



ネコiPS細胞と関連タンパク質LIFの作製に関する研究

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 公開日: 2018-04-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金城, 綾二 メールアドレス: 所属: |
| URL | https://doi.org/10.24729/00000670 |

大阪府立大学博士（獣医学）学位論文

ネコ iPS 細胞と関連タンパク質 LIF の
作製に関する研究

金城 綾二

2017 年

目次

| | | |
|-------|------------------------------|----|
| 緒 言 | ・ ・ ・ ・ ・ | 1 |
| 第 1 章 | レトロウイルスベクターによるネコ iPS 細胞株の樹立 | 4 |
| 第 1 節 | ネコ iPS 細胞株の樹立 | 5 |
| | 材料と方法 | 5 |
| | 結果 | 11 |
| | 考察 | 12 |
| | 小括 | 14 |
| | Table・Figure | 16 |
| 第 2 節 | ネコ iPS 細胞株の特性解析 | 20 |
| | 材料と方法 | 20 |
| | 結果 | 25 |
| | 考察 | 27 |
| | 小括 | 29 |
| | Table・Figure | 31 |
| 第 2 章 | ネコ iPS 細胞株の多分化能の評価 | 38 |
| | 材料と方法 | 40 |
| | 結果 | 42 |
| | 考察 | 42 |
| | 小括 | 45 |
| | Figure | 46 |
| 第 3 章 | 多能性維持タンパク質 LIF の作製 | 48 |
| 第 1 節 | ネコ LIF 遺伝子のクローニングおよびタンパク質の作製 | 50 |
| | 材料と方法 | 50 |
| | 結果 | 54 |
| | 考察 | 55 |
| | 小括 | 56 |
| | Table・Figure | 58 |
| 第 2 節 | ネコ LIF タンパク質の生理活性の評価 | 63 |
| | 材料と方法 | 63 |
| | 結果 | 69 |
| | 考察 | 70 |
| | 小括 | 73 |
| | Table・Figure | 74 |

| | |
|------|----|
| 総合考察 | 80 |
| 総括 | 84 |
| 謝辞 | 86 |
| 文献 | 87 |

緒言

ネコはイヌと同様、古くからヒトによって家畜化され、ネズミ捕りへの利用を中心に人類の歴史に深く関わってきた。現代に至っては家畜としてではなく、欠かすことのできない家族の一員である伴侶動物として幅広く飼育されている。そのため、小動物臨床ではイヌに次ぐ診療対象となっているが、ネコにおいて特に多く発生する疾患および品種特異的に見られる遺伝性疾患は、十分に研究されておらず、有効な治療法が存在しないことも多い。また、ヒトと同様、特に重篤な疾患については臓器移植や細胞移植などが有効と考えられるが、提供動物の確保が困難であり、これら臓器移植や細胞移植の技術研究も不十分である。さらに、ヒト医学ではクロラムフェニコールやピロキシカムなど、グルクロン酸抱合で代謝される医薬品が広く使用されている。しかし、ネコはグルクロン酸抱合能が欠損していることから、ヒトと比較してこれら医薬品の代謝速度が遅い [Court, 2013]。そのため、限られた薬剤しか使用できず、ネコ用医薬品の開発も重要な課題である。

現在、ヒトの医学では幹細胞移植やその分化細胞の移植が再生医療として活発に研究開発されている。中でも胚性幹細胞(Embryonic Stem Cell ; ES 細胞)や人工多能性幹細胞(Induced Pluripotent Stem Cell ; iPS 細胞)は無限に増殖し、一細胞形成に必要なすべての細胞種に分化できる能力があることから非常に注目されている [Evans and Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007]。特に iPS 細胞は受精卵を使用せず体細胞から作製でき、倫理的な問題も発生しないため、これらを分化させることで、ドナーの確保が困難な臓器や細胞を作製し、再生医療に応用する方法が検討されている [Chan *et al.*, 2010; Darabi *et al.*, 2011; Nori *et al.*, 2011; Saito

et al., 2011; Yoshida and Yamanaka, 2011; Minami *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012; Sekine *et al.*, 2012; Takebe *et al.*, 2012]。iPS 細胞は初期化因子と呼ばれる 4 種類の遺伝子またはタンパク質の働きにより、分化した状態である体細胞を最も未分化な多能性幹細胞の状態へと変化させることで作製される [Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007]。したがって、個体から侵襲性の低い方法で体細胞を採取して iPS 細胞を作製し、様々な細胞種に分化させることで個体特異的な細胞を移植治療に用いることや、採取困難な体細胞を研究利用することが可能となった。さらに同様の手法を用いて、遺伝性疾患を有する個体より iPS 細胞を作製することで、遺伝性疾患の個体と同様の遺伝子を持つあらゆる細胞種を研究利用することが可能である [Hanna *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2011; Sánchez-Danés *et al.*, 2012; Castiglioni *et al.*, 2012; Camnasio *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012]。この手法は実際にヒトにおいて iPS 細胞バンクとして運用され、遺伝性疾患の研究および治療薬の開発に利用されている。また、近年 iPS 細胞を用いた生殖細胞の作製も報告されており [Hayashi *et al.*, 2011; Hayashi *et al.*, 2012]、絶滅や遺伝的多様性の喪失が危惧される動物種の保存においてもその利用が検討されている [Liu *et al.*, 2008; Honda *et al.*, 2010; Ben-Nun *et al.*, 2012; Verma *et al.*, 2012]。

しかし、獣医学領域においては代表的なイヌ iPS 細胞の作製は報告されているが [Lee *et al.*, 2011]、ネコ iPS 細胞の作製は未だ報告されていない。ネコ iPS 細胞株が作製されれば、品種開発に伴う遺伝性疾患の研究、低費用での新薬開発に用いる細胞の安定供給、および種の保存が可能となる。また、iPS 細胞の作製時に、ヒトやマウスでは白血病阻止因子(LIF)を培地中に添加することで、iPS 細胞の分化能・増殖能が維持・増強されると報告されている。しかし、ネコ由来の LIF は作製されておらず、ネコ多能性幹細胞の作製に応用されていない。

本研究では、ネコ iPS 細胞を用いた再生医療を目指し、第 1 章として、ネコ胎子線維芽細胞に初期化遺伝子を導入し、ネコ iPS 細胞株の樹立を試みた。第 2 章として、ネコ iPS 細胞株を用いて、基礎研究や臨床応用が期待される神経幹細胞および血液系細胞への分化誘導を試みた。第 3 章としてネコ iPS 細胞の培養維持に有用と考えられる *LIF* 遺伝子のクローニングおよびシーケンス解析を行い、大腸菌におけるタンパク質発現の誘導および合成タンパク質の *LIF* としての活性の測定を行った。

第1章 レトロウイルスベクターによるネコ iPS 細胞株の樹立

現在、ネコの多能性幹細胞は ES 様細胞が作製されており、ヒト ES 細胞と類似した性質を有することが報告されている[Yu *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2010]。しかし、作製された ES 様細胞の継代・維持は困難であり、適切な培養条件も明らかになっていない。一方、ネコ iPS 細胞は未だ作製されておらず、その作製方法についても検討されていない。

iPS 細胞の作製には、体細胞に初期化遺伝子を組み込んだウイルスベクター[Takahashi and Yamanaka, 2006]やプラスミドを導入する方法[Yu *et al.*, 2009]、初期化タンパク質を直接的に作用させる方法[Zhou *et al.*, 2009]が使用されている。その中でもウイルスベクターを用いた方法は、初期化遺伝子の安定した発現と低い細胞毒性が期待できるため、iPS 細胞の作製効率が比較的高く、広く用いられている。

そこで本章では、最も基本的な iPS 細胞の作製法である、初期化遺伝子と呼ばれる *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、および *c-Myc* 遺伝子を、レトロウイルスベクターによりネコ胎子線維芽細胞に遺伝子導入し、ネコ iPS 細胞株の樹立を試みた。

第 1 節 ネコ iPS 細胞株の樹立

ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞の培養には、ウシ胎子血清(FBS)あるいはノックアウト血清代替物(KSR)を含有する培養液が広く用いられてきた [Evans and Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998; Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007]。これらの培養液成分は多能性幹細胞の誘導・維持に対し、さまざまな影響を与える [Chen *et al.*, 2011]。ネコ ES 様細胞においては、KSR 添加培地で初代コロニーが得やすいのに対し、FBS 添加培地は培養・維持に適していることが報告されている [Yu *et al.*, 2008]。一方で、ネコ iPS 細胞の作製は未だ報告されておらず、これら培養液成分の影響についても不明である。

そこで本節ではネコ胎子線維芽細胞にレトロウイルスベクターにより、初期化遺伝子を導入して iPS 細胞の作製を試みた際に、FBS 添加培地および KSR 添加培地を使用し、ネコ iPS 細胞株の樹立を試みた。

材料と方法

1. ネコ iPS 細胞作製のための準備

1) ネコ胎子線維芽細胞の培養

近郊の開業獣医師により、妊娠約 30 日のネコより摘出された子宮を入手し、直ちに子宮から胎子を取り出した。取り出したネコ胎子を PBS(-)で洗浄し、胎子に付着している血液および羊膜を取り除いた。胎子の頭部および内臓を取り除き、18 G 注射針を取り付けたシリンジに胎子を入れ、培養液を注いだ 100 mm

組織培養皿(AGC テクノグラス社製、千葉)上に注射針の先端から胎子を押し出した。これを数回繰り返して胎子を細断し、37℃、5%CO₂ 下でフィーダー細胞培地を使用して培養した。フィーダー細胞培地は Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; Life Technologies 社製、San Diego, CA)に 10%(v/v)FBS(PAA Laboratories 社製、Pasching, Australia)、100 IU/ml ペニシリンおよび 100 µg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-Glutamine(以上 SIGMA-Aldrich 社製、St.Louis, MO)を添加して作製した。この初代培養細胞は増殖後、継代を行い、3 代目までに継代した細胞を用いて実験に使用した。

2) SNL 細胞の培養・不活化・凍結

Health Protection Agency 社(London, UK)より購入した SNL 細胞を 100 mm 組織培養皿を用いて、37℃、5%CO₂ 下で培養・継代を行い、継代後の細胞をマイトマイシン C で処理することで不活化し、フィーダー細胞として使用した。培養液はフィーダー細胞培地を用いた。マイトマイシン C 処理は SNL 細胞に 10 µg/ml マイトマイシン協和 C(協和発酵キリン社製、東京)を添加し、37℃、5%CO₂ 下で 2.5 時間培養した。その後、PBS(-)で細胞を 3 回洗浄し、0.25%EDTA トリプシン(SIGMA-Aldrich 社製)を用いて細胞を回収し、バンバンカー(リンフォテック社製、東京)を用いて、使用するまで-80℃で凍結保存した。

凍結保存した細胞は実験使用前日に 37℃で素早く解凍し、0.1%(w/v)ゼラチン(和光純薬工業社製、大阪)コートした 35 mm 組織培養皿(AGC テクノグラス社製)に細胞数が 3.4×10^5 個となるように調節して播種し、使用した。

3) 293FT 細胞の培養

Life Technologies 社より購入した 293FT 細胞を 100 mm 組織培養皿を用い

て、37℃、5%CO₂ 下で培養・継代し、実験に使用した。培養液は 293FT 細胞培地を用いた。293FT 培地は DMEM に 10%(v/v)FBS、100 IU/ml ペニシリンおよび 100 µg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-Glutamine、1 mM Sodium Pyruvate(SIGMA-Aldrich 社製)、1 mM 非必須アミノ酸(Life Technologies 社製)を添加して作製した。また、培養液に 500 µg/ml Geneticin(Life Technologies 社製)を添加し、ベクター保有細胞の選別を行った。0.25%EDTA トリプシンを用いて細胞を回収し、293FT 細胞培地に 10%(v/v)ジメチルスルホキシド(DMSO; SIGMA-Aldrich 社製)を添加して作製した凍結液を用いて、使用するまで-80℃で凍結保存した。

4) Platinum-E Retroviral Packaging Cell(Plat-E 細胞)の培養

CELL BIOLABS 社(San Diego, CA)より購入した Plat-E 細胞を 0.1%(w/v)ゼラチンコートした 60 mm 組織培養皿(AGC テクノグラス社製)を用いて、37℃、5%CO₂ 下で培養・継代し、実験に使用した。培養液は DMEM に 10%(v/v)FBS、100 IU/ml ペニシリンおよび 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加して作製した 10%FBS 培地を使用した。また、培養液に 10 µg/ml Blastidin および 1 µg/ml Puromycin(SIGMA-Aldrich 社製)を添加し、ベクター保有細胞の選別を行った。細胞の継代は 0.05%EDTA トリプシンを使用した。0.05%EDTA トリプシンを用いて細胞を回収し、バンバンカーを用いて、使用するまで-80℃で凍結保存した。

5) プラスミドの分離

pLenti6/Ub/mSlc7a1 を保有する大腸菌 Stbl3 株および pMXs-Oct3/4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、および pMXs-c-Myc を保有する大腸菌 DH5α 株(以上、

Addgene 製、Cambridge, MA)を用いた。これらプラスミド保有大腸菌を滅菌シャーレ(AGC テクノグラス社製)上の LB 寒天培地上にプレーティングし、37℃、5%CO₂ 下で一晩培養した。LB 寒天培地は超純水に 1%(w/v)トリプトン、1%(w/v)塩化ナトリウム、0.5%(w/v)Extract Yeast Dried(以上、Nacalai Tesque 社製)、1.5%(w/v)アガー、50 µg/ml アンピシリン(SIGMA-Aldrich 社製)を添加して作製した。

シングルコロニーを滅菌爪楊枝でピックアップし、LB 液体培地 1.5 ml 中で、37℃、190 rpm の条件下で 18 時間、振盪培養した。LB 液体培地は超純水に 1%(w/v)トリプトン、1%(w/v)塩化ナトリウム、0.5%(w/v)Extract Yeast Dried、50 µg/ml アンピシリンを添加して作製した。振盪培養にはバイオシェイカー(BR-21UM 型；タイテック社製、大阪)を用いた。

Quick Gene SP kit Plasmid II(富士フイルム社製、東京)を用いたスピン法により、各プラスミドを抽出した。次に分光光度計(ジャスコ V-530 型；日本分光社製、東京)を用いて、抽出液中のプラスミド濃度を測定し、-20℃で凍結保存した。

2. ネコ iPS 細胞の作製

実験者の安全性と遺伝子導入効率を高めるために、初めに宿主域の広いレンチウイルスを用いて *mslc7a1* 遺伝子をネコ胎子線維芽細胞に導入し、マウスエクトロピックレセプターをその細胞表面に発現させた。その後、このレセプターのみを認識するレトロウイルスを用いて細胞の初期化に必要であるマウス *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、および *c-Myc* の 4 遺伝子をネコ胎子線維芽細胞に導入し、細胞の初期化を行った。実際の実験は以下の通りである。

1) レンチウイルスの調整

293FT 細胞はその細胞内のプラスミドにレンチウイルスの構造タンパクを産生する遺伝子を保有しており、レンチウイルスベクターを導入されることで、導入したレンチウイルスベクターを保有するレンチウイルスを産生することができる。レンチウイルスを産生させるため、100 mm 組織培養皿に 293FT 細胞を 3.65×10^6 個播種した。これに対し、Lipofectamine 2000(Life Technologies 社製)を用いたリポフェクタミン法により、Virapower packaging mix(pLP1、pLP2 および pLP/VSVG ; Life Technologies 社製)および pLenti6/Ub/mSlc7a1 を遺伝子導入した。24 時間後に培地交換を行い、さらに 24 時間後に培養上清を回収し、 -80°C で凍結保存した。

2) レンチウイルスの感染(*mslc7a1* 遺伝子の導入)

このレンチウイルス液 2 ml と Geneticin を除去した 293FT 細胞培地 2 ml と混合し、さらに Hexadimethrine Bromide(Nacalai Tesque 社製)を最終濃度 4 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。このウイルス感染液を 60 mm 組織培養皿に 2.85×10^5 個播種したネコ胎子線維芽細胞に培地交換の際に使用し、 37°C 、5% CO_2 下で培養した。16 時間後に PBS(-)で細胞を 3 回洗浄し、0.25%EDTA トリプシンを用いて細胞を回収し、バンバンカーを用いて -80°C で凍結保存した。

3) レトロウイルスの調整

Plat-E 細胞はその細胞内のプラスミドにレトロウイルスの構造タンパクを産生する遺伝子を保有しており、レトロウイルスベクターを導入されることで、導入したレトロウイルスベクターを保有するレトロウイルスを産生することがで

きる。レトロウイルスを産生させるため、60 mm 組織培養皿に Plat-E 細胞を 1.3×10^6 個播種した。これに対し、pMXs-Oct3/4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、pMXs-c-Myc、または pMX-GFP(Cell Biolabs 社製)を Fugene 6 transfection reagent(Roche 社製、Schweiz、Switzerland)を用いて、遺伝子導入した。24 時間後培地交換を行い、さらに 24 時間後に培養上清を回収した。pMXs-Oct3/4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、または pMXs-c-Myc を遺伝子導入した Plat-E 細胞培養上清を等量ずつ混合した。

4) レトロウイルスの感染(4 遺伝子の導入)

凍結保存したレンチウイルス感染済みネコ胎子線維芽細胞を 37°C で素早く解凍し、35 mm 組織培養皿に細胞数が 1.0×10^5 個となるように調節して播種した。ここに前述のレトロウイルス液(pMXs-Oct3/4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、および pMXs-c-Myc 混合物または pMX-GFP)を培地交換の際に 2 ml 加え、37°C、5%CO₂ 下で培養した。16 時間後に Blastidin および Puromycin を含まない 10%FBS 培地を用いて培地交換し、以後は 2 日ごとに同様の培養液を用いて培地交換を行った。

5) 最適再播種細胞数の検討

レトロウイルスによる 4 遺伝子導入後 6 日に、0.25%EDTA トリプシンを用いて 4 遺伝子を導入したネコ胎子線維芽細胞を回収し、新たな 35 mm 組織培養皿に再播種し、37°C、5%CO₂ 下で培養した。35 mm 組織培養皿は 0.1%(w/v)ゼラチンコートし、さらに不活化した SNL 細胞を 3.4×10^5 個播種したものを用いた。再播種する際の細胞数を 5.0×10^3 、 1.0×10^4 、および 4.0×10^4 個とした。また、再播種翌日に培養液をヒト ES 細胞培地に変更した。ヒト ES 細胞培地は

DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM(SIGMA-Aldrich 社製)に 20%(v/v)ES 細胞用 FBS(Life Technologies 社製)または KSR(Life Technologies 社製)、100 IU/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン、2 mM L-Glutamine、0.1 mM 非必須アミノ酸、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(SIGMA-Aldrich 社製)、10 ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF;Repro Tech 社製、Coconut Creek、FL)を添加して作製した。FBS 添加培地および KSR 添加培地それぞれにおけるネコ iPS 細胞初代コロニー形成に最適な細胞数を検討した。

6) ネコ iPS 細胞作製時の培養液の検討

上記の実験で最適であると判断した再播種細胞数でネコ iPS 細胞の作製を行い、FBS 添加培地および KSR 添加培地それぞれにおける初代コロニー形成効率を検討した。また、継代可能な大きさまで成長した初代コロニー(FBS 添加培地で合計 9 個、KSR 添加培地で合計 47 個)を機械的に細断し、P1 として新たな 35 mm 組織培養皿で培養した。35 mm 組織培養皿は 0.1%(w/v)ゼラチンコートし、さらに不活化した SNL 細胞を 3.4×10^5 個播種したものをを用いた。培養液は初代コロニー形成時と同様のものを使用し、FBS 添加培地および KSR 添加培地それぞれにおける継代数を検討した。

統計処理

iPS 細胞の初代コロニー形成効率は平均値 \pm 標準誤差で表し、Statcel2(オーエムエス出版社製、埼玉)を用いて、スチューデントの t 検定により有意差の検定を行った。 $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

結果

1. 最適再播種細胞数の検討

FBS 添加培地では線維芽細胞の増殖が著しく、高い再播種細胞数ではネコ iPS 細胞コロニーの成長が阻害された(Fig.1-1)。また、再播種細胞数が FBS 添加培地では 5×10^3 個、KSR 添加培地では 4×10^4 個の条件が最もネコ iPS 細胞初代コロニーを得やすいことがわかった(Table 1)。

2. ネコ iPS 細胞作製時の培養液の検討

最適再播種細胞数でネコ iPS 細胞作製を試みたところ、初代コロニー形成効率は FBS 添加培地では 0.011%(合計 1.4×10^5 個のネコ胎子線維芽細胞から 15 個の初代コロニー)、KSR 添加培地では 0.035%(合計 11.2×10^5 個のネコ胎子線維芽細胞から 396 個の初代コロニー)であり、KSR 添加培地で有意に($P < 0.01$)高かった(Fig.1-2)。しかし、初代コロニー形成時と同様の培地で継代を行ったところ、FBS 添加培地のほうが長期継代しやすい傾向が見られた(Fig.1-3)。また、FBS 添加培地で P45 まで長期継代できるネコ iPS 細胞株を樹立することができた。

考察

本節では、初期化遺伝子をレトロウイルスベクターによりネコ胎子線維芽細胞に導入し、FBS 添加培地を用いることで、長期継代可能なネコ iPS 細胞株の樹立に成功した。従来、最も基本的な iPS 細胞の作製法として、増殖力が高く調整が容易である線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて 4 遺伝子を導入する方法が用いられているが、その際のヒト iPS 細胞初代コロニー形成効率は 0.01%

であることが報告されている[Takahashi *et al.*, 2007]。本研究では、培養液を FBS または KSR 添加培地として、線維芽細胞の再播種細胞数を検討した結果、FBS 添加培地を用いた際には高い再播種細胞数で線維芽細胞が著しく増殖し、iPS 細胞コロニーの成長が阻害されることがわかった。これはアカゲザルの iPS 細胞作製の報告と一致する[Liu *et al.*, 2008; Honda *et al.*, 2010]。それに対し、KSR 添加培地では高い細胞数でも iPS 細胞コロニーの成長は阻害されなかった。このことから線維芽細胞の増殖特性は培養液による影響を受けることが示唆され、再播種細胞数の検討を十分に行うことで iPS 細胞の作製効率を改善することができると考えられる。さらに、遺伝子導入する細胞の種類に応じた再播種細胞数の検討が広く研究されれば、iPS 細胞の樹立がより効率化されると思われる。

本研究では KSR 添加培地を用いることで初代コロニー形成効率は 0.035% に改善されることがわかった。しかし同時に、継代培養には FBS 添加培地が適していると考えられた。FBS は生体由来の試薬であり、未知の成分が数多く含まれており、既知の成分についてもその正確な濃度については不明である。それに対し、KSR はその詳細な組成は明らかにされていないものの、多能性幹細胞の培養に有用な成分を基に作製されている。マウス ES 細胞およびネコ ES 様細胞の作製時に KSR 添加培地を用いると、初代コロニー形成効率が改善される[Yu *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2010]。また、マウス ES 細胞を KSR 添加培地で培養すると FBS 添加培地で培養した際と比較して、Erk 細胞内伝達系の発現が低下する[Bryja *et al.*, 2006]。さらに、マウス ES 細胞の作製時に Erk を阻害すると、その作製効率が上昇する[Buehr and Smith, 2003; Dalton, 2012; Wang *et al.*, 2008]。これらの報告から、KSR 添加培地においても Erk の発現が低下することで、ES 細胞の作製効率が改善されることが考えられる。また、Erk は形質転換

成長因子 β (TGF- β)およびアクチビンによって誘導され[James *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 2007; Watabe and Miyazono, 2009; Pauklin and Vallier, 2015.]、最終的には創傷の治癒や幹細胞の分化において重要な上皮間葉転換と言われる変化を引き起こす[Lamouille *et al.*, 2014]。線維芽細胞から iPS 細胞を作製する際には、上皮間葉転換とは逆の反応である間葉上皮転換が必要であり[Li *et al.*, 2010]、TGF- β およびアクチビンは iPS 細胞の作製効率を低下させることが明らかにされている[Ichida *et al.*, 2009; Beers *et al.*, 2012]。一方、TGF- β およびアクチビンは初期化終了後には iPS 細胞の増殖を促進し、その維持に極めて重要な働きを示す[Ichida *et al.*, 2009; Beers *et al.*, 2012]。KSR はこの TGF β およびアクチビンを含まないことが明らかにされている[Garcia-Gonzalo and Izpisua Belmonte, 2008.]。これらの報告から、KSR 添加培地では Erk 細胞内伝達系が TGF β およびアクチビンによって誘導されず、間葉上皮転換が促進されて初代コロニー形成効率は高かったが、増殖促進作用は不十分であったために長期継代は困難であったと推測される。

今後、FBS 添加培地および KSR 添加培地の組み合わせ、さらには TGF- β やアクチビン、その阻害剤の添加について検討することで、初代コロニー形成効率を改善し、長期継代も可能な iPS 細胞の培養条件を確立できると考えられる。

小括

ネコ iPS 細胞株の樹立を目的とし、初期化遺伝子をレトロウイルスベクターによりネコ胎子線維芽細胞に遺伝子導入し、樹立に有用と考えられる培地条件の検討を行った結果、FBS 添加培地および KSR 添加培地の双方においてネコ iPS 細胞の初代コロニーを得ることができた。また、KSR 添加培地が初代コロ

ニーを得やすい傾向があるのに対し、FBS 添加培地はネコ iPS 細胞を長期継代しやすい傾向があることを明らかにした。

以上の結果、FBS 添加培地で 45 継代可能なネコ iPS 細胞株の樹立に成功した。

Table • Figure

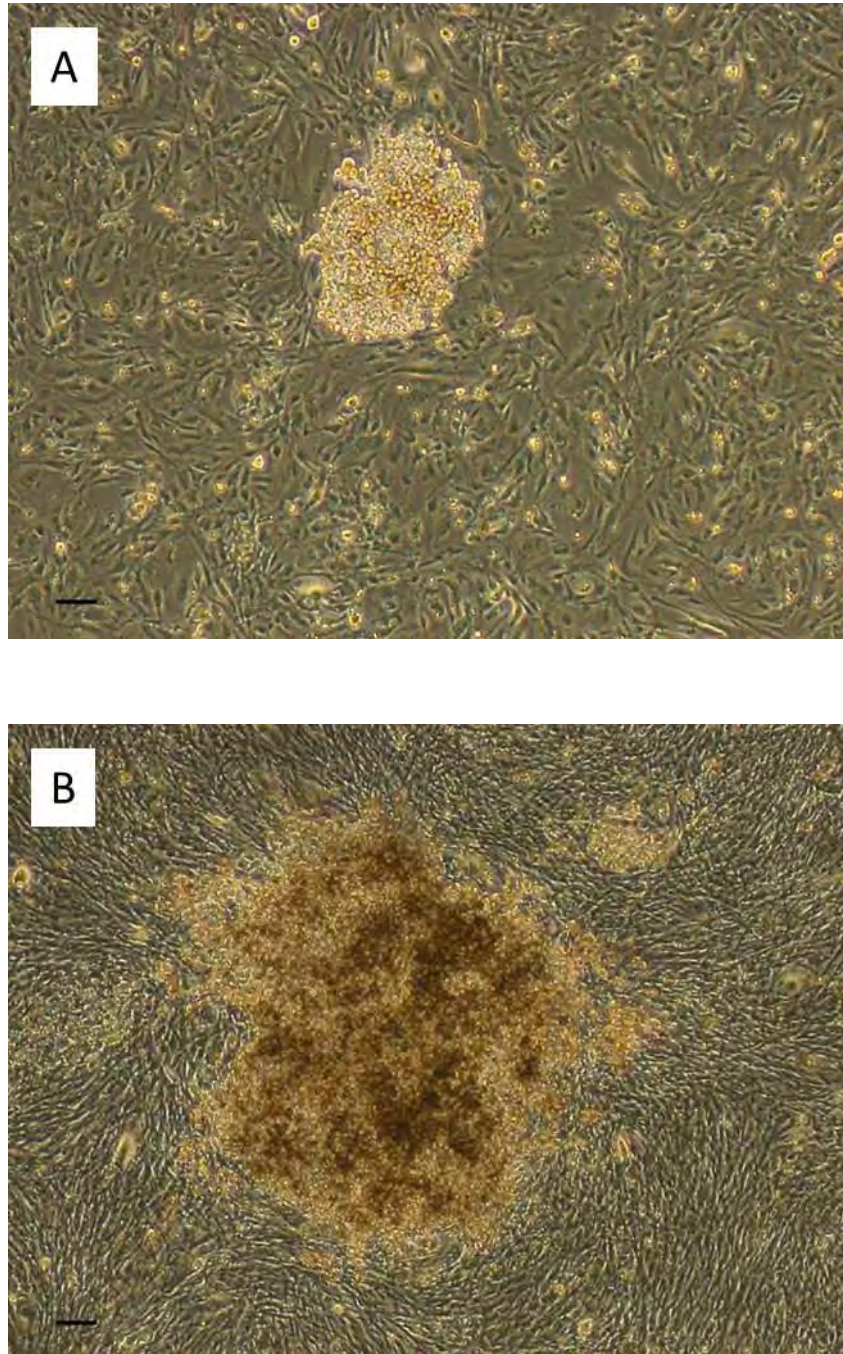


Fig. 1-1 培養液と再播種細胞数

(A)KSR または(B) FBS 添加培地におけるネコ iPS 細胞初代コロニー
(再播種細胞数が 4×10^4 個のときのもの) Bar = 100 μm

| | 再播種細胞数 | | |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 5×10^3 個 | 1×10^4 個 | 4×10^4 個 |
| FBS | 4 | 4 | 1 |
| KSR | 0 | 8 | 8 |

Table 1 再播種細胞数と iPS 細胞コロニー形成数

35 mm 組織培養皿を使用して培養し、倒立顕微鏡下で観察し、
形態的特徴をもとに判断

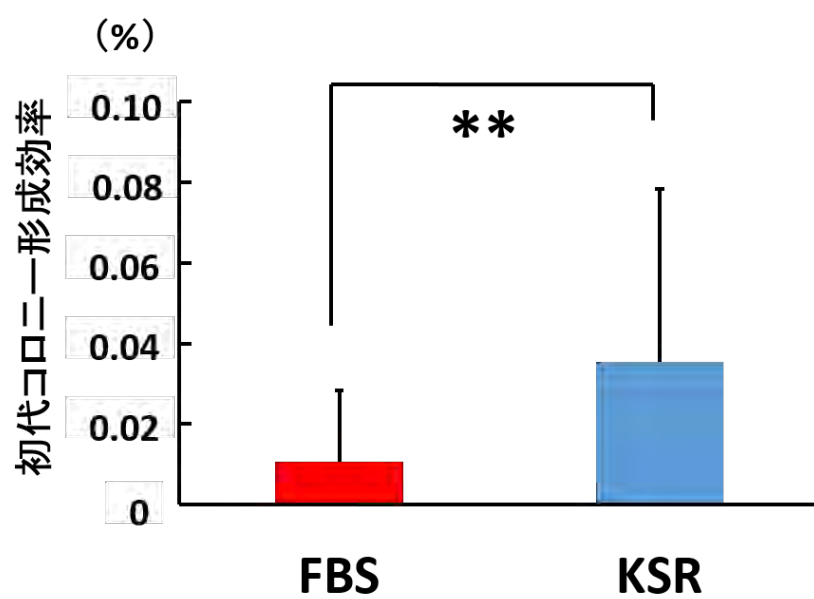


Fig. 1-2 培養液と iPS 細胞初代コロニー形成効率
** $P < 0.01$ 、平均 \pm 標準誤差 (n = 3)

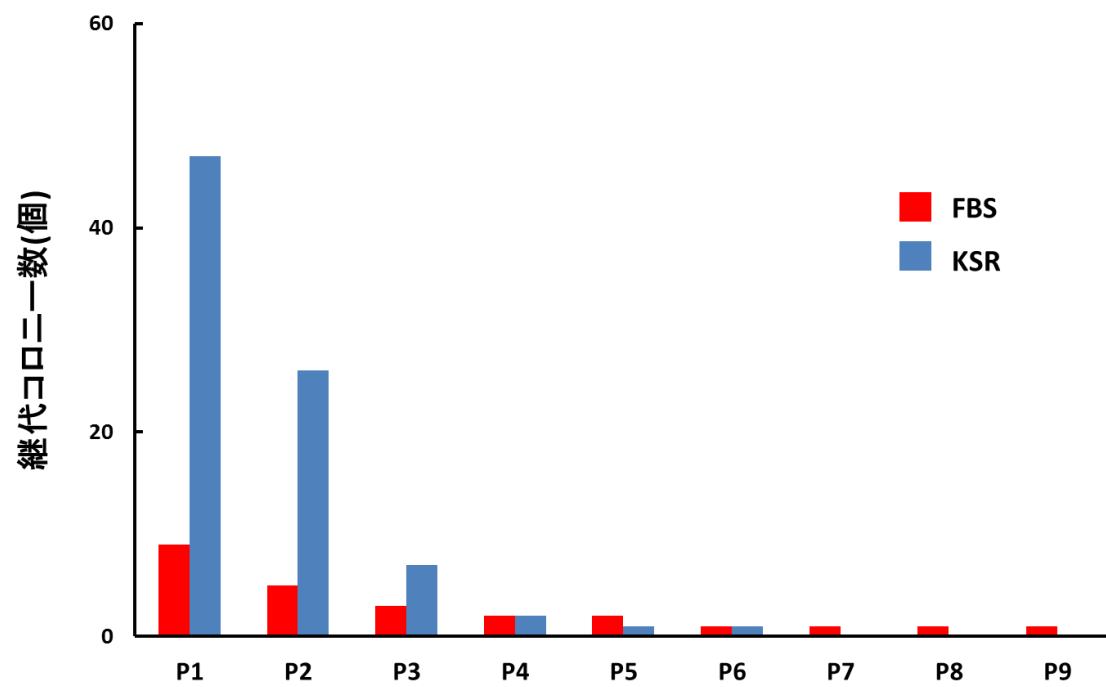


Fig. 1-3 培養液と iPS 細胞コロニー継代数

第2節 ネコ iPS 細胞株の特性解析

過去の研究において ES 細胞の特性解析を行う際には、形態的特徴、未分化マーカーの発現、正常な核型、多能性遺伝子の発現、多分化能などが検討されている [Evans and Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998]。さらに、初期化遺伝子の過剰発現は分化抵抗性を引き起こすと考えられているため、iPS 細胞の特性解析では導入遺伝子の抑制についても評価が行われている [Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi *et al.*, 2007]。また、マウスとヒトでは多能性幹細胞の形態的特徴や増殖特性、発現する未分化マーカー・多能性遺伝子が異なることが知られている [Ginis *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2007]。そのため、マウスまたはヒトと同様の性質を有する多能性幹細胞はそれぞれ naïve 型または primed 型と分類され [Hanna *et al.*, 2010]、新たに多能性幹細胞が作製された際には、マウスおよびヒトの多能性幹細胞と比較する方法が多く用いられている [Hatoya *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2013]。

本節では、マウスおよびヒト多能性幹細胞を比較対象とし、第 1 節で作製したネコ iPS 細胞株の特性解析を行った。

材料と方法

1. 形態および未分化マーカーの発現

ネコ iPS 細胞株の形態的特徴および未分化マーカーの発現を評価した。形態的特徴はマウス iPS 細胞またはヒト iPS 細胞と比較を行った。また、ネコ iPS 細胞で見られた形態的特徴が継代および凍結・融解後も維持されているかにつ

いても評価を行った。凍結処置はガラス化法により行った。すなわち、継代と同様にネコ iPS 細胞のコロニーを回収し、できる限り培養液を除去した後に凍結液 200 μ l を加え、液体窒素中で速やかに凍結させた。凍結液は DAP213 を使用した。DAP213 は 6 ml ヒト ES 細胞培地に 0.59 g アセタミド(SIGMA-Aldrich 社製)を溶解し、さらに 1.42 ml DMSO および 2.2 ml 1,2-プロパンジオール(SIGMA-Aldrich 社製)を加えて作製し、使用するまで -80°C で保存した。ネコ iPS 細胞は凍結後、液体窒素中で使用するまで保存した。

未分化マーカーとして、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性および幹細胞マーカーである Stage-Specific Embryo Antigen 1 (SSEA-1)、SSEA-4、Tumor Rejection Antigen-1-60 (TRA-1-60)、TRA-1-81、NANOG および OCT3/4 の発現の有無を調べた。ALP 活性は Alkaline Phosphatase Staining Kit II (STEMGENT 社製、Cambridge, MA)を使用して判定を行った。すなわち、A 液と B 液を等量ずつ混合して、 37°C で 2 分間静置し、さらに C 液を等量加えたものを染色液とした。この染色液は作製後 30 分以内に使用した。ネコ iPS 細胞の培養液を除去し、そこに PBS と固定液を等量ずつ加え、 37°C で 4 分間静置した。固定液を除去し、0.05%(v/v)Tween20 添加 PBS(-)(PBST)を用いて洗浄した後、染色液を加えて室温暗室下で 10 分間静置した。その後、PBS(-)を用いて 2 回洗浄し、顕微鏡下で観察した。また、幹細胞マーカーは免疫染色によりその発現を評価した。すなわち、ネコ iPS 細胞を PBS(-)で洗浄後、4% パラホルムアルデヒドを用いて室温下で 5 分間固定した。再び PBS(-)で洗浄後、0.5%(v/v)PBST(-)を加え、室温下で 5 分間静置した。0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA ; SIGMA-Aldrich 社製)含有 PBS(-)で洗浄後、10%(w/v)BSA 含有 PBS(-)で 30 分間のブロッキング処理を行った。一次抗体として抗 SSEA-1 モノクローナル抗体(MAB4301 ; Millipore 社製、Billerica, MA)、抗 SSEA-4 モノ

クローナル抗体(MAB4304 ; Millipore 社製)、マウス抗 TRA-1-60 モノクローナル抗体(MAB4360 ; Millipore 社製)およびマウス抗 TRA-1-81 モノクローナル抗体(MAB4381 ; Millipore 社製)を最終濃度 40 $\mu\text{g/ml}$ 、ヤギ抗 NANOG ポリクローナル抗体(ab77095 ; Abcam 社製、Cambridge、MA)を最終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ 、マウス抗 OCT3/4 モノクローナル抗体(MAB4401; Millipore) を最終濃度 40 $\mu\text{g/ml}$ で加え、37°C 下で一晩静置した。0.1%(w/v)BSA 含有 PBS(-)で洗浄後、二次抗体を加えた。二次抗体として SSEA-1、TRA-1-60 および TRA-1-81 に対しては Cy3 標識ヤギ抗マウス IgM モノクローナル抗体(Millipore 社製)を最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ 、SSEA-4 および OCT3/4 に対しては Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG モノクローナル抗体(Life Technologies 社製)を最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ 、NANOG に対しては PE 標識ロバ抗ヤギ IgG ポリクローナル抗体(NB7590; NOVUS Biologicals 社製、Littleton、CO)を最終濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ で使用した。60 分間反応後、ProLong® Gold antifade reagent with DAPI(Life Technologies 社製)を用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon Csi 型 ; ニコン社製、東京)を用いて観察した。その際、ネコ胎子線維芽細胞および二次抗体のみを加えたネコ iPS 細胞をネガティブコントロールとして使用した。

2. 核型解析

実験前日にネコ iPS 細胞コロニー全体を、0.1%(w/v)ゼラチンコートした 35 mm 組織培養皿にフィーダー細胞を使用せずに継代した。コルセミド(Life Technologies 社製)を最終濃度 0.1 $\mu\text{g/ml}$ となるように培養液に添加し、37°C、5%CO₂ 下で培養した。2 時間後、培養液を除去し、PBS(-)で 2 回洗浄を行った。0.25%EDTA トリプシンで 3 分間処理した後、培養液を加えて細胞を回収し、4°C、190 x g の条件で 5 分間遠心を行った。上清を除去した後、あらかじめ 37°C

に温めておいた 0.075 M KCl を 2 ml 沈渣に加えて攪拌し、37℃下で 5 分間静置した。そこにカルノア固定液を 2 ml 静かに重層し、馴染むように混ぜた後に 4℃、190 x g の条件で 5 分間遠心を行った。上清を除去した後、カルノア固定液を 4 ml 沈渣に加えて攪拌し、4℃、190 x g の条件で 5 分間遠心を行った。この作業を 2 回実施した。その後、上清を 0.5 ml 程度残るように除去し、沈渣を攪拌することで細胞懸濁液を作製した。次にスライドグラスを置いた試験管ラックを 43℃のウォーターバス中に静置し、このスライドグラスに上記の細胞懸濁液を約 50 cm 以上の高さから数滴、滴下した。その後、スライドグラスを風乾し、簡易ギムザ染色を実施した後に顕微鏡を用いて観察した。

3. RT-PCR

導入 4 遺伝子(pMXs-Oct3/4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、および pMXs-c-Myc) および内在多能性維持遺伝子(*NANOG*、*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、および *c-MYC*) の発現の有無を評価するために、ネコ iPS 細胞より total RNA を抽出し、RT-PCR を実施した。total RNA は RNeasy Micro(QIAGEN 社製、Hilden、Germany)を使用し、マニュアルに従い回収した。この回収物は逆転写反応に用い、cDNA を合成した。逆転写反応は回収物 1 µg に対し、最終濃度で dNTPs mixture 0.5 mM、random 9 mer 2.5 µM、ReverTra Ace 5 U/µl、1×RT buffer(以上、TOYOBO 社製、大阪)に RNA free 水を加えた総量 20 µl で行った。その後、Block Incubator(BI535 型 ; ASTEC 社製、福岡)を用いて、30℃ 10 分、42℃ 50 分および 99℃ 5 分の温度条件で反応させ、使用するまで-20℃で保存した。

この逆転写反応液 0.5 µl に最終濃度で 1×Blend Taq buffer、Blend Taq 0.025 U/µl (以上、TOYOBO 社製)、dNTPs mixture 0.2 mM、forward および reverse プライマー 0.5 µM ずつに滅菌蒸留水を加えた総量 20 µl で、サーマルサイクラ

ー(My Cyclor ; バイオ・ラッドラボラトリーズ社製、東京)を用いて PCR を行った。PCR は 94℃で 2 分加熱後、94℃ 30 秒、アニーリング温度 30 秒、72℃ 90 秒で 42 サイクル行い、その後 72℃で 2 分加熱後、使用するまで-20℃で保存した。対象遺伝子に対して使用したプライマーおよびアニーリング温度は Table 2 に示した。

PCR 増幅産物に loading buffer を適切な濃度で添加し、エチジウムブロマイド(Nacalai Tesque 社製)添加 2%(w/v)アガロース(Nacalai Tesque 社製)ゲルを用いて電気泳動(100 V、25 分)を行った。UV トランスイルミネーター(DT-20CP 型; ATTO、東京)を用いて電気泳動後のアガロースゲルを観察し、導入 4 遺伝子および内在多能性維持遺伝子の検出を行った。

4. 胚様体形成能および三胚葉への分化能の評価

ネコ iPS 細胞のコロニーを顕微鏡下でフィーダー細胞から分離し、ゼラチンコートおよびフィーダー細胞のない滅菌シャーレで、b-FGF 無添加ヒト ES 細胞培地を用いて 8 日間、37℃ 5% CO₂ 条件下で浮遊培養し、胚様体形成能を評価した。さらに、形成させた胚様体を 0.1%(w/v)ゼラチンコートしたカバーガラスチャンバー(AGC テクノグラス社製)を用いて 8 日間、37℃ 5% CO₂ 条件下で接着培養した。培養液は b-FGF 無添加ヒト ES 細胞培地を用いた。免疫染色は前述の方法で実施した。ただし、一次抗体としてマウス抗 class3 β -tubulin(Tuj1、神経細胞マーカー)モノクローナル抗体(MAB1637; Millipore 社製)を 1000 倍希釈したもの、ウサギ抗 Desmin(中胚葉マーカー)ポリクローナル抗体(ab84990 ; Abcam 社製))およびマウス抗 SOX17(内胚葉マーカー)モノクローナル抗体(ab84990 ; Abcam 社製)を最終濃度 1 μ g/ml で使用し、二次抗体として Tuj1 および SOX17 に対しては Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG モノクローナル抗体

を最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ 、Desmin に対しては Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ IgG モノクローナル抗体(Life Technologies 社製)を最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ で使用した。

5. テラトーマ形成能の評価

ネコ iPS 細胞を PBS(-)で洗浄し、細胞傷害作用が低いと報告されている Accutase(ナカライテスク社製)を用いて、37°C条件下で 3 分間処理した[Bajpai *et al.*, 2008]。その後、酵素反応を停止させるためにヒト ES 細胞培地を添加した後、ネコ iPS 細胞を回収し、20°C、20 x g の条件下で 2 分間遠心した。約 1×10^7 個のネコ iPS 細胞を 10 μl DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM および 10 μl Matrigel Matrix (BD Biosciences 社製、San Jose, CA, USA)の混合液を用いて再懸濁し、氷上に静置した。

オスの重症複合型免疫不全症マウス(SCID マウス ; 日本エスエルシー社製、浜松)に 80 mg/kg ペントバルビタール(共立製薬社製、東京)を腹腔内投与した後、下腹部正中線に沿って切開を行い、開腹した。脂肪体とともに精巣を腹腔外に引き出し、先ほどの懸濁したネコ iPS 細胞を精巣表層部へ注入した。その後、引き出した精巣は正常位置へと戻し、腹壁および皮膚をそれぞれ 20mm 丸針付き 4-0 ポリグリコール酸合成吸収性縫合糸(河野製作所社製、千葉)および 17mmBB 丸針付き 4-0 ポリプロピレン非吸収性縫合糸(Johnson & Johnson 社製、New Brunswick, NJ)で縫合した。マウスは体温低下を防ぐ目的で、覚醒まで保温電球で 38°C前後に保温した。12 週間後に頸椎脱臼による安楽殺を実施して解剖し、テラトーマ形成の有無を確認した。

結果

1. 形態および未分化マーカーの発現

長期継代できたネコ iPS 細胞コロニーは核/細胞質比が大きく、核小体が明瞭であり、細胞間密度が高く、細胞間境界が明瞭である細胞で構成されており、ヒト ES 細胞と類似した形態を有していた(Fig.2-1)。この形態的特徴は 45 継代した後および凍結・融解後も変化は見られなかった(Fig.2-2)。ALP 染色には陽性を示し(Fig.2-3A)、幹細胞マーカーは SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、NANOG、OCT3/4 に陽性の細胞が確認できた(Fig.2-3B-H)。一方で SSEA-1 には陰性を示した(Fig. 2-3I)。

2. 核型解析

核型解析では $2n = 38 XY$ 型の核型を示し、染色体に明らかな異常は確認されなかった(Fig.2-4)。

3. RT-PCR

導入 4 遺伝子(pMXs-Oct3/4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、および pMXs-c-Myc) および内在多能性維持遺伝子(*NANOG*、*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、および *c-MYC*) の発現の有無を RT-PCR で解析したところ、継代を重ねるにつれて導入 4 遺伝子は検出されなくなったが、すべての継代数で内在多能性維持遺伝子は検出された(Fig.2-5)。

4. 胚様体形成能および三胚葉への分化能の評価

胚様体を介した分化誘導を行ったところ(Fig.2-6A)、神経様や上皮様などの多様な形態を示す細胞群が得られた(Fig.2-6B,C)。本細胞群には class3 β -tubulin(外胚葉マーカー)、SOX17(内胚葉マーカー)または Desmin(中胚葉マーカー)に対す

る免疫染色に陽性を示す細胞が確認された(Fig.2-6D-F)。

5. テラトーマ形成能の評価

12 週後に SCID マウスを解剖して精巣を肉眼的に観察したが、テラトーマの形成は確認されなかった。

考察

本節では、第 1 節で作製したネコ iPS 細胞株は増殖特性・凍結融解への耐性・未分化マーカー・核型・導入遺伝子および内在多能性維持遺伝子の発現状態・分化能において、ヒト多能性幹細胞と類似した特性を有していることを明らかにした。すなわち、本研究で樹立した細胞株はヒト ES 細胞と同様に扁平なコロニーを形成して増殖する特性を有しており、コロニーがドーム状の形態を示し、1 個の細胞で継代・培養可能なマウス ES 細胞とは異なる性質を示した[Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007]。また、これらの形態的特徴および増殖特性は凍結・融解を行った後にも変化は認められず、細胞株として維持が可能であると考えられた。化学染色および免疫染色では未分化マーカーである ALP、SSEA-4、TRA-1-60、TRA1-81、NANOG および OCT3/4 に陽性、SSEA-1 に陰性を示し、未分化な状態であることが確認できた。ネコ iPS 細胞株で発現する未分化マーカーはヒト ES 細胞と一致し、マウス ES 細胞と異なることが明らかとなった[Ginis *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2007]。一方、ネコ ES 様細胞の未分化マーカーについて、同一の抗体を使用しているにもかかわらず、Yu らは SSEA-1 および SSEA-4 陽性、Gómez らは SSEA-1 陽性かつ SSEA-4 陰性であると報告している[Yu *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2010]。本研究においても、

同一の抗体を使用しているが、ネコ iPS 細胞株は SSEA-1 陰性かつ SSEA-4 陽性であり、いずれの報告とも異なる未分化マーカーの発現パターンを示した。ネコ多能性幹細胞の真の未分化マーカーを決定するには、多能性幹細胞の性質である自己複製能と三胚葉への分化能を有する細胞を使用することを前提とし、さらに naïve 型あるいは primed 型であるかについても考慮する必要がある。本研究のネコ iPS 細胞株は形態的特徴および増殖特性から判断し、primed 型であると考えられる。また、同時に発現が認められた NANOG および OCT3/4 は高い未分化性の指標とされることから、ネコ iPS 細胞株は primed 型の中でも高い未分化性を有していると考えられる [Chambers *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Theunissen *et al.*, 2011]。

長期継代した細胞では染色体の異常が発生しやすいことが報告されており [Tomioaka *et al.*, 2010]、染色体異常を有する iPS 細胞は腫瘍化または分化させた際に目的とする細胞の性質が得られないといった危険性が考えられることから、核型分析は iPS 細胞の樹立において重要とされている。本研究で樹立した iPS 細胞株は正常な核型を示しており、明らかな染色体異常は認められなかった。今後、遺伝子レベルでの変異についてはより慎重な検討が必要である。

また、本研究で遺伝子導入に用いたベクターはレトロウイルスのプロモーターを有するため、継代を重ねてもその遺伝子発現が抑制されない場合には分化誘導に対する抵抗性、または分化した場合でも遺伝子発現が強力に維持され、分化細胞の腫瘍化または性質の変異を示す危険性が考えられる [Verma *et al.*, 2012]。本研究で樹立した細胞株は RT-PCR では導入 4 遺伝子が検出されずその発現の抑制が示唆され、反対に内在多能性遺伝子である *NANOG*、*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、および *c-MYC* が検出された。これまで樹立されたブタやイヌの iPS 細胞は、導入 4 遺伝子の発現抑制が不十分であったが [Wu *et al.*, 2009; Bao

et al., 2011; Ben-Nun *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2012]、ネコ iPS 細胞は外来遺伝子によらず、内在多能性遺伝子によって維持可能であることが示された。

ネコ iPS 細胞株は浮遊培養で胚様体を形成し、さらに接着培養することで外胚葉マーカー、内胚葉マーカー、または中胚葉マーカーに陽性を示す細胞へ分化した。ネコ ES 様細胞を含め、不完全な多能性幹細胞は一部胚葉への分化が不可能であることが多いが[Yu *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2010]、本研究のネコ iPS 細胞は目的の細胞に分化させて使用できる可能性が示された。一方、ネコ iPS 細胞株を SCID マウスに投与したが、テラトーマの形成は認められなかった。テラトーマ形成能はヒトやマウスの多能性幹細胞で報告されており、高い未分化性の指標とされている[Lyman *et al.*, 1993; Hannum *et al.*, 1994]。ブタやイヌ、ユキヒョウの iPS 細胞においても、テラトーマ形成が報告されているが、これらの iPS 細胞の導入遺伝子は抑制されていない[Wu *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2013]。そのため、ヒトやマウス以外の動物種で、導入遺伝子が抑制された iPS 細胞がテラトーマ形成能を有するかについては慎重な検討が必要である。

小括

本節では、マウスおよびヒト多能性幹細胞を比較対象とし、第 1 節で作製したネコ iPS 細胞株の特性解析を行った。その結果、本細胞株は増殖特性・凍結融解への耐性・未分化マーカー・核型・導入遺伝子および内在多能性維持遺伝子の発現状態・分化能において、ヒト多能性幹細胞と類似した特性を有していた。

以上の結果から、ヒトと同様に最も基本的なレトロウイルスにより 4 遺伝子を導入する方法を用いても、ネコ primed iPS 細胞株を作製できることが示され

た。

Table・Figure

| プライマー名 | 塩基配列 | 目的遺伝子 | |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------|------|
| Oct3/4-S695 | TTG GGC TAG AGA AGG ATG TGG TTC | transgene <i>Oct3/4</i> | 64°C |
| Sox2-S768 | GGT TAC CTC TTC CTC CCA CTC CAG | transgene <i>Sox2</i> | 51°C |
| Klf4-S1236 | GCG AAC TCA CAC AGG CGA GAA ACC | transgene <i>Klf4</i> | 67°C |
| c-Myc-S1093 | CAG AGG AGG AAC GAG CTG AAG CAG | transgene <i>c-Myc</i> | 53°C |
| pMX-AS3200 | TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG CTG | transgene reverse | |
| Felis-NANOG-for | AAG AAG GAC GAT CCA GCT CA | Endogenous <i>NANOG</i> | 68°C |
| Felis-NANOG-rev | GCC ACC TCT TGC ATT TCA TT | | |
| Felis-OCT3/4-for | GGA GTC CCA GGA CAT CAA AG | Endogenous <i>OCT3/4</i> | 69°C |
| Felis-OCT3/4-rev | GCC TGC ACA AGT GTC TCT GC | | |
| Felis-SOX2-for | CAT CAC CCG CAG CAA ATG A | Endogenous <i>SOX2</i> | 61°C |
| Felis-SOX2-rev | AAG AAG TCC AGG ATC TCT CAT AAA | | |
| Felis-KLF4-for | ACC GCT CCA TTA CCA AGA GC | Endogenous <i>KLF4</i> | 61°C |
| Felis-KLF4-rev | ATG CCT GGT CAG TTC GTC AG | | |
| Felis-c-MYC-for | CTC CTC TGG CGT TCC AAG A | Endogenous <i>c-MYC</i> | 61°C |
| Felis-c-MYC-rev | AGA TCA GCA ACA ACC GCA AA | | |
| Felis-GAPDH-for | AAG GTC ATC CCA GAG CTG AA | Endogenous <i>GAPDH</i> | 64°C |
| Felis-GAPDH-rev | GCG TCG AAG GTG GAA GAG T | | |

Table 2 プライマーの塩基配列とアニーリング温度

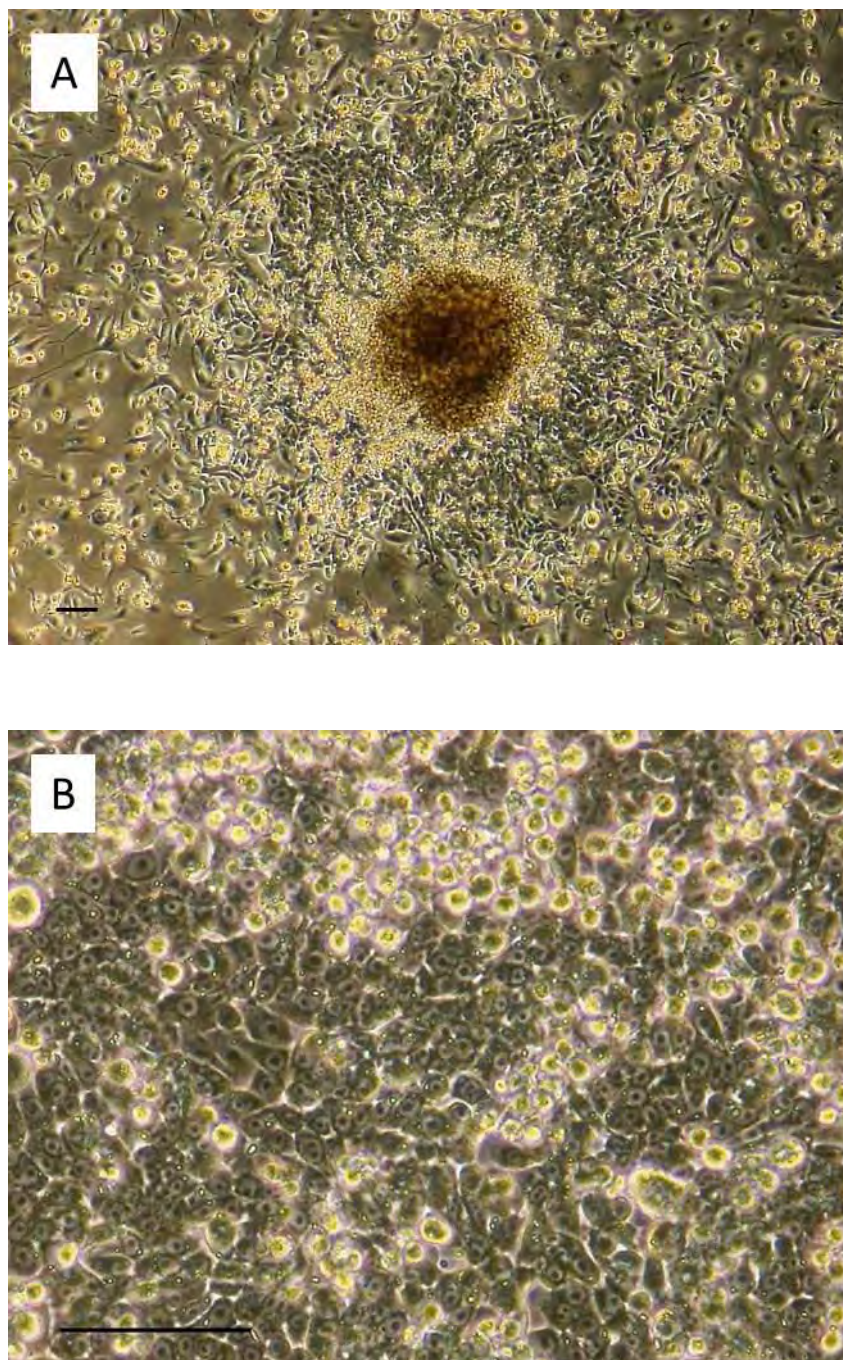


Fig. 2-1 ネコ iPS 細胞コロニーの形態

(A) P2 のネコ iPS 細胞コロニー

(B) (A)の拡大写真

Bar = 100 μm

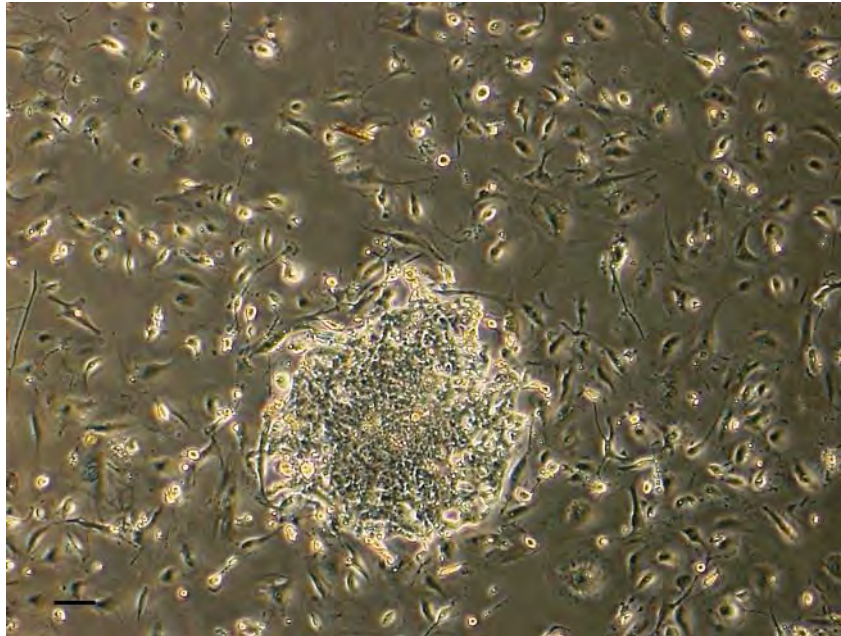


Fig. 2-2 P20 のネコ iPS 細胞コロニー
Bar = 100 μ m

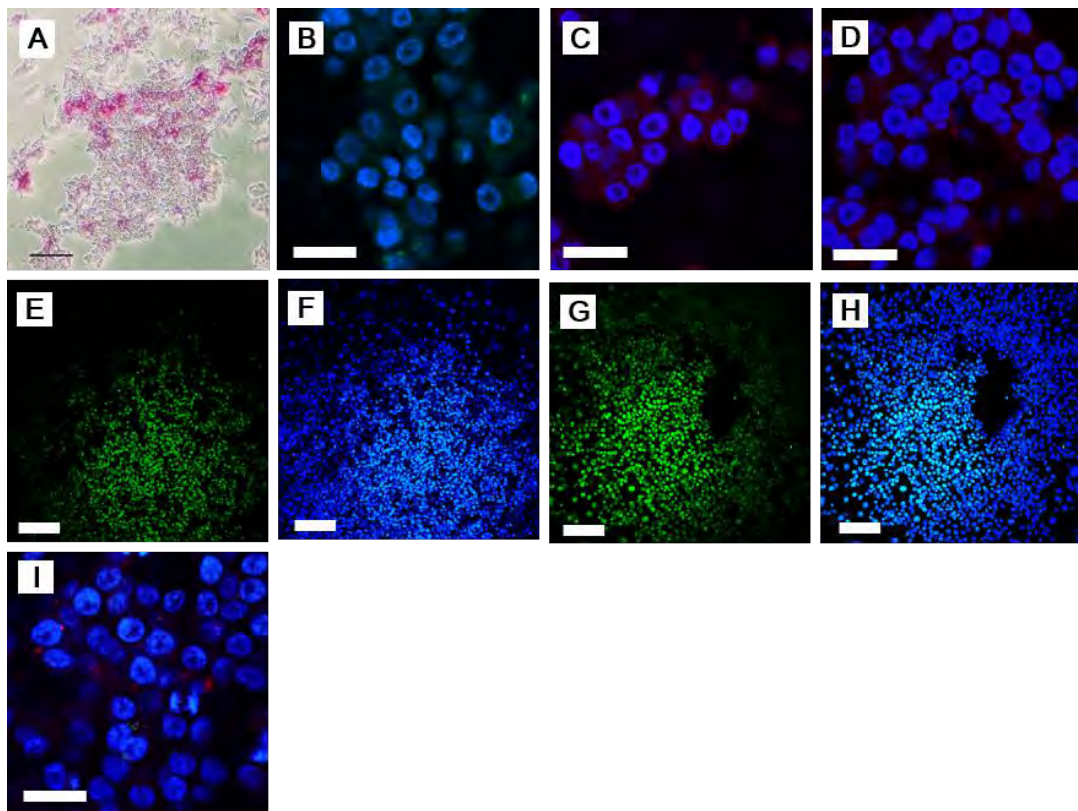


Fig. 2-3 ネコ iPS 細胞の未分化マーカー発現

(A) アルカリフォスファターゼ染色

(B) DAPI(核；青)および SSEA-4(幹細胞マーカー；緑)

(C) DAPI(核；青)および TRA-1-60(幹細胞マーカー；赤)

(D) DAPI(核；青)および TRA-1-81(幹細胞マーカー；赤)

(E, F) NANOG(幹細胞マーカー；緑)または DAPI(核；青)

(G, H) OCT3/4 (幹細胞マーカー；緑)または DAPI(核；青)

(I) DAPI(核；青)および SSEA-1(幹細胞マーカー；赤)

Bar = 20 μ m (B-D, I) または 100 μ m (A, E-H)

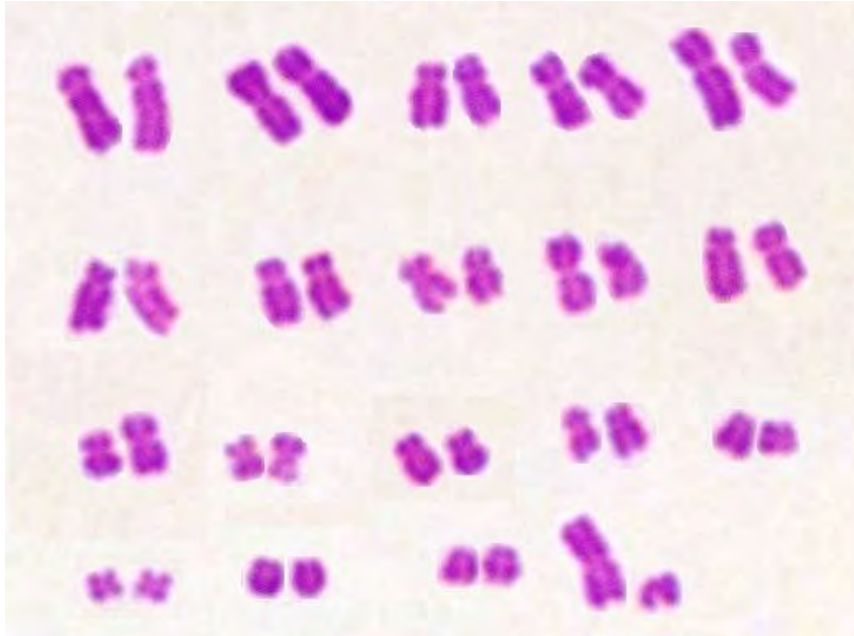


Fig.2-4 P20 のネコ iPS 細胞の核型解析(n = 42)

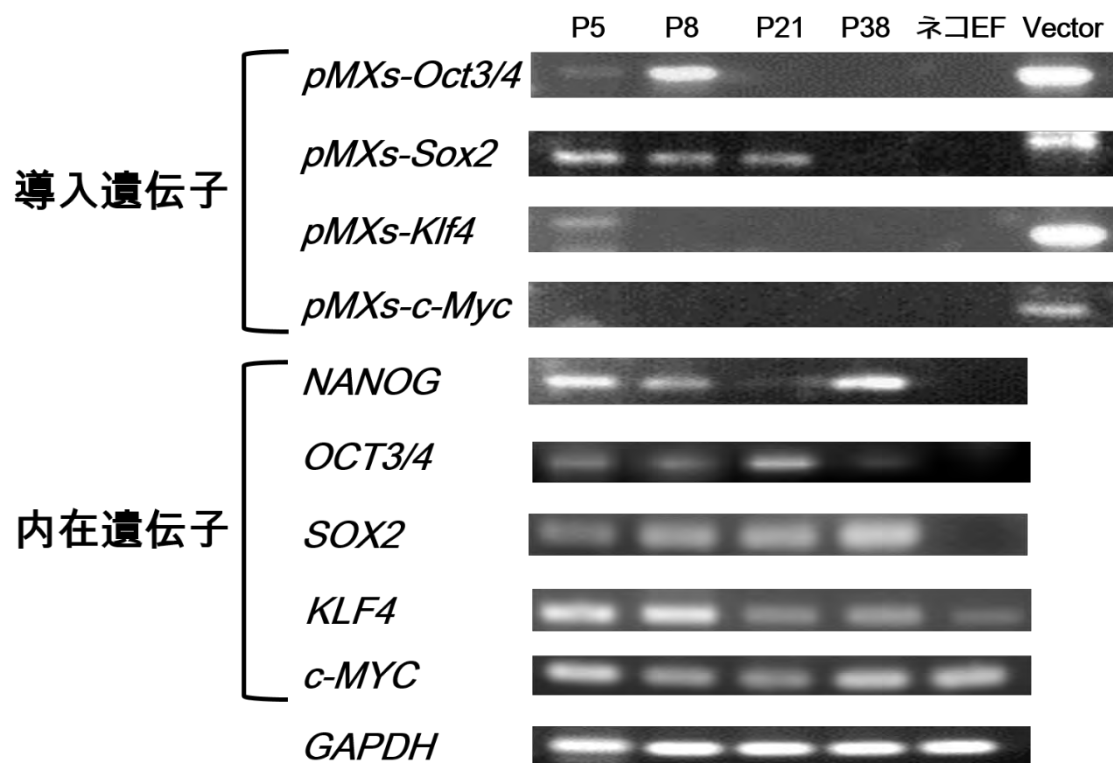


Fig. 2-5 ネコ iPS 細胞株の遺伝子発現
 ネガティブコントロールとしてネコ胎子線維芽細胞(ネコ EF)、
 ポジティブコントロールとして遺伝子導入に用いたベクターを使用。

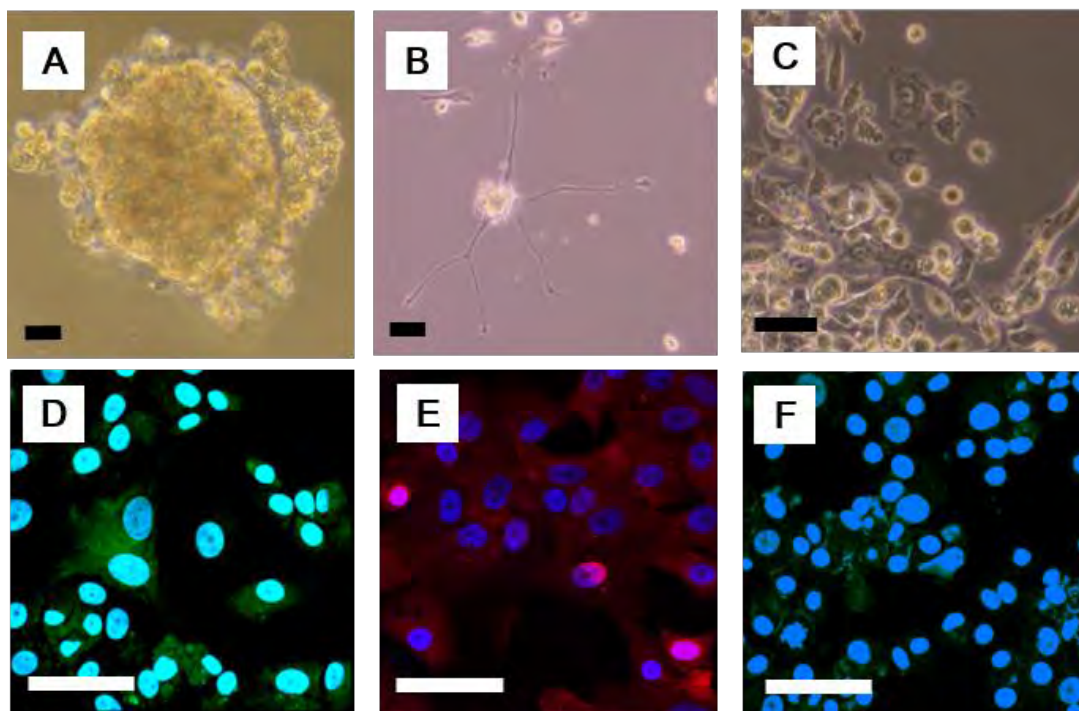


Fig. 2-6 ネコ iPS 細胞株の分化能

(A)胚様体

(B)神経細胞様細胞

(C)上皮細胞様細胞

(D)class3 β -tubulin(Tuj1 ; 神経細胞マーカー)

(E)Desmin(中胚葉マーカー)

(F)Sox17 (内胚葉マーカー)

Bar = 20 μ m

第2章 ネコ iPS 細胞株の多分化能の評価

iPS 細胞の応用として、目的に応じて分化させた細胞を移植治療に用いたり、研究利用することが期待されている。そのため、ヒトでは樹立した多能性幹細胞株を神経細胞や血液系細胞、心筋細胞など様々な細胞へ分化誘導する方法が確立され[Klimchenko *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2010; Darabi *et al.*, 2011; Nori *et al.*, 2011; Yoshida and Yamanaka, 2011; Minami *et al.*, 2012]、基礎研究から臨床応用まで幅広く、分化細胞の利用が計画されている。一方、ネコ ES 様細胞は特定の細胞への分化誘導は試みられてない[Yu *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2010]。

ネコゲノムの解析により、ネコにもヒトと同様の原因遺伝子による遺伝性神経疾患が多く存在することが明らかとなっている[O'Brien *et al.*, 2002]。しかし、適切な細胞モデルが確保できないなどの理由から、その機序や治療に関する研究は十分になされていない。マウスなどのげっ歯類やヒトでは、生体から自己複製能を有する神経幹細胞が単離され、これを分化誘導して得た神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイトが中枢神経の細胞モデルとして応用されている[Eriksson *et al.*, 1998; Goldman, 1998]。しかし、ネコ神経幹細胞の単離は報告されておらず、その培養・維持についても検討されていない。さらに、ヒトやマウスでは多能性幹細胞から神経幹細胞への分化誘導法も確立され、生体を傷害することなく、神経系細胞を得ることが可能となっている[Bain *et al.*, 1995; Okabe *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2000; Tropepe *et al.*, 2001]。

また、ヒト医療と同様に獣医療でも、慢性腎臓病や血液疾患など重篤な貧血を引き起こす疾患が問題となっており、この治療として輸血が行われている。ヒト医療ではドナーから採取した血液を検査・保存・共有する血液バンクが確立され、臨床現場で安全かつ安定した血液製剤の利用が可能となっている。しかし、獣医

療には法的に認可を受けた血液バンクが存在しない。さらに、ネコでは猫白血病ウイルスや猫免疫不全ウイルスが血液を媒介して伝搬し、治療法のない重篤な感染症を引き起こす[Reine, 2004; Wardrop *et al.*, 2005]。また、ネコは初回の輸血であっても血液型が適合していないと拒絶反応が起こることから、保有率の低いB型およびAB型のネコに対する輸血治療はさらに困難である[Auer and Bell, 1983; Giger and Bücheler, 1991; Griot-Wenk and Giger, 1995]。そのため、新たな輸血用血液の供給システムの開発が待ち望まれている。

これらの問題に対し、ネコ多能性幹細胞から神経幹細胞および赤芽球系細胞への分化誘導法が確立されれば、ネコにおいても神経疾患モデル細胞や感染症フリーな輸血用血液の安定供給が利用可能となると考えられる。

そこで本章では、第1章で樹立・解析したネコ iPS 細胞株を用いて、遺伝性疾患の研究や輸血治療で重要と考えられる神経幹細胞および赤芽球系細胞への分化誘導を試みた。

材料と方法

1. 神経幹細胞への分化誘導

ネコ iPS 細胞株の神経幹細胞への分化誘導は、ヒト ES 細胞での方法を参考にして行った[Okuno *et al.*, 2009.]. ネコ iPS 細胞のコロニーを顕微鏡下でフィーダー細胞から分離し、ゼラチンコートおよびフィーダー細胞のない無処理 60 mm ディッシュ(AGC テクノグラス社製)で、ラット胎子アストロサイト培養上清(nerve-cell culture medium; 住友ベークライト社製、東京)を用いて 10 日間、37°C 5% CO₂ 条件下で浮遊培養した。毎日、終濃度 20 ng/ml のヒト bFGF を添加した。また、2 日毎に同培地の培養液を半量交換した。次に、形成された細胞塊を 10 µg/ml ラミニン(AGC テクノグラス社製)でコートした 35 mm L-lysine coated dishes (AGC テクノグラス社製)に継代した。継代後は神経幹細胞維持培地を用いて、細胞塊を 37°C 5% CO₂ 条件下で培養した。神経幹細胞維持培地は Neurobasal Medium (Life Technologies 社製)に 100 IU/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、および B-27®supplement (Thermo Fisher Scientific 社製)を添加して作製した。毎日、終濃度 20 ng/ml bFGF および 20 ng/ml ヒト上皮成長因子(EGF ; SIGMA-Aldrich 社製)を添加した。また、2 日毎に同培地の培養液を半量交換した。

7 日間培養の後、細胞塊の周縁部から増殖した細胞の免疫染色を前節と同様にして実施した。一次抗体として、ウサギ抗 Nestin ポリクローナル抗体(MAB353; Millipore 社製)を最終濃度 1 µg/ml で使用し、二次抗体として Alexa546 標識ヤギ抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を最終濃度 1 µg/ml で使用した。

2. 赤芽系細胞への分化誘導

ネコ iPS 細胞株の赤芽球形細胞への分化誘導は、ヒト多能性幹細胞での方法を参考にして行った[Grigoriadis *et al.*, 2010]。ネコ iPS 細胞のコロニーを顕微鏡下でフィーダー細胞から分離し、ゼラチンコートおよびフィーダー細胞のない滅菌シャーレで、b-FGF 無添加ヒト ES 細胞培地を用いて 5 日間、37°C 5% CO₂ 条件下で浮遊培養し、胚様体を作製した。次に、血液分化培地を用いて、作製した胚様体を 37°C 5% CO₂ 条件下で浮遊培養した。血液分化培地は Stem-Pro-34 (Life Technologies 社製) に 100 IU/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、50 mg/ml アスコルビン酸(SIGMA-Aldrich 社製)、50 mM モノチオグリセロール(SIGMA-Aldrich 社製)、および 10% (v/v) FBS を添加して作製した。その際、想定される血液系細胞への分化段階に応じて、以下に示す種々のサイトカインの組み合わせを培地へ添加した。血液分化培地での浮遊培養開始日に 10 ng/ml ヒト骨形成タンパク質 4 (BMP4; R&D systems 社製、Minneapolis, MN, USA)、1 日後に 10 ng/ml BMP4 および 5 ng/ml bFGF、4 日後に 1 ng/ml bFGF、10 ng/ml イヌ血管内皮細胞増殖因子 (VEGF; R&D systems 社製)、100 ng/ml イヌ stem cell factor (SCF; R&D systems 社製)、5 ng/ml ヒト interleukin 11 (IL-11; R&D systems 社製)、10 ng/ml ネコ IL-6 (R&D systems 社製)、および 40 ng/ml イヌ IL-3 (MyBioSource 社製、San Diego, CA, USA)、8 日後に 10 ng/ml VEGF、100 ng/ml SCF、5 ng/ml IL-11、10 ng/ml IL-6、40 ng/ml IL-3、20 ng/ml イヌエリスロポエチン(EPO; R&D systems 社製)、および 50 ng/ml ヒトトロンボポエチン(TPO; R&D systems 社製)を使用した。

浮遊培養 18 日後に、細胞塊を回収してピペッティングにより解離し、35mm 組織培養皿を用いてメチルセルロース培地中(STEMCELL technologies 社製 Vancouver, Canada)で 10 日培養した。形成されたコロニーを光学顕微鏡下で

観察した後、PBS(-)で洗浄した。さらにピペッティングにより細胞を解離し、Shandon Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて細胞をスライドガラス上に塗布した。細胞はライトギムザ染色を実施した後に光学顕微鏡を用いて観察した。

結果

1. 神経幹細胞への分化誘導

ネコ iPS 細胞株をアストロサイト培養上清で 10 日間浮遊培養することにより、浮遊細胞塊(neurosphere)を得た(Fig.3-1A)。さらに、neurosphere を神経幹細胞維持培地で接着培養をすることで、紡錘形の細胞が得られた(Fig.3-1B)。本細胞は神経幹細胞マーカーである Nestin に陽性を示した(Fig.3-1C)。

2. 赤芽系細胞への分化誘導

メチルセルロースコロニーアッセイの結果、赤芽球系の前駆細胞からなる CFU-E に類似したコロニーを得ることが出来た(Fig.3-2A)。また、そのコロニーは多数のマクロファージ様細胞と少数の赤芽球様細胞で構成されていた(Fig.3-2B, C)。

考察

本章では、第 1 章で樹立したネコ iPS 細胞株を用いて、遺伝性疾患の研究や輸血治療で重要と考えられる神経幹細胞および赤芽球系細胞への分化誘導を試

みた結果、神経幹細胞、マクロファージ様細胞、赤芽球様細胞に分化誘導することに成功した。多能性幹細胞を神経幹細胞へ分化誘導する方法として、胚様体形成法[Okabe *et al.*, 1996]、レチノイン酸法[Bain *et al.*, 1995]、Stromal Cell-Derived Induction Activity(SDIA)法[Kawasaki *et al.*, 2000]、無血清法[Tropepe *et al.*, 2001]など、いくつかの報告がある。しかし、これらの手法は長期の培養期間やフィーダー細胞を必要とするなど、非常に煩雑であった。そこで、本研究では短時間で簡便であるという点に着目し、これまでに当教室で行ってきたラット胎子アストロサイト培養上清である *nerve-cell culture medium* を用いた分化誘導法を採用した[Okuno *et al.*, 2009]。アストロサイトが分泌するさまざまな成長因子は神経細胞への分化促進、神経以外の細胞種への分化抑制、神経保護効果などの作用を有することから[Miyamoto *et al.*, 1993; Mitoma *et al.*, 1998; Lein *et al.*, 2002; Lafon-Cazal *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2006]、本培養液は神経幹細胞への分化誘導に用いられている。今回、神経幹細胞マーカーである Nestin に陽性を示す多数の紡錘形細胞を得られたことから、本分化誘導法はネコ iPS 細胞にも有用であると考えられる。しかし、真に神経幹細胞と同定するためには、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化能[Eriksson *et al.*, 1998]、さらにはホールセルパッチクランプ法による神経細胞の機能評価など[Song *et al.*, 2012]、さらに慎重な検討を行う必要がある。

多能性幹細胞を血液細胞へ分化誘導する方法として、他の細胞との共培養[Klimchenko *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2011]とサイトカイン添加培地の使用[Chang *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2010]が報告されている。共培養法では、マウス骨髄間質細胞に由来し、造血サイトカインを産生する OP9 細胞が主に用いられており、血液系細胞への分化誘導効率が比較的高い[Nakano *et al.*, 1994; Palacios *et al.*, 1995]。しかし、異種動物由来細胞を共培養に用いると、細胞移

植時に免疫反応を引き起こす可能性が指摘されている[Ellerström *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012]。そこで本研究では、ネコ iPS 細胞株から血液系細胞を作製した後、生体移植することを想定し、サイトカイン添加培地による方法を採用した。骨髄における造血幹細胞の維持・分化は、サイトカインや酸素の濃度、他の骨髄細胞との相互作用などの微小環境(ニッチ)によってコントロールされている[Méndez-Ferrer *et al.*, 2010; Hoggatt and Pelus, 2011]。そのため、多能性幹細胞から血液系細胞を分化誘導するには、この骨髄ニッチを再現することが重要であると考えられる[Grigoriadis *et al.*, 2010]。本研究においても、種々のサイトカインを段階的に培地へ添加することで骨髄ニッチに近い環境を再現し、ネコ iPS 細胞株を血液系細胞に分化誘導できたと考える。形成された造血コロニーはやや赤みを帯びていたことから CFU-E であると考えられた。しかし、構成細胞の解析ではマクロファージ様細胞が多く認められ、赤芽球系細胞は少なかった。この結果は本研究が参考にしたヒト多能性幹細胞を血液系細胞に分化誘導した報告と一致する[Grigoriadis *et al.*, 2010]。より効率的に赤芽球系細胞を得るためには、赤芽球系への分化を促進、あるいはマクロファージへの分化を抑制する必要があると考えられる。赤芽球系への分化誘導には FLT-3L がしばしば用いられている[Lyman *et al.*, 1993; Hannum *et al.*, 1994]。FLT-3L は造血幹細胞の増殖を促進し、さらに kit リガンドと協調することで BFU-E を増加させることが報告されている[Lyman *et al.*, 1993; Hannum *et al.*, 1994]。本研究では FLT-3L を添加していない。今後、ネコにおける FLT-3L の使用法を検討することで、赤芽球系への分化誘導効率の改善が期待される。マクロファージへの分化ではマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) が重要であり[Tushinski *et al.*, 1982]、その作用を阻害することでマクロファージへの分化を抑制できることが報告されている[Minehata *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2015]。また、M-CSF

を産生しない OP9 細胞との共培養あるいは培養上清の利用を検討することで、赤芽球系細胞への分化誘導効率が改善できると考えられる[Vodyanik *et al.*, 2005]。

また、ヒトおよびマウスの多能性幹細胞は三胚葉への分化能を有していても、細胞株間で分化傾向に差があることが報告されている[Hu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010]。マウス iPS 細胞では、継代培養を重ねることで分化傾向の差は徐々に小さくなり、16 継代後には認められなくなった[Pollo *et al.*, 2010]。本研究では 20 継代以降のネコ iPS 細胞株を分化研究に使用しているため、分化傾向に対する影響はごくわずかであると考えられる。

小括

本節では、ネコ iPS 細胞株を用いて、遺伝性疾患の研究や輸血治療で重要と考えられる神経幹細胞および赤芽球系細胞への分化誘導を試みた。その結果、培養条件を変更することで、神経幹細胞マーカーNestin に陽性を示す紡錘形細胞、マクロファージ様細胞、赤芽球様細胞に分化誘導できた。

以上の結果より、ネコ iPS 細胞株を神経幹細胞および血液系細胞に分化誘導できることが示された。

Figure

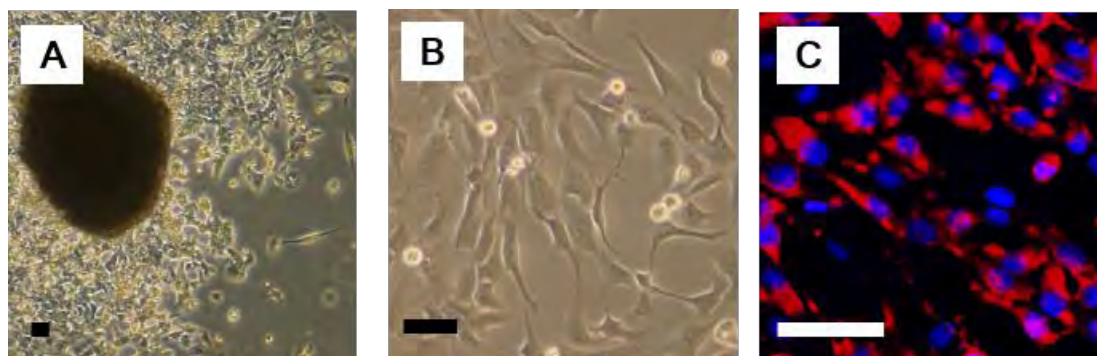


Fig. 3-1 ネコ iPS 細胞株の神経幹細胞への分化誘導

(A)neurosphere

(B)紡錘形細胞

(C)DAPI(核；青)および Nestin (神経幹細胞マーカー；赤)

Bar = 20 μ m

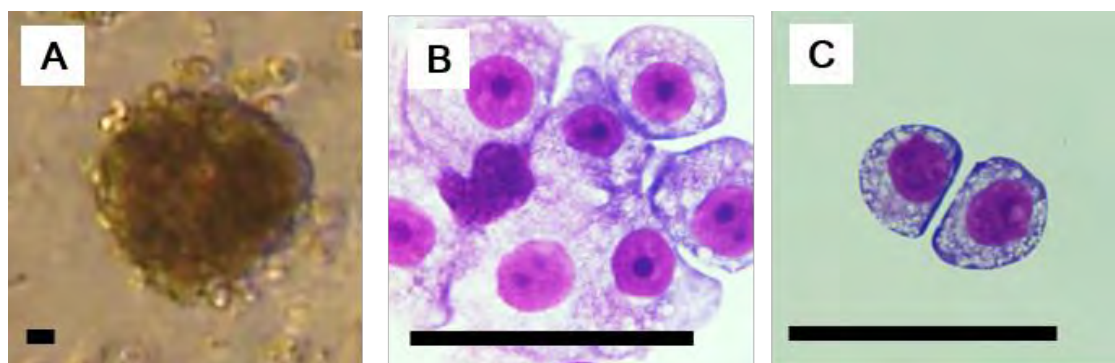


Fig. 3-2 ネコ iPS 細胞株の血液系細胞への分化誘導

(A)CFU-E 様のコロニー

(B)マクロファージ様細胞

(C)赤芽球様細胞

Bar = 20 μ m

第3章 多能性維持タンパク質 LIF の作製

LIF は IL-6 ファミリーに分類され、マウス骨髄性白血病細胞を分化誘導するサイトカインとして発見された[Gough *et al.*, 1987]。その後の研究により、LIF は単球や巨核球、神経系細胞、骨芽細胞、卵細胞、肝細胞、脂肪細胞、ES 細胞、iPS 細胞など LIF レセプターを有する幅広い細胞種に対して生理活性を示すことが明らかとなっている[Evans and Kaufman, 1981; Williams *et al.*, 1988; Metcalf and Gearing, 1989; Hilton *et al.*, 1991; Takahashi and Yamanaka, 2006]。LIF の作用は多くが他の IL-6 ファミリーと共通であるが、LIF 特異的な作用としてマウス多能性幹細胞の多能性・増殖能の維持が知られている[Evans and Kaufman 1981; Williams *et al.*, 1988; Auernhammer and Melmed, 2000; Takahashi and Yamanaka 2006; Mo *et al.*, 2010]。

多能性幹細胞の多能性・増殖能は、分化させた細胞を細胞移植源や基礎研究の材料として利用する際に極めて重要となる特性である。しかし、マウスとヒトまたは他の動物種では、多能性幹細胞の培養条件および特性が異なることが報告されている[Ginis *et al.*, 2004]。従来、ヒトや他の動物種の多能性幹細胞は LIF ではなく b-FGF によって維持される primed 型であり、マウス多能性幹細胞のような naïve 型と比較して多能性と増殖能が低いとされてきた[Honda *et al.*, 2010; Dahéron *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005]。本研究で樹立したネコ iPS 細胞株も、形態的特徴および増殖特性から primed 型と考えられた。しかし、これまで primed 型多能性幹細胞しか作製できないと考えられていた動物種でも、導入遺伝子の追加や試薬の添加により、未分化性の高い naïve iPS 細胞の作製が可能となった[Li *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Lengner *et al.*, 2010; Buecker *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011]。この naïve iPS 細胞はマウス多能性幹細胞と同様に、

LIF によってその未分化性が維持され、高い増殖能と分化能を有する。そのため、大量の分化細胞が必要となる臨床応用や基礎研究への利用を考慮した際には、LIF を使用して naïve iPS 細胞を作製することが望ましい。

一方、他の動物種の LIF を添加因子として代用した際には、期待される LIF の作用が得られないと報告されている。ヒトとウシの LIF 塩基配列は 89.1% の相同性を有しているにもかかわらず、ヒト LIF をウシ受精卵の体外培養時に使用すると、胚盤胞期胚への発生率が低下した[Rodríguez *et al.*, 2007]。また、ブタ LIF のアミノ酸配列と比較して、ヒト LIF は 88%、マウス LIF は 79% の相同性を示す。しかし、ヒトまたはマウス LIF を使用してもブタ多能性幹細胞は作製できず、ブタ LIF を添加した時にのみブタ iPS 細胞が作製可能であった[Wianny *et al.*, 1997; Fujishiro *et al.*, 2013]。さらに、ネコ ES 様細胞はマウス LIF を添加した培地で作製されたが、培養・維持は困難であり、三胚葉への分化能も認められなかった[Yu *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2010]。これら過去の報告から、ネコ naïve iPS 細胞の作製時には、異種動物由来の LIF を代用するよりも同種動物由来の LIF を使用するべきであると考えられる。

リコンビナント LIF はヒト[Tomala *et al.*, 2010]、マウス[Gough *et al.*, 1987]、ラット[Takahama *et al.*, 1998]などの動物種では作製されているが、ネコでは作製されていない。ネコにおいても、LIF が使用できれば naïve iPS 細胞の作製が可能となり、分化させた多様な細胞の細胞移植や基礎研究、薬品開発への利用が期待される。

本章では、ネコ胎子線維芽細胞より *LIF* 遺伝子のクローニングおよびシーケンス解析を行い、大腸菌におけるタンパク質発現の誘導および合成タンパク質の LIF 活性の測定を行った。

第1節 ネコ *LIF* 遺伝子のクローニングおよびタンパク質の作製

マウスやヒト *LIF* のリコンビナントタンパク質は大腸菌[Samal *et al.*, 1995]、酵母[Gough *et al.*, 1988]、または COS 細胞[Geisse *et al.*, 1996]を用いて作製されている。その中でも大腸菌を使用したタンパク質の作製方法は、簡単に大量のタンパク質が得られることを利点とする[Imsoonthornruksa *et al.*, 2011]。しかしながら、作製するタンパク質の大きさ・性質によっては、封入体の形成や可溶性の低下などにより収集効率が低下し、翻訳後修飾が行われないうえに生理活性を示さない可能性が報告されている[Liu and Chen, 2007; Kim *et al.*, 2008; Tomala *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2011]。

一方、タンパク質発現用ベクター pCold® TF DNA は合成タンパク質の可溶性を改善するトリガーファクターと呼ばれる配列を付加することを特徴とする[Fujita *et al.*, 2011]。また、大腸菌を用いてヒト *LIF* の作製を行った研究では、翻訳後修飾がなくとも *LIF* は生理活性を有することが示されている[Aikawa *et al.*, 1998]。

そこで本節では、ネコ胎子線維芽細胞からネコ *LIF* 遺伝子をクローニングしてシーケンス解析を行った。さらに、得られた *LIF* 遺伝子配列をタンパク質発現用ベクター pCold® TF DNA に挿入し、大腸菌 BL21 を使用してタンパク質の創製を試みた。

材料と方法

1. ネコ *LIF* 遺伝子のクローニング

1) pGEM®-T Easy Vector へのネコ *LIF* 遺伝子のクローニング

total RNA は RNeasy Mini(QIAGEN 社製)を使用し、マニュアルに従い、ネコ胎子線維芽細胞より回収した。逆転写反応および PCR は第一章第二節の方法と同様にして実施した。ただし、ネコの *LIF* 遺伝子配列は未報告であるために、これらプライマーは多くの動物種で共通してみられる配列をもとに作製した(Table 3)。PCR は 94°C で 2 分加熱後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 90 秒で 35 サイクル行い、その後 72°C で 2 分加熱後、使用するまで -20°C で保存した。PCR 増幅産物を pGEM®-T Easy Vector(Promega 社製、Madison、WI)にクローニングし、このベクターを用いて、ヒートショック法によりコンピテントセル DH5α を形質転換した(Fig.4-1A)。この DH5α を 50 µg/ml アンピシリン含有 LB 寒天培地上にプレーティングした。37°C で一晩培養し、プラスミドキットを用いたスピン法により、挿入 DNA 陽性クローンからプラスミドを抽出した。これを SIGMA-Aldrich 社に依頼してシーケンス解析を行った。シーケンス解析のプライマーはユニバーサルプライマー T7 とユニバーサルプライマー SP6 を用いた(Table 3)。

2) pCold®-TF DNA へのネコ *LIF* 遺伝子のサブクローニング

シーケンス解析により得られた塩基配列をヒト *LIF* 遺伝子塩基配列と比較し、ネコ *LIF* 遺伝子のうち成熟タンパク質となる部分のコード領域を推定した。この領域を BamHI 部位付加 forward プライマーと HindIII 部位付加 reverse プライマー(Table 3)を用いて PCR により増幅した。クローニング済み pGEM®-T Easy ベクター 10 ng に対し、最終濃度で 1×KOD buffer、KOD plus 0.02 U/µl、MgSO₄ 1 mM(以上、TOYOBO 社製)、dNTPs mixture 0.5 mM、forward

およびreverse プライマー 0.5 μ M ずつに滅菌蒸留水を加えた総量 20 μ l で PCR を行った。PCR は 94°C で 2 分加熱後、94°C 15 秒、62°C 30 秒、68°C 60 秒で 30 サイクル行い、その後 68°C で 2 分加熱後、使用するまで -20°C で保存した。PCR 産物および pCold®-TF DNA (TaKaRa 社製、滋賀) に対し、BamHI および HindIII (以上 TOYOBO 社製) による制限酵素処理を行い、ライゲーション反応に用いた。ライゲーション反応は制限処理したプラスミド 25 μ g、PCR 産物 12.5 μ g、Ligation High 3.3 μ l (TOYOBO 社製) に滅菌蒸留水を加えて 10 μ l の反応液とし、16°C 下で 1 時間行った。ライゲーション反応液 1 μ l を用いて上記と同様の方法で DH5 α を形質転換し、50 μ g/ml アンピシリン含有 LB 寒天培地を用いて培養し、挿入 DNA 陽性クローンからプラスミドを抽出した (Fig.4-1B)。これを SIGMA-Aldrich 社に依頼してシーケンス解析を行った。シーケンス解析のプライマーは pCold®-TF-F1 と pCold®-TF-R を用いた (Table 3)。

2. ネコ LIF タンパク質の作製・精製

1) 大腸菌 BL21 の形質転換

シーケンス解析により目的遺伝子の挿入が確認できた pCold®-TF DNA を用いて、ECOS™ E.coli BL21(DE3)(BL21 ; ニッポン・ジーン社製、東京) の形質転換を行った。すなわち、BL21 凍結液を on ice で融解させ、プラスミドを 1 ng 添加して、1 秒間ボルテックスした。これを on ice で 5 分間静置した後に 42°C で 5 分間処理した。さらに 1 秒間ボルテックスし、50 μ g/ml アンピシリン含有 LB 寒天培地上にプレーティングした。37°C で一晩培養し、挿入 DNA 陽性クローンを PCR により確認した。

2) 大腸菌のタンパク質発現誘導処置

タンパク質発現を誘導するため、挿入 DNA 陽性クローンをアンピシリン含有 (50 $\mu\text{g/ml}$)LB 液体培地 10 ml を用いて 37°C、190 rpm、16 時間、振盪培養した。振盪培養には Bio-Shaker(BR-30L 型;タイテック社製)を使用した。その後、これをアンピシリン含有(50 $\mu\text{g/ml}$)LB 液体培地 1 L に加え、OD₆₀₀ が 0.5 に達するまで 37°C、160 rpm の条件で、Bio-Shaker を用いて振盪培養した。次に、isopropyl- β -D-thiogalactopuranside (IPTG ; 和光純薬工業社製)を最終濃度 1 mM となるように加え、15°C 下で 30 分静置し、さらに 15°C、160 rpm の条件で、Bio-Shaker を用いて 24 時間振盪培養した。

この培養液を事前に氷冷した容器に移し、4°C、800 x g の条件で 10 分間遠心を行い、上清を除去した。沈渣を氷冷 PBS(-)10 ml に再懸濁し、4°C、800 x g の条件で 10 分間遠心を行い、上清を除去した。沈渣は使用するまで -80°C で凍結保存した。

3) 大腸菌からの目的タンパク質の回収および精製

凍結した沈渣に氷冷 PBS(-)20 ml を加え、超音波発生機(UD-201 ; 株式会社トミー精工製、東京)を用いて氷上で超音波破碎した。この破碎物を事前に氷冷した容器に移し、4°C、800 x g の条件で 10 分間遠心を行い、上清を回収した。この上清を事前に氷冷した容器に移し、4°C、22800 x g の条件で 10 分間遠心を行い、上清を回収した。

上清を PBS(-)に馴化した Ni-NTA セファロース(GE ヘルスケア社製、東京)に 20 ml/h で流した。その後、カラムを 10 倍量の PBS(-)で洗浄し、非特異的に結合していたタンパク質を除去した。このカラムに段階的に希釈した 10 倍量のイミダゾール(Nacalai Tesque 社製)含有 PBS(-)を 20 ml/h で流し、目的タンパク質の溶出を行った。大腸菌破碎液および溶出液の SDS-PAGE を行い、目的タン

パク質の検出を行った。

4) 精製タンパク質の Thrombin 処理および精製

溶出液 10 μ l に Bradford 試薬(TaKaRa 社製)1 ml を加えてボルテックスし、5 分後に測定した OD₅₉₅ と標準曲線を基にタンパク質濃度を算出した。タグおよびトリガーファクターを除去するため、溶出液のタンパク質 1 mg に対して Thrombin 1 U、最終濃度 1×Thrombin Cleavage Buffer(Thrombin kit ; Merck 社製、Darmstadt、Germany)を加え、4℃下で 16 時間反応させた。反応液を Ni-NTA セファロースで再精製した後、流出液を SDS-PAGE で解析し、目的タンパク質の検出を行った。また、前述の方法で流出液のタンパク質濃度を算出し、以後の実験に用いた。

結果

1. ネコ *LIF* 遺伝子のクローニング

pGEM®-T Easy Vector へクローニングした遺伝子の配列を Fig.4-2 に示した。この遺伝子の塩基配列は 609 bp であり、ヒト *LIF* 遺伝子と 91%、マウス *LIF* 遺伝子と 82%が一致した。また、ヒト *LIF* 遺伝子との比較により成熟タンパク質に相当する配列は 540 bp と予測された。成熟タンパク質のアミノ酸配列はヒト *LIF* アミノ酸配列と 92%、マウス *LIF* アミノ酸配列と 81%が一致した(Fig.4-3)。

2. ネコ *LIF* タンパク質の作製および精製

大腸菌破砕液を SDS-PAGE で分析したところ、目的タンパク質の予想分子量

である 70kDa 付近にバンドが確認された。また、この分子量 70kDa のタンパク質は Ni-NTA セファロースで分離することができた(Fig.4-4)。さらに Thrombin 処理したサンプルを SDS-PAGE で分析したところ、70kDa のタンパク質は 50kDa と 20kDa のタンパク質に分離された。このサンプルを Ni-NTA セファロースで再度精製した後、SDS-PAGE により分析したところ、20kDa のタンパク質のみが分離された(Fig.4-4)。

考察

本研究ではネコ *LIF* 遺伝子のクローニングおよび大腸菌でのタンパク質創製を試みた結果、ネコ *LIF* 遺伝子配列を初めて明らかにし、さらに予想分子量と一致するタンパク質を単離することに成功した。すでに遺伝子配列が報告されているヒト *LIF*[NM_002309]およびマウス *LIF*[NM_008501]とアミノ酸配列について比較したところ、ネコ *LIF* アミノ酸配列はヒト *LIF* アミノ酸配列と 91% が一致した。それに対し、マウス *LIF* アミノ酸配列は総延長がヒトおよびネコと比較して短く、アミノ酸配列の一致度も 82%と低かった。ヒト *LIF* とマウス *LIF* の比較から、ヒト *LIF* 受容体特異的な部位との結合において、重要なアミノ酸が特定されている[Owczarek *et al.*, 1995]。ネコ *LIF* とヒト *LIF* でこの結合に重要な部位のアミノ酸を比較すると、その一致度は 83%であった。ヒト *LIF* とネコ *LIF* 受容体の反応性について判断するには、ネコ *LIF* 受容体のアミノ酸配列および立体構造についても明らかにする必要がある。しかし、ウシやブタでの *LIF* 使用に関する報告[Wianny *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2007; Fujishiro *et al.*, 2013]からも、ヒト *LIF* はネコの細胞に対し十分な活性を有していない可能性が考えられる。そのため、ネコ *LIF* は naïve iPS 細胞の作製において、異

種動物の LIF よりも有用であると考えられる。

本研究では大腸菌を超音波破碎した破碎液から Ni-NTA セファロースを用いることにより高効率に 70 kDa 程度のタンパク質を分離することができた。これは合成タンパク質の予想分子量と一致し、大腸菌における目的タンパク質発現の誘導およびその分離を行えたと考えられる。さらに 50 kDa のタグ部分を Thrombin 処理により切断した後、Ni-NTA セファロース精製を行うことでタグ部分を除去し、目的タンパク質の予想分子量である 20 kDa 程度のタンパク質を分離できた。不要なタンパク質は多くが大腸菌由来であり、細胞に対して増殖能の低下や分化誘導といった毒性を示すため[Sivasubramaniyan *et al.*, 2008. Schwarz *et al.*, 2014]、これらを高効率に除去することで細胞の培養液中に添加した際の悪影響を防ぐことができる。本研究では SDS-PAGE で目的タンパク質以外のバンドが確認されないため、これら毒性物質の混入は極めて少ないと考えられる。

小括

本節では、ネコ胎子線維芽細胞からネコ *LIF* 遺伝子をクローニングしてシーケンス解析を行い、さらに大腸菌 BL21 を使用してタンパク質の創製を試みた。その結果、ネコ LIF 成熟タンパク質のアミノ酸配列はヒト LIF アミノ酸配列と 92%、マウス LIF アミノ酸配列と 81%が一致した。また、タンパク質発現を誘導した大腸菌の破碎物に対し、Thrombin 処理および Ni-NTA セファロースによる分離を行うことで、ネコ LIF 予想分子量と一致するタンパク質を単離することに成功した。

以上の結果から、ネコ *LIF* 遺伝子をクローニングしてその配列を明らかにし、

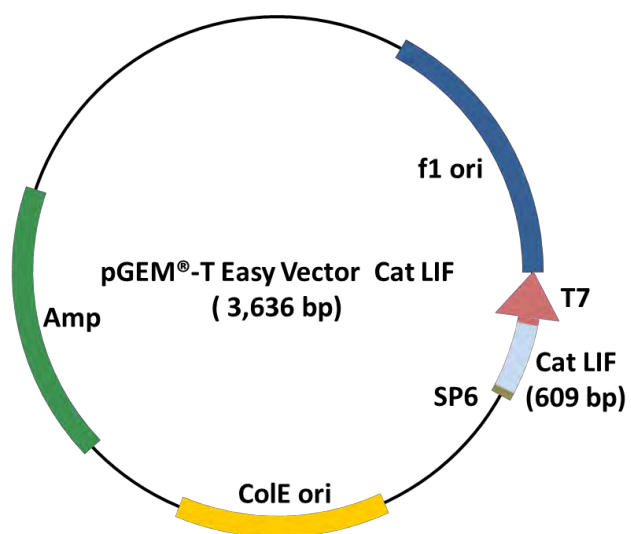
大腸菌における創製に成功したと考える。

Table・Figure

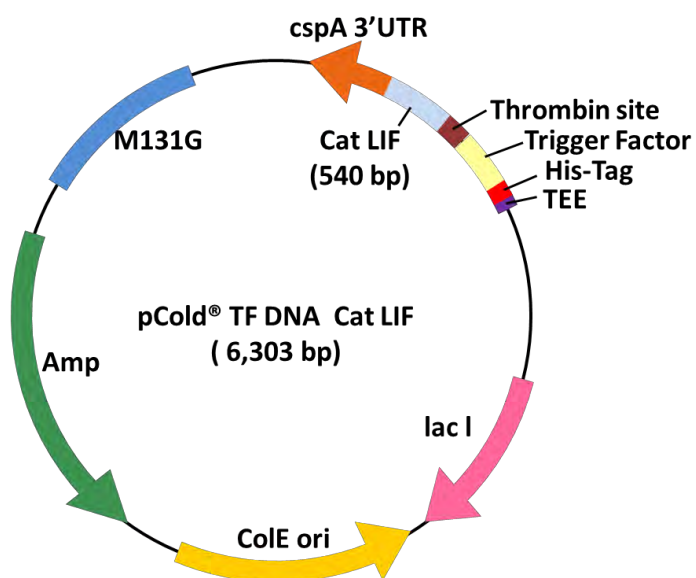
| プライマー名 | 塩基配列 | 使用目的 | |
|---------------------|---|----------------------------|-----|
| Human LIF36-56 | CAG CCC ATA ATG AAG GTC TTG | LIF cloning | 60℃ |
| Human LIF653-633 | CTA GAA GGC CTG GGC CAA CAC | | |
| Felis-LIF-for-BamH1 | <u>AGG GAT CCA</u> GCC CCC TTC CTA TCA CCC C | LIF subcloning | 62℃ |
| Felis-LIF-rev-Hind3 | ACA AGC TTG AAG GCC TGG <u>GCC AAC ACA</u> G | | |
| T7 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG G | pGEM®-T Easy sequencing | |
| SP6 | TAT TTA GGT GAC ACT ATA G | | |
| pCold-TF-F1 | CCA CTT TCA ACG AGC TGA TG | pCold®-TF sequencing | |
| pCold-TF-R | GGC AGG GAT CTT AGA TTC TG | | |

Table. 3 プライマーの塩基配列とアニーリング温度

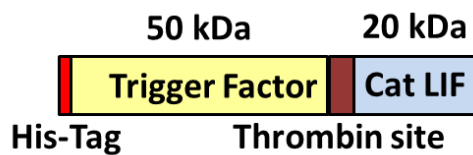
* 下線部は、付加した制限酵素サイトを示す



(A) pGEM®-T Easy Vector Cat LIF の構造



(B) pCold® TF DNA Cat LIF の構造



(C) 合成タンパク質の構造

Fig. 4-1 pGEM®-T Easy Vector と pCold®-TF DNA の再構成

```

1  ATGAAGGTCTTGGCGGCAGGAGTCGTGCCCCTGCTGCTGGTTCTGCACTGGAAACATGGG 60
   M K V L A A G V V P L L L V L H W K H G
61  GCGGGGAGCCCCCTTCCTATCACCCCTGTCAACGCCACCTGTGCCACACGCCACCCATGT 120
   A G S P L P I T P V N A T C A T R H P C
121 CACAGCAACCTCATGAACCAGATCAGGAACCAACTGGCGCAGCTCAATGGCAGTGCCAAT 180
   H S N L M N Q I R N Q L A Q L N G S A N
181 GCCCTCTTTATTCTCTATTACACGGCCCAGGGGAGCCGTCCCCAACCACTGGACAAA 240
   A L F I L Y Y T A Q G E P F P N N L D K
241 CTGTGCGGCCCCAACGTGACGGACTTCCCGCCATTCCATGCCAACGGCACAGAGAAGACC 300
   L C G P N V T D F P P F H A N G T E K T
301 CGGTTAGTGGAGCTGTACCGCATCATCGCTTACCTTGGTGCCTCCCTGGGCAACATCACC 360
   R L V E L Y R I I A Y L G A S L G N I T
361 CGGGACCAGAAGGTCCTCAATCCCAATGCCCTCAGCCTCCACAGCAAACCTGAACGCCACT 420
   R D Q K V L N P N A L S L H S K L N A T
421 GCAGACATCATGCGGGGCCTCCTCAGCAACGTGCTTTGCCGCCTGTGTAACAAGTATCAC 480
   A D I M R G L L S N V L C R L C N K Y H
481 GTGGCCACGTGGACGTGGCCTATGGCCCTGACACCTCAGGCAAGGACGTCTTTCAGAAG 540
   V A H V D V A Y G P D T S G K D V F Q K
541 AAGAAGCTGGGCTGTCAGCTCCTGGGGAAGTATAAACAGGTCATTGCTGTGTTGGCCCAG 600
   K K L G C Q L L G K Y K Q V I A V L A Q
601 GCCTTCTAG
   A F

```

Fig. 4-2 ネコ *LIF* 遺伝子の cDNA 塩基配列

* 赤字はヒトおよびイヌの *LIF* 遺伝子と比較して、**mature protein** になると予測された塩基配列およびアミノ酸配列を示す。

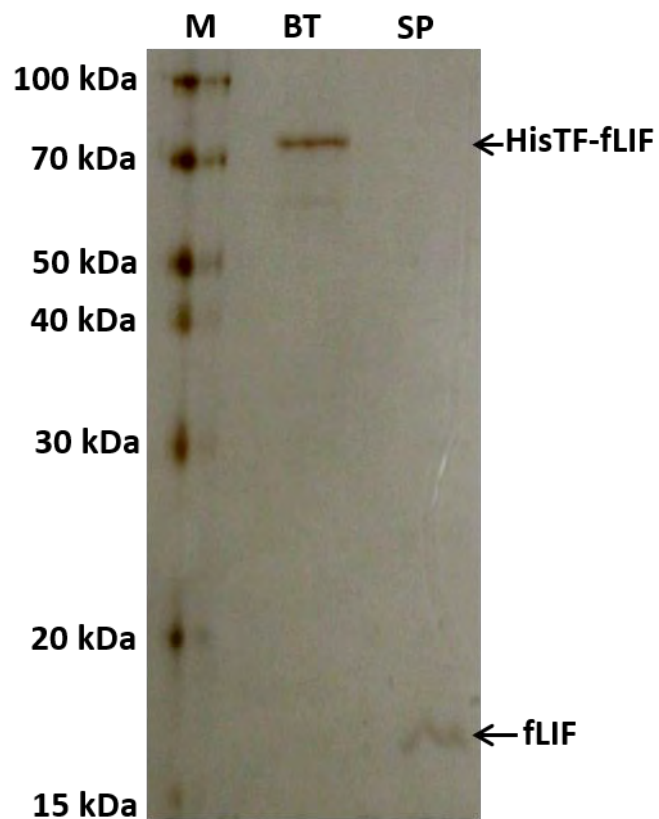


Fig. 4-4 回収タンパク質および最終精製後の SDS-PAGE

M ; 分子量マーカー

BT ; Thrombin 処理前のタンパク質

SP ; 最終精製後のタンパク質

His-fLIF ; His-tag・トリガーファクターが付加されたネコ LIF

fLIF ; ネコ LIF

第2節 ネコ LIF タンパク質の生理活性の評価

LIF はマウス骨髄性白血病細胞である M1 細胞の分化促進作用を有するサイトカインとして報告された[Gough *et al.*, 1987]。その後、単球や巨核球、神経系細胞、骨芽細胞、卵細胞、肝細胞、脂肪細胞、ES 細胞、iPS 細胞など LIF レセプターを有する幅広い細胞種に対して生理活性を示すことが明らかとなっている[Evans and Kaufman, 1981; Williams *et al.*, 1988; Metcalf and Gearing, 1989; Hilton *et al.*, 1991; Takahashi and Yamanaka, 2006]。そのため、これらの細胞を用いることで、LIF の生理活性が評価できると考えられる。

マウス ES 細胞の増殖能と未分化性は LIF によって維持され、リコンビナント LIF の生理活性の評価に用いられてきた[Imsoonthornruksa *et al.*, 2011]。また、ヒト赤白血病細胞株 TF-1 はヒト赤白血病患者から樹立され、ヒト LIF を含む様々なサイトカインの刺激に対し濃度依存的に増殖活性を示すため、TF-1 細胞を用いたサイトカイン活性の評価が報告されている[Kim *et al.*, 2008 ; Imsoonthornruksa *et al.*, 2011]。さらに、LIF はヒトおよびマウス卵丘細胞の膨化促進、マウス出生率の改善[De Matos *et al.*, 2008]、ブタ未成熟卵細胞の核成熟促進[Dang-Nguyen *et al.*, 2014]、ウシ受精卵の胚盤胞発生率の改善[Mo *et al.*, 2014]など、未成熟卵細胞や胚発生に対する作用も有する。

そこで本節では、前節で創製・単離したネコ LIF タンパク質の生理活性を評価するため、マウス ES 細胞、TF-1 細胞、およびネコ未成熟卵細胞に対する作用を検討した。

材料と方法

1. ネコ LIF 活性測定の前準備

1) マウス胎子線維芽細胞(MEF)の培養・不活化・凍結

妊娠 12-13 日のマウスを頸椎脱臼により安楽殺した後、第一章第一節のネコ胎子線維芽細胞と同様の方法で MEF を採取し、100 mm 組織培養皿を用いて、37°C、5%CO₂ 下で培養した。培養液はフィーダー細胞培地を用いた。3 代目までに継代した細胞を第一章第一節の SNL 細胞と同様にマイトマイシン C で不活化し、-80°C で凍結保存した。

凍結保存した細胞は実験使用前日に 37°C で素早く解凍し、0.1%(w/v)ゼラチンコートした 60 mm 組織培養皿に細胞数が 4.0×10^5 個となるように調節して播種し、フィーダー細胞として使用した。

2) マウス ES 細胞の培養

RIKEN Bioresource Center 社(埼玉)より購入したマウス ES 細胞株 TT2 は 37°C、5%CO₂ 下で培養した。培養皿は 60 mm 組織培養皿を、0.1%(w/v)ゼラチンコートし、さらに不活化した MEF を 4.0×10^5 個播種した後に用いた。培養液はマウス ES 細胞培地 ; DMEM Nutrient Mixture F-12 HAM に 20%(v/v)ES 細胞用 FBS、100 IU/ml ペニシリンおよび 100 µg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-Glutamine、0.1 mM 非必須アミノ酸、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM Sodium Pyruvate、0.075%(w/v) Sodium Bicarbonate solution(SIGMA-Aldrich 社製)、1000 U/ml マウス LIF(ESGRO ; Millipore 社製)を添加したものを使用した。2-3 日後、ネコ胎子線維芽細胞と同様に継代を行い、新鮮なフィーダー細胞上で培養した。

マウス ES 細胞の凍結保存は、継代と同様にして回収したマウス ES 細胞の沈

渣を凍結液で攪拌し、 -80°C 下で緩やかに凍結させた。凍結液はマウス ES 細胞培地に 10%(v/v) DMSO を添加したもの、またはバンバンカーを使用した。凍結後は -80°C で使用するまで保存した。

3) ヒト赤白血病細胞の培養

Health Protection Agency 社より購入したヒト赤白血病細胞株 TF-1 を 37°C 、5% CO_2 下で培養・継代し、実験に使用した。培養には 25cm^2 組織培養フラスコ(旭テクノグラス社製)を用いた。培養液は Roswell Park Memorial Institute(RPMI; Nacalai Tesque 社製)に 10%(v/v)FBS、100 IU/ml ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、2 mM L-Glutamine、1 mM Sodium Pyruvate を添加したものを使用した。また、4 ng/ml ヒト顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF ; Millipore 社製)を 48 時間ごとに培養液に添加した。細胞を回収し、バンバンカーを用いて、使用するまで -80°C で凍結保存した。

4)ネコ未成熟卵細胞の回収

泉佐野近郊の開業獣医師のもとで、臨床的に健康な雌ネコから摘出された左右卵巢を入手した。ネコは個人によって飼育されており、卵巢入手時には飼育者の同意を得た。また、本研究への利用を目的とした手術は実施していない。卵巢は 0.85%塩化ナトリウム中に保存して運び、6 時間以内に採卵を行った。卵巢に付着した血液や組織を除去した後に、25 mM HEPES 含有 M199 培地(M199 ; Life Technologies 社製)に移した。外科剪刀を用いて卵巢を細断し、30G 歯科用針(テルモ社製)で卵胞を穿刺して卵細胞を脱出させた。その後、先端を細く火炎加工したガラス毛細管ピペット(DURAN® ; Hirschmann Laborgerate 社製、Eberstadt, Germany)を用いて、M199 に浮遊した卵細胞を回収し、IVM 培地

に移した。IVM 培地は M199 培地に 0.4%(w/v) BSA、10 IU/ml 17 β -estradiol(SIGMA-Aldrich 社製)、100 mg/ml ゲンタマイシン(SIGMA-Aldrich 社製)、および 137 mg/ml Sodium Pyruvate を添加して作製した。

2. 作製ネコ LIF の活性測定

1) マウス ES 細胞を用いた作製ネコ LIF の活性測定

前節で作製したネコ LIF の活性を調べるために、ヒト LIF(Recombinant Human LIF ; Millipore)、マウス LIF(ESGRO ; 1 ng/ml = 100 U/ml)または作製ネコ LIF を 0.2 ng/ml、1 ng/ml または 10 ng/ml の濃度でマウス ES 細胞培地に添加し、2 日ごとに一定の倍率で希釈継代を行いつつ、マウス ES 細胞を培養した。5 継代した後、マウス ES 細胞の総コロニー数を数えた。さらに Alkaline Phosphatase Staining Kit II を使用して ALP 活性を評価し、ALP 陽性コロニーの割合を算出した。総コロニー数および ALP 陽性コロニーの割合により各 LIF のマウス ES 細胞に対する増殖活性および未分化性維持機能を評価した。

2) ヒト赤白血病細胞を用いた作製ネコ LIF の活性測定

増殖活性を調べる 24 時間前より、TF-1 細胞の培養液からヒト GM-CSF を除去し、その後さまざまな濃度のヒト LIF、マウス LIF または作製ネコ LIF を添加して 96 well プレートに 2×10^4 個/well となるように TF-1 細胞を再播種した。37°C、5%CO₂ 下で 48 時間培養し、Cell Counting Kit8(DOJINDO 社製、熊本)を用いて細胞数依存的な吸光度を測定し、各 LIF の TF-1 細胞に対する増殖活性を調べた。すなわち、CCK-8 溶液を 10 倍希釈となるように培養液に添加し、37 °C、5%CO₂ 下で 4 時間培養した後、Marks™ Microplate Spectrophotometer(バイオ・ラッドラボラトリーズ社製)を用いて OD₄₅₀ で測定

した。増殖活性は

$$(\text{OD}_{450}(\text{sample}) - \text{OD}_{450}(0 \text{ ng/ml})) / (\text{OD}_{450}(\text{MAX}) - \text{OD}_{450}(0 \text{ ng/ml LIF})) \times 100$$

という計算式で算出した。

3) ネコ未成熟卵細胞を用いた作製ネコ LIF の活性測定

未成熟卵細胞は卵丘細胞が 5 層以上付着しているものを Grade1、2~4 層付着しているものを Grade2、1 層付着しているものを Grade3、付着していないものを Grade4 と分類した。Grade1 および Grade2 の卵細胞において胚盤胞期胚への発生が認められたとの報告[Wood and Wildt, 1997]に基づき、本研究では Grade1 および Grade2 の卵細胞のみを使用した。また、未成熟卵細胞の群分けはランダムに行った。IVM 培地に作製ネコ LIF を 0 ng/ml、1 ng/ml、10 ng/ml、または 100 ng/ml の濃度で添加した。未成熟卵細胞を IVM 培地で洗浄し、ミネラルオイル(SIGMA-Aldrich 社製)を重層した LIF 添加 IVM 培地の 100 μ l オイルドロップに入れ、38.5°C、5%CO₂、20%O₂ 下で 28 時間培養した。1 ドロップあたり、10 個の未成熟卵細胞を上限とした。培養後、倒立顕微鏡下(倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 型 ; オリンパス社製、東京)で接眼マイクロメーターを使用して卵丘細胞層の厚さを測定した。さらに、卵丘細胞の膨化を促進する作用が報告されている黄体刺激ホルモン(FSH)および EGF と LIF の作用の関係を検討した。前述の方法で未成熟卵細胞の選別、群分け、および培養を行った。ただし、IVM 培地に 0.02 IU/ml Follistim(ヒトリコンビナント FSH ; MSD 社製、東京)および 25 ng/ml ヒト EGF を添加して使用した。28 時間の培養後、倒立顕微鏡下で接眼マイクロメーターを使用して卵丘細胞層の厚さを測定した。さらに、Hoechst 染色により培養した卵細胞の核相を判定した。Hoechst 染色は過去の報告[Otoi *et al.*, 2002]を一部修正して実施した。培養後の卵細胞から卵丘細胞

をガラス毛細管ピペット(ringcaps® 50µl ; Hirschmann Laborgerate 社製)で剥離し、卵細胞を PBS で 2 回洗浄した。3.7% パラホルムアルデヒドおよび 1% Triton-X100(SIGMA-Aldrich 社製)含有 PBS で卵細胞を 15 分間処理し、さらに 0.3% polyvinylpyrrolidone (SIGMA-Aldrich 社製)で 15 分間処理して、固定を行った。その後、卵細胞をスライドガラス上で 10 µg/ml bis-benzimide(Hoechst 33342 ; SIGMA-Aldrich 社製)含有 90%グリセリンと混合し、24 時間静置して染色を行った。染色後、カバーガラスとマニキュアを用いて封入し、蛍光顕微鏡(Nikon ECLIPSE 80i 型 ; ニコン社製、東京)下で、励起波長 355 nm、測定波長 465 nm の条件で観察した。核相の判定は過去の報告[Kitiyanant *et al.*, 2003]に従い、全ての卵細胞を分類した。すなわち、散在したクロマチンに囲まれた核小体と大きな角を特徴とする卵核胞(GV)期、GV の核膜が消失しクロマチンの凝縮が起きた卵核胞崩壊(GVBD)期、二価染色体が紡錘体の赤道面に並んだ第一減数分裂中(MI)期、あるいは凝縮した染色体と他方に染色体が塊をなした第一極体の放出を特徴とする第二減数分裂(MII)期、卵割が認められる単為発生(PA)、分類不可(unclassified)に分類した。MII 期のものを核成熟卵細胞とした。また、染色前に死滅したものや染色したものの核相が観察できないものを変性卵細胞と分類した。

統計処理

マウス ES 細胞およびネコ卵丘細胞の膨化に対する LIF の効果の検討は平均値±標準誤差で表し、Statcel2 を用いて、多重比較検定(Tukey-Kramer 法)により有意差の検定を行った。また、ネコ未成熟卵細胞の核成熟率は平均値±標準誤差で表し、アークサイン変換を行ったのちに Statcel2 を用いて、多重比較検定(Tukey-Kramer 法)により有意差の検定を行った。 $P<0.05$ の場合に有意差あり

とした。

結果

1. マウス ES 細胞を用いた作製ネコ LIF の活性測定

マウス ES 細胞の培養液中にヒト LIF、マウス LIF または作製ネコ LIF を様々な濃度で添加すると、動物種とは無関係に濃度依存的な効果が見られた (Fig.5-1,2)。すなわち、LIF 無添加群では総コロニー数および ALP 陽性コロニーの割合は、1 ng/ml または 10 ng/ml の LIF 添加群よりも有意に ($P<0.01$) 低かった。0.2 ng/ml の LIF 添加群でも ALP 陽性コロニーの割合は、1 ng/ml または 10 ng/ml の LIF 添加群よりも有意に ($P<0.01$) 低かった。1 ng/ml と 10 ng/ml の LIF 添加群との間には有意差は見られなかった。

2. TF-1 細胞を用いた作製ネコ LIF の活性測定

TF-1 細胞の培養液中にヒト LIF または作製ネコ LIF を様々な濃度で添加すると、濃度依存的な細胞増殖の促進効果が得られたが、マウス LIF では高濃度でも促進効果は得られなかった (Fig.5-3)。

3. ネコ未成熟卵細胞を用いた作製ネコ LIF の活性測定

ネコ未成熟卵細胞の培養液中に作製ネコ LIF を様々な濃度で添加すると、濃度依存的な効果が見られた (Fig.5-4A)。すなわち、10 ng/ml LIF 添加群および 100 ng/ml LIF 添加群では LIF 無添加群あるいは 1 ng/ml 添加群と比較して、卵丘細胞の膨化が有意に ($P<0.01$) 促進された。10 ng/ml LIF 添加群と 100 ng/ml LIF 添加群の間に有意な差は認められなかった。さらに、FSH および EGF 添

加 IVM 培地を用いた際においても、作製ネコ LIF の濃度依存的な作用が見られた(Fig.5-4B)。10 ng/ml LIF 添加群および 100 ng/ml LIF 添加群では LIF 無添加群あるいは 1 ng/ml 添加群と比較して、卵丘細胞の膨化が有意に($P<0.01$)促進された。10 ng/ml LIF 添加群と 100 ng/ml LIF 添加群の間に有意な差は認められなかった。卵細胞の核成熟率は 100 ng/ml の LIF 添加群で、LIF 無添加群、1 ng/ml 添加群、および 10 ng/ml 添加群と比較して有意に($P<0.05$)改善された(Table 4)。

考察

本節では、第 1 節で作製したネコ LIF タンパク質の生理活性を評価した結果、マウス ES 細胞の増殖促進・未分化性維持、TF-1 細胞の増殖促進、ネコ卵丘細胞の膨化促進および未成熟卵細胞の核成熟率改善が認められ、ネコ LIF タンパク質は生理活性を有すると考えられた。ネコ LIF はマウス ES 細胞に対して、市販されているヒト LIF およびマウス LIF と同様の活性を示した。マウス LIF 受容体に対する活性はヒト LIF とマウス LIF で差がないと報告されている[Layton *et al.*, 1994; Owczarek *et al.*, 1995]。本研究で作製したネコ LIF も同様に、マウス ES 細胞の増殖促進・維持作用においてヒトおよびマウス LIF との有意差は認められなかった。これまでに、LIF は ES 細胞の未分化性維持に寄与することが報告されている[Williams *et al.*, 1988; Mo *et al.*, 2010]。しかし、本研究の LIF 無添加群では、一般的なマウス ES 細胞の培養方法であるマウス LIF 10 ng/ml 添加群と比較して、ALP 陽性コロニーの割合だけでなく、総コロニー数の減少も見られた。LIF の添加濃度に応じて ES 細胞の増殖能が変化することが過去にも報告されており、マウス ES 細胞の未分化性が維持されないことによ

り細胞分化が起こり、その結果としてマウス ES 細胞の増殖能低下につながるためと考えられる [Williams *et al.*, 1988; Mo *et al.*, 2010]。さらに、通常の使用濃度に対し 50 倍である 500 ng/ml の濃度でネコ LIF を培養液中に添加した際にも、マウス ES 細胞の総コロニー数や ALP 染色陽性コロニーの割合の減少は見られず、本研究で作製したネコ LIF 中のエンドトキシンによる影響はないものと考えられる (Supplementary Fig.1)。

TF-1 細胞に対してヒト LIF およびネコ LIF を培養液中に添加した際には、濃度依存的な細胞増殖の促進効果が見られたが、マウス LIF を培養液中に添加した際にはその効果は認められなかった。これはヒト LIF 受容体に対してマウス LIF は結合しないという過去の報告と一致する [Layton *et al.*, 1994; Owczarek *et al.*, 1995]。また、ヒト LIF およびネコ LIF はどちらも TF-1 細胞に対して増殖活性を示したが、その反応性にはわずかな差は見られた。活性にどの程度の差があるかの検討については前節で述べたように、ネコ LIF 受容体の構造を中心とした詳細な解析が必要である。しかし、ヒト LIF 受容体に対する反応からは各々の LIF は交差反応性を有するものの、同時に種特異性も有することが示唆された。

ネコ LIF を培養液中に添加することで、卵丘細胞の膨化が促進された。この作用は FSH および EGF の添加に関係なく認められた。LIF が卵丘細胞の膨化に対して与える影響はブタ [Dang-Nguyen *et al.*, 2014]、マウスおよびヒト [De Matos *et al.*, 2008]において報告されている。マウスを使用した研究では、FSH および EGF は mitogen-activated protein kinases (MAPK)細胞内伝達系を介して卵丘細胞の膨化を促進することが明らかになっている [Su *et al.*, 2002]。一方、LIF は MAPK 細胞内伝達系のみならず、signal transducer and activator of transactivation 3 (STAT3)細胞内伝達系も活性化し [Auernhammer and

Melmed, 2000]、STAT3 の活性化はブタにおいて卵丘細胞の膨化を促進する [Dang-Nguyen *et al.*, 2014]。これらの研究報告から、IVM 培地へ添加したネコ LIF は、ネコ卵丘細胞の MAPK および STAT 細胞内伝達系を活性化し、FSH および EGF の添加とは無関係にネコ卵丘細胞の膨化を促進したと考えられる。

未成熟卵細胞の核成熟に対する LIF の作用はマウス [Mohammadi Roushandeh *et al.*, 2010]、ブタ [Dang-Nguyen *et al.*, 2014]、およびウシ [Mo *et al.*, 2014]において報告されている。本研究では、ネコ LIF を FSH および EGF とともに培養液中へ添加することで、MII 期の卵細胞の割合が有意に増加した。この結果については、卵丘細胞の膨化による影響、およびネコ LIF の直接的な作用の双方について考える必要がある。ブタやラットを用いた研究では、卵丘細胞の膨化は卵丘細胞同士、および卵丘細胞と卵細胞間のギャップ結合喪失と関連しており、未成熟卵細胞の核成熟を促進することが示されている [Larsen *et al.*, 1986; Isobe *et al.*, 1998]。一方、ウシの卵細胞においては STAT 細胞内伝達系の活性化が直接的に核成熟を促進する [Mo *et al.*, 2014]。これら研究報告から、ネコ LIF はネコ未成熟卵細胞の体外培養において、直接的作用および間接的作用の双方を示したと考えられる。今回、ネコ LIF が胚発生に及ぼす影響については検討していない。しかし、未成熟卵細胞の培養時に LIF を添加すると、マウスで卵割率および胎子出生率が改善し [De Matos *et al.*, 2008]、ウシで胚盤胞期胚への発生率およびその細胞数が増加する [Mo *et al.*, 2014]と報告されている。これらの報告から、ネコでも未成熟卵細胞の培養時に LIF を添加することで、胚盤胞期胚への発生率および出生率を改善できると考えられる。

以上のことから今回作製したネコ LIF はネコ ES 細胞および naïve iPS 細胞の作製において、ヒト LIF を用いるよりも有用であると考えられる。またネコ LIF を高濃度で添加した際にも、マウス ES 細胞に対する有害な作用は見られな

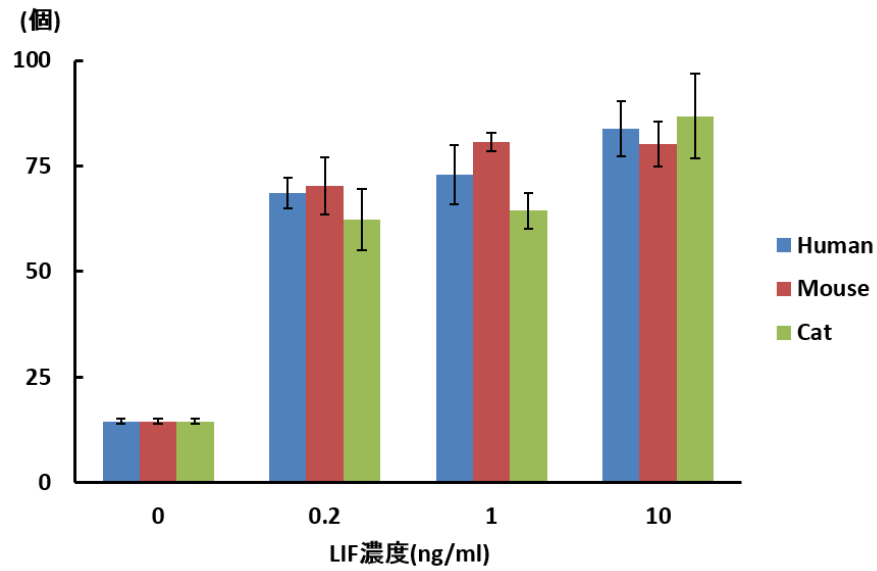
かったため、安全性は高いと考えられる。今後、作製ネコ LIF を培養液中に添加することで、増殖活性が高く、分化効率のよいネコ naïve iPS 細胞の作製につながることを期待される。

小括

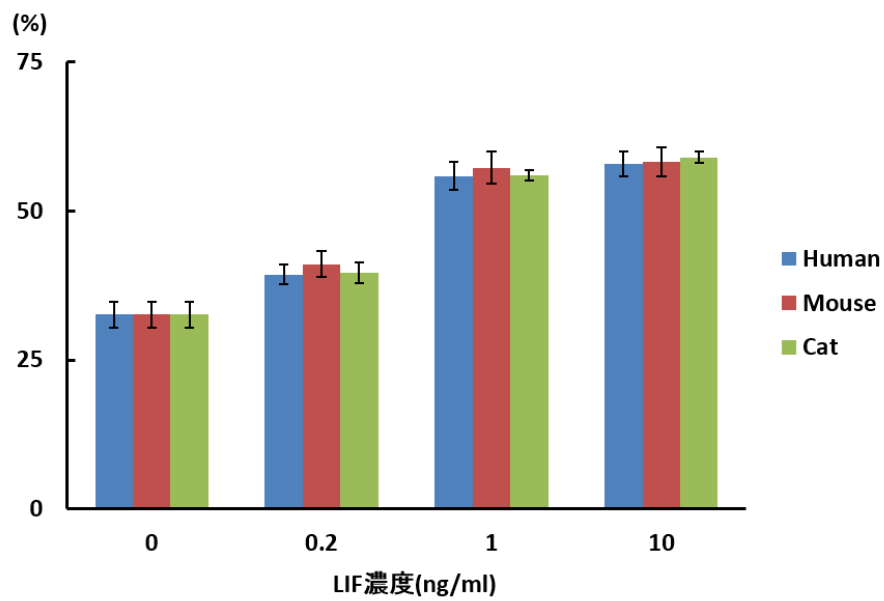
本節では、前節で創製・単離したネコ LIF タンパク質の生理活性を評価するため、マウス ES 細胞、TF-1 細胞、およびネコ未成熟卵細胞に対する作用を検討した。その結果、ネコ LIF タンパク質はマウス ES 細胞の増殖促進・未分化性維持、TF-1 細胞の増殖促進、ネコ卵丘細胞の膨化促進および未成熟卵細胞の核成熟率改善といった作用を示した。

以上の結果から、作製したネコ LIF タンパク質は LIF としての生理活性を有すると考えられる。

Table・Figure



(A)総コロニー数



(B)ALP 陽性コロニーの割合

Fig. 5-1 ヒト LIF およびマウス LIF、作製ネコ LIF の
マウス ES 細胞 TT2 株に対する効果
a VS b ($P<0.01$)、平均±標準誤差 (n = 3)

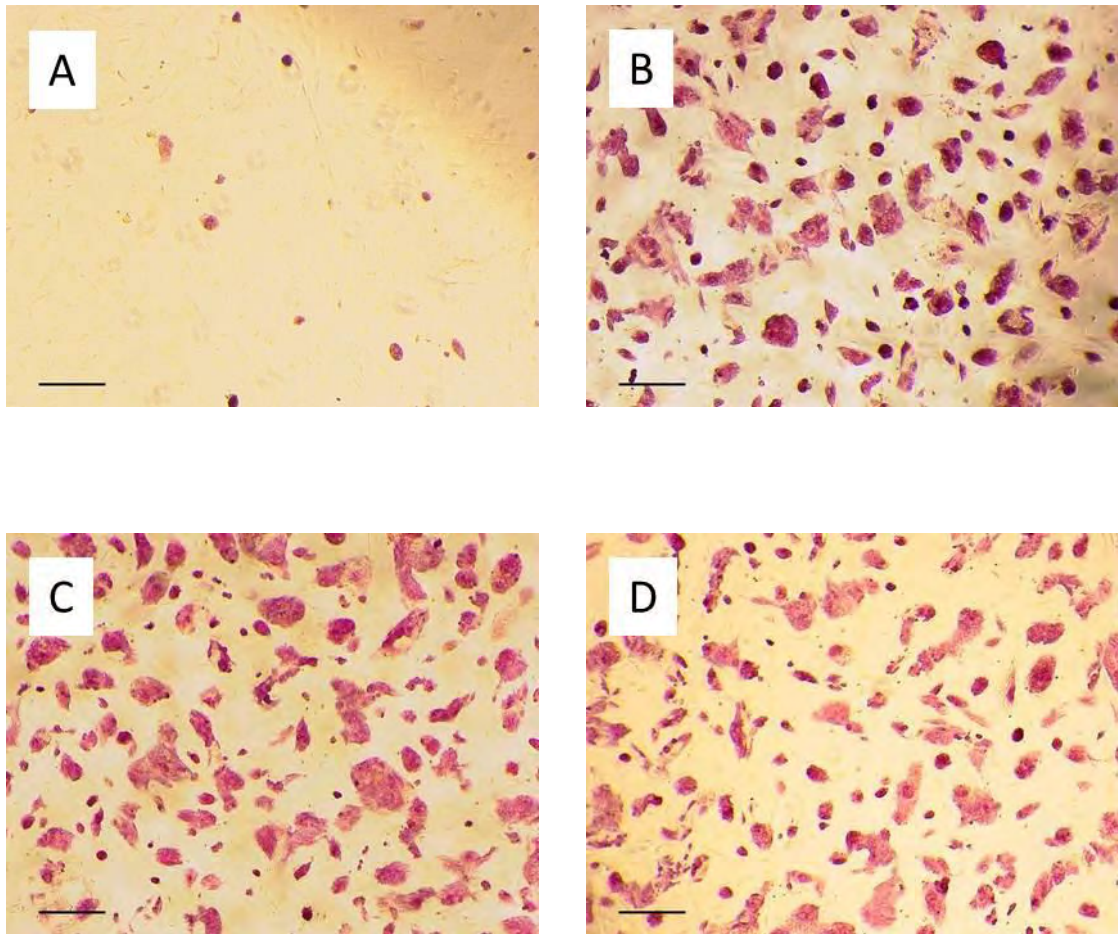


Fig. 5-2 各 LIF におけるマウス ES 細胞コロニーの
 総コロニー数およびアルカリフォスファターゼ染色性
 (A)LIF 無添加群
 (B)ヒト LIF 10 ng/ml 添加群
 (C)マウス LIF 10 ng/ml 添加群
 (D)ネコ LIF 10 ng/ml 添加群
 Bar = 100 μ m

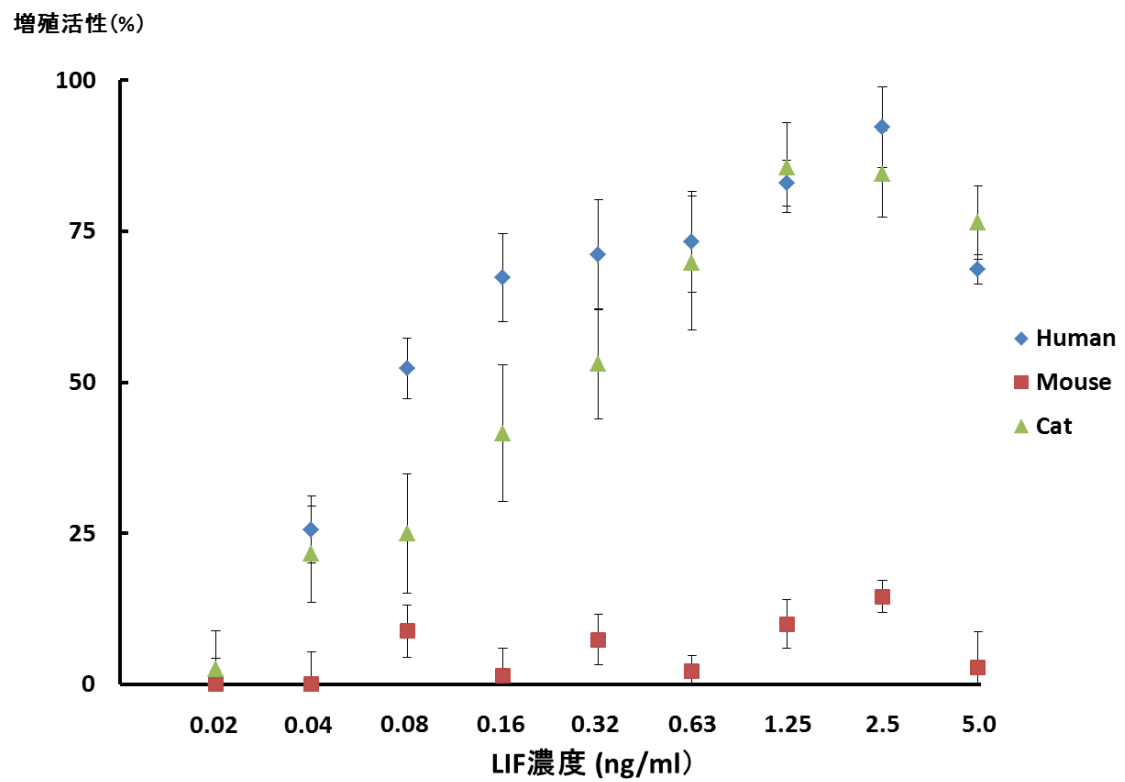
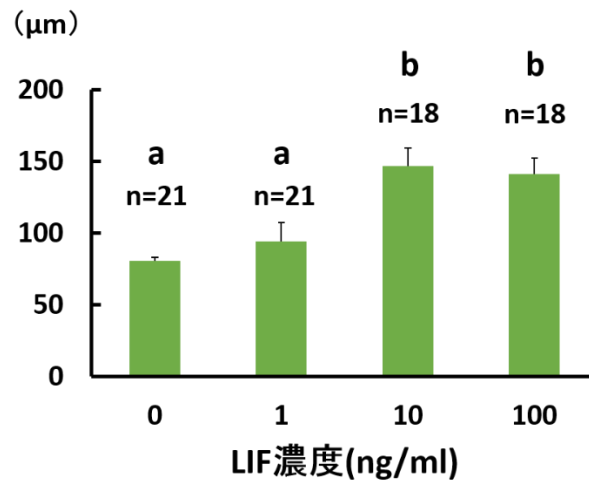
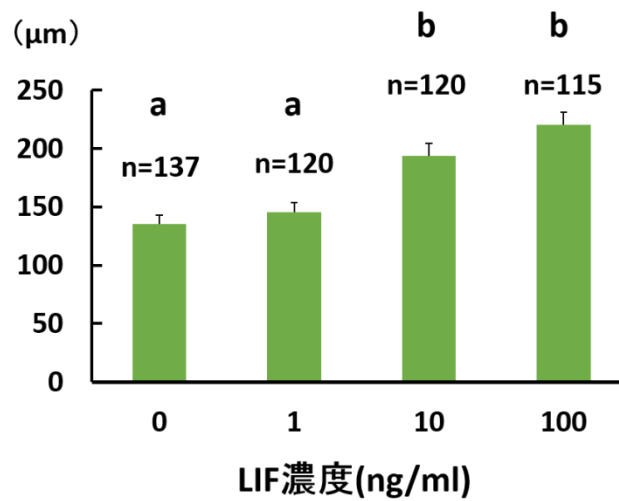


Fig. 5-3 各 LIF の TF-1 細胞の増殖活性に対する効果
平均±標準誤差 (n = 3)



(A)IVM 培地



(B)IVM 培地 + FSH, EGF

Fig.5-4 作製ネコ LIF のネコ卵丘細胞膨化に対する効果
a VS b ($P < 0.01$)、平均±標準誤差

| fLIF (ng/mL) | No. of oocytes examined | Percentage of oocytes at the stage of | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------|------------|------------|--------------------------|-----------|--------------|
| | | GV | GVBD | MI | MII | PA | unclassified |
| 0 | 108 | 6.6 ± 2.4 | 14.1 ± 3.4 | 27.0 ± 6.3 | 48.7 ± 4.2 ^a | 0.7 ± 0.7 | 2.9 ± 2.0 |
| 1 | 107 | 3.3 ± 1.6 | 18.6 ± 4.0 | 18.8 ± 4.4 | 54.4 ± 5.9 ^{ab} | 0.0 ± 0.0 | 4.9 ± 1.9 |
| 10 | 95 | 3.1 ± 1.6 | 15.8 ± 5.0 | 16.9 ± 3.9 | 64.1 ± 5.9 ^{ab} | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| 100 | 104 | 2.6 ± 1.7 | 10.8 ± 2.4 | 14.4 ± 4.5 | 72.2 ± 4.9 ^b | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |

Table 4 作製ネコ LIF のネコ卵細胞の核成熟に対する効果

a VS b ($P < 0.05$)、平均 ± 標準誤差

GV ; 卵核胞期

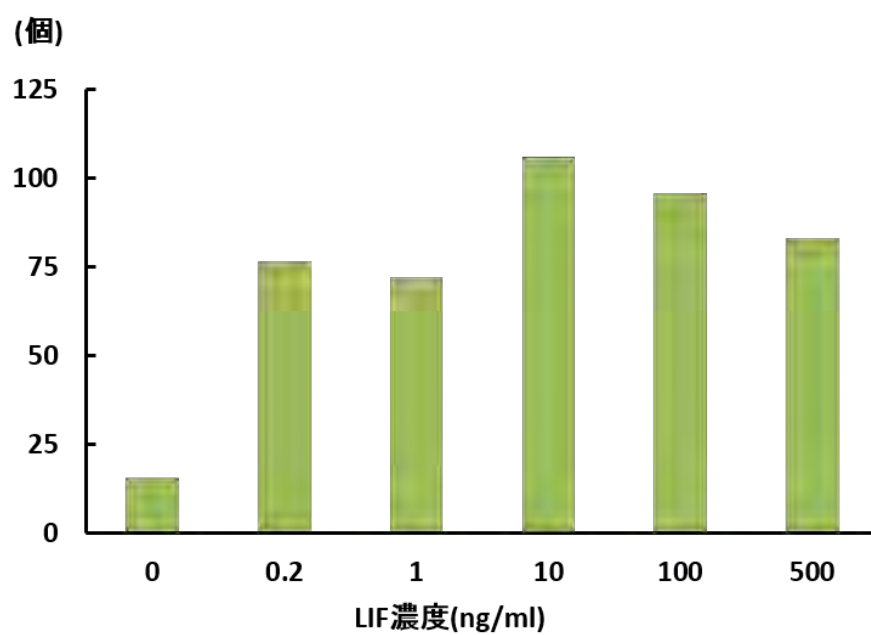
GVBD ; 卵核胞崩壊期

MI ; 第一減数分裂中期

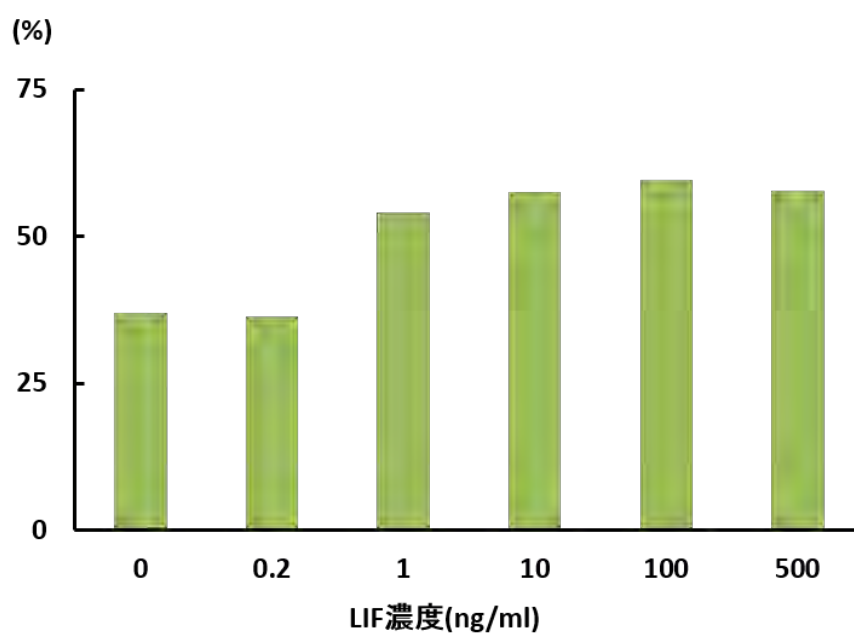
MII ; 第二減数分裂期

PA ; 単為発生

unclassified ; 分類不可



(A)総コロニー数



(B)ALP 陽性コロニーの割合

Supplementary Fig.1 作製ネコ LIF のマウス ES 細胞 TT2 株に対する効果
(n = 1)

総合考察

多能性細胞は自己複製能・多分化能を有することから、再生医療への応用が期待されている。ヒト医療では倫理的問題や免疫拒絶が起こりにくく、遺伝性疾患を再現できることから、iPS 細胞が特に注目されている。一方、伴侶動物として一般的なネコでは ES 様細胞が作製されているが、その培養・維持は困難であり、三胚葉への分化能も確認されていない。さらにネコ iPS 細胞の作製は試みられていない。

そこで本研究では、第 1 章として、ネコ胎子線維芽細胞に初期化遺伝子を導入し、ネコ iPS 細胞株の樹立を試みた。

第 1 節では、これまでに報告されているネコ ES 様細胞は培養・維持が困難であったことから、ネコ iPS 細胞の作製・長期継代に適した培地の検討を行った。多能性幹細胞の最も基本的な培地として、FBS または KSR を添加したヒト ES 細胞培地が用いられている。そこで、ネコ iPS 細胞にこれらの培地が与える影響を調べるため、各培地における初代コロニー形成効率および継代数を検討した。その結果、KSR 添加培地で初代コロニー形成効率が有意に高かったが、FBS 添加培地で長期継代しやすい傾向にあった。本節では、FBS 添加培地を用いることでネコ iPS 細胞株の樹立に成功した。TGFβ およびアクチビンは iPS 細胞の作製時には間葉上皮転換を阻害して初代コロニー形成効率を低下させる一方、作製された iPS 細胞の増殖を促進する。TGFβ およびアクチビンは FBS にのみ含まれているため、ネコ iPS 細胞の初代コロニー形成効率は KSR 添加培地で高く、FBS 添加培地で長期継代しやすかったと推測される。今後、FBS および KSR 添加培地の組み合わせ、さらには TGFβ とその阻害剤の使用を検討し、初代コロニー形成効率が高く、長期継代も可能な培養方法の確立が期待される。

第2節では、第1節で作製したネコ iPS 細胞株の特性評価を行った。これまで作製が報告されているネコ ES 様細胞は、長期継代と三胚葉への分化ができず、多能性幹細胞としての性質は十分ではなかった。そこで本節では、ネコ iPS 細胞株の多能性幹細胞としての特性を検討した。ネコ iPS 細胞株は増殖特性・凍結融解への耐性・未分化マーカー・核型・導入遺伝子および内在多能性維持遺伝子の発現状態・分化能において、ヒト多能性幹細胞と類似した特性を有していた。以上の結果から、本細胞株をネコ iPS 細胞株であると判断した。これまでヒト・マウス以外の動物種で作製された iPS 細胞は、その多くが長期継代できないもの、または導入遺伝子が発現していて腫瘍化の危険性が高いと考えられるものであった。その一方、ネコではヒトと類似した性質を示す iPS 細胞の作製が可能であると確認できた。

第2章として、第1章で作製したネコ iPS 細胞を用いて、遺伝性疾患の研究や輸血治療で重要と考えられる神経幹細胞および赤芽球系細胞への分化誘導を試みた。その結果、培養条件を変更することで、神経幹細胞マーカーNestinに陽性を示す紡錘形細胞、マクロファージ様細胞、赤芽球様細胞に分化誘導できることを確認した。本研究では、分化誘導期間が比較的短く、他の細胞との共培養を必要としない手法を用いた場合でも、ネコ iPS 細胞株から目的の細胞を得られた。しかし、分化誘導して得た細胞の機能や特性の評価は十分ではなく、より慎重な検討が必要である。また、赤芽球系細胞への分化誘導効率は高くないため、分化細胞を幅広く応用するには分化誘導法の改善、あるいは iPS 細胞の分化能を高める必要があると考える。

第3章としてネコ iPS 細胞の培養維持に有用と考えられるネコ LIF を創製した。

第1節では、これまで報告がないネコ *LIF* 遺伝子のクローニングおよびシー

クエンズ解析を行い、大腸菌におけるタンパク質発現の誘導を試みた。その結果、成熟タンパク質のアミノ酸配列がヒトと 92%、マウスと 81%一致するネコ *LIF* 遺伝子をクローニングすることができた。さらに、遺伝子組み換え大腸菌を用いることでネコ *LIF* タンパク質の創製に成功した。ヒト *LIF* では受容体との結合で重要なアミノ酸が特定されている。今回明らかにしたネコとヒト *LIF* のアミノ酸配列を比較すると、この重要なアミノ酸の一致率は 83%であった。ヒト *LIF* とネコ *LIF* 受容体の反応性を判断するには、ネコ *LIF* 受容体のアミノ酸配列および立体構造も明らかにする必要がある。しかし、ウシやブタでの *LIF* 使用に関する報告からも、ヒト *LIF* はネコの細胞に対し十分な活性を有していない可能性が十分に考えられる。また、本研究では大腸菌の破碎液を Ni-NTA セファロースで精製することで、高効率にネコ *LIF* タンパク質を分離することができた。不要なタンパク質は多くが大腸菌由来であり、幹細胞に対して増殖能の低下や分化誘導などの毒性を示す。そのため、目的タンパク質を高効率に分離することで、細胞への悪影響を防ぐことができると考えられる。

第 2 節では、第 1 節で創製したネコ *LIF* タンパク質の生理活性を評価した。その結果、ネコ *LIF* タンパク質はマウス ES 細胞の増殖促進・未分化性維持、TF-1 細胞の増殖促進、ネコ卵丘細胞の膨化促進および未成熟卵細胞の核成熟率改善などの作用を示した。この結果から、作製したネコ *LIF* は生理活性を有すると判断した。マウス ES 細胞の増殖促進・未分化性維持は *LIF* 特異的な反応である。また、ネコ *LIF* は TF-1 細胞の増殖を促進したが、ヒト *LIF* とわずかな差が見られた。そのため、各々の *LIF* は交差反応性を有するが、同時に種特異性も有することが示唆された。ネコ卵丘細胞の膨化および未成熟卵細胞の核成熟率に対するネコ *LIF* の作用は、FSH と EGF を併用した際にも認められた。マウスを用いた研究では FSH と EGF は MAPK 細胞内伝達系を活性化して、

作用を示すと報告されている。一方、LIF は MAPK 細胞内伝達系に加え、STAT 細胞内伝達系を活性化し、作用を示す。そのため、FSH と EGF を併用した際にも、卵丘細胞の膨化および未成熟卵細胞の核成熟を促進したと考えられる。また、サイトカインの多くは合成後に修飾が行われることで活性を持つ。しかし、ネコ LIF はタンパク質の修飾が行われない大腸菌で作製しても生理活性を示した。大腸菌は低コストで多くのタンパク質を得ることに適している。そのため、大腸菌を用いることで、生理活性を有するネコ LIF を安価で大量に作製でき、ネコ LIF を幅広く応用できると考えられる。

以上、本研究の結果から、ネコ iPS 細胞の培養条件を検討し、その知見を応用してネコ iPS 細胞株を樹立した。さらに、樹立したネコ iPS 細胞株の神経幹細胞および血液系細胞への分化誘導に成功した。また、ネコ *LIF* 遺伝子のクローニング・解析し、生理活性を有するネコ LIF タンパク質の創製に成功した。今後、これらの技術がさらに進むことにより、再生獣医療の応用が期待される。

総括

ネコにおける iPS 細胞株樹立を目的として、その作製条件の検討およびネコ iPS 細胞株樹立を試みた。さらに、基礎研究での利用や臨床応用が期待される神経幹細胞および血液系細胞への分化誘導を行った。また、ネコ iPS 細胞の多能性と増殖能を高めると考えられるネコ *LIF* 遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク作製を試みた。その結果、以下のことが明らかになった。

1. KSR 添加培地では初代コロニー形成効率が有意に高いが、FBS 添加培地のほうが長期継代しやすく、ネコ iPS 細胞株を樹立できた。
2. 本細胞株は未分化マーカーを発現し、正常な核型と三胚葉への分化能を有することからヒト ES 細胞と類似した性質を有することが明らかとなった。また、初期化に用いた導入遺伝子の発現は抑制されていた。
3. 本細胞株は分化培地を用いることで、神経幹細胞および血液系細胞に分化誘導することができた。
4. ネコ *LIF* 遺伝子をクローニングしてその配列を初めて明らかにし、大腸菌を用いることでタンパク質の創製に成功した。
5. 作製したネコ *LIF* はマウス ES 細胞、TF-1 細胞、およびネコ未成熟卵細胞に作用を示したことから、*LIF* としての生理活性を有することを明らかにした。

以上、本研究により、ヒト ES 細胞と類似した性質を有するネコ iPS 細胞株の樹立に成功した。さらに、樹立したネコ iPS 細胞株の神経幹細胞および血液

系細胞への分化誘導に成功した。また、ネコ iPS 細胞の多能性と増殖能を高めると考えられる *LIF* 遺伝子をクローニングし、生理活性のある LIF タンパク質を創製した。今後、これらの技術が再生獣医療へ応用できるものであると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、直接の御指導と御鞭撻を賜りました本学細胞病理学教室の鳩谷晋吾准教授に深く感謝致します。また、御校閲の労を賜りました本学獣医繁殖学教室の玉田尋通教授と統合生理学の中村洋一教授に感謝の意を表します。さらに、諸事にわたり温かい御指導と御助言を賜りました当教室の稲葉俊夫教授、杉浦喜久弥准教授、細胞分子生物学教室の竹中重雄准教授、ならびに獣医繁殖学教室の川手憲俊准教授に感謝の意を表します。

また、貴重な検体を快く提供してくださった、いしづか動物病院の石塚泰雄院長ならびに辻誠副院長、あつべ動物病院の野村麻子院長、新金岡動物病院の水戸凱院長に心から御礼申し上げます。

そして、種々の御援助を賜りました教室各位の皆様に深く感謝致します。

参考文献

Aikawa J, Sato E, Kyuwa S, Sato E, Sasai K, Shiota K, Ogawa T. Asparagine-linked glycosylation of the rat leukemia inhibitory factor expressed by simian COS7 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62:1318-1325.

Auer L, Bell K. Transfusion reactions in cats due to AB blood group incompatibility. *Res Vet Sci.* 1983;35:145-152.

Auernhammer CJ, Melmed S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev.* 2000;21:313-345. Review.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol.* 1995;168:342-357.

Bajpai R, Lesperance J, Kim M, Terskikh AV. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev.* 2008;75:818-827.

Bao L, He L, Chen J, Wu Z, Liao J, Rao L, Ren J, Li H, Zhu H, Qian L, Gu Y, Dai H, Xu X, Zhou J, Wang W, Cui C, Xiao L. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res.* 2011;21:600-608.

Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N. A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell Rep.* 2012;2:1-13.

Beers J, Gulbranson DR, George N, Siniscalchi LI, Jones J, Thomson JA, Chen G. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nat Protoc.* 2012;7:2029-2040.

Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang YC, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA, Loring JF. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods.* 2011 ;8:829-831.

Bryja V, Bonilla S, Cajánek L, Parish CL, Schwartz CM, Luo Y, Rao MS, Arenas E. An

efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:844-849.

Buecker C, Chen HH, Polo JM, Daheron L, Bu L, Barakat TS, Okwieka P, Porter A, Gribnau J, Hochedlinger K, Geijsen N. A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6:535-546.

Buehr M, Smith A. Genesis of embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358:1397-1402.

Camnasio S, Carri AD, Lombardo A, Grad I, Mariotti C, Castucci A, Rozell B, Riso PL, Castiglioni V, Zuccato C, Rochon C, Takashima Y, Diaferia G, Biunno I, Gellera C, Jaconi M, Smith A, Hovatta O, Naldini L, Di Donato S, Feki A, Cattaneo E. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiol Dis*. 2012;46:41-51.

Castiglioni V, Onorati M, Rochon C, Cattaneo E. Induced pluripotent stem cell lines from Huntington's disease mice undergo neuronal differentiation while showing alterations in the lysosomal pathway. *Neurobiol Dis*. 2012;46:30-40.

Chambers I, Silva J, Colby D, Nichols J, Nijmeijer B, Robertson M, Vrana J, Jones K, Grotewold L, Smith A. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*. 2007;450:1230-1234.

Chan SS, Li HJ, Hsueh YC, Lee DS, Chen JH, Hwang SM, Chen CY, Shih E, Hsieh PC. Fibroblast growth factor-10 promotes cardiomyocyte differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2010;5:e14414.

Chang KH, Huang A, Hirata RK, Wang PR, Russell DW, Papayannopoulou T. Globin phenotype of erythroid cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2010;115:2553-2554.

Chang KH, Nelson AM, Cao H, Wang L, Nakamoto B, Ware CB, Papayannopoulou T. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high

levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood*. 2006;108:1515-1523.

Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourget J, Teng JM, Thomson JA. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods*. 2011;8:424-429.

Court MH. Feline drug metabolism and disposition: pharmacokinetic evidence for species differences and molecular mechanisms. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2013;43:1039-1054.

Dahéron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;22:770-778.

Dalton S. Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2013; 25:241-246.

Dang-Nguyen TQ, Haraguchi S, Kikuchi K, Somfai T, Bodó S, Nagai T. Leukemia inhibitory factor promotes porcine oocyte maturation and is accompanied by activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Mol Reprod Dev*. 2014;81:230-239.

Darabi R, Pan W, Bosnakovski D, Baik J, Kyba M, Perlingeiro RC. Functional myogenic engraftment from mouse iPS cells. *Stem Cell Rev*. 2011;7:948-957.

De Matos DG, Miller K, Scott R, Tran CA, Kagan D, Nataraja SG, Clark A, Palmer S. Leukemia inhibitory factor induces cumulus expansion in immature human and mouse oocytes and improves mouse two-cell rate and delivery rates when it is present during mouse in vitro oocyte maturation. *Fertil Steril* 2008;90:2367–2375.

Dias J, Gumenyuk M, Kang H, Vodyanik M, Yu J, Thomson JA, Slukvin II. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011;20:1639-1647.

Ellerström C, Strehl R, Moya K, Andersson K, Bergh C, Lundin K, Hyllner J, Semb H.

Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells*. 2006;24:2170-2176.

Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;1313-1317.

Evans MJ, Kaufman MJ. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154-156.

Fujishiro SH, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Arai Y, Matsunari H, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Abe T, Furukawa Y, Umeyama K, Yamanaka S, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y. Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev* 2013;22:473–482.

Fujita M, Tsuchida A, Hirata A, Kobayashi N, Goto K, Osumi K, Hirose Y, Nakayama J, Yamanoi T, Ashida H, Mizuno M. Glycoside hydrolase family 89 alpha-N-acetylglucosaminidase from *Clostridium perfringens* specifically acts on GlcNAc alpha1,4Gal beta1R at the non-reducing terminus of O-glycans in gastric mucin. *J Biol Chem*. 2011;286:6479-6489.

Garcia-Gonzalo FR, Izpisua Belmonte JC. Albumin-associated lipids regulate human embryonic stem cell self-renewal. *PLoS One*. 2008;3:e1384.

Geisse S, Gram H, Kleuser B, Kocher HP. Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expr Purif*. 1996;8:271-282.

Giger U, Bücheler J. Transfusion of type-A and type-B blood to cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1991;198:411-418.

Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J, Rao MS. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 2004;269:360-380.

Goldman SA. Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J Neurobiol*. 1998;36:267-286.

Gómez MC, Serrano MA, Pope CE, Jenkins JA, Biancardi MN, López M, Dumas C, Galiguis J, Dresser BL. Derivation of cat embryonic stem-like cells from in vitro-produced blastocysts on homologous and heterologous feeder cells. *Theriogenology*. 2010;74:498-515.

Gough NM, Gearing DP, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, Nice EC, Kelso A, Metcalf D. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*. 1987;6:3995-4002.

Grigoriadis AE, Kennedy M, Bozec A, Brunton F, Stenbeck G, Park IH, Wagner EF, Keller GM. Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells. *Blood*. 2010;115:2769-2776.

Griot-Wenk ME, Giger U. Feline transfusion medicine. Blood types and their clinical importance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1995;25:1305-1322.

Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010;143:508-525.

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007;318:1920-1923.

Hannum C, Culpepper J, Campbell D, Mcclamahan T, Zurawski S, Kastelein R, Bazan JF, Hudak S, Wagner J, Mattson J, Luh J, Duda G, Martina N, Peterson D, Menon S, Shanafelt A, Muench M, Kelner G, Namikawa R, Rennick D, Roncarolo MG, Zlotnik A, Rosnet O, Dubreuil P, Birnbaum D, Lee F. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*. 1994;368:643-648.

Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, Kawate N, Tamada H, Sawada T, Kumagai D, Sugiura K, Inaba T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2006;73:298-305.

Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*.

2012;338:971-975.

Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146:519-532.

Hoggatt J, Pelus LM. Many mechanisms mediating mobilization: an alliterative review. *Curr Opin Hematol*. 2011;18:231-238.

Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba S, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem*. 2010;285:31362-31369.

Hu N, Qiu Y, Dong F. Role of Erk1/2 signaling in the regulation of neutrophil versus monocyte development in response to G-CSF and M-CSF. *J Biol Chem*. 2015;290:24561-24573.

Hu Q, Friedrich AM, Johnson LV, Clegg DO. Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells*. 2010;28:1981-1991.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of tgfbeta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*. 2009;5:491-503.

Imsoonthornruksa S, Noisa P, Parnpai R, Ketudat-Cairns M. A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2011;151:295-302.

Isobe N, Maeda T, Terada T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between cumulus cells attached to pig oocytes. *J Reprod Fertil*. 1998;113:167-172.

James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells.

Development. 2005;132:1273-1282.

Kato T, Heike T, Okawa K, Haruyama M, Shiraishi K, Yoshimoto M, Nagato M, Shibata M, Kumada T, Yamanaka Y, Hattori H, Nakahata T. A neurosphere-derived factor, cystatin C, supports differentiation of ES cells into neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:6019-6024.

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron.* 2000;28:31-40.

Kim HJ, Lee DH, Kim DK, Han GB, Kim HJ. The glycosylation and in vivo stability of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced in rice cells. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:290-294.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2010;467:285-290.

Kitiyanant Y, Saikhun J, Pavasuthipaisit K. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation. *Theriogenology.* 2003;59:1775-1786.

Klimchenko O, Mori M, Distefano A, Langlois T, Larbret F, Lecluse Y, Feraud O, Vainchenker W, Norol F, Debili N. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood.* 2009;114:1506-1517.

Koh S, Thomas R, Tsai S, Bischoff S, Lim JH, Breen M, Olby NJ, Piedrahita JA. Growth requirements and chromosomal instability of induced pluripotent stem cells generated from adult canine fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 2013;22:951-963.

Lafon-Cazal M, Adjali O, Galéotti N, Poncet J, Jouin P, Homburger V, Bockaert J, Marin P. Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. Comparison with the

cerebrospinal fluid proteome. *J Biol Chem*. 2003;278:24438-24448.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:178-196.

Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol*. 1986;113:517-521.

Layton MJ, Lock P, Metcalf D, Nicola NA. Cross-species receptor binding characteristics of human and mouse leukemia inhibitory factor suggest a complex binding interaction. *J Biol Chem*. 1994;269:17048-17055.

Lee AS, Xu D, Plews JR, Nguyen PK, Nag D, Lyons JK, Han L, Hu S, Lan F, Liu J, Huang M, Narsinh KH, Long CT, de Almeida PE, Levi B, Kooreman N, Bangs C, Pacharinsak C, Ikeno F, Yeung AC, Gambhir SS, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Preclinical derivation and imaging of autologously transplanted canine induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem*. 2011;286:32697-32704.

Lein PJ, Beck HN, Chandrasekaran V, Gallagher PJ, Chen HL, Lin Y, Guo X, Kaplan PL, Tiedge H, Higgins D. Glia induce dendritic growth in cultured sympathetic neurons by modulating the balance between bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP antagonists. *J Neurosci*. 2002;22:10377-10387.

Lengner CJ, Gimelbrant AA, Erwin JA, Cheng AW, Guenther MG, Welstead GG, Alagappan R, Frampton GM, Xu P, Muffat J, Santagata S, Powers D, Barrett CB, Young RA, Lee JT, Jaenisch R, Mitalipova M. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell*. 2010;141:872-883.

Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*. 2008;135:1299-1310.

Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010;7:51-63.

Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*. 2009;4:16-19.

Liu CH, Chen LH. Promotion of recombinant macrophage colony stimulating factor production by dimethyl sulfoxide addition in Chinese hamster ovary cells. *J Biosci Bioeng*. 2007;103:45-49.

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, Deng H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008;3:587-590.

Luo Y, Fan Y, Zhou B, Xu Z, Chen Y, Sun X. Generation of induced pluripotent stem cells from skin fibroblasts of a patient with olivopontocerebellar atrophy. *Tohoku J Exp Med*. 2012;226:151-159.

Lyman SD, James L, Vanden Bos T, de Vries P, Brasel K, Gliniak B, Hollingsworth LT, Picha KS, McKenna HJ, Splett RR, Fletcher FA, Maraskovsky E, Farrah T, Foxworthe D, Williams DE, Beckmann MP. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell*. 1993;75:1157-1167.

Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466:829-834.

Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, Fujiyoshi K, Koike M, Uchiyama Y, Ikeda E, Toyama Y, Yamanaka S, Nakamura M, Okano H. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:16825-16830.

Minehata K, Mukouyama YS, Sekiguchi T, Hara T, Miyajima A. Macrophage colony stimulating factor modulates the development of hematopoiesis by stimulating the differentiation of endothelial cells in the AGM region. *Blood*. 2002;99:2360-2368.

Mitoma J, Furuya S, Hirabayashi Y. A novel metabolic communication between neurons and astrocytes: non-essential amino acid L-serine released from astrocytes is essential for developing hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 1998;30:195-199.

Miyamoto M, Naruo K, Seko C, Matsumoto S, Kondo T, Kurokawa T. Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4251-4259.

Mo C, Chearwae W, Bright JJ. PPARgamma regulates LIF-induced growth and self-renewal of mouse ES cells through Tyk2-Stat3 pathway. *Cell Signal.* 2010;22:495-500.

Mo X, Wu G, Yuan D, Jia B, Liu C, Zhu S, Hou Y. Leukemia inhibitory factor enhances bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev.* 2014;81:608-618.

Mohammadi Roushandeh A, Haji Hosseinlou H, Niknafs B, Halabian R, Mehdipour A, Habibi Roudkenar M. Effects of leukemia inhibitory factor on gp130 expression and rate of metaphase II development during in vitro maturation of mouse oocyte. *Iran Biomed J.* 2010;14:103-107.

Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science.* 1994;265:1098-1101.

Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Sugiura K, Wijewardana V, Kuwamura M, Tanaka M, Yamate J, Izawa T, Takahashi M, Kawate N, Tamada H, Imai H, Inaba T. Generation of functional platelets from canine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22:2026-2035.

O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Yuhki N. The Feline Genome Project. *Annu Rev Genet.* 2002;36:657-686.

Ogawa K, Saito A, Matsui H, Suzuki H, Ohtsuka S, Shimosato D, Morishita Y, Watabe T, Niwa H, Miyazono K. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2007;120:55-65.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev.* 1996;59:89-102.

Okada M, Oka M, Yoneda Y. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1800:956-963.

Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu S, Takano M, Kondo Y, Inoue N. Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2009;4:e6318.

Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westhusin M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction.* 2002;124:775-781.

Owczarek CM, Layton MJ, Metcalf D, Clark R, Gough NM, Nicola NA. Inter-species chimeras of leukemia inhibitory factor define a human receptor binding site. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;762:165-178.

Palacios R, Golunski E, Samaridis J. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7530-7534.

Pauklin S, Vallier L. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development.* 2015;142:607-619.

Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010;28:848-855.

Reine NJ. Infection and blood transfusion: a guide to donor screening. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2004;19:68-74.

Rodríguez A, De Frutos C, Díez C, Caamaño JN, Facal N, Duque P, García-Ochoa C, Gómez E. Effects of human versus mouse leukemia inhibitory factor on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology.* 2007;67:1092-1095.

Saito H, Takeuchi M, Chida K, Miyajima A. Generation of glucose-responsive functional islets with a three-dimensional structure from mouse fetal pancreatic cells and iPS cells in vitro. *PLoS One*. 2011;6:e28209.

Samal BB, Arakawa T, Boone TC, Jones T, Prestrelski SJ, Narhi LO, Wen J, Stearns GW, Crandall CA, Pope J, Suggs S. High level expression of human leukemia inhibitory factor (LIF) from a synthetic gene in *Escherichia coli* and the physical and biological characterization of the protein. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1260:27-34.

Sánchez-Danés A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jiménez-Delgado S, Caig C, Mora S, Di Guglielmo C, Ezquerro M, Patel B, Giralt A, Canals JM, Memo M, Alberch J, López-Barneo J, Vila M, Cuervo AM, Tolosa E, Consiglio A, Raya A. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med*. 2012;4:380-395.

Schwarz H, Schmittner M, Duschl A, Horejs-Hoeck J. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One*. 2014;9:e113840.

Sekine K, Takebe T, Enomura M, Matsui C, Tanaka H, Taniguchi H. Regenerative medicine approach as an alternative treatment to islet transplantation. *Transplant Proc*. 2012;44:1104-1106.

Sekine K, Takebe T, Suzuki Y, Kamiya A, Nakauchi H, Taniguchi H. Highly efficient generation of definitive endoderm lineage from human induced pluripotent stem cells. *Transplant Proc*. 2012;44:1127-1129.

Silva J, Nichols J, Theunissen TW, Guo G, van Oosten AL, Barrandon O, Wray J, Yamanaka S, Chambers I, Smith A. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*. 2009;138:722-737.

Sivasubramanian K, Atluri RR, Sarda K, Arvind M, Balaji V, Deb KD. Endotoxin-induced silencing of mesoderm induction and functional differentiation: role of HMGB1 in pluripotency and infection. *Regen Med*. 2008;3:23-31.

Song B, Smink AM, Jones CV, Callaghan JM, Firth SD, Bernard CA, Laslett AL, Kerr

PG, Ricardo SD. The directed differentiation of human iPS cells into kidney podocytes. *PLoS One*. 2012;7:e46453.

Song B, Sun G, Herszfeld D, Sylvain A, Campanale NV, Hirst CE, Caine S, Parkinson HC, Tonta MA, Coleman HA, Short M, Ricardo SD, Reubinoff B, Bernard CC. Neural differentiation of patient specific iPS cells as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. *Stem Cell Res*. 2012;8:259-273.

Su YQ, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*. 2002;143:2221-2232.

Takahama Y, Ochiya T, Sasaki H, Baba-Toriyama H, Konishi H, Nakano H, Terada M. Molecular cloning and functional analysis of cDNA encoding a rat leukemia inhibitory factor: towards generation of pluripotent rat embryonic stem cells. *Oncogene*. 1998;16:3189-3196.

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

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

Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H. Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc*. 2012;44:1018-1020.

Theunissen TW, van Oosten AL, Castelo-Branco G, Hall J, Smith A, Silva JC. Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions. *Curr Biol*. 2011;21:65-71.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.

Tomala M, Lavrentieva A, Moretti P, Rinas U, Kasper C, Stahl F, Schambach A, Warlich E, Martin U, Cantz T, Scheper T. Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner. *Protein Expr Purif.* 2010;73:51-57.

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, Okano H. Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes Cells.* 2010;15:959-969.

Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron.* 2001;30:65-78.

Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology.* 2012;77:220-228.

Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood.* 2005;105:617-626.

Wang Q, Mou X, Cao H, Meng Q, Ma Y, Han P, Jiang J, Zhang H, Ma Y. A novel xeno-free and feeder-cell-free system for human pluripotent stem cell culture. *Protein Cell.* 2012;3:51-59.

Wang S, Shen Y, Yuan X, Chen K, Guo X, Chen Y, Niu Y, Li J, Xu RH, Yan X, Zhou Q, Ji W. Dissecting signaling pathways that govern self-renewal of rabbit embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 2008;283:35929-35940.

Wang W, Yang J, Liu H, Lu D, Chen X, Zenonos Z, Campos LS, Rad R, Guo G, Zhang S, Bradley A, Liu P. Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:18283-18288.

Wang Y, Zheng CG, Jiang Y, Zhang J, Chen J, Yao C, Zhao Q, Liu S, Chen K, Du J, Yang

Z, Gao S. Genetic correction of β -thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res.* 2012;22:637-648.

Wardrop KJ, Reine N, Birkenheuer A, Hale A, Hohenhaus A, Crawford C, Lappin MR. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J Vet Intern Med.* 2005;19:135-142.

Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res.* 2009;19:103-115.

Wianny F, Perreau C, Hochereau de Reviers MT. Proliferation and differentiation of porcine inner cell mass and epiblast in vitro. *Biol Reprod.* 1997;57:756-764.

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature.* 1988;336:684-687.

Wood TC, Wildt DE. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. *J Reprod Fertil.* 1997;110:355-360.

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, Xiao L. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol.* 2009;1:46-54.

Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, Carpenter MK. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells.* 2005;23:315-323.

Xu Y, Zhu X, Hahm HS, Wei W, Hao E, Hayek A, Ding S. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:8129-8134.

Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50:327-332.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009;324:797-801.

Yu X, Jin G, Yin X, Cho S, Jeon J, Lee S, Kong I. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from in vivo-produced cat blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2008;75:1426-1432.

Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4:381-384.

Zou J, Mali P, Huang X, Dowey SN, Cheng L. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood*. 2011;118:4599-4608.