supporting Information Figure S1.)

### 図 3: L-MYC と Glis1 を含む SeV ベクターを用いた iPS 細胞作製

(a) L-MYC と Glis1 を含むセンダイウイルス (SeV) ベクターの概要図。外因性 L-MYC cDNA は、TS15 ベクターの HN と L 領域の間に挿入した。Glis1 cDNA は、従来型および TS15 SeV ベクターでは、同様に HN と L 位置の間に挿入した。他に 2 本のベクター、+18/TS Glis1 と +18/TS15 Glis1 を作製した。これらは従来型および TS15 SeV ベクターにリーダーのすぐ下流に Glis1 を含む。

(b) MYC ベクターによる iPS 細胞作製効率の比較。iPS 細胞コロニーは誘導の 28 日目に、ES 細胞様の形態を持ち、ALP 陽性のコロニーを計数した。

(c) 様々な Glis1 ベクターによる iPS 細胞作製効率の比較。

## 7.2 新型 SeV ベクターを用いて作製したヒト iPS 細胞の細胞生物学的特徴

次に新しく開発したベクターの血液細胞からの誘導について検討した。

まずヒト T リンパ球を抗-CD3 抗体とインターロイキン 2 で刺激し、それらを従来型と新型 SeV ベクターに感染させた。

この結果、ヒト iPS 細胞作製は従来型 SeV ベクターより新型 TS12KOS SeV ベクターを用いた方が、非常に効率良く作製できた(図 4-a)。

また、従来型 SeV 感染では、継代 1 または 2 での 37°C から 38°C への温度シフトでヒト iPS 細胞株で SeV 除去が出来なかった。対照的に、新型 TS12KOS SeV ベクターを同状況下で使用した際、継代 1 と 2 において、それぞれ 65%と 47% がヒト iPS 細胞株において SeV が除去された(図 4-b)。

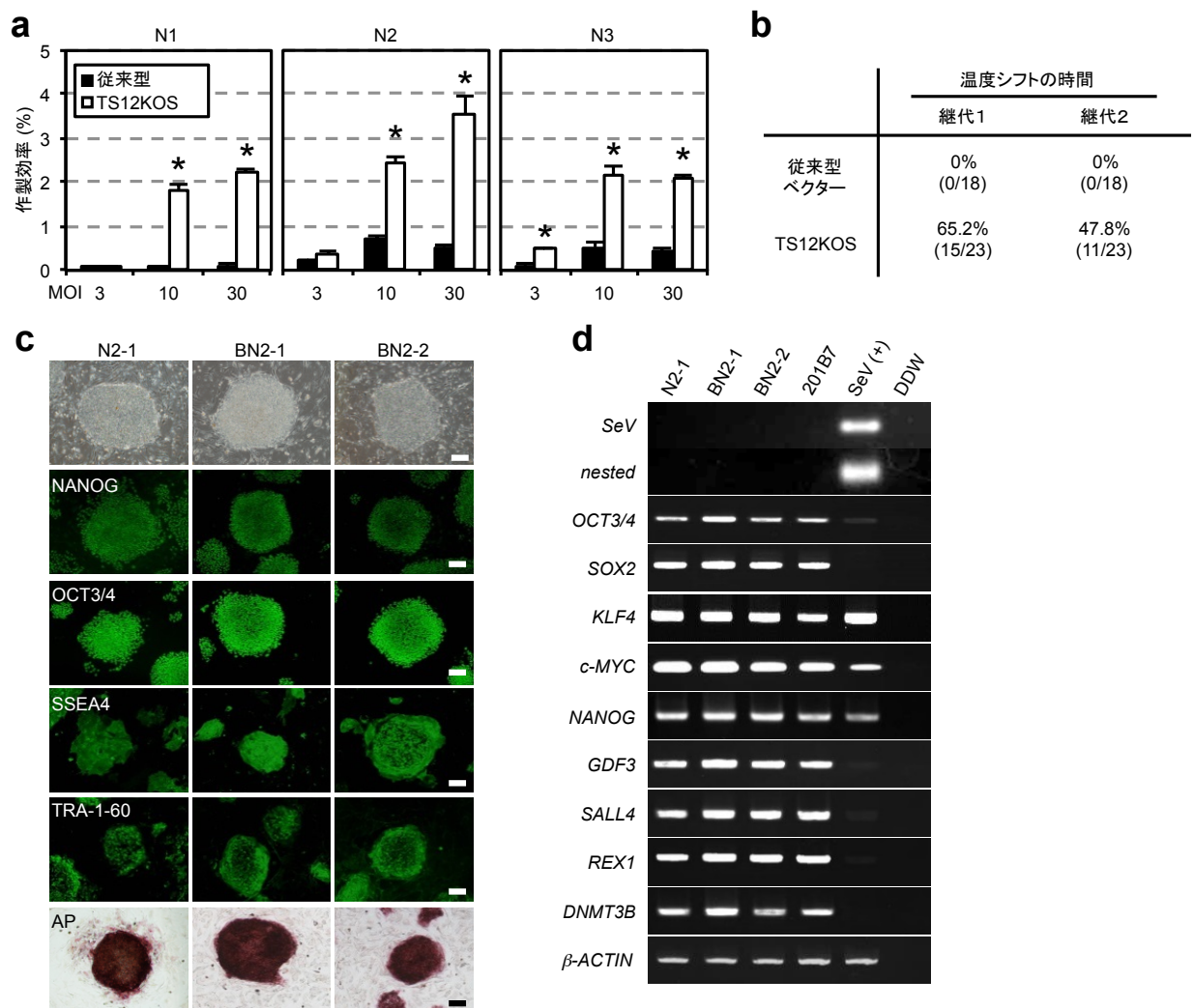
このことは、ヒト線維芽細胞で得られる結果と類似しており、ヒト T リンパ球に由来する iPS 細胞からの新型 TS12KOS ベクター除去が従来型 SeV ベクターより速やかに起こったことを意味する。

ヒト皮膚線維芽細胞に由来する iPS 細胞株、そして新型 TS12KOS ベクターによって誘導された T リンパ球に由来する iPS 細胞株は典型的に ES 細胞様形態を示し、未分化マーカーを発現していた(図 4-c, d)。

また、これらのヒト iPS 細胞株は、継代後も正常ヒト核型 46XY を持っていた(図 5-a)。

次に作製した iPS 細胞株の多分化能を確認するため、それらを免疫不全マウスの精巣に注射しテラトーマを作製した。移植の 12 週間後に摘出したテラトーマ切片をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色し、作製したテラトーマ全てで三胚葉由来の組織を確認した(図 5-b)。

以上の研究結果に基づき、新型 SeV ベクターで作製したヒト皮膚由来線維芽細胞とヒト末梢血液由来 iPS 細胞株がヒト iPS 細胞としての基準を満たすと、私は結論づけた。



(出典: *PLOS ONE* 9: e113052, 2014. Figure 2.)

#### 図 4: TS12KOS ベクターを用いたヒト iPS 細胞の作製とその特徴(1)

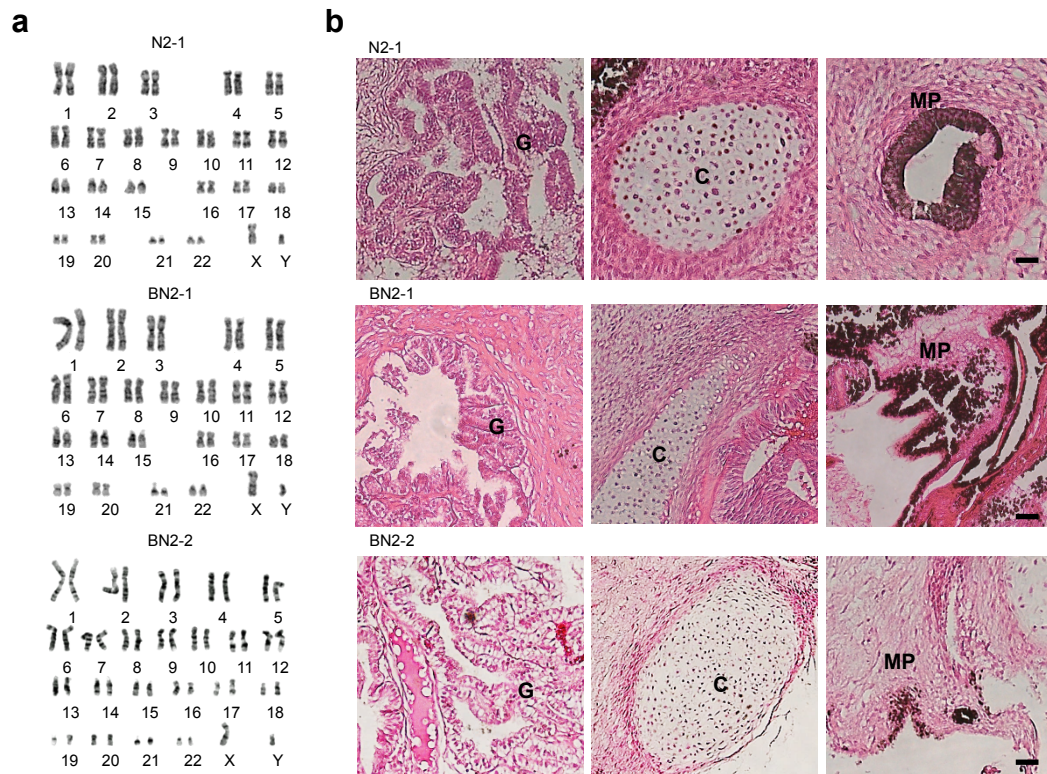
(a) ヒト血液細胞からの iPS 細胞作製実験。N1、N2 と N3 は、それぞれ健常人サンプル。

\*有意確率  $P < 0.01$ , エラーバーは平均標準偏差 (standard deviation of the mean: SDM), 実験回数は 3 回。

(b) ヒトの血液細胞由来 iPS 細胞作製時の  $37^{\circ}\text{C}$  から  $38^{\circ}\text{C}$  への温度シフト後の TS12KOS ベクター除去率。

(c) 同一の健常人の皮膚由来線維芽細胞と血液に由来する iPS 細胞の免疫染色と ALP 染色。  
スケールバーは  $200\ \mu\text{m}$  を示す。

(d) SeV と各 iPS 細胞におけるマーカー遺伝子の RT-PCR 解析。



(出典: *PLOS ONE* 9: e113052, 2014. Figure 2.)

## 図 5: TS12KOS ベクターを用いたヒト iPS 細胞の作製とその特徴(2)

(a) 新型 TS12KOS ベクターを用いて作製したヒト iPS 細胞株の核型解析。

(b) 新型 TS12KOS ベクターを用いて作製した iPS 細胞株の代表的なテラトーマの切片写真。

G: 消化管様腺構造(内胚葉), C: 軟骨(中胚葉), MP: メラニン(外胚葉)。

スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

### 7.3 チンパンジーiPS 細胞の樹立

今回私は新型 SeV ベクターを用いて、チンパンジーから iPS 細胞の樹立を試みた。採血後の血液からの樹立は非侵襲的にサンプルを得ることができる。2 頭のメスのチンパンジーの健康診断時に採血した末梢血を用いた。

ヒト血液からの iPS 細胞作製と同プロトコルを使用し、チンパンジー末梢血から iPS 細胞株を作製した。しかし、最初に行った実験では iPS 細胞作製頻度は非常に低かった。加えて、正常な核型を持つチンパンジー末梢血由来 iPS 細胞株は 1 株しか樹立できなかった(図 6-a)。

誘導条件を最適化するために、ヒト末梢単核細胞から T リンパ球刺激を、抗-CD3 抗体、Phytohaemagglutinin (PHA) または Concanavalin A (ConA) を用いて行い、どの方法がよいかを比較した(図 6-b)。

ConA で刺激されたヒト末梢単核細胞に由来するコロニーと、抗-CD3 と PHA で刺激されたヒト末梢単核細胞に由来する iPS 細胞の形態は大きく異なるものであった。ConA 刺激では抗-CD3 と PHA で刺激された血液由来 iPS 細胞コロニーよりきれいな円形の平らなコロニーで、全体が ALP 陽性であった(図 6-c)。

以上の結果より ConA で刺激されたヒト末梢単核細胞に由来するコロニーが、作製に適していると判断した。以降のチンパンジーの実験では ConA を使用している。さらに私は iPS 細胞誘導の間、MOI 10~30 と線維芽細胞成長因子 2 (FGF2) 濃度を 5 ng/ml から 30 ng/ml に変化させた(図 7-a)。過去のマーモセットの研究では高濃度 (20 ng/ml) の FGF2 を使用していたからである。加えて iPS 細胞株作製の効率を上昇させるために培地中に酪酸ナトリウム (NaB) を添加した(Wu et al., 2010, Mali et al., 2010)。

ヒト末梢血において、30 ng/ml の FGF2 による iPS 細胞作製効率は、5 ng/ml の FGF2 濃度による効率よりわずかに低かった(図 7-b)。しかしながら興味深いことに、上記の変更はコロニー作製率を改善し、より多くの iPS 細胞コロニーを形成させた。ただし、チンパンジー末梢単核細胞からの iPS 細胞作製効率は、ヒト血液からの作製効率より低かった (0.32% 対 2%: 図 6-a)。

センダイウイルスを除くために継代 1 で 3 日間培養温度を 38°C に移し、増殖させた。チンパンジー iPS 細胞からの SeV 除去率は、ヒト iPS 細胞 (65.2%対 58.6%)と極めて類似した。

次に iPS 細胞作製効率を従来型 SeV ベクターと新型 TS12KOS ベクターとを比較した。従来型 SeV ベクターでも MOI 30 でチンパンジーiPS 細胞を作製することができたが、新型 TS12KOS ベクターは iPS 細胞作製において従来の方法より高い作製効率を示した。また、従来型のベクターの SeV 除去率は低かった(従来型 0.073%に対して 0.32%: 図 6-a)。

最終的に私は TS12KOS を用いてチンパンジーの血液より、iPS 細胞株を 4 クローン樹立した (C101, C201, C205, C402)。作製したチンパンジーiPS 細胞株は ES 細胞のような細胞形態を示し、RT-PCR 解析より SeV が除去されていることを証明した(図 8-a, b)。

同様に、開発した新型 TS12KOS SeV ベクターが従来型 SeV ベクターより効率的にチンパンジー血液細胞より iPS 細胞を作製できたことを示している。また、これらの細胞がチンパンジー血液に由来したことを確認すべく、チンパンジーとヒトとの遺伝子を区別するために、チンパンジー由来サンプルがヒト DNA 断片を含まないことを確認できる PCR プライマーを数種用いて PCR を行い確認した (McLean et al., 2011: 図 9-a)。さらに、作製した iPS 細胞株がさらに通常のチンパンジー核型 (48XX) に由来することを、核型解析結果で示した(図 9-b)。

また、チンパンジーiPS 細胞の細胞起源を確認するため、T 細胞レセプター (TCR) DNA に特有なプローブを用いたサザンブロット解析を行った (Langerak et al., 1999)。再構築されたバンドは全ての樹立チンパンジーiPS 細胞株で確認できた。このことから、作製した iPS 細胞はチンパンジーの T リンパ球に由来することが検証できた(図 9-c)。

次に試験管内分化とテラトーマ形成を解析することにより、チンパンジーiPS 細胞株の多分化能を調べた(図 10-a, b)。作製したチンパンジーiPS 細胞株を分化誘導し、内胚葉 (Sox17 陽性)、中胚葉 (Brachyury 陽性)、外胚葉 (β-III-tubulin 陽性)細胞が出現することを確認した(図 10-a)。

NOD-SCID マウス(T・B 細胞が存在せず重度の免疫不全を呈すが、移植の際の異種細胞や組織に対する拒絶反応が少ないマウス)の精巣で作製したテラトーマ(奇形腫)が三胚葉(例:立方骨の上皮、メラニン、軟骨、筋肉と様々な腺構造)の細胞を含むことが、組織学的解析で観察できた(図 10-b)。

以上の2つの結果より、チンパンジー由来の iPS 細胞は、多分化能を持ち確かに iPS 細胞としての基準を満たしていると言える。

さらにチンパンジーiPS 細胞の細胞生物学的特徴を調べるために、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。得られたデータを用いてチンパンジーとヒト由来 iPS 細胞株間で全体的な違いを見るべく、遺伝子の主成分分析法(PCA)と階層的クラスター解析を実行した。その際、ヒトの ES 細胞、iPS 細胞、線維芽細胞と様々な組織由来細胞からのデータも、チンパンジーiPS 細胞株と共に解析した。

この結果、チンパンジーiPS 細胞株は異なる個体に由来しているが、各自のデータは PCA によって、ヒトの ES 細胞株と iPS 細胞株の近傍に位置づけられた(図 11-a)。また、チンパンジー由来 iPS 細胞株の遺伝子発現プロファイルは、ヒトの ES 細胞株と iPS 細胞株と同じクラスターに集約され、様々なヒト組織の遺伝子を含んでいるクラスターとは分離された(図 11-b)。

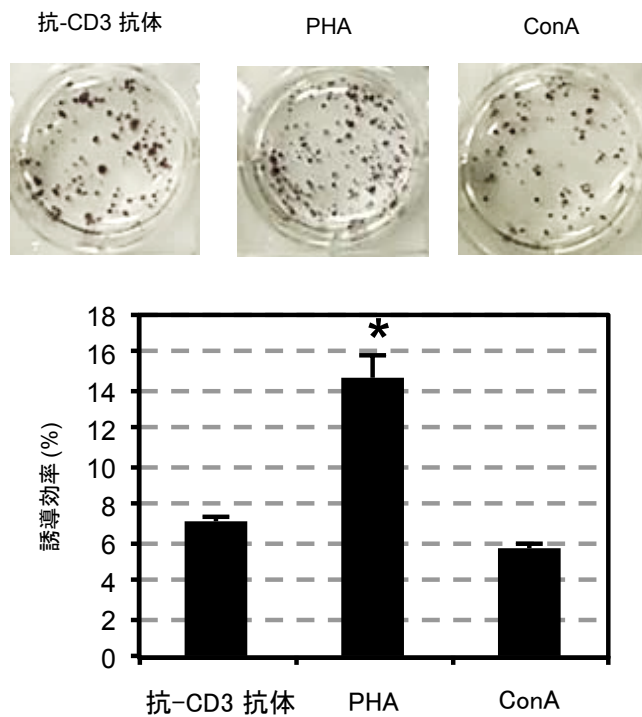
したがって、チンパンジーiPS 細胞株の網羅的な遺伝子発現パターンはヒトの ES 細胞株と iPS 細胞株の遺伝子発現パターンと類似していることが示唆された。



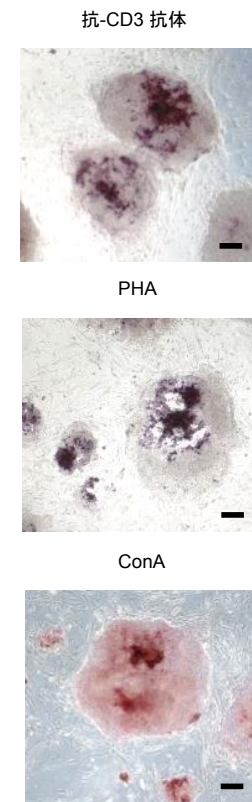
**a**

	チンパンジー			Tリンパ球 刺激因子	SeV	MOI	FGF2 (ng/ml)	誘導効率 平均(%)	ピックアップ コロニー数	SeV(-) コロニー数	コロニー作製効率 平均(%)	核型 正常数/総数	クローン名
	No	年齢	性別										
実験1	1	36	メス	抗-CD3 抗体	新型	10	5	0.0016	2	2	100	1/2	C101
実験2	2	46	メス	ConA	新型	30	30	0.32	29	17	58.62	2/3	C201, C205
実験3				ConA	従来型	30	30	0.073	11	2	18.18	1/2	C402

**b**



**c**



(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Figure 3.)

## **図 6: TS12KOS ベクターを用いたチンパンジーiPS 細胞の作製(1)**

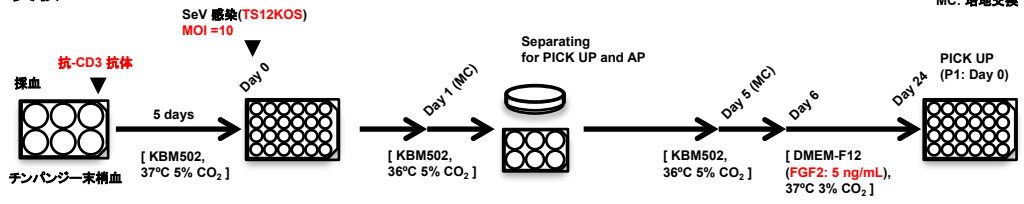
(a)作製した各種チンパンジーiPS 細胞。

(b)ヒト末梢単核細胞を用いた、Tリンパ球刺激因子別のヒト末梢血由来 iPS 細胞作製効率。

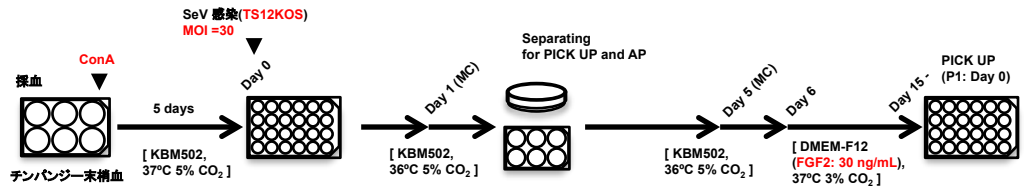
(c)(b)と同じく、ヒト末梢単核細胞を刺激した Tリンパ球からのヒト末梢血由来 iPS 細胞のコロニー形態と ALP 染色。

a

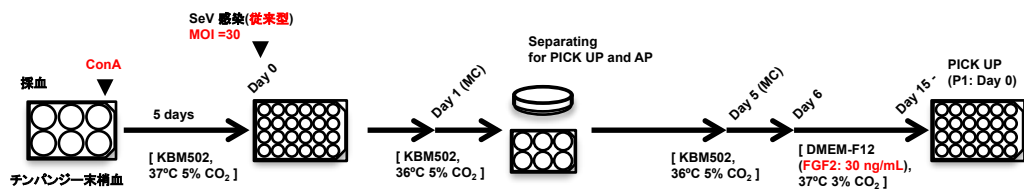
### 実験1



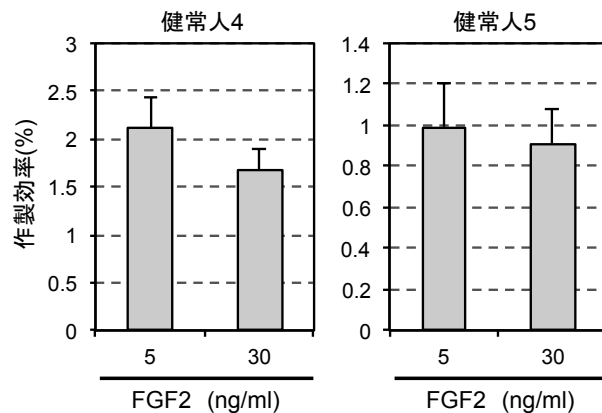
### 実験2



### 実験3



b



(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Supporting Information Figure S2, Figure S3.)

## 図 7: TS12KOS ベクターを用いたチンパンジーiPS 細胞の作製(2)

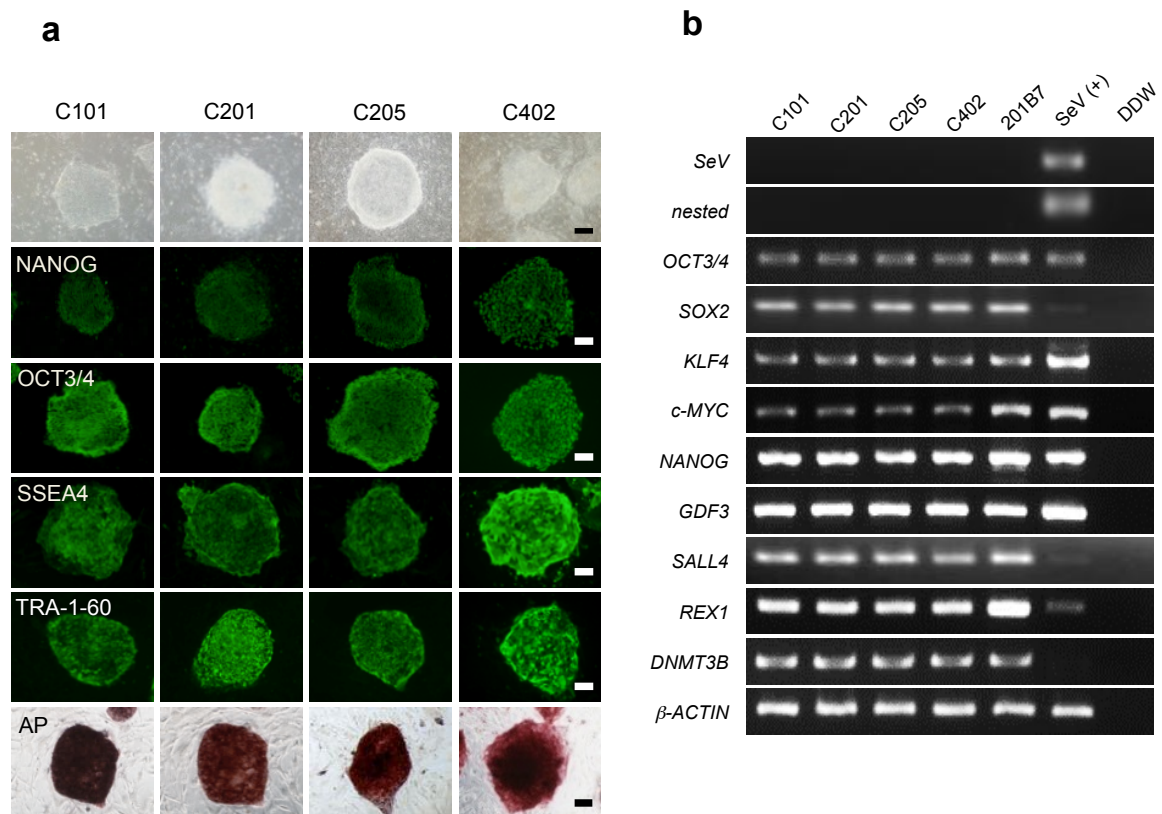
(a)チンパンジー末梢血由来 iPS 細胞作製の実験概要図。

チンパンジー血液から単核球を分取し、最初の 5 日間、各 T リンパ球刺激因子で刺激した。

SeV ベクター感染後、細胞を MMC 処理済み MEF の上に播種した。

実験の異なる条件は、赤字で示した。

(b)2 人のボランティアにおける、ヒト血液細胞から iPS 細胞作製効率を FGF2 濃度(5 ng/ml と 30 ng/ml) で比較した。

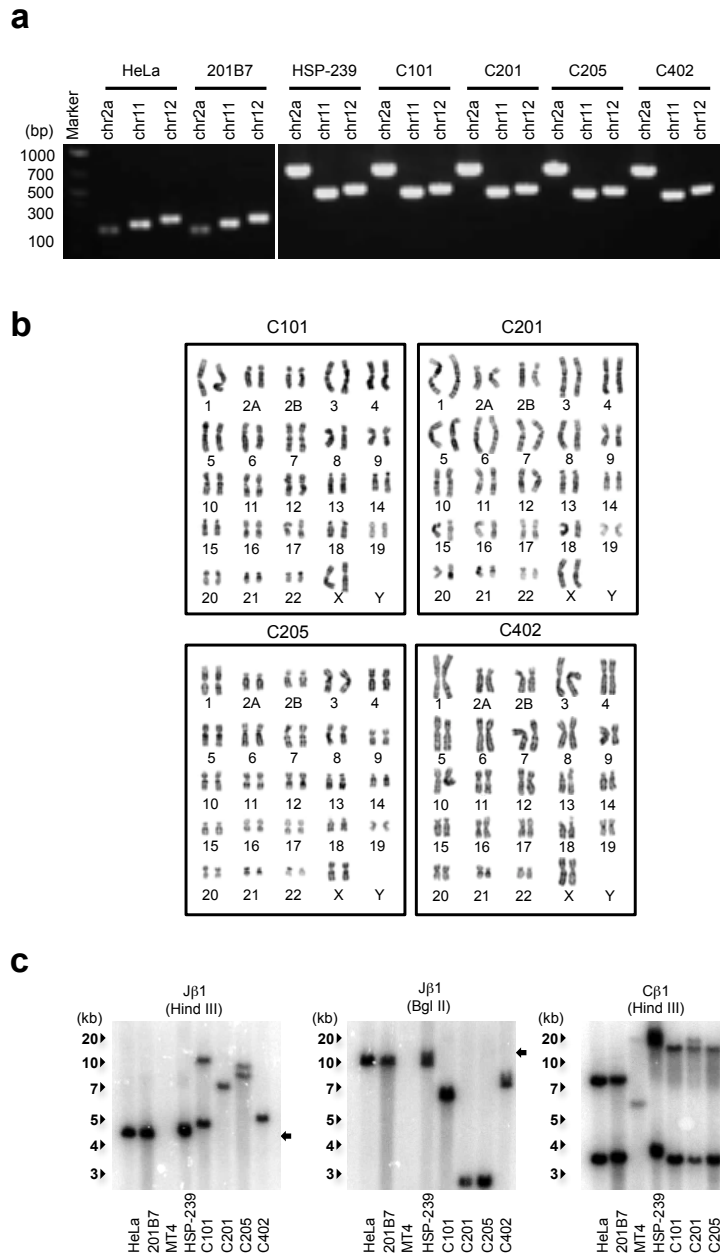


(出典: *PLOS ONE* 9: e113052, 2014. Figure 3.)

### 図 8: TS12KOS ベクターを用いたチンパンジーiPS 細胞の作製(3)

(a)各チンパンジーiPS 細胞における免疫染色と ALP 染色。スケールバーは 200  $\mu$ m を示す。

(b)SeV と各チンパンジーiPS 細胞におけるマーカー遺伝子の RT-PCR 解析。



(出典: *PLOS ONE* 9: e113052, 2014. Figure 3.)

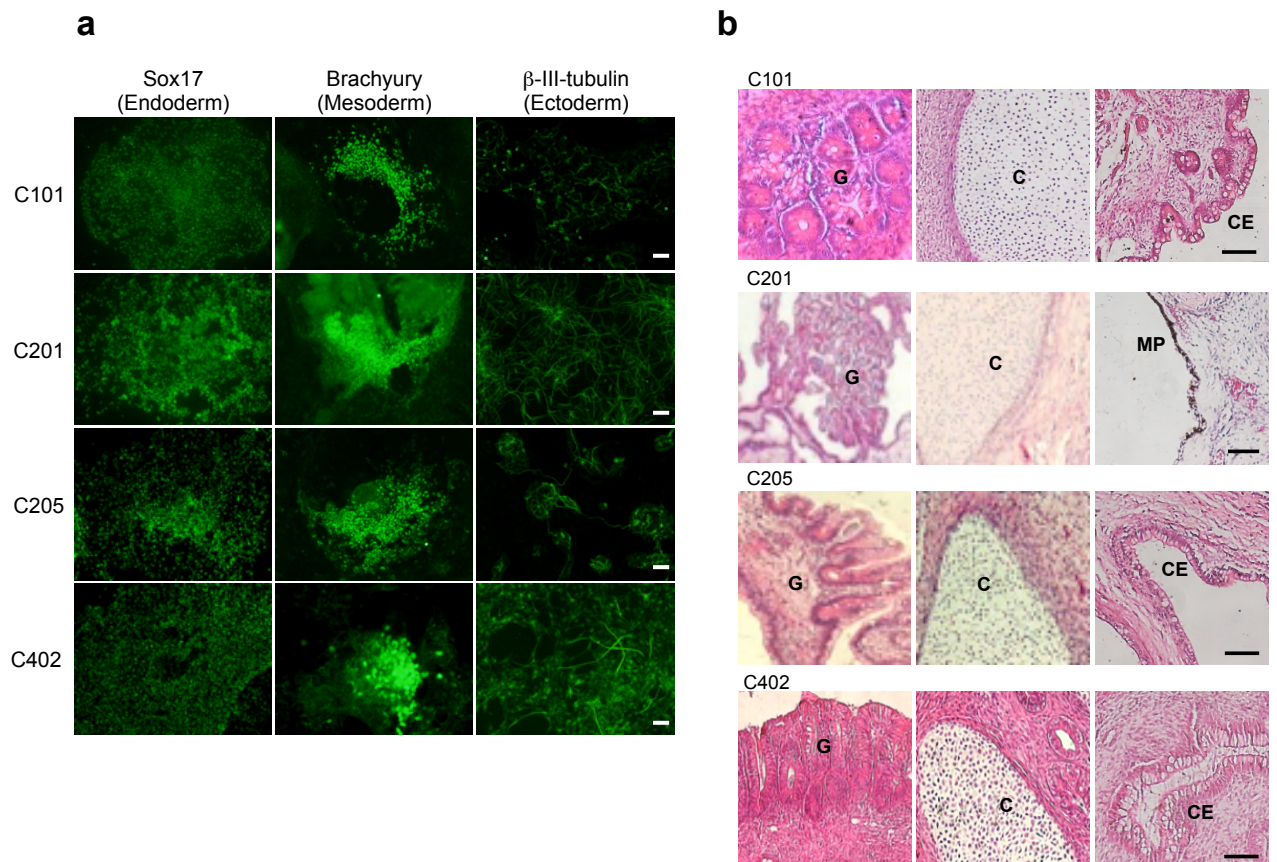
## 図 9: TS12KOS ベクターを用いたチンパンジーiPS 細胞の作製(4)

(a)チンパンジーゲノムとヒトゲノムを区別するプライマーを用いた PCR 結果。

chr2a, chr11, chr12 に対するプライマーはチンパンジーでそれぞれ 782, 472, 504bp、ヒトで 203, 245, 278bp。  
HeLa: ヒト由来細胞株, 201B7: ヒト iPS 細胞株, MT4: ヒト T 細胞株, HSP-239: チンパンジーT 細胞株。

(b)TS12KOS ベクターで作製したチンパンジーiPS 細胞株の核型解析。

(c)サザンブロット法を用いた、TCR 遺伝子再構築の検出。チンパンジーiPS 細胞株から抽出した遺伝子を各制限酵素で消化し、各 TCR プロブ(Jβ-1、Cβ-1)とハイブリダイズした。  
矢印は、TCR 遺伝子の未再構築(germline)バンドを示す。



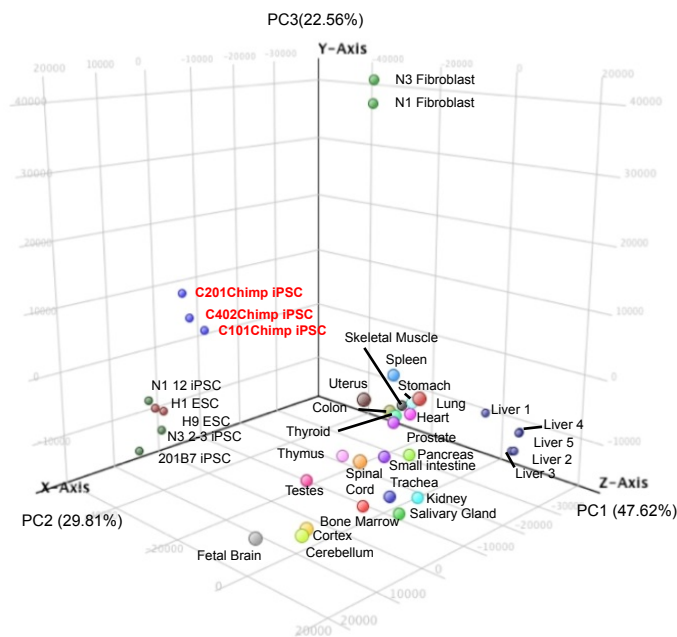
(出典: *PLOS ONE* 9: e113052, 2014. Figure 4.)

## 図 10: TS12KOS ベクターを用いたチンパンジーiPS 細胞の作製(5)

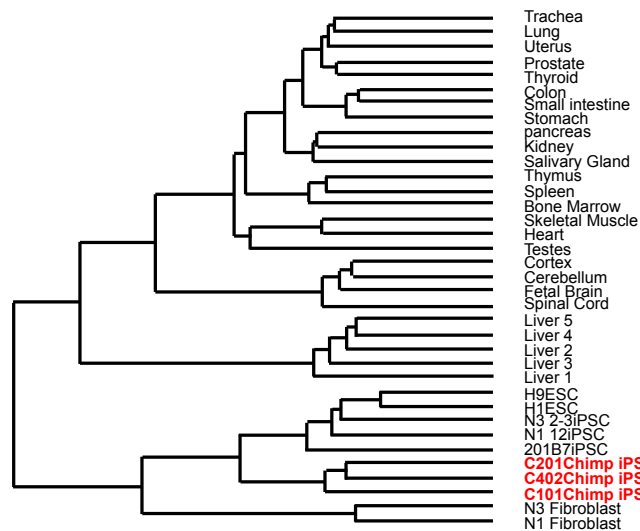
(a)in vitro での三胚葉分化。内胚葉マーカーとして Sox17、中胚葉マーカーとして Brachyury、そして外胚葉マーカーとして β-III-tubulin を用いた。  
スケールバーは 100 μm を示す。

(b)各チンパンジーiPS 細胞株から作製したテラトーマの切片写真。  
G: 消化管様腺構造(内胚葉), C: 軟骨(中胚葉), CE: 立方上皮構造(外胚葉), MP: メラニン(外胚葉)。  
スケールバーは 100 μm を示す。

a



b



(出典: PLOS ONE 9: e113052, 2014. Figure 4.)

## 図 11: TS12KOS ベクターを用いたチンパンジーiPS 細胞の作製(6)

(a)主成分分析(PCA)。

主要な 3 つの構成要素、PC1 (47.62%)、PC2 (29.81%)、PC3 (22.56%) に分類し、3 次元的に表示した。  
パーセンテージは、各々の構成要素で相違する率を示す。

(b)チンパンジーiPS 細胞株、ヒト ES と iPS 細胞株のクラスター解析。

調べた遺伝子は、ユークリッドの距離測定基準に従った。ヒト ES 細胞と様々な組織のデータセットは、Gene Expression Omnibus を用いた。

## 8. 考察

本研究において、作製した新型の温度感受性 SeV ベクター(TS12KOS)は、ヒト皮膚線維芽細胞や末梢血細胞からの iPS 細胞作製において非常に効率が高いベクターであることを実証した。

また、このベクターを使用して新たにチンパンジー末梢血由来の iPS 細胞を作製することに成功した。これによって、ヒト-チンパンジー特有の病原体に対して有用な研究材料となり得る。

iPS 細胞をウイルスで作製する際の重大な問題は、宿主細胞ゲノムへのウイルスゲノムの挿入であるが、SeV は細胞質のみでその複製を完了し、かつ自己複製能をもたず、非伝播性である。

しかも、TS12KOS ベクターを使用して樹立した iPS 細胞では優れたベクター内の温度感知機構により、単に 3 日間、培養温度を 37°C から 38°C へ温度変化するだけでウイルスが完全に除去されていた。

また、導入遺伝子除去後の iPS 細胞はコロニーを 1 週間以内に発生させることができた。

SeV ベクターを使用しない従来の技術とは異なり、本システムは、初期化因子である KLF4(K)、OCT3/4(O)と SOX2(S)を1つのベクター上に持つため、宿主細胞への感染によるダメージが軽減される。また、タンデムであることから、一定量を安定して発現することが考えられる。さらに、iPS 細胞の作製効率は、他技術(例としてレトロウイルス (Takahashi et al., 2007)、レンチウイルス (Sommer et al., 2009)またはプラスミドベクター (Okita et al., 2013))を使用して得た作製効率より 20 倍から 100 倍高いものであった。また、皮膚線維芽細胞が iPS 細胞を作製するために最も一般的に使用される細胞源であるが、より侵襲性がなく、採血により簡便に採取可能な末梢血細胞の方がより好ましい。

本研究により、TS12KOS ベクターがヒト皮膚線維芽細胞(～4%)のみならず、ヒト末梢血細胞(～2%)においても高効率で iPS 細胞作製ができることを証明した。

過去の報告において、iPS 細胞の作製ために必須とされる『初期化 4 因子(KLF4, OCT3/4, SOX2 そして c-Myc)』の過剰発現は、ヒトの皮膚由来の線維芽細胞に、レンチウイルスとレトロウイルス・ベクターを媒介として感染実験が行われてきた(Takahashi et al., 2007、Sommer et al., 2009)。



これらの遺伝子発現システムは非常に安定したものであるが、これらの方法には2つの潜在的な問題がある。1点目はウイルスベクターを感染させた際、初期化 4 因子をコードしている遺伝子が宿主ゲノムに組み込まれ、作製された iPS 細胞に残存してしまう点である。そして2点目は挿入遺伝子による変異が生じる危険性があるという点である。これらは移植を行った際に生体内で腫瘍形成を促進してしまう危険性を含んでいる(Nakagawa et al., 2008)。Cre/loxP 組み換えシステム、アデノウイルス・ベクター、ピギーバック方式トランスポゾン、マイクロ RNA などを用いた初期化システムは、iPS 細胞作製時において宿主ゲノムへの感染誘導を必要とすることから iPS 細胞への有用が難しい(Woltjen et al., 2009、Zhou et al., 2009、Miyoshi et al., 2011、Stadtfield et al., 2008、Soldner et al., 2009)。また、エピソーマルプラスミドベクターを用いて血液から iPS 細胞を作製できることが報告されたが、作製効率は低いものであった(～0.1%: Okita et al., 2013)。

iPS 細胞作製問題を解決するために、本研究において、ヒトおよびチンパンジー血液細胞から宿主ゲノムへの挿入のない iPS 細胞を簡単かつ効率的に作製することが可能な新型 SeV ベクターを開発した。SeV ベクターは、宿主ゲノムへ自身の遺伝子挿入することなく目的遺伝子を発現できる RNA ウイルスである。このことから、本ベクターは上述の問題を解決することができる。さらにヒト以外の霊長類由来 iPS 細胞は、哺乳類という分類の中で解剖学と生理学に多くの類似点を持つため、再生医療研究のために非常に有用なマテリアルとなる(Hackett et al., 2001、Rogers et al., 2014)。チンパンジーとヒトはゲノム DNA 配列の多くを共有し、その差は約 1.2%にすぎない(Kehrer-Sawatzki et al., 2007)。動物愛護等の観点からは、個体を継続して実験に用いることは難しい。この点も本研究で作製したチンパンジー iPS 細胞を使用することで解決可能だと言える。

今回、新型 SeV ベクターを使用してチンパンジー血液由来 iPS 細胞株を作製したが、この iPS 細胞作製効率は、同じく新型 SeV ベクターを用いて作製したヒト血液由来 iPS 細胞作製効率と比較した場合、ヒトよりも低い数値を示した。このことは、生物種間で iPS 細胞作製効率に差があることを示唆している。



最近、他のグループはレトロウイルス・ベクターを用いてチンパンジー皮膚由来線維芽細胞よりチンパンジーiPS 細胞株を樹立した(Marchetto et al., 2013)。だが、医療用に多くの制限を含むため、チンパンジー線維芽細胞を使用することは難しい。

これに対し新型ベクターを用いた作製方法は、他の組織より採取の制限を受けにくい健康診断時に採取したチンパンジー血液から、iPS 細胞を簡便に作製できる。

今回のチンパンジーiPS 細胞樹立では、多大な労力を必要とする他のヒト iPS 細胞作製方法の良い部分を生かして、非常に価値ある生体素材として樹立することができた。このことは、他の皮膚などの生検が難しい生物種における iPS 細胞作製の代替法となる可能性を持っている。また、今回作製したチンパンジーiPS 細胞はヒト単体では行えない、神経細胞などの体外比較実験などへの可能性を広げたと考えられる。SeV はその特性からアカゲザル、カニクイザルとマーモセットの血液細胞にも感染できる。新型ベクターを用いてそれらの血液から iPS 細胞への誘導が可能であることが示唆される(Sasaki et al., 2005、Fusaki et al., 2014)。

以上のアプローチは、チンパンジーと比較することで、進化学的な解析にも応用できる。進化と発達における多様化を、表現型と遺伝子型の相関関係からの視点より、チンパンジー大腿骨骨幹部形態と非翻訳遺伝子の長さとを比較して分析結果を報告した研究もある(Morimoto et al., 2014)。

今後の展望としては、本実験で得られた iPS 細胞を用いて基底状態(ナイーブ化)iPS 細胞の作製を行うことにより、さらなる臨床応用へ向けた生体素材の開発・改良の促進が期待できる。

## 9. 結語

本研究では、新型 SeV ベクターを用いて、効率よくチンパンジー末梢血細胞から iPS 細胞の作製を行うことができた。血液由来であることの証明を TCR プローブを用いたサザンブロットングで行い、核型解析や hCONDEL(ヒトでのみ欠損している遺伝子配列)を PCR で調べることでチンパンジー細胞種であることを確認した。細胞ディッシュ上で各胚葉への分化能を有するか否かの実験より、代表的な胚葉マーカー(中胚葉:Brachyury、内胚葉:Sox17、そして外胚葉:β-III-tubulin)の発現が見られたことから、作製した iPS 細胞が *in vitro* で三胚葉への分化能を有することを確認した。また、樹立したチンパンジー iPS 細胞を NOD-SCID マウスの精巢に移植して形成したテラトーマから、ヘマトキシリン-エオジン染色により *in vivo* でも三胚葉分化能を有することも証明した。

得られた iPS 細胞は臨床応用研究において、倫理面をクリアするための異種間キメラ(マウス-チンパンジー)作製やヒト-チンパンジー間の特殊病原体の解析などに応用できる細胞源として非常に有用であることが示唆される。

## 10. 参考文献

Asano T., Sasaki K., Kitano Y., Terao K., and Hanazono Y.  
In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells.  
*Methods Mol Biol.* 2006: 329, 459-67.

Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., and Nishikawa, S.  
Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108: 14234-14239, 2011.

D'Amour, K., Agulnick, AD., Eliazar, S., Kelly, OG., Kroon, E., Baetge, EE.  
Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm.  
*Nat. Biotechnol.* 12: 1534–1541, 2005.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M.  
Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome.  
*Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 85: 348-362, 2009.

Fusaki, N., Ban, H., and Nagai, Y.  
Induction of Human Pluripotent Stem Cells by the Sendai Virus Vector: Establishment of a Highly Efficient and Footprint-Free System. Sendai Virus Vector: Advantages and Applications.  
*Springer* 171-183, 2014.

Gonzalez, JP., Prugnotte, F., and Leroy, E.  
Men, primates, and germs: an ongoing affair.  
*Curr Top Microbiol Immunol.* 365: 337-353, 2013.

Hackett, TA., Preuss, TM., and Kaas, JH.  
Architectonic identification of the core region in auditory cortex of macaques, chimpanzees, and humans.  
*J Comp Neurol.* 441: 197-222, 2001.

Hamasaki, M., Hashizume, Y., Yamada, Y., Katayama, T., Hohjoh, H., Fusaki, N., Nakashima, Y., Furuya, H., Haga, N., Takami, Y., and Era, T.  
Pathogenic mutation of ALK2 inhibits induced pluripotent stem cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification.  
*Stem Cells* 30: 2437-2449, 2012.

Hankowski, KE., Hamazaki, T., Umezawa, A., and Terada N.  
Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface.  
*Lab Invest.* 91: 972-977, 2011.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, CW., Meissner, A., Cassady, JP., Beard, C., Brambrink, T., Wu, LC., Townes, TM., and Jaenisch, R.  
Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin.  
**Science** 318:1920-3, 2007.

Hannan, NR., Segeritz, CP., Touboul, T., and Vallier, L.  
Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells.  
**Nat. Protoc.** 8: 430–437, 2013.

Kehrer-Sawatzki, H and Cooper, DN.  
Understanding the recent evolution of the human genome: insights from human-chimpanzee genome comparisons.  
**Hum Mutat.** 28: 99-130, 2007.

Kitagawa, M., Takebe, A., Ono, Y., Imai, T., Nakao, K., Nishikawa, S., and Era, T.  
Phf14, a novel regulator of mesenchyme growth via platelet-derived growth factor (PDGF) receptor- $\alpha$ .  
**J. Biol. Chem.** 287: 27983-27996, 2012.

Langerak, AW., Wolvers-Tettero, IL., and van Dongen, JJ.  
Detection of T cell receptor beta (TCRB) gene rearrangement patterns in T cell malignancies by Southern blot analysis.  
**Leukemia** 13: 965-974, 1999.

Liao, J., Cui, C., Chen, S., Ren, J., Chen, J., Gao, Y., Li, H., Jia, N., Cheng, L., Xiao, H., and Xiao, L.  
Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells.  
**Cell Stem Cell** 4: 11-15, 2009.

Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., Qu, X., Xiang, T., Lu, D., Chi, X., Gao, G., Ji, W., Ding, M., and Deng, H.  
Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts.  
**Cell Stem Cell** 3: 587-590, 2008.

Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S.  
Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1.  
**Nature** 474: 225-229, 2011.

Mali, P., Chou, BK., Yen, J., Ye, Z., Zou, J., Dowey, S., Brodsky, RA., Ohm, JE., Yu, W., Baylin, SB., Yusa, K., Bradley, A., Meyers, DJ., Mukherjee, C., Cole, PA., and Cheng, L.  
Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes.  
**Stem Cells** 28: 713-720, 2010.

Marchetto, MC., Narvaiza, I., Denli, AM., Benner, C., Lazzarini, TA., Nathanson, JL., Paquola, AC., Desai, KN., Herai, RH., Weitzman, MD., Yeo, GW., Muotri, AR., and Gage, FH.  
Differential L1 regulation in pluripotent stem cells of humans and apes.  
*Nature* 503: 525-529, 2013.

McLean, CY., Reno, PL., Pollen, AA., Bassan, AI., Capellini, TD., Guenther, C., Indjeian, VB., Lim, X., Menke, DB., Schaar, BT., Wenger, AM., Bejerano, G., and Kingsley, DM.  
Human-specific loss of regulatory DNA and the evolution of human-specific traits.  
*Nature* 471: 216-219, 2011.

Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, DL., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., Saito, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M.  
Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs.  
*Cell Stem Cell* 8: 633-638, 2011.

Morimoto, N., Ponce de León, MS., and Zollikofer CP.  
Phenotypic variation in infants, not adults, reflects genotypic variation among chimpanzees and bonobos.  
*PLOS ONE* 9: e102074, 2014

Mubiru, JN., Yang, AS., Olsen, C., Nayak, S., Livi, CB., Dick, EJ Jr., Owston, M., Garcia-Forey, M., Shade, RE., Rogers, J.  
Analysis of prostate-specific antigen transcripts in chimpanzees, cynomolgus monkeys, baboons, and African green monkeys.  
*PLOS ONE* 9: e94522, 2014.

Nagai, Y., Takakura, A., Irie, T., Yonemitsu, Y., and Gotoh, B.  
Sendai virus: Evolution from mouse pathogen to a state-of-the-art tool in virus research and biotechnology.  
The biology of Paramyxoviruses Samal SK, Ed,  
*Caister Academic Press, Norfolk, UK*: 115-173, 2011.

Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., and Yamanaka, S.  
Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 107: 14152-14157, 2010.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S.  
Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.  
*Nat. Biotechnol.* 26: 101-106, 2008.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S.  
Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors.  
*Science* 322: 949-953, 2008.

Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., and Yamanaka, S.

An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells.

**Stem Cells** 31: 458-466, 2013.

Rearden, A.

Evolution of glycophorin A in the hominoid primates studied with monoclonal antibodies, and description of a sialoglycoprotein analogous to human glycophorin B in chimpanzee.

**J. Immunol.** 136: 2504-2509, 1986.

Robertson, BH., and Margolis, HS.

Primate hepatitis B viruses – genetic diversity, geography and evolution.

**Rev Med Virol.** 12: 133-41, 2002.

Rogers, J., and Gibbs, RA.

Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics.

**Nat. Rev. Genet.** 15: 347-359, 2014.

Sakurai, H., Era, T., Jakt, LM., Okada, M., Nakai, S., Nishikawa, S., and Nishikawa, S.

In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility.

**Stem Cells** 24: 575-586, 2006.

Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, SI., Okada, T., Hasegawa, M., Ozawa, K., and Hanazono, Y.

Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved.

**Gene Ther.** 12: 203-210, 2005.

Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Okada, Y., Seimiya, H., Fusaki, N., Hasegawa, M., and Fukuda, K.

Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells.

**Cell Stem Cell** 7: 11-14, 2010.

Seki, T., Yuasa, S., and Fukuda, K.

Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus.

**Nat Protoc.** 7: 718-28, 2012.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, GW., Cook, EG., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., and Jaenisch, R.

Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors.

**Cell** 136: 964-977, 2009.

Sommer, CA., Stadtfeld, M., Murphy, GJ., Hochedlinger, K., Kotton, DN., and Mostoslavsky, G.  
Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette.  
**Stem Cells** 27: 543-549, 2009.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K.  
Induced pluripotent stem cells generated without viral integration.  
**Science** 322: 945-949, 2008.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S.  
Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.  
**Cell** 131: 861-872, 2007.

Takahashi, K., and Yamanaka, S.  
Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.  
**Cell** 126: 663-676, 2006.

Tomioka, I., Maeda, T., Shimada, H., Kawai, K., Okada, Y., Igarashi, H., Oiwa, R., Iwasaki, T., Aoki, M., Kimura, T., Shiozawa, S., Shinohara, H., Suemizu, H., Sasaki, E., and Okano, H.  
Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28.  
**Genes Cells**. 15: 959-969, 2010.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, JB., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., and Sasai, Y.  
A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells.  
**Nat. Biotechnol.** 25: 681-686, 2007.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, BE., and Jaenisch, R.  
In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.  
**Nature** 448: 318-324, 2007.

Woltjen, K., Michael, IP., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, HK., and Nagy, A.  
piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells.  
**Nature** 458: 766-770, 2009.

Wu, Y., Zhang, Y., Mishra, A., Tardif, SD., and Hornsby, PJ.  
Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts.  
**Stem Cell Res.** 4: 180-188, 2010.

Wu, Z., Chen, J., Ren, J., Bao, L., Liao, J., Cui, C., Rao, L., Li, H., Gu, Y., Dai, H., Zhu, H., Teng, X., Cheng, L., and Xiao, L.

Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system.

**J. Mol. Cell Biol.** 1: 46-54, 2009.

Yan, Y., Shin, S., Jha, BS., Liu, Q., Sheng, J., Li, F., Zhan, M., Davis, J., Bharti, K., Zeng, X., Rao, M., Malik, N., and Vemuri, MC.

Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells.

**Stem Cells Transl. Med.** 2: 862-870, 2013.

Yu, J., Vodyanik, MA., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, JL., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, GA., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, IL., and Thomson, JA.

Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.

**Science** 318:1917-20, 2007.