

Multilineage-differentiating stress -enduring (Muse) cells are a
primary source of induced pluripotent stem cells in human
fibroblasts.

Multilineage-differentiating stress -enduring (Muse) 細胞は
ヒト皮膚由来線維芽細胞から誘導される iPS 細胞の主要な起源である

目次

1. 要約	4-5
2. 研究背景	6-9
3. 研究目的	
3-1. ヒト成体皮膚由来線維芽細胞およびヒト成体皮膚組織に存在する Muse 細胞の解析	10
3-2. ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導において Muse 細胞が寄与する可能性についての検討	11-12
4. 研究方法	13-29
5. 研究結果	
5-1. ヒト成体皮膚由来線維芽細胞およびヒト成体皮膚組織に存在する Muse 細胞の解析	
5-1-1. ヒト成体皮膚および培養皮膚由来線維芽細胞中に存在する Muse 細胞	30-32
5-2. ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導において Muse 細胞が寄与する可能性についての検討	33-35
5-2-1. 培養ヒト成体皮膚由来線維芽細胞における Muse 細胞と	

non-Muse 細胞からの iPS 細胞誘導	36-39
5-2-2. Muse-iPS 細胞および non-Muse 細胞由来コロニーの比較および 検討	40-41
6. 考察	
6-1. 培養ヒト成体皮膚由来線維芽細胞およびヒト成体皮膚組織に存在 する Muse 細胞の解析	42-43
6-2. ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導において Muse 細胞が 寄与する可能性についての検討	44-47
7. 結論	48-53
8. 文献	54-63
9. 図	64-80
10. 表	81-82
11. 基礎論文と参考論文	83-84
12. 謝辞	85-86

1. 要約

幹細胞研究において、皮膚は最も研究されている組織であり、様々な幹細胞が報告されている。我々はヒト皮膚由来線維芽細胞をストレス条件下で培養することで得られる細胞集団に着目し、詳細な検討を行った。その結果、これらの細胞はヒト多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 をマーカーとして単離でき、自己複製能、多能性幹細胞マーカーの発現、三胚葉性の細胞へ分化する能力を有することが明らかとなり、これらの細胞を Muse (Multilineage-differentiating Stress Enduring) 細胞と名付けた。本研究では Muse 細胞がいくつかの多能性幹細胞の特徴を有することから、この細胞がヒト皮膚由来線維芽細胞から誘導される iPS 細胞の起源となる可能性を考え、以下の検討を行った。培養ヒト皮膚由来線維芽細胞から SSEA-3 をマーカーとして SSEA-3 (+) Muse 細胞と SSEA-3 (-) non-Muse 細胞を単離した後、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 因子をレトロウイルスで導入した。遺伝子導入から 4 日後に、それぞれ 1×10^5 の細胞をフィーダー細胞の上に播き直し、iPS 細胞誘導を行った。30 日後、TRA-1-81 染色、RT-PCR、コロニーピックアップにより、SSEA-3 (+) Muse 細胞および SSEA-3 (-) non-Muse 細胞からの iPS 細胞誘導の評価を詳細に行った。MEF 細胞の上に播き直して 30 日後に、多能性幹細胞マーカーである TRA-1-81 染色を行った結果、SSEA-3 (+) Muse 細胞からのみ陽性コロニーが得られ、RT-PCR により解析した結果、

SSEA-3 (+) Muse 細胞からのみ多能性幹細胞マーカーである endogenous Sox2、Nanog の発現が確認された。また、SSEA-3 (+) Muse 細胞、SSEA-3 (-) non-Muse 細胞由来のコロニーをピックアップし、iPS 細胞の樹立を試みた。すると、SSEA-3 (+) Muse 細胞からのみヒト ES 細胞様コロニーが得られ、多能性幹細胞マーカーの発現、in vitro、in vivo における三胚葉性の細胞への分化が確認出来た。これらのことからヒト皮膚由来線維芽細胞から誘導される iPS 細胞は、SSEA-3 (+) Muse 細胞が起源となっている可能性が考えられる。

2. 研究背景

1998 年に初めて報告された、ヒト胚盤胞の内部細胞塊から樹立された多能性幹細胞である胚性幹細胞 (human embryonic stem cells, ヒト ES 細胞) は、三胚葉性の細胞へと分化する能力を有しておりほぼ無限に増殖させることが可能な細胞であるため、再生医療への応用や新薬開発の観点からさかんに研究されている¹⁾。

ヒト ES 細胞を再生医療への応用を実現するために特定の細胞へと分化誘導させる技術の開発が盛んに行われており、特に難病疾患への細胞移植応用を見据えた分化誘導法が開発が盛んであり、神経細胞や心筋細胞、膵 β 細胞などが効率的に作製されつつある²⁾⁻⁴⁾。しかし使用するヒト ES 細胞は限られたものであり、患者に移植した際の major histocompatibility complex (MHC) 抗原の相違による、免疫拒絶を起こすことが問題点とされている⁵⁾。また、特定の細胞への誘導効率が 100 %ではないため、未分化なヒト ES 細胞の残存による腫瘍形成も懸念されている⁶⁾。さらに、受精卵を材料として使用することで樹立されるため、生命の萌芽を失うことによる倫理問題が議論を呼んでいる^{7), 8)}。そのため、現段階においてヒト ES 細胞の新たな作製を認めない国もある。

一方、2007 年にヒト成体由来の細胞に複数の遺伝子を導入することで、未分化な細胞である ES 細胞と同等の多能性と増殖能力を併せ持つ induced pluripotent stem

(iPS) 細胞の樹立が報告された^{9), 10)}。これまで再生医療研究の主流であったヒト ES 細胞は、受精卵の使用による倫理的問題が議論されてきたが、iPS 細胞はこの問題を解決しうる人工的な多能性幹細胞として世界中から注目を浴びている。また、患者自身の体細胞から iPS 細胞を作製し、そこから特定の細胞へと分化誘導することで、ヒト ES 細胞で問題とされる拒絶反応の問題も解決される可能性がある¹¹⁾⁻¹³⁾。さらに、これまでに有効な治療法がなかった難病に対して発症メカニズムの解析や、薬剤に対する効果を患者個々のレベルで評価することが可能であるため、それぞれの患者に見合った薬剤投与が可能となる。

しかし、iPS 細胞の樹立効率は非常に低いことが知られている^{14), 15)}。貴重な患者の細胞から確実に iPS 細胞を作製するためには、更なる樹立効率の改善が求められている。また、樹立された iPS 細胞は、それぞれの株によって分化能力などに違いがあることも示唆されており、個々の細胞の質が不均一であることも問題となっている^{16), 17)}。そのため、標準的な iPS 細胞の基準を決定することが重要な課題であると考えられる。

iPS 細胞は c-Myc などの発癌遺伝子をレトロウイルスやレンチウイルスなどによって染色体へと組み込むことで、癌細胞と同様の細胞増殖能を持たせた人工的な細胞である⁷⁾。そのため、内在性の遺伝子が失われたり、活性化されるなどの変異が起こることで、がん化の可能性も懸念されている¹⁸⁾。また、遺伝子導入による iPS 細胞誘導

の詳細なメカニズムについても未だ明らかとされていない。さらに、エピジェネティックな修飾や細胞の寿命、分化能力などがヒト ES 細胞とは異なることが報告されている¹⁹⁾。iPS 細胞はヒト ES 細胞に比べて倫理面においてのハードルはなくなったと考えられるが、iPS 細胞の樹立において生物学的に様々な解決すべき問題点が出てきたため、臨床応用へのハードルは高く当初の予定よりも大幅な遅延を生じている。

細胞移植治療は、難病疾患に対して失われた細胞の補充のための有効的な治療方法であると考えられており、いくつかの細胞がその候補として考えられる。成体に存在する幹細胞（組織幹細胞）は、その幹細胞の存在する組織が損傷を受けた場合などにおいて、組織を構成する細胞群に分化することでその組織を修復、維持することを可能とする細胞であると考えられているが、その分化能や役割は限定されており、例えば、造血幹細胞であれば血球系の細胞を作り出し、神経幹細胞であれば神経細胞やグリア細胞を作り出す能力を有する²⁰⁾。一方で、これらの幹細胞は成体にすでに存在する細胞であり人工的なものではないため、臨床での使用において腫瘍化という面で比較的安全であると考えられている。実際に、ドナーと遺伝子型の近い患者に対する骨髓移植や末梢血幹細胞移植、臍帯血由来幹細胞移植などが行われており、一定の成果を収めている²¹⁾。これらの組織幹細胞の中で特殊な幹細胞として間葉系幹細胞が知られている²²⁾。間葉系幹細胞は、様々な細胞種を含む集団から構成されており、自発的

な分化や特定の誘導をかけることによる分化を含め、骨や軟骨、脂肪などの中胚葉性の細胞だけでなく、外胚葉性の細胞である神経細胞や内胚葉性の細胞である肝細胞など、胚葉を超えた分化も報告されている^{23), 24)}。我々はヒト成体骨髄などの間葉系組織に存在する間葉系細胞から、発生学的に同じ由来である中胚葉性の細胞だけでなく、内胚葉性・外胚葉性の細胞にも分化することができる新たな幹細胞の存在を見出した²⁵⁾。これらの幹細胞は、ヒト多能性幹細胞マーカーである stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) をマーカーとして単離することが可能である。また、消化酵素などのストレスに耐性であり、Nanog、Oct3/4、Sox2 といった多能性幹細胞マーカーを発現し、自己複製能、1 細胞から三胚葉性の細胞へと分化する能力を有しているが、腫瘍形成能を持たない幹細胞である。我々は、これらの性状からこの幹細胞を、Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) 細胞と名付け、報告した²⁵⁾。骨髄などに含まれる間葉系細胞は、その多岐にわたる分化能力が報告されているが²³⁾、²⁴⁾、多能性を有する Muse 細胞は、不均一な細胞集団である間葉系細胞の広範な分化転換能を説明する一つの答えとなる可能性が考えられる。

Muse 細胞は間葉系幹細胞中に存在するため容易に採取可能であり、その分化能力からも再生医療の新たな細胞ソースとして期待できる。また、生体由来の細胞であるため腫瘍形成は認められず、安全性という面でその臨床応用が期待されている。

3. 研究目的

3-1. ヒト成体皮膚由来線維芽細胞およびヒト成体皮膚組織に存在する

Muse 細胞の解析

我々が見出した Muse 細胞は、ヒト成体骨髄などの間葉系組織に存在する間葉系細胞からヒト多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 をマーカーとして単離でき、Oct3/4、Nanog、Sox2 といった多能性幹細胞マーカーを発現し、自己複製能、1 細胞から三胚葉性の細胞へと分化する能力を有しているが、腫瘍形成能を持たないといった特徴を有する多能性幹細胞である²⁵⁾。このような多能性幹細胞が骨髄などと同じ間葉系組織であるヒト成体皮膚から樹立された線維芽細胞からも SSEA-3 をマーカーとして単離可能であり、この細胞がすでに報告されている骨髄由来の Muse 細胞と同様の性質を有しているかを検討するとともに、単離された細胞についてフローサイトメトリーや遺伝子発現解析を行うことで、これまでに報告されているヒト成体皮膚由来の様々な幹細胞や前駆細胞との差異について検討することを目的とした。また、多能性幹細胞である Muse 細胞が、培養ヒト皮膚由来線維芽細胞だけでなくヒト成体皮膚組織中に存在するのか、存在するのであればどのような局在を示すかについて、免疫組織化学染色により同定することを目的とした。

3-2. ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導において Muse 細胞が寄与する可能性についての検討

現在、iPS 細胞誘導において、ストカスティックモデルとエリートモデルの二つのモデルが提唱されている²⁶⁾。iPS 細胞は様々な細胞から誘導されているが、ストカスティックモデルは、いかなる体細胞においても iPS 細胞になる可能性を持つと仮定するもので、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog、Lin28 などの因子を導入することで^{9), 10)}、分化した体細胞は初期化され、確率論に従い一部の細胞に置いて完全な初期化が生じることにより多能性を獲得するモデルである。一方、エリートモデルは、特定の細胞のみが遺伝子導入により iPS 細胞になり得るとするモデルである。ストカスティックモデルは広く受け入れられつつあったが、実際のところ厳密な意味での説明はなされていなかった。また、元となる細胞の分化段階や限定された細胞を使用することで誘導効率に影響を与えることが報告されている^{27), 28)}こともあり、エリートモデルの可能性も議論されつつあった²⁹⁾⁻³¹⁾。

我々の報告した Muse 細胞は、成体間葉系組織由来の間葉系細胞からヒト多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 をマーカーとして単離することが可能であり、Oct3/4、Sox2、Nanog といった多能性幹細胞マーカーを発現し、自己複製能や 1 細胞から三胚葉性の細胞へと分化することができる多能性幹細胞である。このように、Muse 細胞は

腫瘍形成が認められないこと以外に iPS 細胞と共通する点が非常に多いことから、iPS 細胞誘導において広く一般的に使用されているヒト皮膚由来線維芽細胞から誘導される iPS 細胞は Muse 細胞が起源となっている可能性を考え、ヒト皮膚由来線維芽細胞から SSEA-3 (+) Muse 細胞と SSEA-3 (-) non-Muse 細胞をそれぞれ単離した後、レトロウイルスにより 4 因子を導入することでそれぞれ iPS 細胞誘導を行い、それぞれの細胞がどのように iPS 細胞へ寄与するかについて詳細に検討を行った。また、4 因子を導入する前の Muse 細胞と non-Muse 細胞、4 因子を導入した Muse 細胞、non-Muse 細胞から iPS 細胞誘導過程において出現する iPS 細胞を含むコロニーについて、その遺伝子発現やエピジェネティックな解析を行い比較することで、ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導におけるメカニズムの解明を試みた。

4. 研究方法

ヒト細胞の使用、遺伝子組換え実験、動物実験は、東北大学専門委員会の指針に基づき、研究計画書を提出し、機関承認を得て実験を実施した。ヒト ES 細胞 (Kyoto hESC-1, KhES-1) は、文部科学省から使用にあたって承認を得た京都大学再生医科学研究所の中畑龍俊教授から供与された。ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導は、高橋らによって報告された方法をもとに行った⁹⁾。また、すべての研究はヘルシンキ宣言に従って実施された。

細胞培養および cluster 形成

本研究において、我々はLonza社とScienCell社から購入したヒト成体皮膚由来線維芽細胞を用いて研究を行った。細胞は10 % FBSと0.1 mg/mlのカナマイシンを含んだ α -minimum Essential Medium Eagle Modification (α -MEM; SIGMA, M4526) 培地を使用し、37 °C、5 % CO₂の条件下で培養した。

単一細胞の浮遊培養では、細胞浮遊液を限界希釈したのち、1細胞ずつ96 wellプレート[®]の各ウェルに播種し、10 % FBSを含んだ α -MEM培地で培養した。位相差顕微鏡を用いて1細胞のみ播種されたウェルを選別し、空のウェルや複数の細胞が入ったウェルは実験から除外した。また、細胞が接着するのを防ぐため、dishの底をpoly

(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA; SIGMA, P3932) によりコーティングして使用した。

ヒト皮膚由来線維芽細胞からSSEA-3をマーカーとしてFACSにより単離された細胞を限界希釈した後、1細胞ずつ96 wellプレートの各ウェルに播種し、10 % FBSを含んだ α -MEM培地で1週間培養した（第一世代のcluster）。第一世代のclusterをdishに接着させ、約5000個になった後、再度1細胞ずつ96 wellプレートの各ウェルに播種し、10 % FBSを含んだ α -MEM培地で培養した（第二世代のcluster）。同様の操作を繰り返すことで、第三世代のclusterまで培養した。

フローサイトメトリーと細胞の単離

Muse細胞の単離およびMuse細胞の性状を解析するために、ヒト成体皮膚由来線維芽細胞を0.25 % trypsin-EDTAで処理し、dishから解離した。その後、カルシウム、マグネシウム不含0.02 M リン酸緩衝生理食塩水で細胞を洗浄した。抗体染色を伴う際には、細胞を 1×10^6 cells/100 μ lの濃度に調整し、FACS buffer（カルシウム、マグネシウム不含0.02 M リン酸緩衝生理食塩水、2 mM EDTA、0.5 % BSA）に懸濁した。細胞の単離には、FACS Aria II（Becton Dickinson）を使用し、ストリーム速度を低く設定することで、細胞の生存率を高く保つ設定で細胞の単離を行った。また、FACSに

よる細胞単離の際には、染色なしのサンプル、二次抗体のみで染色したサンプルを
製し、これらのデータをもとに陽性細胞のゲートを決めた。使用した抗体を以下に記
す。

Anti stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) (1:100; Millipore, MAB4303)

FITC-conjugated anti-rat IgM (1:50; Jackson ImmunoResearch, 112-095-075)

DyLight649-conjugated anti-rat IgM (1:50; Jackson ImmunoResearch, 112-496-075)

Anti CD105 (1:50; Becton Dickinson, 555690)

FITC-conjugated anti-mouse IgG (1:100; Jackson ImmunoResearch, 115-095-071)

Phycoerythrin-conjugated anti CD34 (1:100; Becton Dickinson, 555822)

FITC-conjugated anti von Willebrand factor (1:100; Becton Dickinson, 555849)

Phycoerythrin-conjugated anti CD117 (1:100; Becton Dickinson, 555714)

Phycoerythrin-conjugated anti CD146 (1:100; Becton Dickinson, 550315)

FITC-conjugated anti NG2 (1:100; Becton Dickinson, 554275)

Phycoerythrin-conjugated anti CD271 (1:100; Becton Dickinson, 557196)

Phycoerythrin-conjugated anti CD29 (1:100; Becton Dickinson, 556049)

Phycoerythrin-conjugated anti CD90 (1:100; Becton Dickinson, 555596)

Phycoerythrin -conjugated anti CD31 (1:100; Becton Dickinson, 560983)

免疫組織化学染色

ヒト成体皮膚は、Biopredic Internationalから入手した。組織を4 % パラホルムアルデヒド (PFA) を含む0.1 M リン酸緩衝液で一晩固定し、パラフィンを用いて包埋後、3 μ mの切片を作製した。切片は、0.3 % hydrogen peroxideを含むメタノールで30分インキュベートすることで内在性のペルオキシダーゼ活性を不活性化後、染色を行った。一次抗体にはanti-SSEA-3抗体 (1:50; Millipore) を使用し、二次抗体にはHRP-conjugated anti-rat IgM抗体 (1:100; Jackson ImmunoResearch, 112-035-075) を使用した。SSEA-3の発現は、3,3' -diaminobenzidine (DAB) によるペルオキシダーゼ反応により検出した。

アルカリホスファターゼ染色

7日間培養したMuse細胞由来のclusterを遠心操作により回収後、生理食塩水で数回洗浄した。染色にはLeukocyte Alkaline Phosphatase kit (SIGMA, 86R-1KT) を用いた。まず100 μ lの硝酸ナトリウムと100 μ lのFRVアルカリ溶液を混和し、静置した。この混合液に4.5 mlの蒸留水を加えて混和し、100 μ lのナフトールAS-BI溶液を加えて混合し、これを染色液とした。この染色液を、あらかじめ回収しておいたMuse細胞

由来のclusterに500 μ l加えて、37 °Cで15～20分染色後、顕微鏡にて写真撮影を行った。

免疫細胞化学染色

Muse細胞由来clusterの染色では、4 % PFAを含む0.1 M リン酸緩衝液で固定した後、PBSで3回洗浄し、2200 \times g、5分間遠心することにより細胞ペレットを得た。これにOCTコンパウンドを加えて冷却し、凍結切片作製のサンプルとした。これらのサンプルから、クリオスタットを用いて3 μ mの凍結切片を作製した。

細胞の染色は、サンプルを4 % PFAを含む0.1 M リン酸緩衝液で固定後、blocking buffer（カルシウム、マグネシウム不含0.02 M リン酸緩衝生理食塩水、3 % bovine serum albumin、5 % goat serum、0.2 % TritonX-100）にてブロッキング処理を行い、それぞれの一次抗体をblocking bufferに添加して4 °Cで一晩インキュベートした。その後0.1 M リン酸緩衝液で一次抗体を洗浄後、二次抗体を加えてインキュベーションし、コンフォーカルレーザー顕微鏡 DIGITAL ECLIPSE C1（Nikon）を用いて観察を行った。

TRA-1-81染色は、サンプルを4% PFAを含む0.1 M リン酸緩衝液で固定し、抗TRA-1-81抗体で染色後、二次抗体にはHRP-conjugated anti-rat IgM抗体を用いて反応させ、DAB反応により検出した。

Anti Nanog (1:100; Chemicon, AB5731)

Anti Oct3/4 (1:100; 大阪大学発生遺伝学グループ、濱田博司教授から供与)

Anti Sox2 (1:100; Abcam, AB5603)

Anti SSEA-3 (1:50; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa)

Anti smooth muscle actin (1:100; SMA, Lab Vision, MS-113-P0)

Anti neurofilament-M (1:100; NF-M, Millipore, AB1987)

Human α -fetoprotein (1:100, α -FP, DAKO, N1501)

Nestin (1:100; Millipore, MAB5326)

Musashi (1:100; Millipore, AB5977)

NeuroD (1:100; Millipore, AB5688)

MAP2 (1:100; Biogenesis, 6242-0039)

Osteocalcin (1:100; R&D Systems, MAB1419)

TRA-1-81 (1:100; SantaCruz, sc-21706)

テロメラーゼ活性の測定

テロメラーゼ活性は、Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) 法に準じて、TRAPEZE XL telomerase detection kit (Millipore, S7707) を用いて測定した。測定したい細胞をCHAPS溶液に溶解し、遠心分離後、上清にTRAPEZE XL reaction mixtureを加え、72℃で3分のextension step後、94 °Cで30秒、59 °Cで30秒、72 °Cで1分を36サイクルでPCRを行った。PCR反応のpolymeraseにはEx Taq polymerase (TaKaRa, RR001A) を用いた。PCR後の蛍光強度はマイクロプレートリーダー (Tecan) を用いて測定した。

RT-PCR

細胞からNucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel, 740902.10) を用いて、total RNAを抽出した。ゼラチンコートしたdishに接着したclusterから増殖、分化した細胞に溶解液を加え、NucleoSpin Filterにかけ、ライセートの清澄化を行った。このサンプルをシリカメンブレンに通し、DNAおよびtotal RNAの回収を行った。その後、DNase処理によりDNAのみを切断後、total RNAを溶出した。溶出されたtotal RNAから、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, 11754-050) を用いてcDNAを合成した。PCR反応には、Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa) を使用した。ポジティブコ

ントロールとして、Human whole embryosのtotal RNA (Clontech, 636185) を用い、
 α -FPのポジティブコントロールとしてHuman fetal liverのtotal RNA (Clontech,
636540) を用いた。下記のプライマーを使用した。

Brachyury: sense, 5' -ACCTTCATGTGAAGCAGCAA-3'

antisense, 5' -CTCCACAGTTGGGTTCATCTGTAA-3'

Nkx2.5: sense, 5' -GGGACTTGAATGCGGTTTCAG-3'

antisense, 5' -CTCATTGCACGCTGCATAATC-3'

Human α -FP: sense, 5' -CCACTTGTTGCCAACTCAGTGA-3'

antisense, 5' -TGCAGGAGGGACATATGTTTCA-3'

MAP2: sense 5' -ACTACCAGTTTCACACCCCCTTT-3

antisense, 5' -AAGGGTGCAGGAGACACAGATAC-3'

GATA6: sense, 5' -CCTGCGGGCTCTACAGCAAGATGAAC-3'

antisense, 5' -CGCCCCTGAGGCTGTAGGTTGTGTT-3'

Human albumin: sense, 5' -AAATGAAGATCAAAAGCTTAT-3'

antisense, 5' -TACCGAAGTGAATAAGAGAGAA-3'

Human β -actin: sense, 5' -GGATCAGCAAGCAGGAGTATGA-3'

antisense, 5' -AATGCTATCACCTCCCCTGTGT-3'

Mouse β -actin: sense, 5' -ACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATGAC-3'

antisense, 5' -CCGCTCGTTGCCAATAGTGATGACCT-3'

Sox10: sense, 5' -GAGAAGGAGGTTGACTGTTGCA-3'

antisense, 5' -GCATGTCAGACCCTCACTATCTGT-3'

Snail: sense, 5' -AATCGGAAGCCTAACTACAGCGAG-3'

antisense, 5' -CCTTCCCACTGTCCTCATCTGACA-3'

Slug: sense, 5' -CCTTCCTGGTCAAGAAGCATTTCA-3'

antisense, 5' -AGGCTCACATATTCTTGTCACAG-3'

Dct: sense, 5' -TGAACGGGACAAACGCTTT-3'

antisense, 5' -GCCAAGTTGGTCTGAGGTAA-3'

Tyrp1: sense, 5' -ACCCTGCTGTTCTGAAGTCTT-3'

antisense 5' -AGCGCCAACTACTGCTATGG-3'

Dnmt3b: sense, 5' -TGCTGCTCACAGGGCCCGATACTTC-3'

antisense, 5' -TCCTTTGAGCTCAGTGCACCACAAAAC-3'

Abcg2: sense, 5' -TACCTGTATAGTGTACTTCAT-3'

antisense, 5' -GGTCATGAGAAGTGTTGCTA-3'

Cdx2: sense, 5' -AAGGCTTGGCTGGTGTATGC-3'

antisense, 5' -CACAGACCAACAACCCAAACAG-3'

その他の多能性マーカーに対するプライマーは、高橋らの報告を参考にした⁹⁾。

核型解析

第三世代のMuse細胞由来clusterから得られた細胞の核型は、分裂中の細胞から空
気乾燥法により染色体標本を作製し、キナクリン・ヘキスト二重染色法を用いて実験
動物中央研究所（ICLAS）において核型解析された。

in vitroにおけるMuse細胞由来clusterの分化誘導

Muse細胞から形成されたclusterを接着培養し、増殖させた。増殖した細胞を回収
し、4つに分けてそれぞれの分化誘導を行った。

神経細胞への分化は、 1×10^5 cells/cm²の細胞密度に調整し、B27サプリメント
(Invitrogen, 17504044)、30 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Peprotech,
100-18B)、30 ng/ml epidermal growth factor (Peprotech, AF-100-15) を含む
Neurobasal medium (Invitrogen, 21103-049) に懸濁し、poly-HEMAコートされたdish
上で7日間培養することで、sphere形成を行った。形成されたsphereをpoly-L-Lysin
コートされたガラスに接着させ、2 % FBS、25 ng/ml bFGF、25 ng/ml brain-derived

neurotrophic factor (BDNF; Peprotech, 450-02) を含む α -MEM 培地で10日間培養することにより、神経細胞への分化誘導を行った。

脂肪細胞、骨細胞への分化には、Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems, sc006) を使用した。

脂肪細胞への分化は、 2.1×10^4 cells/cm²の細胞密度に調整し、10 % FBS、adipogenic supplementを加えた分化培地で2～3週間培養を行った。

骨細胞への分化には、 4.2×10^3 cells/cm²の細胞密度に調整し、10 % FBS、osteogenic supplementを加えた分化培地で2～3週間培養を行った。

肝細胞への分化は、すでに報告されている方法を参考に誘導を行った²⁴⁾。 2×10^4 cells/cm²の細胞密度に調整し、10 % FBS、 $10 \times$ insuline-transferrin-selenium (Invitrogen, 51300-044)、10 nM dexamethasone (Sigma, D1756)、100 ng/ml hepatocytes growth factor (Peprotech, 100-39)、50 ng/ml FGF-4を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, 10313021) 培地に懸濁して、コラーゲンコートされたdish上で14日間培養した。

レトロウイルスベクターの構築

本研究において、iPS細胞を誘導するためのレトロウイルスベクターは、すでに報告されている方法を参考にした^{9), 32), 33)}。4因子別々のレトロウイルスベクターは、ヒトOct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc遺伝子のORFを、制限酵素サイト（BamHI、EcoRI）を付加したプライマーを用いてPCRにより増幅させ、pMXsベクターにそれぞれ挿入することでレトロウイルスベクターを作製した。

4因子とGFPを単一のベクターで導入するために、ヒトOct3/4、Sox2、Klf4、c-MycおよびGFP遺伝子を、この順番で、すべてself-cleaving 2A peptide（2Aペプチド）で繋げたポリシストロニックベクターを作製した。それぞれの因子を、制限酵素サイト（BamHI、Mf1I、MluI）および2Aペプチドを付加したプライマーを用いてPCRにより増幅させ、制限酵素で切断した後、pMXsレトロウイルスベクターへと挿入した。2Aペプチドで繋いだ4因子を挿入後、EGFPを制限酵素サイト（Mf1I、SalI）および2Aペプチドを付加したプライマーを用いてPCRにより増幅させ、4因子の後ろに繋いだ。

使用した2Aペプチドを構成する塩基配列は、下記に記す。

T2A1: GAGGGCAGAGGCAGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAAAACCTGGCCCT

T2A2: GAGGGACGCGGCTCCCTGCTCACCTGTGGAGATGTGGAAGAGAACCCAGGCCCC

T2A3: GAAGGCAGAGGCTCTCTGCTGACATGTGGGGATGTGGAGGAAAATCCTGGCCCT

T2A4: GAAGGTAGGGGAAGTTTGCTTACTTGCGGTGACGTGAAGAGAATCCAGGACCA

ウエスタンブロッティング

ポリシストロニックベクターを用いて作製したレトロウイルスを、ヒト皮膚由来線維芽細胞に感染させた。感染から5日後に、1 mlの10 mM Tris-HCl (pH7.5)、75 mM NaCl、0.5 % TritonX-100、15 % Glycerol、2 % SDS、50 mM DTT、5 mM EDTA、1×Complete (Roche, 11697498001) を含むlysis bufferにより溶解し、100 °Cで10分間沸騰させることでサンプルとした。また、コントロールとして無処理のヒト皮膚由来線維芽細胞を準備し、同様の方法を用いてサンプリングを行った。これらのサンプルを、10 % SDSを含む10 % アクリルアミドゲルを用いて泳動した。泳動されたタンパクを、セミドライ転写装置を用いてImmobilon-Pメンブレン (Millipore, IPVH00010) へと転写した。転写したメンブレンを、5 % skim milk (Nacalai tesque, 31149-75) を含むTBST (20 mM Tris-HCl (pH7.5)、136 mM NaCl、0.05 % Tween-20) によりブロッキングした後、それぞれの一次抗体を加えて4 °Cで一晩インキュベートした。翌日メンブレンをTBSTで洗浄後、HRP標識された二次抗体を加えて、室温で1時間インキュベートした。その後TBSTで洗浄した後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, RPN2109) を用いて化学発光させ、LAS-4000 mini (FUJIFILM) にて検出を行った。

使用した抗体を以下に記す。

Anti Oct3/4 (1 : 200; SantaCruz, sc-9081)

Anti Klf4 (1 : 500; Abcom, AB26648)

Anti Sox2 (1 : 1000; Abcom, AB59776)

Anti Myc (1 : 500; Abcom, AB39688)

HRP-conjugated anti-rabbit IgG抗体(1:5000, Jackson ImmunoResearch, 111-035-144)

iPS細胞誘導および胚様体形成による自発的分化

iPS細胞誘導は、すでに報告されている方法を用いて行った⁹⁾。作製した4つのプラスミドをパッケージング細胞であるPLAT-A細胞へ、別々に遺伝子導入した。48時間後に培養上清を回収し、8000×gで4℃、16時間遠心することで、レトロウイルスを濃縮した。Muse細胞とnon-Muse細胞へのレトロウイルスの導入効率をGFPにより測定し、導入効率はMuse細胞で 69.9 ± 0.7 %、non-Muse細胞で 69.0 ± 3.7 %であった。

ウイルスを感染させる前日に、単離したMuse細胞とnon-Muse細胞を 2×10^5 cells/60 mm dishの細胞密度で播種した。翌日、4 μ g/ml Polybrene (Nacalai tesque, 17736-44)を含む培地にウイルス溶液を添加し、遺伝子導入を行った。24時間後、ウイルスを含んだ培地を除去し、新たな培地で4日間培養した。その後細胞を剥離し、 1×10^5

cells/100 mm dishの細胞密度で、不活性化したmouse embryonic fibroblasts (MEFs) の上に播種した。翌日、培地を4 ng/ml bFGFを含むPrimate ES cell medium (ReproCELL, RCHEMD001) へと交換した。一日おきに培地交換を行い、30日間培養後、TRA-1-81染色、total RNAの回収、コロニーピックアップを行った。

樹立したiPS細胞を小さくカットし、bFGFを含まないPrimate ES cell mediumに懸濁し、poly-HEMAコートしたdishに播種し、10日間浮遊培養を行うことで胚様体形成を行った。その後、形成した胚様体をピックアップし、ゼラチンコートしたdish上に播種することで接着培養を行い、自発的な分化を行った。

免疫不全マウスの精巣への細胞移植

1×10^5 cellsのMuse細胞由来clustersを0.02M PBSに懸濁し、ガラスピペットを用いて8週齢のNOGマウス (NOD/Shi-scid IL-2R γ KO Jicマウス) の精巣へと移植した (n=3)。移植から6ヶ月後にマウスを屠殺した。ポジティブコントロールとしてマウスES細胞を (n=3)、ネガティブコントロールとしてマイトマイシンCにより不活性化させたMEFsを移植した (n=3)。Muse細胞由来iPS細胞は、60 mm dishでコンフルエントの細胞を5等分して精巣へと移植した。移植から12週間後にマウスを屠殺した。

定量RT-PCR

Non-Muse細胞、Muse細胞、non-Muse細胞由来コロニー、Muse細胞由来iPS細胞、ヒトES細胞を定量RT-PCRにより解析した。RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを回収し、RT² First Strand Kit (SA Biosciences, 330401) を用いてcDNAの合成を行い、SYBR GreenとリファレンスDyeを含むRT²マスターミックスとカスタマイズしたプライマー (SA Biosciences) を混合し、Applied Biosystemsの7300 real-time PCRを用いてPCR反応を行った。また、得られたCt値から $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて遺伝子発現のFold Changeを解析した。

バイサルファイトシーケンス

Non-Muse細胞、Muse細胞、non-Muse細胞由来コロニー、Muse細胞由来iPS細胞の、Nanog、Oct3/4のプロモーター領域におけるメチル化を解析した。Non-Organic DNA Extraction Kit (Millipore, S4520) を用いてそれぞれの細胞からゲノムDNAを回収した。回収したゲノムDNAにバイサルファイト処理を行うことで、非メチル化シトシンのみがウラシルに変換され、シーケンス反応としてウラシルはチミンとして表現され、バイサルファイト処理前後で生じるNanog、Oct3/4のプロモーター領域のシトシンとチミン(ウラシル)の差異を配列データとして得た。このバイサルファイト修飾

反応には、BisulFast DNA Modification Kit (Toyobo, MDD-101T) を用いた。また、使用したNanog、Oct3/4のプロモーター領域のゲノムシーケンスは、すでに報告されている部位を用いて解析した^{9), 34)}。

5. 研究結果

5-1. ヒト成体皮膚由来線維芽細胞およびヒト成体皮膚組織に存在する

Muse 細胞の解析

5-1-1. ヒト成体皮膚および培養皮膚由来線維芽細胞中に存在する Muse

細胞

以前、我々はヒト ES 細胞などの多能性幹細胞マーカーであり、膜表面に発現する糖脂質である SSEA-3^{1), 25)} をマーカーとして培養ヒト間葉系幹細胞から、また SSEA-3 と間葉系幹細胞マーカーである CD105 の二重陽性として直接ヒト骨髓液から FACS を用いることで Muse 細胞が単離できることを報告した²⁵⁾。

ヒト成体皮膚由来線維芽細胞において、SSEA-3 陽性率は細胞の継代数や細胞密度により影響を受ける。我々は 70~80% の密度で培養された細胞を使用した場合、SSEA-3 陽性率は 1~2% であることを明らかにした (図 1. A-C)。ヒト成体皮膚には、skin-derived precursor (SKPs)、neural crest-derived stem cells (NCSCs)、melanoblasts、perivascular cells (PCs)、endothelial progenitors (EPs)、adipose-derived stem cells (ADSCs)^{35) -42)} など様々な幹細胞や前駆細胞が存在しており、培養ヒト成体皮膚由来線維芽細胞にもこれらの細胞が含まれている可能性がある。そこで我々は、Muse 細胞において NG2 (PCs のマーカー)、CD34 (EPs と ADSCs)、

von Willebrand factor (EPs)、CD31 (EPs)、CD117 (melanoblasts)、CD146 (PCs と ADSCs)、CD271 (NCSCs)、Sox10 (NCSCs)、Snail (SKPs)、Slug (SKPs)、Tyrp1 (melanoblasts) そして Dct (melanoblasts) などの発現を解析した。その結果、これらのマーカーはフローサイトメトリー解析および RT-PCR の両方で Muse 細胞からは検出されなかったことから、ヒト成体皮膚に存在する Muse 細胞は、これらの幹細胞や前駆細胞とは異なることが明らかとなった (図 1. E-L)。

さらに我々は、ヒト皮膚組織において SSEA-3 陽性である Muse 細胞の局在を知るために免疫組織化学染色を行った。その結果、Muse 細胞は真皮および皮下組織に存在する結合組織に局在していた。また、ほとんどの場合において Muse 細胞は結合組織中に散在し、血管や真皮乳頭のような特別な構造とは関連していないことが明らかとなった (図 1. M-O)。さらにフローサイトメトリー解析により、すべての SSEA-3 陽性細胞が間葉系マーカーである CD29 や CD90 (図 1. P, Q)、そして CD105 (図 1. D) を発現していることが確認された。CD105 は確立された間葉系幹細胞マーカーであるが、フローサイトメトリー解析の結果、この研究で使用したヒト成体皮膚由来線維芽細胞は CD105 陽性率が $96.7 \pm 0.20\%$ (図 1. R) であり、すべての細胞が陽性であるとは限らないことが実証された。

近年、very small embryonic-like stem cells (VSELs) が、CD34⁺/Lin⁻/CD45⁻の非

造血細胞画分として、ヒト臍帯血および末梢血から同定された^{43), 44)}。これらの細胞は、間葉系細胞集団に属していないため、CD29、CD90、CD105 などの間葉系細胞マーカーを発現していない⁴⁵⁾。一方、Muse 細胞は骨髄間葉系幹細胞およびヒト皮膚由来線維芽細胞から同定された細胞であり、CD29、CD90、CD105 などの間葉系幹細胞マーカーを発現しているが（図 1. D, P, Q）、CD34 を発現していない（図 1. F）。これらの結果は、Muse 細胞は VSELs とは異なる細胞集団であることを示している。

5-1-2. ヒト皮膚由来線維芽細胞から単離された Muse 細胞の特徴

培養ヒト成体皮膚由来線維芽細胞から SSEA-3 陽性である Muse 細胞と、SSEA-3 陰性である non-Muse 細胞を FACS によってそれぞれ単離し、限界希釈後に一細胞ずつ浮遊培養を行った。10 日後、Muse 細胞の $63.3 \pm 5.4\%$ がヒト ES 細胞由来の胚様体に良く似た細胞塊を形成した (図 2. A, B)。対照的に、non-Muse 細胞から細胞塊は形成されなかった。Muse 細胞由来の直径 $25 \mu\text{m}$ 以上の細胞塊は一貫してアルカリホスファターゼ (ALP) 陽性 (図 2. C) であり、多能性幹細胞マーカーである Nanog、Oct3/4、Sox2、SSEA-3 も陽性であった (図 2. D-G)。これらの結果は、以前の報告と同様の傾向を示した²⁵⁾。また、これらの細胞塊を Muse cell-derived clusters (M-Clusters) と名付けた。

免疫細胞化学染色により M-Clusters において多能性幹細胞マーカーの発現が確認されたが (図 2. D-G)、定量的 RT-PCR により、その発現量は一般的な多能性幹細胞であるヒト ES 細胞 (hES) と比較して非常に低かった (表. 1)。例えば、Oct3/4 の発現量はおおよそ 1/100 であり、Nanog や Sox2 は 1/1000 未満であった。

免疫不全マウスの精巣に M-Clusters と、コントロールとしてマウス ES 細胞、フィーダー細胞を移植し、テラトーマを形成するか検討した。その結果、マウス ES 細胞は 4 週でテラトーマを形成したが (図 2. H1)、フィーダー細胞と M-Clusters は 6 週

月経過しても奇形腫を形成することはなかった（図 2. H2, 3, 4）。さらに、Muse 細胞と M-Clusters は低いテロメラーゼ活性を示したことから、細胞分裂に限界があることが示唆された（図 2. I）。

一細胞から得られた M-Clusters を、ゼラチンコートした dish に張り付かせて 7 日間培養することにより、自発的な分化を試みた。すると、smooth muscle actin (SMA)（中胚葉）（図 3. A 緑）、neurofilament (NF)（外胚葉）（図 3. A 赤）、 α -fetoprotein（ α -FP）（内胚葉）陽性の細胞へと分化し（図 3. B）、三胚葉性の細胞へ分化する能力を有していることも確認された⁹⁾。また、第一世代 M-Clusters、第三世代 M-Clusters を自発的に分化させて RT-PCR により解析した結果、MAP2（外胚葉）、Brachyury (Brachy)、Nkx2.5（中胚葉）、GATA6、 α -FP（内胚葉）を発現していることが確認された（図 3. C）⁹⁾。これらの結果から、一細胞の Muse 細胞は自己複製能を有しており、自発的に外胚葉、中胚葉、内胚葉性の三胚葉性の細胞へと分化することができることが示された。

また、繰り返し 1 細胞からの浮遊培養を繰り返すことで得られる第三世代 M-Clusters は、核型に異常な変化は見られなかった（図 3. D）。

我々は、確立された誘導方法により、Muse 細胞の分化誘導がコントロールできるか検証した。限界希釈後に一細胞から形成された M-Cluster を接着培養により拡張させた後、これらの細胞を 4 つに分けて、神経細胞（外胚葉）^{23), 46)}、脂肪細胞（中胚葉）

²³⁾、骨細胞（中胚葉）²³⁾ そして肝細胞（内胚葉）²⁴⁾ へと分化させた。神経誘導した細胞から形成された sphere は、神経幹細胞マーカーである Nestin、Musashi、NeuroD 陽性細胞を含んでおり（図 4. A-C）、これらの sphere を分化培地で培養することで、MAP2 陽性細胞へと分化することが明らかとなった（図 4. D、陽性率は $89.2 \pm 5.7\%$ ）。脂肪細胞誘導では、オイルレッド O により染色される脂肪滴を持った細胞 ($90.1 \pm 4.9\%$) が誘導された（図 4. E, F）。骨細胞誘導では、osteocalcin 陽性の細胞 ($97.3 \pm 3.5\%$) が誘導された（図 4. G）。肝細胞誘導では、 α -fetoprotein (α -FP) 陽性の細胞 ($87.4 \pm 7.6\%$) が誘導され（図 4. H）、RT-PCR においても、 α -FP と albumin の発現が確認された（図 4. I）。また、未分化状態の Muse 細胞ではこれらのマーカーを発現していないことが、免疫細胞化学染色および RT-PCR により確認された（図 4. J-T）。

5-2. ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導において Muse 細胞が寄与する可能性についての検討

5-2-1. 培養ヒト成体皮膚由来線維芽細胞における Muse 細胞と non-Muse 細胞からの iPS 細胞誘導

培養ヒト成体皮膚由来線維芽細胞から、SSEA-3 をマーカーとして Muse 細胞と non-Muse 細胞を単離した。以前報告された方法により、単離されたそれぞれの細胞へ、レトロウイルスによって Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc を導入した⁹⁾。遺伝子導入から 5 日後に、不活性化させた mouse embryonic fibroblast (MEFs) の上に、 1×10^5 細胞 / 10 cm dish の密度で細胞を播種した。30 日後、それぞれの細胞からコロニーは得られたが、non-Muse 細胞に比べて Muse 細胞からは約 8 倍のコロニーが形成された。さらに、Muse 細胞からのみヒト多能性幹細胞マーカーであり、iPS 細胞誘導において信頼性のあるマーカーである TRA-1-81⁴⁷⁾ で陽性反応を示す、ヒト ES 細胞様のコロニーが得られた (図 5. A, A1, A3)。対照的に、non-Muse 細胞からは TRA-1-81 陽性コロニーは一つも得られなかった (図 5. A, A2)。コロニーピックアップをする前の dish 上にあるすべてのコロニーと細胞から RNA を回収し、RT-PCR を行った。すると、内在性の Sox2 や Nanog は Muse 細胞からのみ検出されたのに対し、non-Muse 細胞からは検出されなかった (図 5. B)。

Muse 細胞と non-Muse 細胞から得られた堅くつまったコロニーをピックアップし、継代を行うことで iPS 細胞の樹立を試みた。Muse 細胞からはヒト ES 細胞に似た平らな形態を示すコロニーが得られたのに対し（図 5. C, C1）、non-Muse 細胞からはヒト ES 細胞とは全く異なる形態のコロニーしか得られなかった（Fig. 3D、D1）。3 回継代した後、それぞれ代表的な 2 つの堅くつまったコロニーについて、RT-PCR により遺伝子発現の解析を行った。単一の要因でのみ iPS 細胞誘導の評価を行うことは不十分であると考えられるため^{48), 49)}、RT-PCR により iPS 細胞において重要である内在性の Oct3/4、内在性の Sox2、Nanog といった 3 つの因子において遺伝子発現の解析を行った。その結果、Muse 細胞由来コロニーからのみ内在性の Oct3/4、内在性の Sox2、Nanog の発現が確認され、Muse 細胞からは iPS 細胞（Muse-iPS）が誘導され、non-Muse 細胞からは iPS 細胞は誘導されないことが明らかとなった（図 5. E）。また、non-Muse 細胞由来コロニー（non M-1、non M-2）は、内在性の Oct3/4 や内在性の Sox2、Nanog を発現していないことに加え、Rex1 や Abcg2、Dnmt3b、Cdx2 も発現していなかった（図 5. E）。これらの因子は、不完全にリプログラミングされた細胞では発現しておらず、完全にリプログラミングされた iPS 細胞でのみ発現している因子である⁴⁹⁾。このことから、non-Muse 細胞からは iPS 細胞誘導の初期段階のコロニーのみ誘導されていることが示唆された。

Muse-iPS 細胞は、免疫細胞化学染色によっても Nanog、Oct3/4、Sox2、TRA-1-81 の発現が確認された (図 5. F-I)。対照的に、non-Muse 細胞由来コロニーにおいてはこれらの因子の発現は認められなかった (図 5. J-M)。ヒト成体皮膚由来線維芽細胞を用いた場合、iPS 細胞の誘導効率は約 0.001 %であった。これに対してヒト成体皮膚由来線維芽細胞から単離した Muse 細胞を用いた場合、Muse-iPS 細胞は約 0.03 %の効率で樹立され、誘導効率は約 30 倍に上昇した。

Non-Muse 細胞から iPS 細胞が誘導されなかったのは、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 つの因子を別々のレトロウイルスにより導入したことにより、4 因子のうち導入されていない遺伝子が存在したために引き起こされた可能性がある。最近、4 つの因子すべてをコードするポリシストロニックベクターによって、iPS 細胞が誘導された^{32), 33)}。そこで、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc の 4 つの因子と GFP を一つのベクターに搭載したポリシストロニックベクターを作製し (図 6. A)、Muse 細胞、non-Muse 細胞に遺伝子導入を行い、iPS 細胞が誘導されるか検討した。遺伝子導入された細胞は、GFP 陽性細胞のみを FACS により単離し iPS 細胞誘導を行った。また、導入された 5 因子の細胞内タンパク発現は、ウェスタンブロッティングにより確認した (図 6. B)。

MEFs の上に播種してから 30 日後、コロニーピックアップを行う前の段階で、RT-PCR により内在性の Oct3/4 と内在性の Sox2、Nanog などの遺伝子発現解析を行った結果、

Muse 細胞からは全ての因子の発現が確認されたのに対して、non-Muse 細胞からはこれらの遺伝子発現は確認されなかった (図 6. C)。また、ピックアップ後のコロニーにおいても、Muse 細胞由来 iPS 細胞 (M iPS-1, M iPS-2, M iPS-3) は全ての因子の発現が確認されたが、non-Muse 細胞由来コロニー (Non M col-1, Non M col-2, Non M col-3, Non M col-4) では内在性の Oct3/4、内在性の Sox2、Nanog および Utf1、Rex1、Abcg2、Dnmt3b、Cdx2 の発現も確認されなかった (図 6. D)。これらの結果は、4 つの因子を別々に導入した際の結果と同じであった。

5-2-2. Muse-iPS 細胞および non-Muse 細胞由来コロニーの比較および

検討

次に Muse-iPS 細胞の特性について評価した。Muse-iPS 細胞から浮遊培養により得られた胚様体の *in vitro* における分化能を免疫細胞化学染色、RT-PCR により解析した。その結果、Neurofilament (NF)、MAP2 を発現する外胚葉性の細胞、smooth muscle actin (SMA)、Brachyury (Brachy)、Nkx2.5 を発現する中胚葉性の細胞、 α FP、GATA-6 を発現する内胚葉性の細胞へと分化していることが確認された (図 5. N-P)。さらに Muse 細胞とは対照的に、Muse-iPS 細胞は免疫不全マウスの精巣へと移植すると奇形腫を形成した (図 5. Q-T)。

次に、多能性関連遺伝子群および細胞増殖関連遺伝子群について、定量 RT-PCR により Muse 細胞 (Muse)、non-Muse 細胞 (non-Muse)、Muse-iPS 細胞 (M-iPS)、non-Muse 細胞由来コロニー (non-M col)、ヒト ES 細胞について遺伝子発現解析を行った (表 1)。それぞれの遺伝子発現パターンや発現量は、Muse-iPS 細胞、ヒト ES 細胞においてほぼ同様であった。Muse 細胞 (Muse) における Nanog、Oct3/4、Sox2 といった遺伝子の発現量は Muse-iPS 細胞 (M-iPS) の方が高く発現していた。対照的に、non-Muse 細胞由来コロニー (non-M col) では、4 因子が導入されているにもかかわらず、これらの遺伝子群の発現上昇は認められなかった。Muse 細胞 (Muse) と比較して、Muse-iPS

細胞（M-iPS）では細胞増殖関連遺伝子群の発現向上が認められた。Non-Muse 細胞由来コロニー（non-M col）においても non-Muse 細胞（non-Muse）と比べていくつかの細胞増殖関連遺伝子は発現向上していた。しかし、Muse-iPS 細胞（M-iPS）ほど広範囲な発現の向上は認められなかった（表. 1）。

Nanog および Oct3/4 のプロモーター領域のシトシン・グアニン・ジヌクレオチドは、Muse 細胞（Muse）において部分的にメチル化されており、Muse-iPS 細胞（Muse-iPS）では完全に脱メチル化されていた（図 5. U）。プロモーター領域のメチル化レベルの変化は、定量 RT-PCR で実証されているように Muse-iPS 細胞（Muse-iPS）における Nanog、Oct3/4 のより高い発現量を反映している可能性がある。一方で、non-Muse 細胞（non-Muse）は、Muse 細胞（Muse）に比べて Nanog、Oct3/4 のプロモーター領域がメチル化されており、Muse-iPS 細胞（Muse-iPS）において見られる脱メチル化は、non-Muse 細胞由来コロニー（non-M-colony）において認められなかった。

6. 考察

6-1. 培養ヒト成体皮膚由来線維芽細胞およびヒト成体皮膚組織に存在する Muse 細胞の解析

培養ヒト皮膚由来線維芽細胞およびヒト皮膚組織において、骨髄由来 Muse 細胞と同等の性質を有する Muse 細胞が存在することが明らかとなった。ヒト成体皮膚には様々な幹細胞や前駆細胞が存在するが³⁵⁾⁻⁴²⁾、Muse 細胞はそれぞれのマーカーを発現していないため、新たな多能性幹細胞であると考えられる (図 4. J-N)。また、間葉系マーカーである CD105 は、培養ヒト皮膚由来線維芽細胞のすべての細胞において発現しているわけではないため (図 1. R)、Muse 細胞は SSEA-3 と CD105 の二つのマーカーを用いて単離することで、より正確に単離することができると考えられる (図 1. C, D)。

培養ヒト皮膚由来線維芽細胞から、SSEA-3 をマーカーとして単離された Muse 細胞は浮遊培養を行うことで、一細胞からヒト ES 細胞由来の胚様体に良く似た M-Cluster を形成し、多能性幹細胞マーカーである Nanog、Oct3/4、Sox2 を発現していた (図 2. A-G)。しかし、一般的な多能性幹細胞であるヒト ES 細胞と比較して、Muse 細胞における多能性幹細胞マーカーの発現量は低かった (表. 1)。また、Muse 細胞は、浮遊培養と接着培養を繰り返すことで第三世代まで M-cluster を形成することが確認され、

第三世代の M-Cluster においても三胚葉性の細胞への分化能が確認されたことから

(図 3. C)、自己複製能を持った幹細胞であると考えられる。さらに、Muse 細胞は、一細胞から形成された M-Cluster を、確立された分化誘導方法を用いることで、高効率で三胚葉性の細胞への分化をコントロールすることができた (図 4. A-H)。しかし、テロメラーゼ活性が低く、一般的な多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞とは異なり、免疫不全マウスの精巣に移植しても奇形腫を形成しなかった (図 2. H, I)。

ある条件下で培養された epiblast stem cells は多能性幹細胞であるとみなされているが、免疫不全マウスの精巣へ移植しても奇形腫を形成しないことが知られている⁵⁰⁾。このことは、すべての多能性幹細胞が腫瘍形成能を有しているわけではないことを意味しており、Muse 細胞もこの細胞の性質により近い多能性幹細胞であると推測される。また、本研究において、ヒト皮膚組織においても SSEA-3 陽性である Muse 細胞が、結合組織内に散在性に存在することが明らかとなった (図 1. M-0)。すでに報告されている移植実験の結果をふまえると²⁵⁾、多能性幹細胞である Muse 細胞が生体内において repairing cell として組織の恒常性の維持に関与している可能性が示唆された。

6-2. ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導において Muse 細胞が寄与する可能性についての検討

Muse 細胞は、腫瘍形成することではなく、テロメラーゼ活性が低いという点が iPS 細胞とは異なるが、他のいくつかの点において iPS 細胞に似た特性を有している。我々は、培養ヒト皮膚由来線維芽細胞から Muse 細胞と non-Muse 細胞を単離し、iPS 細胞誘導を行った。その結果、iPS 細胞は Muse 細胞からのみ誘導され、non-Muse 細胞からは iPS 細胞は誘導されなかった (図 5. A-E)。このことから、ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導は、Muse 細胞が起源となっていると考えられる。

Byrne らは、ヒト線維芽細胞に存在する SSEA-3 陽性細胞からのみ iPS 細胞が誘導されるという非常に重要な報告を行った²⁹⁾。しかしながら、オリジナルの SSEA-3 陽性細胞の特性について完全に解明されておらず、この細胞集団からの iPS 細胞誘導のプロセス、つまり分化能や自己複製能は山中 4 因子の導入によって引き起こされたものなのか、あるいはもともと細胞が持っていた特性なのかは不明瞭のままであった。本研究において我々は、成体ヒト皮膚由来線維芽細胞において Muse 細胞の存在を明らかにし、その分化能や自己複製能は、山中 4 因子の導入によって新たに獲得したわけではないことを明らかにした。さらに、Muse 細胞が Muse-iPS 細胞になることで、奇形腫形成能を示し、多能性関連遺伝子の発現レベルが向上することを明らかにした。

(図 5. Q-T, 表. 1)。今後、Muse 細胞と Muse-iPS 細胞のさらなる解析により、ヒト皮膚由来線維芽細胞からの iPS 細胞誘導メカニズムについて深く理解できると考えられる。

定量 RT-PCR によって、Muse 細胞の多能性関連遺伝子群の発現パターンは Muse-iPS 細胞に似ていたが、Nanog、Oct3/4、Sox2 といった遺伝子の発現レベルは Muse-iPS 細胞と比較して低かった (表. 1)。さらに、Muse 細胞において Nanog、Oct3/4 のプロモーター領域は、部分的にメチル化されていた (図 5. U)。Muse 細胞が Muse-iPS 細胞へ、non-Muse 細胞が non-Muse 細胞由来コロニーへと変化すると、ほとんどの細胞増殖関連遺伝子群の発現が上昇した (表. 1)。また、Muse 細胞を免疫不全マウスの精巣へと移植すると 6 ヶ月経過しても奇形腫を形成しなかったが、Muse-iPS 細胞は 12 週間で奇形腫を形成したことから、腫瘍形成能を有さない Muse 細胞は 4 因子の導入によって後天的に腫瘍性増殖能を獲得したことが示唆された (図 2. H、図 5. Q-T)。

また、Zhang、Lee らにより、ES 細胞などの多能性幹細胞において、Nanog や Oct3/4 が細胞分裂を促進させることが報告されている^{51), 52)}。これらのことから、Muse 細胞において、4 因子の導入により細胞増殖関連遺伝子群と多能性関連遺伝子群の発現が上昇し、その発現上昇した多能性関連遺伝子群によって更に細胞増殖関連遺伝子群の発現上昇が促進されたと考えられる。もしそうであれば、Muse 細胞は成体組織中に存

在するため、iPS 細胞に比べて多能性関連遺伝子群の発現は低いレベルに調節されていると考えられる。

Muse 細胞とは対照的に、ヒト成体皮膚由来線維芽細胞中の non-Muse 細胞からは iPS 細胞が誘導されず、TRA-1-81 陽性コロニーも得られなかった (図 5. A, D)。また、TERT や UTF1 など、いくつかの多能性関連遺伝子群の発現が弱いながらも確認されたが、Nanog や内在性の Sox2 といった、iPS 細胞やヒト ES 細胞などの多能性幹細胞における主要な因子の発現は認められなかった (図 5. B, E, J-M)。これらの結果は、4 つの因子を一つのベクターに搭載したポリシストロニックベクターを使用した場合においても同様で (図 6. C, D)、non-Muse 細胞由来コロニーでは多能性関連遺伝子群の発現向上や、Nanog、Oct3/4 のプロモーター領域の脱メチル化は認められなかった (表. 1, 図 5. U)。また、non-Muse 細胞由来コロニーにおいて Rex1、Abcg2、Dnmt3b および Cdx2 の発現が認められなかったことは特筆すべきことである (図 5. E)。Chan らにより、これらの因子は完全にリプログラミングされた iPS 細胞でのみすべて発現しており、不完全なリプログラミング状態では部分的に発現するにとどまることが報告されている^{47), 48)}。さらに、Chan らは不完全にリプログラミングされたコロニーはタイプ I、タイプ II コロニーに分類され、Rex1、Abcg2、Dnmt3b および Cdx2 のすべて発現していないタイプ I コロニーは iPS 細胞へと変化することはなく、Rex1、Abcg2、

Dnmt3b は発現しておらず Cdx2 のみ発現しているタイプ II コロニーは、ごく少数ではあるが部分的に自発的に iPS 細胞へと変化すると報告している^{47), 48)}。本研究の結果から、non-Muse 細胞由来コロニーは、Rex1、Abcg2、Dnmt3b および Cdx2 のすべてが発現していないことから、タイプ I コロニーに相当すると考えられ、non-Muse 細胞由来コロニーは iPS 細胞にはなり得ない、つまり non-Muse 細胞からは iPS 細胞は誘導されないことが明らかとなった。

本研究の結果から、ヒト成体皮膚由来線維芽細胞を用いた場合、iPS 細胞は Muse 細胞からのみ誘導され、non-Muse 細胞からは誘導されないという、エリートモデルの存在が示唆された。また、Muse 細胞と Muse-iPS 細胞の大きな相違点は、奇形腫を形成する腫瘍性増殖能であることが明らかとなり、4 因子の導入により細胞増殖関連遺伝子の発現亢進が、Muse 細胞に腫瘍性増殖能を付与したことで iPS 細胞になるという新たな可能性が示唆された。

7. 結論

本研究により、培養されたヒト皮膚由来線維芽細胞からヒト多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 と間葉系細胞マーカーである CD105 の二重陽性を示す Muse 細胞の存在が明らかとなった。また、ヒト皮膚由来線維芽細胞から単離される Muse 細胞は、すでに報告されている骨髄由来の Muse 細胞と同様に²⁵⁾、自己複製能や三胚葉性の細胞への分化能を持った細胞であることも確認された。さらに、Muse 細胞は一細胞から形成された cluster を確立された分化誘導方法を用いることで、高効率で三胚葉性の細胞への分化をコントロールすることができた。これらのコントロールされた分化により誘導された細胞は、それぞれマーカーを発現していることは確認されたが、これらの細胞が機能的であるかどうか検討されていない。そのため、今後は損傷モデルへの移植などにより、分化誘導させた細胞が生体内において機能するかについて検討する必要がある。

Muse 細胞は、成体の間葉系組織においてもヒト多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 をマーカーとして同定することが可能であることが明らかとなった。このような多能性を有する細胞が、不均一な細胞集団である間葉系細胞の広範な分化転換を担っている可能性が考えられる。しかし、生体内における Muse 細胞の特徴として、SSEA-3 を発現していることは確認されているが、生体内における分化能や自己複製能がどのよ

うに制御されているか、あるいは repairing cell としてどのようなシグナルによって、損傷組織へと遊走し、組織修復を行っているかについては明らかとされておらず、今後その制御機構について詳細に検討する必要がある。また、現在使用されている Muse 細胞の特異的なマーカーである SSEA-3 は糖脂質であり、タンパク質ではないため、その遺伝子として存在しないため、遺伝子改変動物の作製や発生段階において多能性を有する Muse 細胞が、どのような細胞からどのような段階で派生しているか解析することが困難である。そのため、SSEA-3 以外の特異的なマーカーの探索も必須であると考えられる。

本研究により、ヒト成体皮膚由来線維芽細胞中に存在する SSEA-3 陽性である Muse 細胞からは iPS 細胞が誘導され、SSEA-3 陰性である non-Muse 細胞からは iPS 細胞は誘導されないことを示した。この結果は、iPS 細胞誘導メカニズムについて議論されている 2 つのモデルのうち、すべての細胞が確率論的に iPS 細胞にリプログラミングされるのではなく、特定の細胞が iPS 細胞に変化するというエリートモデルにあてはまることを示している。さらに、エリートモデルというだけでなく、多能性幹細胞である Muse 細胞だからこそ iPS 細胞に変化したことから、iPS 細胞とはこういった細胞なのかという生物学的な疑問を生じることとなった。

これまでに様々な組織からの iPS 細胞誘導が報告されている⁵³⁾⁻⁵⁶⁾。本研究におい

て示されたエリートモデルの存在は、ヒト成体皮膚由来線維芽細胞を用いた iPS 細胞誘導においてのみ示されたものであり、他の細胞ソースを用いた iPS 細胞誘導においては検証されていないため、今回の結果が全ての現象に当てはまるかは今後更なる検証が必要であると考えられる。本研究においては、ヒト成体真皮には SSEA-3 陽性である Muse 細胞の存在が明らかとなったが、ヒト骨髓液からも、ヒト多能性幹細胞である SSEA-3 と間葉系細胞マーカーである CD105 の二重陽性として Muse 細胞が単離可能であることが報告されている²⁵⁾。さらに、現時点で脂肪組織や脾臓、臍帯、末梢血などにおいても SSEA-3 陽性の Muse 細胞が存在することが明らかとされつつある。これらのことから Muse 細胞はあらゆる組織に存在することで、その組織の恒常性の維持に関わっている可能性が考えられる。またこのような Muse 細胞が様々な組織からの iPS 細胞誘導に深く関わっている可能性が示唆される。

これまで、iPS 細胞の誘導を評価するための基準が統一されていないため、iPS 細胞の誘導効率の根拠はそれぞれの報告によって異なる結果となっている。いくつかの報告では、ALP 染色のみで評価を行い、ある報告では単一の多能性幹細胞マーカーのみ評価を行っている⁵⁷⁻⁵⁹⁾。そのため、それぞれの報告における誘導効率を比較することは不可能である。実際には、ALP 染色陽性コロニーのすべてが iPS 細胞とは限らない。同様に、単一の多能性幹細胞マーカーが陽性のコロニーであっても iPS 細胞の

基準を満たしていない可能性もある。そのため我々は、TRA-1-81 の免疫細胞化学染色と Nanog、内在性の Oct3/4、内在性の Sox2、Rex1、Abcg2、Dnmt3b、Cdx2 の遺伝子発現を RT-PCR により解析することで、複数のマーカーを用いた iPS 細胞コロニーの評価を行った。その結果、ヒト成体皮膚由来線維芽細胞を用いた場合の iPS 細胞誘導効率は約 0.001%であったのに対して、ヒト成体皮膚由来線維芽細胞から単離した Muse 細胞を用いた場合、iPS 細胞は約 0.03%の効率で樹立され、誘導効率は約 30 倍に向上したが、それほど高くなることはなかった。これらの結果は、ポリシストロニックベクターを用いた実験系においても同様の結果であった。このことから、遺伝子導入効率の違いや特定の遺伝子の導入失敗などの理由により生じた結果ではないことが確認された。ではなぜ iPS 細胞の誘導効率が 30 倍にしかないのだろうか。理由は 2 つ考えられる。一つは、Muse 細胞は SSEA-3 陽性細胞としてヒト成体皮膚由来線維芽細胞から単離され、浮遊培養により 1 細胞から cluster を形成する特徴を有しているが、この cluster の形成効率は約 50 % 程度であり 100 %ではない。つまり、SSEA-3 をマーカーとして単離される Muse 細胞は単一の細胞集団ではなく、その中には多能性を持たない細胞も含まれている可能性があるため、iPS 細胞誘導効率がそれほど高くならなかったと推測される。そのためにも、SSEA-3 陽性細胞の中から多能性を有する細胞、つまり 1 細胞から浮遊培養により cluster を形成する能力を有する細胞のみ

を単離するためのマーカー等を探索する必要があると考えられる。二つ目に、本研究ではヒト皮膚由来線維芽細胞を用いた場合、iPS 細胞は Muse 細胞からのみ誘導されることからエリートモデルの存在が示され、さらに導入された遺伝子によって細胞内の細胞増殖関連遺伝子群と多能性関連遺伝子群の発現が上昇し、その発現上昇した多能性関連遺伝子群によってさらに細胞増殖関連遺伝子群の発現上昇が促進され、Muse 細胞が腫瘍性増殖能を付与されたことにより iPS 細胞になるという誘導メカニズムが示唆された。Muse 細胞は生体由来の多能性幹細胞であり、多能性の維持や細胞増殖は微妙なバランスによって維持されているものと考えられる。そのため、導入された遺伝子が働く強さや、それぞれの因子の発現バランスなどによって、Muse 細胞内の微妙な遺伝子発現パターンに変化が生じた結果、腫瘍性増殖能を獲得できた細胞が iPS 細胞へと変換し、遺伝子発現バランスの変化にうまく対応できず腫瘍性増殖能を獲得できない細胞ができてしまったため、誘導効率の劇的な変化には繋がらなかった可能性が考えられる。つまり、確率論に従って Muse 細胞が腫瘍性増殖能を獲得するという、エリートモデル内におけるストカスティックモデルの存在も考えられる。これらの仮説を検証するためには、Muse 細胞における多能性や細胞増殖の維持などにおける詳細な分子メカニズムの解析をする必要があると考えられる。また、Muse 細胞を用いた iPS 細胞の誘導効率はそれほど高くはないが、バルプロ酸や extracellular

signal-regulated kinase (ERK)、glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β)、activin receptor-like kinase 5 (ALK5) インヒビター、あるいは p53 の抑制のような他のアプローチと組み合わせることで、iPS 細胞の誘導効率はさらに向上させることができると考えられる⁶⁰⁻⁶³⁾。さらに、いくつかの特定されていない条件や因子が、iPS 細胞誘導の効率に影響を与える可能性が考えられ、最適化されたシステムが確立されれば、Muse 細胞を用いた iPS 細胞の誘導効率向上も期待されることが考えられる。

間葉系組織から得られる細胞は、様々な細胞を含んだ細胞集団から構成されているが、そこから単離される Muse 細胞は比較的均質な細胞集団であるため、こうした細胞を用いて iPS 細胞誘導の各プロセス間の比較を行うことで、iPS 細胞誘導メカニズムについて、より理解が深まるのではないかと考えられる。また、この系の詳細な解析により、iPS 細胞の腫瘍形成に対する問題を解決する糸口が得られるであろうと推測される。

8. 文献

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145-1147
2. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al: In Vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001;19:1129-1133
3. Assady S, Maor G, Amit M, et al: Insulin production by human embryonic stem cells. Diabetes 2001;50:1691-1697
4. Kehat I, Gepstein A, Spira A, et al: High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: A novel invitro model for the study of conduction. Cric Res 2002;91(8):659-661
5. Drukker M, Katz G, Urbach A, et al: Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002;23;99:9864-9
6. Seminatore C, Polentes J, Ellman D, et al: The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. Stroke. 2010;41:153-9

7. Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharensky V, et al: Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004;9(6):623-9
8. Tesar PJ: Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(23):8239-44
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2006;131:861-872
10. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al: Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 2007;318:1917-1920
11. Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY, et al: Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(41):17668-73
12. Marchetto MC, Carron C, Acab A, et al: A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010;143(4):527-39
13. Tolar L, Xia L, Riddle MJ, et al: Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 2011;131(4):848-56

14. Robinton DA, Daley GQ: The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 2012;18;(7381):295-305
15. Stadtfeld M, Hochedlinger K: Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010;24(20):2239-63
16. Kim K, Doi A, Wen B, et al: Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010;467(7313):285-90
17. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al: Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2010;28(8):848-55
18. Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, et al: Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(32):14152-57
19. Sullivan GJ, Bai Y, Fletcher J, et al: Induced pluripotent stem cells: Epigenetic memories and practical implications. *Mol Hum Reprod* 2010;16:880-885
20. Kørbling M, Estrov Z: Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-582
21. Thomas ED: Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg* 2000;24:815-818

22. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147
23. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al: Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004;113:1701-1710
24. Oyagi S, Hirose M, Kojima M, et al: Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. *J Hepatol* 2006;44:742-748
25. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al: Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:8639-8643
26. Yamanaka S; Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009;460:49-52
27. Hanna J, Saha K, Pando B, et al: Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 2009;462:595-601
28. Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, et al: Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 2009;41:968-976

29. Byrne JA, Nguyen HN, Reijo Pera RA: Enhanced generation of induced pluripotent stem cells from a subpopulation of human fibroblasts. *PLoS ONE* 2009;4(9):e7118
30. Ou L, Wang X, Zou F: Is iPS cell the panacea? *IUBMB Life* 2010;62(3):170-75
31. Abollo-Jiménez F, Jiménez R, Cobaleda C: Physiological cellular reprogramming and cancer. *Semin Cancer Biol* 2010;20:98-106
32. Sommer CA, Standtfeld M, Murphy GJ, et al: Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 2009;27:543-9
33. Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, et al: Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(1):157-62
34. Deb-Rinker P, Ly D, Jezierski A, et al: Sequential DNA methylation of the Nanog and Oct-4 upstream regions in human NT2 cells during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 2005;280(8):6257-60
35. Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, et al: Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002;416:854-860

36. Murga M, Yao L, Tosato G: Derivation of endothelial cells from CD34- umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22:385-395
37. Middleton J, Americh L, Gayon R, et al: A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol* 2005;206:260-268
38. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al: A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301-313
39. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, et al: Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell* 2008;2:392-403
40. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, et al: A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 2004;6:1082-1093
41. Biernaskie J, Paris M, Morozova O, et al: SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:610-623

42. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007;100:1249-1260
43. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, et al: Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: Preliminary report. *Leukemia* 2007;21:297-303
44. Wojakowski W, Tendera M, Kucia M, et al: Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1-9
45. Wojakowski W, Kucia M, Zuba-Surma E, et al: Very small embryonic-like stem cells in cardiovascular repair. *Pharmacol Ther* 2011;129:21-28
46. Hermann A, eGastl R, Liebau S, t al: Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004;117:4411-22
47. Lowry WE, Richter L, Tachechko R, et al: Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2883-88

48. Subramanyam D, Blelloch R: Watching reprogramming in real time. *Nat Biotechnol* 2009;27:997-8
49. Chan EM, Ratanasirintrawoot S, Park IH, et al: Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 2009;27:1033-37
50. Chou YF, et al. (2008) The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135:449-61
51. Zhang X, Neganova I, Przyborski S, et al: A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *J Cell Biol* 2009;184:67-82
52. Lee J, Go Y, Kang I, et al: Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. *Biochem J* 2010;426:171-181
53. Trond Aasen, Angel Raya, Maria J Barrero, et al: Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008;26:1276-84

54. Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al: Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009;113(22):5476-9
55. Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, et al: Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(37):15720-5
56. Haase A, Olmer R, Schwanke K, et al: Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009;5(4):434-41
57. Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al: Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008;26(7): 795-797
58. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448(7151): 318-24
59. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448(7151):313-7
60. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al: Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008;26:1269-1275

61. Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, et al: Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 2009;460:1140–1144
62. Li W, Wei W, Zhu S, et al: Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 2009;4:16–19
63. Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, et al: A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 2009;6:805–808

9. 図

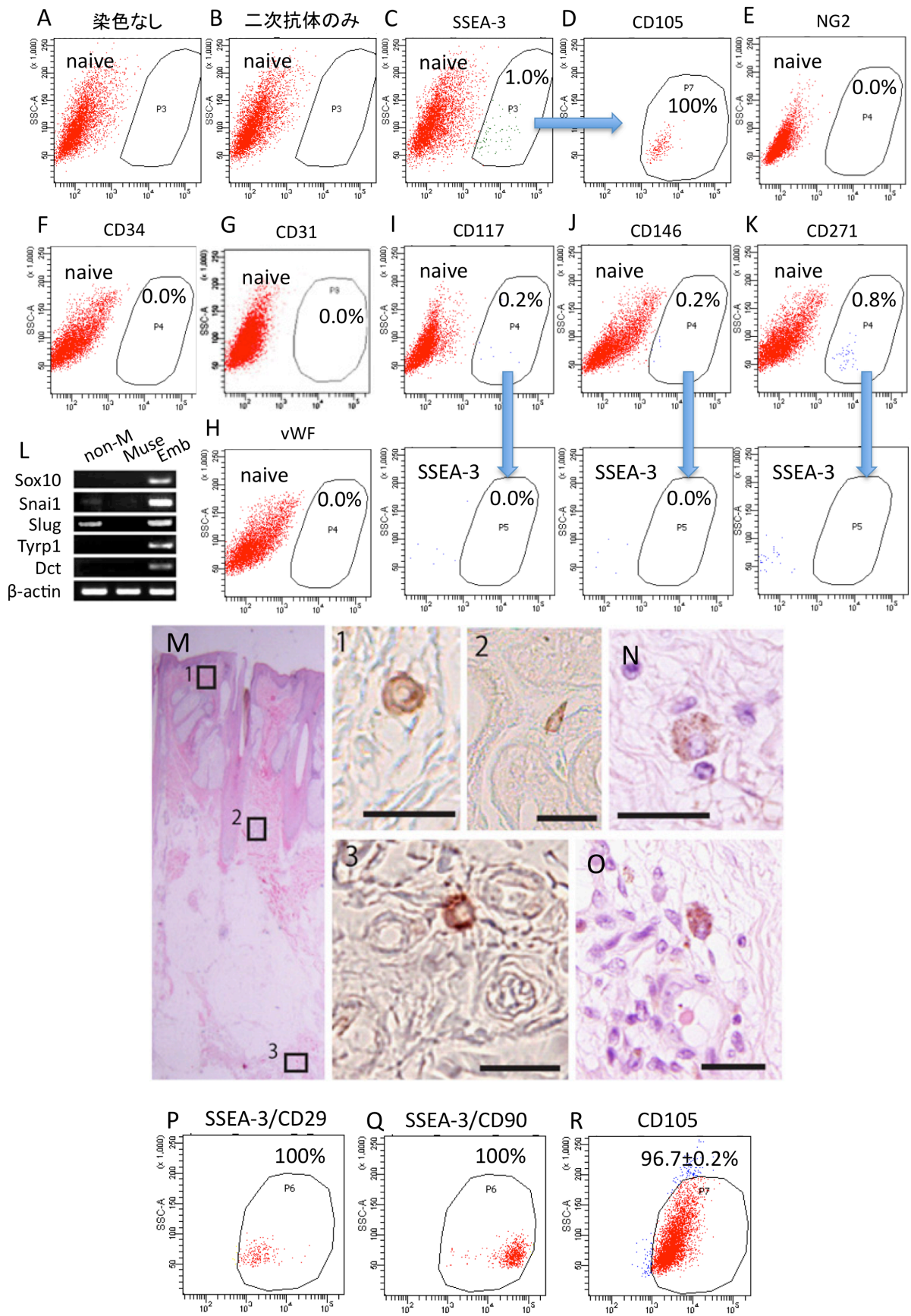


図 1. ヒト皮膚由来線維芽細胞における Muse 細胞

(A-D) フローサイトメトリーによる、培養ヒト皮膚由来線維芽細胞における SSEA-3 陽性である Muse 細胞の解析。抗体を用いない、染色なしの培養ヒト皮膚由来線維芽細胞のフローサイトメトリーによる解析 (A)。二次抗体のみ (FITC-conjugated anti-rat IgM) で染色した培養ヒト皮膚由来線維芽細胞をフローサイトメトリーによる解析 (B)。SSEA-3 抗体を用いて染色した培養ヒト皮膚由来線維芽細胞のフローサイトメトリーによる解析 (C)。培養ヒト皮膚由来線維芽細胞に含まれる SSEA-3 陽性細胞は、すべて CD105 陽性であった (D)。

(E-H) フローサイトメトリーによる SSEA-3 陽性細胞の解析。培養ヒト皮膚由来線維芽細胞は、NG2 (E)、CD34 (F)、CD31 (G)、von Willebrand factor (vWF) (H) は陰性であった。

(I-K) 培養ヒト皮膚由来線維芽細胞のうち、少数の細胞は CD117 (I)、CD146 (J)、CD271 (K) 陽性であった。しかしこれらの陽性細胞はすべて SSEA-3 陰性であった。

(L) RT-PCR による解析。SSEA-3 陰性である non-Muse 細胞 (non-M) は Snail、Slug を弱いながらも発現していたが、SSEA-3 陽性である Muse 細胞 (Muse) はすべてのマーカーにおいて陰性であった。ポジティブコントロールには、ヒト胎児の cDNA (Emb) を使用した。

(M)免疫組織化学染色。(M)はヒト皮膚組織のH&E染色、1-3はMのボックス内のSSEA-3陽性細胞。SSEA-3陽性細胞は、真皮(1)、汗腺(2)、微小血管周辺(3)の結合組織に存在していた。

(N、O)近接したヒト皮膚組織切片の、SSEA-3抗体による免疫組織化学染色とH&E染色の組み合わせ。(scale bars, 50 μ m)

(P-R)フローサイトメトリーによる培養ヒト皮膚由来線維芽細胞の解析。培養ヒト皮膚由来線維芽細胞から得られるSSEA-3陽性細胞は、すべてCD29(P)、CD90(Q)陽性であった。培養ヒト皮膚由来線維芽細胞内には間葉系マーカーであるCD105陰性の細胞も存在する(R)。

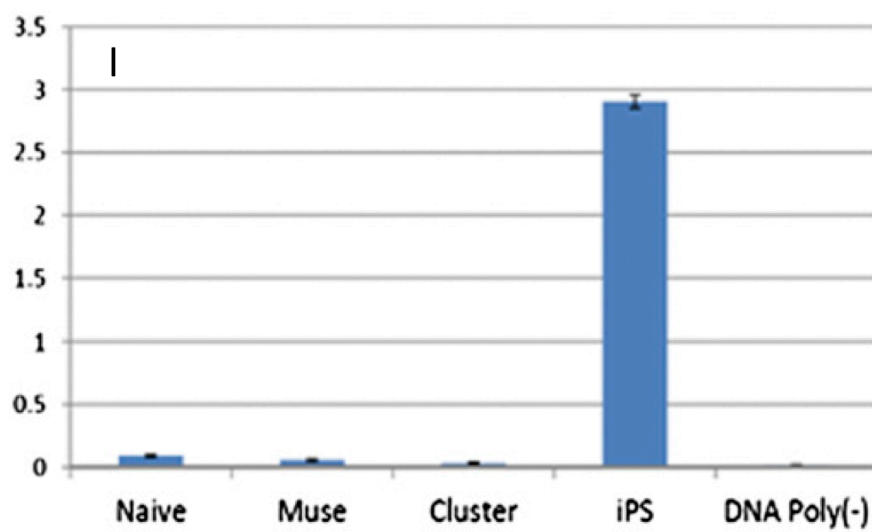
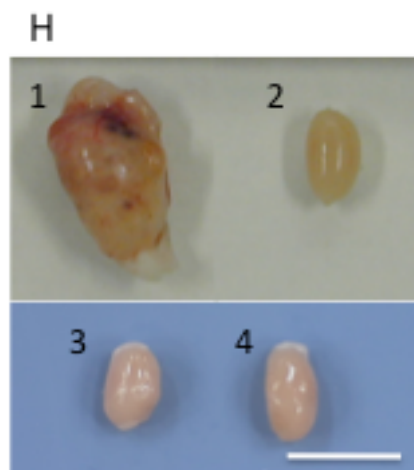
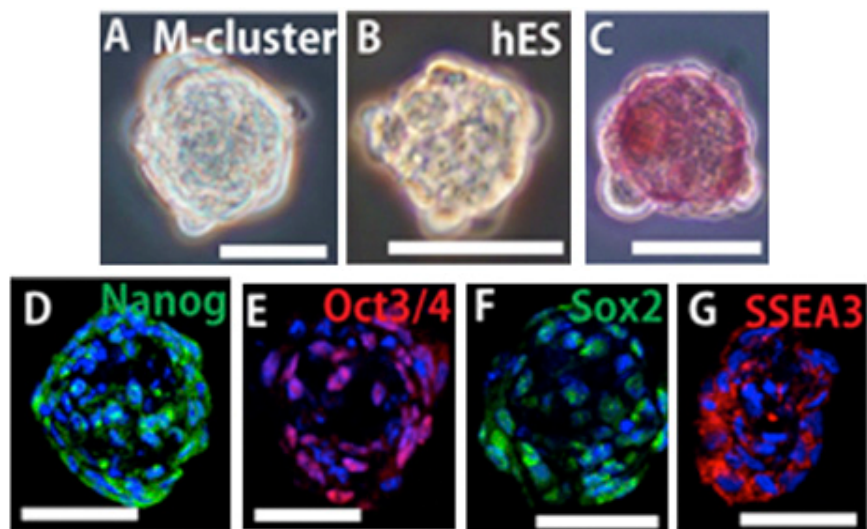


図 2. Muse 細胞と Muse 細胞由来 cluster の特徴

(A) 単一の Muse 細胞を浮遊培養することで得られた Muse 細胞由来 cluster (M-Cluster)。

(B) ヒト ES 細胞の浮遊培養により得られた Cluster。

(C) M-Cluster のアルカリホスファターゼ染色。

(D-G) M-Cluster の免疫細胞化学染色。M-Clusters は多能性幹細胞マーカーである Nanog (D)、Oct3/4 (E)、Sox2 (F)、SSEA-3 (SSEA3) (G) を発現していた。(scale bars, 30 μ m)

(H) テラトーマ形成の検証。ポジティブコントロールであるマウス ES 細胞を移植した精巣では 4 週間でテラトーマを形成し (1)、ネガティブコントロールであるフィーダー細胞はテラトーマ形成しなかった (2)。M-Cluster を移植した精巣では、6 ヶ月経過してもテラトーマを形成することなく (3)、何も移植していない精巣 (4) と比較しても変化はなかった。(scale bars, 1cm)

(I) ヒト皮膚由来線維芽細胞 (Naive)、ヒト皮膚由来線維芽細胞から単離された Muse 細胞 (Muse)、単一の Muse 細胞由来の M-Cluster (Cluster)、iPS 細胞 (iPS) のテロメラーゼ活性の測定。DNA poly (-) はネガティブコントロールを示している。

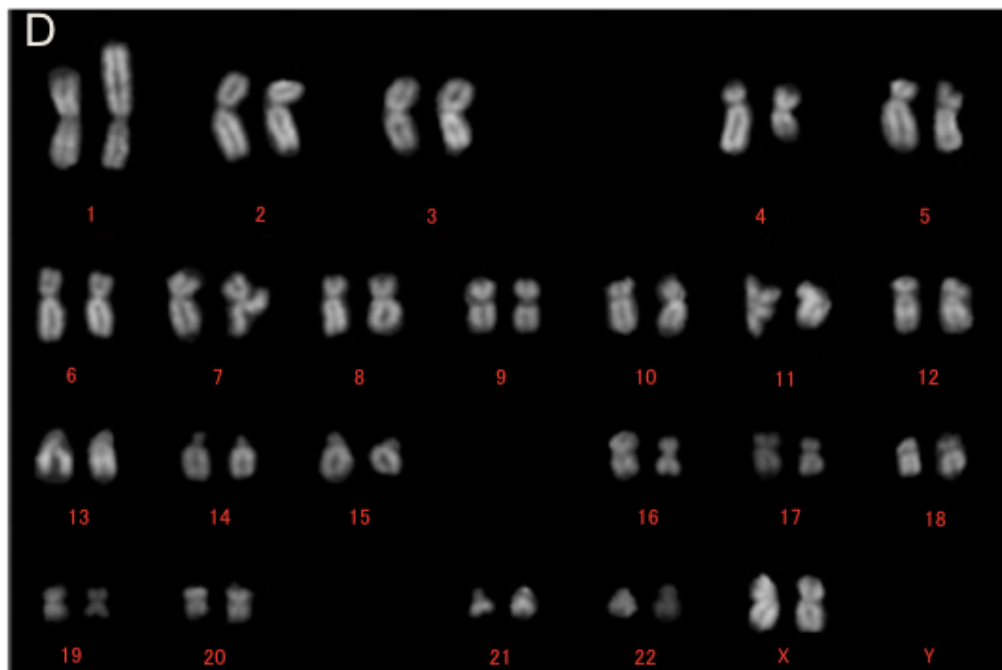
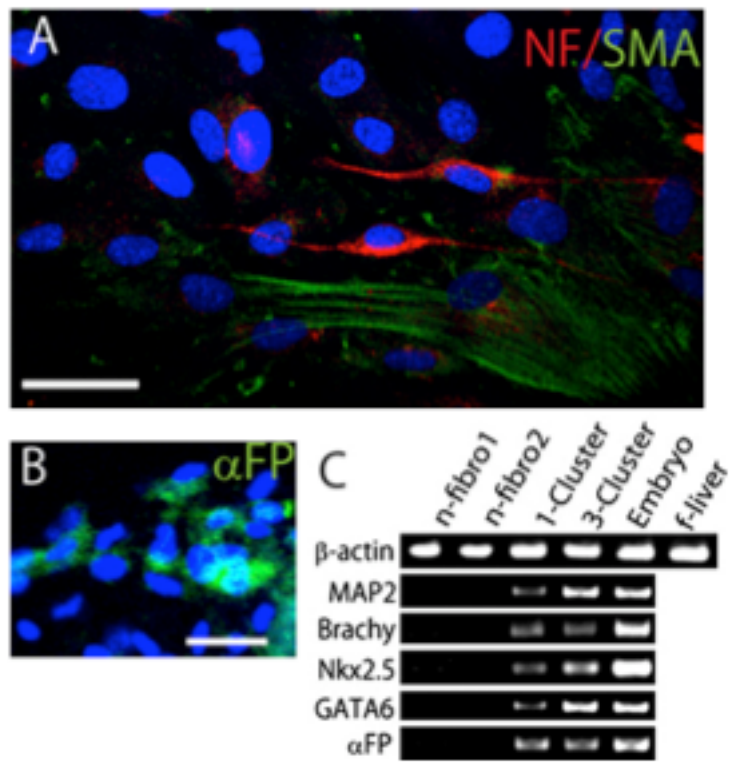


図 3. M-Cluster の自発的分化と核型解析

(A、B) ゼラチンコートした dish 上で 7 日間培養することで、M-Clusters から自発的に分化した細胞の免疫細胞化学染色。自発的に分化した細胞の中で、一部の細胞は neurofilament (NF; 赤)、smooth muscle actin (SMA; 緑) (A)、alpha-fetoprotein

(α -FP; B) を発現していた。(scale bars, 30 μ m)

(C) ヒト皮膚由来線維芽細胞 (n-fibro1、n-fibro2) と第一世代、第三世代の M-Cluster (1-Cluster、3-Cluster) から自発的に分化させた細胞の RT-PCR による解析。ヒト胎児 (Embryo) は、MAP2、Brachyury (Brachy)、Nkx2.5、GATA6 のポジティブコントロールとして使用し、ヒト胎児肝臓 (f-liver) は、alpha-fetoprotein (α -FP) のポジティブコントロールとして使用した。

(D) Muse 細胞の核型解析。第三世代の M-Cluster においても、核型に変化はなかった。

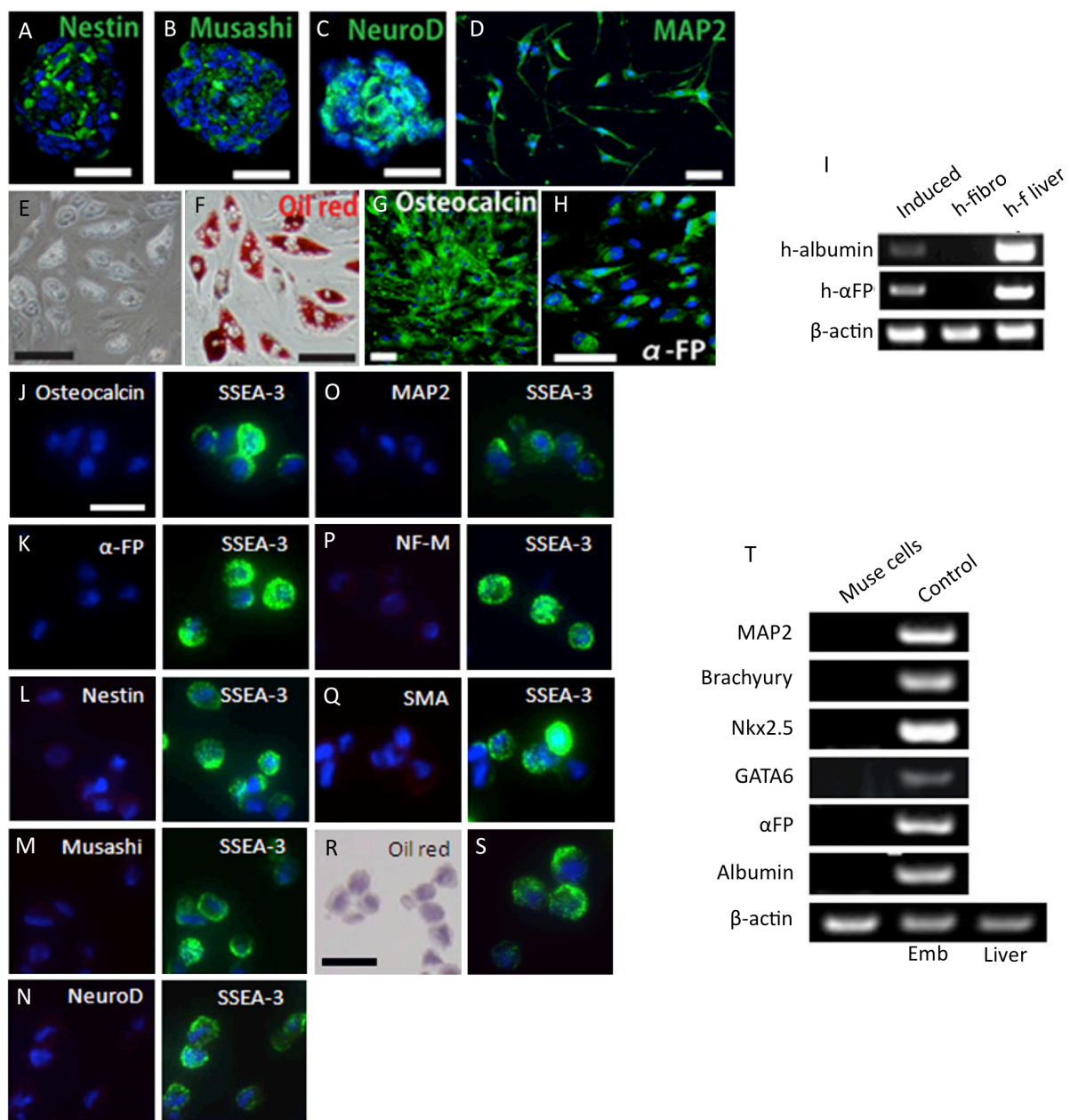


図 4. M-Cluster のコントロールされた分化誘導

(A-C) 神経細胞誘導によって得られた sphere は、Nestin (A)、Musashi (B)、NeuroD

(C) を発現していた。(Scale bars, 50 μ m)

(D) sphere から分化誘導した神経細胞は、MAP2 を発現していた。(Scale bars, 30 μ m)

(E, F) 誘導された脂肪細胞は、oil red O で染色されたる脂肪滴を含んでいた (E, F)。

(Scale bars, 30 μ m)

(G) 誘導された骨細胞は、osteocalcin を発現していた。(Scale bars, 30 μ m)

(H, I) 誘導された肝細胞は、 α -FP を発現しており (H)、RT-PCR では α -FP と albumin の発現が確認された (I)。(Scale bars, 50 μ m)

(J-S) 免疫細胞化学染色および疾患組織学的染色を用いた、Muse 細胞における分化マーカーの発現解析。未分化な Muse 細胞では分化マーカーである osteocalcin (J)、 α -FP (K)、Nestin (L)、Musashi (M)、Neuro D (N)、MAP2 (O)、neurofilament (NF)

(P)、SMA (Q) の発現が確認されなかった。また、Oil red O 染色 (R) においても、陽性である細胞は確認されなかった。二次抗体のみを用いて染色した、ネガティブコントロールである Muse 細胞 (S)。(Scale bars, 30 μ m)

(T) RT-PCR を用いた Muse 細胞における分化マーカーの発現解析。Muse 細胞 (Muse

cells) では、分化マーカーである MAP2、Brachyury、Nkx2.5、GATA6、 α -FP、human albumin (Albumin) の発現が確認されなかった。ヒト胎児 (Emb) は、MAP2、Bracyury、Nkx2.5、GATA6 のポジティブコントロールで、ヒト胎児肝臓 (f-liver) は、 α -FP、albumin のポジティブコントロールを示す。

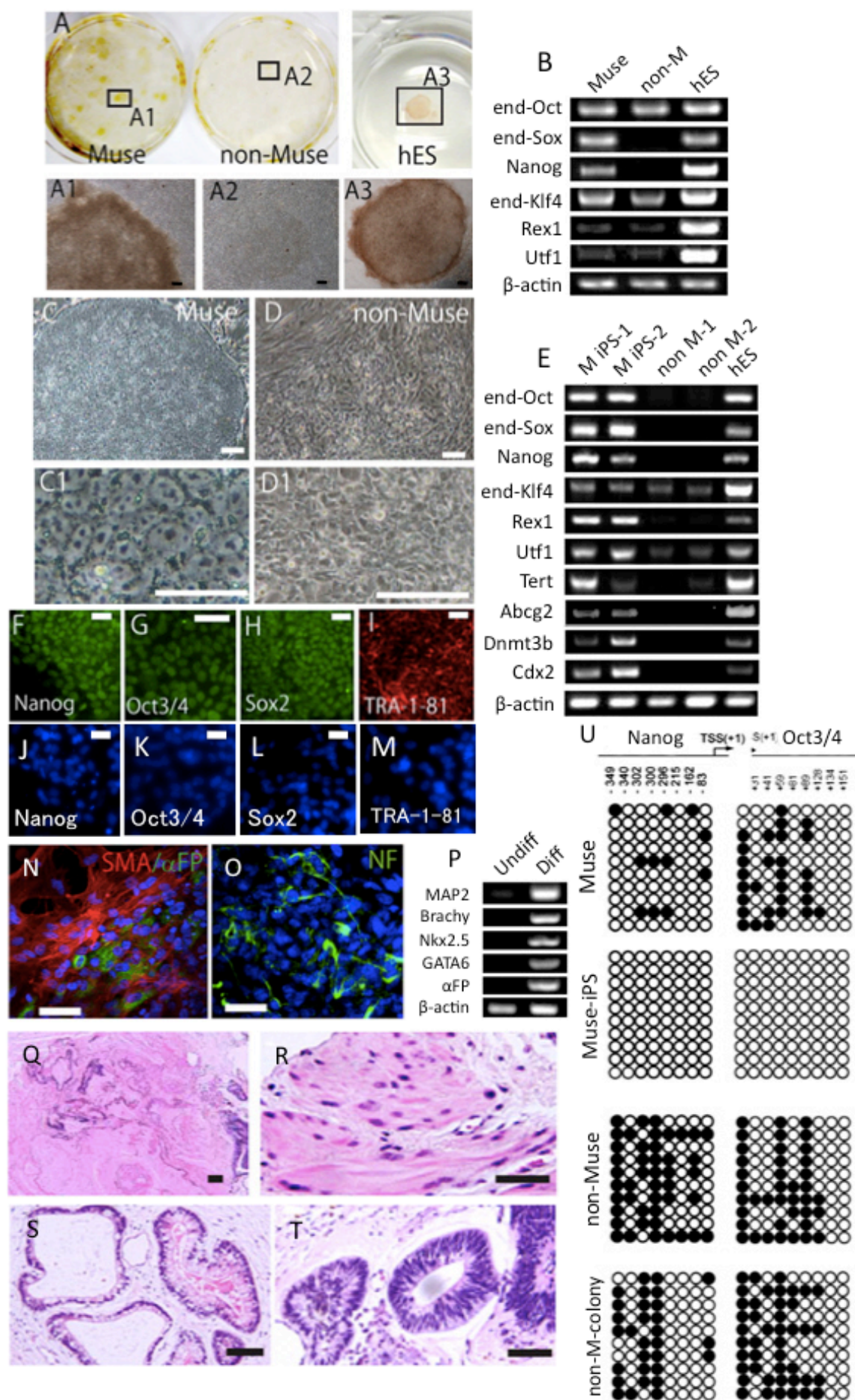


図 5. Muse 細胞からの iPS 細胞誘導

(A) 遺伝子導入した細胞を MEFs の上で 30 日間培養すると、Muse 細胞からは TRA-1-81 陽性コロニーが得られたのに対し (A1)、non-Muse 細胞からは TRA-1-81 陰性コロニーのみ得られた (A2)。ヒト ES 細胞 (hES) はポジティブコントロールを示す (A3)。(scale bars, 100 μ m)

(B) 遺伝子導入した Muse 細胞 (Muse)、non-Muse 細胞 (non-M) を 30 日間培養後、MEFs の上にあるすべてのコロニーおよび細胞について、内在性の Oct3/4 (end-Oct)、内在性の Sox2 (end-Sox)、Nanog、内在性の Klf4 (end-Klf4)、Rex1、UTF1 の発現を RT-PCR により解析した。また、ヒト ES 細胞 (hES) をポジティブコントロールとして使用した。

(C、D) ピックアップ後の Muse 細胞由来 iPS 細胞 (Muse; C、C1) と non-Muse 細胞由来コロニー (non-Muse; D、D1) の形態。(scale bars, C と D, 100 μ m、C1 と D1, 50 μ m)

(E) ピックアップ後の Muse 細胞由来 iPS 細胞 (2 クローン : M iPS-1、M iPS-2) と non-Muse 細胞由来コロニー (2 クローン : non M-1、non M-2) について、内在性の Oct3/4 (end-Oct)、内在性の Sox2 (end-Sox)、Nanog、内在性の Klf4 (end-Klf4)、Rex1、UTF1、TERT、Abcg2、Dnmt3b、Cdx2 の発現を RT-PCR により解析した。また、ヒト ES

細胞 (hES) をポジティブコントロールとして使用した。

(F-M) Muse 細胞由来 iPS 細胞と non-Muse 細胞由来コロニーの免疫細胞化学染色。Muse 細胞由来 iPS 細胞は、Nanog (F)、Oct3/4 (G)、Sox2 (H)、TRA-1-81 (I) を発現していた。対照的に non-Muse 細胞由来コロニーにおいては、Nanog (J)、Oct3/4 (K)、Sox2 (L)、TRA-1-81 (M) の発現が確認されなかった。(scale bars, 50 μ m)

(N, O) Muse 細胞由来 iPS 細胞の自発的分化能の検討。Muse 細胞由来 iPS 細胞を浮遊培養して得られた胚様体を接着培養し、三胚葉性の細胞へ自発的分化をさせた。分化した細胞は、免疫細胞化学染色により、SMA (N、赤)、 α -FP (N、緑)、neurofilament (NF) (O) を発現していることが確認された。(scale bars, 50 μ m)

(P) 未分化な Muse 細胞由来 iPS 細胞 (Undiff) と Muse 細胞由来 iPS 細胞を自発的分化させた細胞 (Diff) の RT-PCR による解析。分化後 (Diff) は、それぞれ三胚葉性の細胞マーカーを発現していた。

(Q-T) Muse 細胞由来 iPS 細胞のテラトーマ形成能の検討。Muse 細胞由来 iPS 細胞を移植後、12 週間経過した免疫不全マウスの精巣で形成されたテラトーマの H&E 染色

(Q)。テラトーマでは、中胚葉 (R)、内胚葉 (S)、外胚葉 (T) 組織が認められた。(scale bars, 100 μ m)

(U) Muse 細胞 (Muse)、Muse 細胞由来 iPS 細胞 (Muse-iPS)、non-Muse 細胞 (non-Muse)、

non-Muse 細胞由来コロニー (non-M colony) における、Nanog、Oct3/4 のプロモーター領域のバイサルファイトシーケンスによる解析。白丸と黒丸はそれぞれ、非メチル化とメチル化シトシンを表している。

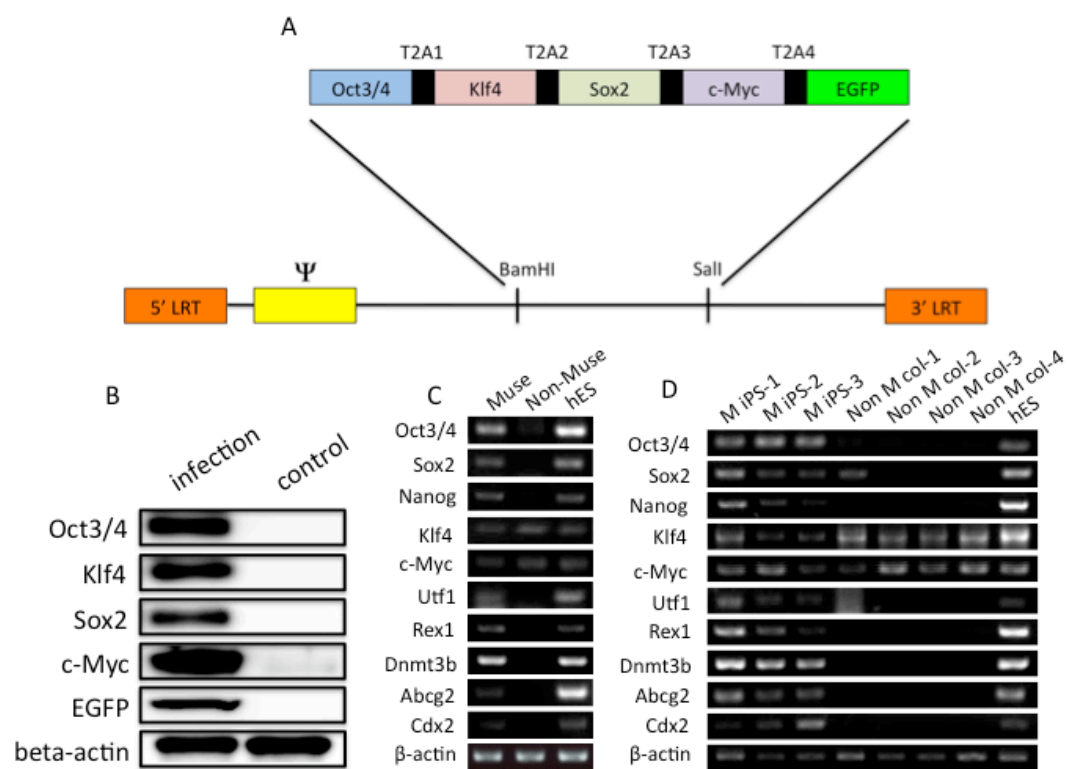


図 6. ポリシストロニックベクターと iPS 細胞誘導

(A) 作製したポリシストロニックベクターの概略図。hOct3/4、hKlf4、hSox2、hc-Myc、EGFP を、この順番ですべて 2A ペプチドにより繋ぎ、pMXs ベクターの BamHI、SalI サイトに挿入した。

(B) ウェスタンブロッティングによる、導入された 5 因子の細胞内タンパク発現解析。ポリシストロニックベクターを用いて作製したレトロウイルスを感染させた細胞における 5 因子のタンパク発現を、ウェスタンブロッティングにより確認した (infection)。Control はレトロウイルスを感染させていない細胞。

(C) ポリシストロニックベクターを用いて作製したレトロウイルスを感染させた Muse 細胞 (Muse)、non-Muse 細胞 (non-Muse) を 30 日間培養後、MEFs の上にあるすべてのコロニーおよび細胞について、内在性の Oct3/4 (Oct3/4)、内在性の Sox2 (Sox2)、Nanog、内在性の Klf4 (Klf4)、内在性の c-Myc (c-Myc)、Utf1、Rex1、Dnmt3b、Abcg2、Cdx2 の発現を RT-PCR により解析した。また、ヒト ES 細胞 (hES) をポジティブコントロールとして使用した。

(D) iPS 細胞誘導から 30 日後にピックアップした Muse 細胞由来 iPS 細胞 (3 クローン: M iPS-1、M iPS-2、M iPS-3) と non-Muse 細胞由来コロニー (4 クローン: non M col-1、non M col-2、non M col-3、non M col-4) について、内在性の Oct3/4 (Oct3/4)、内

在性の Sox2 (Sox2)、Nanog、内在性の Klf4 (Klf4)、内在性の c-Myc (c-Myc)、Utf1、
Rex1、Dnmt3b、Abcg2、Cdx2 の発現を RT-PCR により解析した。また、ヒト ES 細胞 (hES)
をポジティブコントロールとして使用した。

10. 表

Pluri marker				
	/non-Muse			
	Muse	M-iPS	non-M col	hES
NANOG				
Oct3/4				
SOX2				
ALPL				
ATRX				
BMP4				
BMPR1A				
CBX7				
CDX2				
CTR9				
DAZL				
DDX4				
DNMT1				
DPPA2				
DPPA3				
DPPA4				
EPC1				
ERAS				
F11R				
FGFR1				
FOXD3				
GDF3				
GRB7				
HAND1				
HES1				
HEXIM1				
HOXB1				
ID1				
ID3				
IFITM1				
KCNK				
KITLG				
KLF4				
LIN28				
MSX2				
MYC				
NAT1				
NKX1-2				
NR0B1				
OTX2				
PAN3				
PRDM1				
RAG1AP1				
SALL4				
SIX4				
SPAG9				
SPRY1				
SPRY2				
STAT3				
SSBP2				
TERT				
TDGF1				
TFE3				
TRDMT1				
UTF1				

2²⁰

2¹⁸

2¹⁶

2¹⁴

2¹²

2¹⁰

2⁸

2⁶

2⁴

2²

2⁰

2⁻²

2⁻⁴

2⁻⁶

2⁻⁸

2⁻¹⁰

2⁻¹²

2⁻¹⁴

2⁻¹⁶

2⁻¹⁸

2⁻²⁰

ND

Cell Cycle				
	/non-Muse			
	Muse	M-iPS	non-M col	hES
ABL1				
ATM				
ATR				
BRCA1				
CCNB1				
CCNB2				
CCNC				
CCND1				
CCND2				
CCNE1				
CCNF				
CCNG1				
CCNG2				
CCNH				
CCNT1				
CCNT2				
CDC16				
CDC2				
CDC20				
CDC34				
CDK2				
CDK4				
CDK5R1				
CDK5RAP1				
CDK6				
CDK7				
CDK8				
CDKN1A				
CDKN1B				
CDKN2A				
CDKN2B				
CDKN3				
CHEK1				
CHEK2				
E2F4				
GADD45A				
MAD2L1				
MAD2L2				
MCM2				
MCM3				
MCM4				
MCM5				
MNAT1				
MRE11A				
PCNA				
RAD51				
RB1				
RBBP8				
RBL1				
RBL2				
RPA3				
SKP2				
TFDP1				
TFDP2				
TP53				

2⁶

2⁴

2²

2⁰

2⁻²

2⁻⁴

2⁻⁶

表 1. 多能性関連遺伝子群と細胞増殖関連遺伝子群のグローバルな遺伝子発現解析

それぞれの遺伝子発現を、Muse 細胞 (Muse)、Muse 細胞由来 iPS 細胞 (M-iPS)、non-Muse 細胞由来コロニー (non-M col)、ヒト ES 細胞 (hES) について、定量 RT-PCR により解析した。それぞれの遺伝子における mRNA の発現量を、内在性コントロールである β -actin の発現量によりノーマライズした。得られたそれぞれの値を、コントロールサンプルである non-Muse 細胞 (non-Muse) の発現量と比較し、 $\Delta \Delta Ct$ 法により定量を行った。赤くなるにつれて発現量の高さを示し、青くなるにつれて発現量の低さを示している。

1 1. 基礎論文と参考論文

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成されたものである。

Shohei Wakao, Masaaki Kitada, Yasumasa Kuroda, Taeko Shigemoto, Dai Matsuse, Hideo Akashi, Yukihiro Tanimura, Kenichiro Tsuchiyama, Tomohiko Kikuchi, Makoto Goda, Tatsutoshi Nakahata, Yoshinori Fujiyoshi, and Mari Dezawa

“Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts.”

Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 14;108(24):9875-80.

参考論文

1. Yasumasa Kuroda, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Kouki Nishikawa, Yukihiro Tanimura, Hideki Makinoshima, Makoto Goda, Hideo Akashi, Ayumu Inutsuka, Akira Niwa, Taeko Shigemoto, Yoko Nabeshima, Tatsutoshi Nakahata, Yo-ichi Nabeshima, Yoshinori Fujiyoshi, Mari Dezawa.

“Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations.”

Proc Natl Acad Sci USA 2010;107(19):8639-43

2. Shohei Wakao, Masaaki Kitada, Yasumasa Kuroda, Fumitaka Ogura, Toru Murakami, Akira Niwa, Mari Dezawa.

“Morphologic and gene expression criteria for identifying human induced pluripotent stem cells” PLoS One 2012;7(12):e48677

1 2. 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇篤なるご指導を賜りました東北大学大学院医学研究科細胞組織学分野 教授 出澤 真理 先生に深く感謝申し上げます。

本研究の全般に渡り、ご指導賜りました東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野准教授 北田容章 先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、ヒト ES 細胞を供与頂いた京都大学 iPS 細胞研究所 教授 中畑龍俊 先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、終始有益なご助言を賜りました、京都大学大学院理学研究科細胞分子構成分野 教授 藤吉 好則 先生（現 名古屋大学細胞生理学研究センター基礎生物学研究部門 教授）、同共同研究員 合田 真 博士（現 名古屋大学細胞生理学研究センター基礎生物学研究部門 特定研究員）に深く感謝申し上げます。

本研究でともに研究を遂行し、また様々なことでお世話になりました東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野 助教 谷村 幸宏 先生（現 名古屋大学細胞生理学

研究センター基礎生物学研究部門 特定研究員) 助手 黒田康勝 先生 (現 東北大学大学院医学系研究科人体構造学分野 助教)、同助手 松瀬 大 先生 (現 九州大学大学院医学研究院 助教)、同助手 明石 英雄 先生 (現 東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野 助教)、同大学院生 繁本 妙子 氏、同大学院生 土山 健一郎 氏、東北大学医学部学生 菊池 智彦 氏に心から感謝申し上げます。