アストロサイトからiPS細胞へのリプログラミング過程の解析

小山（中島）　明

目次

要旨・・・2

略語・・・4

序論・・・5

材料と方法・・・9

結果・・・16

考察・・・62

引用文献・・・66

謝辞・・・73

要旨

体細胞は、特定の転写因子を導入することで、胚性幹細胞（ES 細胞）と同等の自己複製能と多分化能を持つ人工多能性幹細胞（iPS 細胞）へとリプログラミングされる。これまでに細胞リプログラミング過程における遺伝子発現の変化やエピジェネティックな変化が数多く報告されている。しかしながら、細胞リプログラミングの過程が通常の発生・分化の過程を遡るのかについては十分に明らかにされていない。特に、分化した細胞が自身の元となった組織幹細胞・前駆細胞の状態を経由してリプログラミングされるのかどうかはほとんどわかっていない。

本研究において私は、神経系の分化細胞の一つであるアストロサイトからリプログラミングを誘導し、神経幹細胞様状態を経由して iPS 細胞になることを明らかにした。マウスのアストロサイトから、Oct3/4、Klf4 、Sox2、c-Myc(以下 OKSM)の 4 因子だけではなく、Oct3/4、Klf4、Sox2 (以下 OKS)または Oct3/4、Klf4(以下 OK)の組み合わせによっても、iPS 細胞を作製した。次に免疫染色を用いて、神経幹細胞特異的な転写因子 Sox1 がリプログラミング過程で一過的に発現することを見出した。さらに、*Sox1*-GFP レポーターマウス由来のアストロサイトを用いたところ、リプログラミング過程において *Sox1*-GFP 陽性細胞が出現することが示された。リプログラミング過程で *Sox1*-GFP 陽性となった細胞を FACS により採取し培養を続けると、iPS 細胞に変化することを見出した。これらの結果から、Sox1 がアストロサイトのリプログラミングの途中段階のマーカーであることが示された。Sox1 のノックアウトは、OKSM および OKS を用いたリプログラミングの効率には影響を与えなかったが、OK を用いたリプログラミングの効率を劇的に減少させた。この結果は、OK を用いたリプログラミングの際には、Sox1 が Sox2 の代わりに機能し、アストロサイトのリプログラミングを促進することを示唆している。また、

マイクロアレイ解析を行うことにより、アストロサイトのリプログラミング過程において Sox1 陽性となった細胞の遺伝子発現プロファイルが神経幹細胞に類似していることを見出した。さらに、リプログラミング過程の細胞は、ニューロンとグリア細胞の両方に分化することのできるニューロスフィアを形成することができた。これらの結果から、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞は、遺伝子発現と分化能という点で神経幹細胞に類似していることが示唆された。一方で、マウスの胎仔繊維芽細胞（MEF）から iPS 細胞を誘導した場合は、Sox1 の発現上昇は見られなかった。さらに、MEF のリプログラミング過程の細胞は、ニューロンやグリア細胞に分化することのできるニューロスフィアを形成することができなかった。以上の結果は、MEF のリプログラミング過程においては神経幹細胞様状態を経由しないことを示している。

本研究により、アストロサイトが神経幹細胞様状態を経由して iPS 細胞へとリプログラミングされることが明らかとなり、分化細胞が組織幹細胞・前駆細胞の状態を経由して多能性を獲得すること、リプログラミング過程が部分的に発生・分化過程を逆行することが示唆された。

略語

OKSM: Oct3/4, Klf4, Sox2 and c-Myc

OKS: Oct3/4, Klf4, and Sox2

OK: Oct3/4 and Klf4

iPSC: induced pluripotent stem cell

NSC: neural stem cell

MEF: mouse embryonic fibroblast

ESC: embryonic stem cell

AP: alkaline phosphatase

GFAP: glial fibrillary acidic protein

LIF: Leukemia inhibitory factor

bFGF: basic FGF

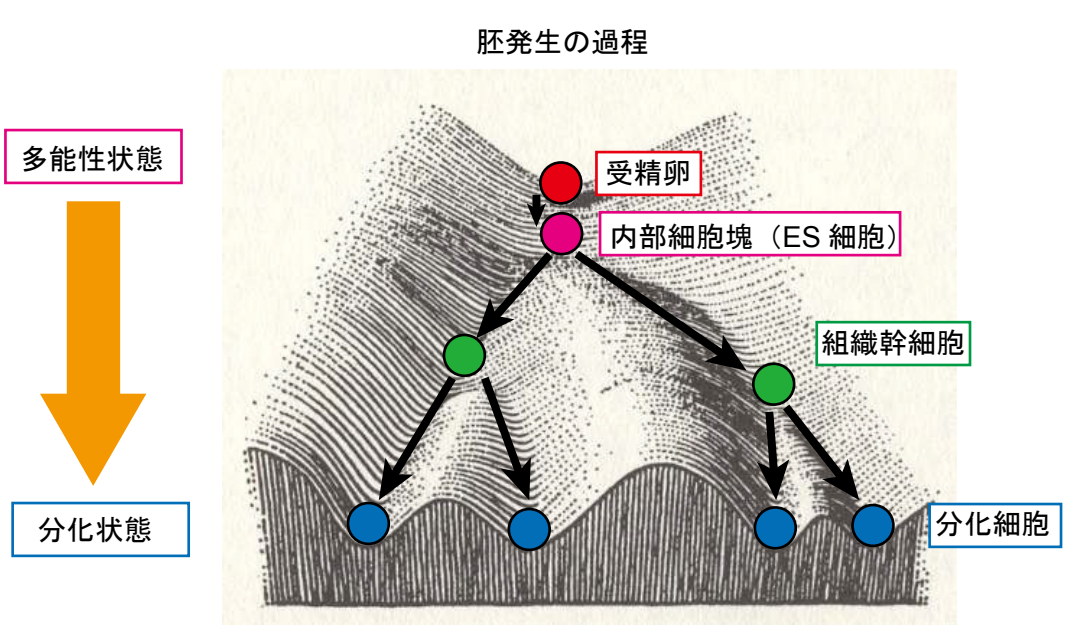
FBS: fetal bovine serum

序論

1957年、Conrad Waddingtonは、胚発生の過程を、山頂の多能性状態から麓の分化状態へと坂道を下るボールになぞらえた図を発表した(Waddington, 1957) (図 1A)。胚発生の進行に伴い、細胞は分化多能性を徐々に失う。一度坂を下ったボールは高い位置に戻ることはできない、つまり、胚発生の過程は不可逆的である、と長らく考えられていた。しかしながら、2006年に、体細胞に特定の転写因子 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc) を導入することにより、胚性幹細胞（embryonic stem cells; ES細胞）と同様の自己複製能と多分化能をもつ人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells; iPS細胞）が樹立できることが報告された(Takahashi and Yamanaka, 2006)。iPS細胞は、ES細胞が抱える倫理的な問題と移植における拒絶反応の問題の双方を克服することができるため、再生医療への応用が期待されている。この報告を機に、体細胞からiPS細胞へと至る過程、すなわち細胞リプログラミング過程の分子機構に関する研究が精力的に行われている(Buganim et al., 2013)。現在までに、細胞リプログラミング過程における遺伝子発現の変化、エピジェネティクス修飾の変化について網羅的な解析が行われ、これらの変化に重要な転写因子やエピジェネティクス修飾制御因子などが多数同定されている(Hussein et al., 2014; Koche et al., 2011; Koga et al., 2014; Mikkelsen et al., 2008; Polo et al., 2012)。

分化した細胞が多能性状態へと戻る細胞リプログラミングは、一見、通常の胚発生と逆の現象であると言える。しかしながら、細胞リプログラミングの過程が発生・分化の過程を遡るのかについては十分に明らかにされていない。これまでに、ヒトの体細胞が、胚発生過程の初期に見られる原条様中内胚葉の細胞に似た状態を経由して多能性を獲得することが報告された(Takahashi et al., 2014)。一方で、繊維芽細胞からリプログラミング誘導をした際に、繊維芽細胞とは異なる細胞系譜を制御する遺伝子が一過的に発

A



Waddington’ s landscape（Waddington 1957 改変）

B

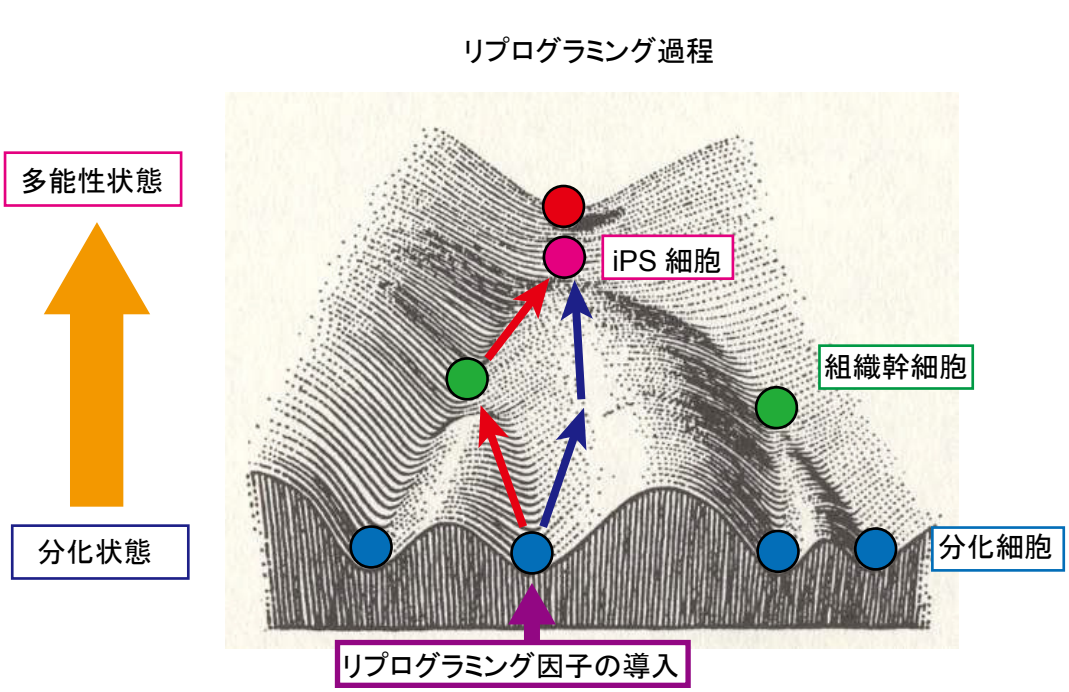


図 1　胚発生過程とリプログラミング過程

(A)Conrad Waddington が提唱した胚発生過程のモデル図。 受精卵は内部細胞塊、 組織幹細胞を経て様々な細胞へと分化する。
(B)2006 年の iPS 細胞樹立より、 分化細胞が多能性状態を獲得できることが示された。 しかしながら、 リプログラミング過程が胚発生の過程を逆行するのかどうかは明らかにされていない。 分化細胞が自身の元となった組織幹細胞・前駆細胞の状態を経由してリプログラミングされるのか（赤矢印）、 あるいは組織幹細胞とは異なる状態を経由してリプログラミングされるのか（青矢印）はほとんどわかっていない。

現することが複数報告されている(Koga et al., 2014; Mikkelsen et al., 2008; Polo et al., 2012)。さらに、繊維芽細胞のリプログラミング過程において、多数の上皮系の遺伝子が一過的に発現することも報告されている(Li et al., 2010; O'Malley et al., 2013; Samavarchi-Tehrani et al., 2010)。これらの結果は、細胞リプログラミング過程が発生・分化過程の単純な逆戻りではないことを示唆している。しかしながら、細胞リプログラミング過程が発生・分化過程と関連があるのかどうか、特に、分化細胞が自身の元となった組織幹細胞・前駆細胞の状態を経由してリプログラミングされるのか(図 1B、赤矢印) 、あるいは全く異なる状態を経由してリプログラミングされるのか (図 1B、青矢印)は明らかにされていない。

細胞リプログラミング過程に関するこれまでの研究は、主にマウス胎仔繊維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts; MEF)のリプログラミング過程を対象としていた(Buganim et al., 2012; Golipour et al., 2012; Smith et al., 2010; Sridharan et al., 2009)。しかしながら、MEFの初代培養系は非常にヘテロな細胞集団である。また、MEF自身が筋肉、骨、脂肪細胞へと分化することのできる間葉系幹細胞である。したがって、MEFをドナー細胞として用いた場合は、分化細胞が組織幹細胞の状態を経由してリプログラミングされるのかに関して検証することは難しい。これまでに、様々な細胞種からiPS細胞が作製できることが報告されているが(Yamanaka, 2009)、MEF以外の細胞種のリプログラミング過程についてはほとんど解析が行われていない。

本研究では、グリア細胞の一種であるアストロサイトからのリプログラミング過程を解析した。多能性幹細胞はまず神経幹細胞に分化し、続いてアストロサイトへと分化する。神経細胞系譜の分化のメカニズムに関する知見は多く存在するため、アストロサイトのリプログラミング過程は、細胞リプログラミング過程と発生・分化の過程を比較するのに適した系であると考えた。細胞リプログラミングの過程が発生・分化の過程を逆行するのであれば、アストロサイトは神経幹細胞状態を経由して iPS 細胞

へとリプログラミングされるのではないか、という仮説を立て検証を行った。まず、マウスのアストロサイトに、Oct3/4、Klf4 、Sox2、c-Myc （以下 OKSM）の 4 因子、Oct3/4、Klf4、Sox2 (以下 OKS)の 3 因子、または Oct3/4、Klf4(以下 OK)の 2 因子を導入することで、iPS 細胞を作製した。さらに、アストロサイトのリプログラミング過程において、神経幹細胞に特異的な転写因子である Sox1 が一過的に発現し、Sox1 陽性となった細胞が将来 iPS 細胞になる運命にあることを見出した。また、Sox1 ノックアウトマウスを用いた解析により、OK を用いたリプログラミングの際には、Sox1 が Sox2 の代わりに機能し、アストロサイトのリプログラミングを促進することが示された。さらに、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞は、遺伝子発現プロファイルと分化能という点で神経幹細胞に類似していることを見出し、アストロサイトが神経幹細胞様状態を経由して iPS 細胞へとリプログラミングされることが示唆された。興味深いことに、MEF のリプログラミング過程では Sox1 の発現上昇、ニューロンやグリア細胞への分化能力の獲得は観察されなかった。これらの研究結果は、分化細胞が組織幹細胞・前駆細胞の状態を経由して多能性を獲得すること、リプログラミング過程が部分的に発生・分化過程を逆行することを示唆するものである。

材料と方法

細胞培養

マウスのアストロサイトと神経幹細胞の初代培養方法は、過去の報告に基づいて行った(Imura et al., 2003)。初代培養アストロサイトは生後三日目のマウスの大脳から採取し、DMEM/F12 (Life Technoligies)に10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma)、25 units/ml penicillin/25 μg/ml streptomycin (Gibco)を加えた培地で培養した。90%以上の細胞がアストロサイトのマーカー遺伝子（GFAPとS100β）陽性であった。神経幹細胞は胎生12.5日目から14.5日目のマウスの脳から採取し、神経幹細胞用の培地（DMEM/F12、25 μg/ml insulin (Sigma)、 100 μg/ml apo-transferrin (ナカライテスク)、 20 nM progesterone (Sigma)、 100 μM putrescine (Sigma)、30 nM sodium selenite (Sigma)、20 ng/ml basic FGF (bFGF) (R&D Systems) 、20 ng/ml EGF (R&D Systems)を含む）を用いて培養した。MEFは胎生14.5日目のマウスから採取したものを使用した。MEFとHEK293T細胞は、FBS培地 (DMEM（ニッスイ)、10% FBS (Sigma) 、penicillin/streptomycin、2 mM L-Glutamine (Gibco)を含む）を用いて、Plat-E 細胞はFBS培地に1 μg/ml puromycin (Sigma) と10 μg/ml blastcidin S (科研製薬) を加えて培養した。リプログラミング過程の細胞は、ES細胞用培地（high glucose DMEM(ナカライテスク)、15% ES-FBS (Thermo Scientific)、1×NEAA (Gibco)、1 mM Sodium pyruvate (Sigma)、penicillin/ streptomycin、L-Glutamine、0.1 mM 2-mercaptethanol (Gibco)、 1000 units/ml ESGRO Leukemia inhibitory factor (以下、LIF) (Millipore)を含む）を用いて培養した。MEFから樹立されたiPS細胞株はiPS-MEF-Ng-20D-17株である(Okita et al., 2007)。アストロサイトやMEFから樹立されたiPS細胞株や、FACSセルソーターで採取後のリプログラミング過程の細胞は、マイトマイシンC処理したMEFやSNLフィーダー細胞上で、1500 units/ml ESGRO LIFを含むES細胞用培地を用

いて培養した。

マウス

アストロサイトとMEFは、ICRマウスまたは*Sox1*-GFPマウス由来のものを用いた。*Sox1*-GFPマウスはAustin Smith博士から提供された(Aubert et al., 2003)。*Sox1*-GFPマウスは、Sox1のopen reading frame (ORF)にEGFPがノックインされた*Sox1*+/-マウスであり、リプログラミング過程におけるSox1の発現を調べるために用いた。Sox1ホモノックアウトマウス(*Sox1*-/-)は、*Sox1*-GFPマウス(*Sox1*+/-)のオスとメスを掛け合わせて得た。

プラスミド

pMXs ベクター(pMXs-hOct4、-hSox2、-hKlf4、-hc-Myc)は Addgene (Addgene plasmids #17217、 #17218、#17219、#17220)から購入した(Takahashi et al., 2007)。また、pMX-GFP ベクターは、Cell Biolabs 社から購入した(Kitamura et al., 2003)。MadMyc-HA プラスミドは Bert Vogelstein 博士から提供された(Hermeking et al., 2000)。

リプログラミング誘導

細胞リプログラミングの方法は過去の報告に基づいて行った(Takahashi and Yamanaka, 2006)。リプログラミング因子をコードしたpMXsベクターを、FuGENE®HD Transfection Reagent (Promega)を用いてPlat-E細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから2日後、レトロウィルス含む培地を回収し、6 ug/mlのポリブレン (ナカライテスク)を加えてから、アストロサイトおよびMEFに感染させた。ウィルス感染 24時間後にES細胞用培地に交換した。培地交換は二日に一度行

った。MEFのリプログラミングでは、ウィルス感染から三日後に、ゼラチンコートしたdishに細胞をまきなおした。アストロサイトとMEFのリプログラミング過程ではフィーダー細胞は使用していない。

免疫染色

細胞は、4%パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定し、0.2% Triton X-100 を含む PBS を用いて膜透過処理を行った。3% BSA を含む PBS でブロッキング後、一次抗体を 4℃で一晩あるいは室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体を 4℃で一晩あるいは室温で 2 時間反応させた。観察には、Axiophot 2 (Carl Zeiss)、Axiovert 200 M (Carl Zeiss) 、SZX16 (Olympus)を用いた。使用した一次抗体は以下の通りである。anti-GFAP 抗体(Dako、Z0334)、anti-S100β抗体(Sigma、S2532)、 anti-Oct3/4 抗体(Santa Cruz、 sc-9081)、 anti-Nanog 抗体(Calbiochem、 sc1000)、 anti-Nanog 抗体(BD Biosciences、 M55-312)、 anti-SSEA1 抗体(Santa Cruz、 sc-21702)、anti-β-tubulin III 抗体(Sigma、 T8660)、 anti-α-sarcomeric actinin 抗体(Sigma、A7811)、 anti-Afp 抗体(Dako、 A000829), anti-Sox1 抗体(Santa Cruz、 sc-17318)、anti-E-cadherin 抗体(Cell Signaling、3195)、 anti-GFP 抗体(Life Technologies、A1112)、 anti-Bmi1 抗体(Millipore、 05-637)、anti-O4 抗体(Millipore、 MAB345)、anti-HA 抗体(Covance、16B12)。使用した二次抗体は以下の通りである。Alexa Fluor 350-、488- 、594-goat- あるいは donkey-anti-rabbit IgG、anti-mouse IgG、anti-mouse IgM 、anti-goat IgG 抗体(Molecular Probes)。

アルカリフォスファターゼ(AP)染色

AP染色は、Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma)を用い、「ヒト多能性幹細胞の維持培養プロトコール」(理研 CDB 幹細胞研究支援・開発室) に基づいて行った。

観察には実体顕微鏡（SZX16、 Olympus)を用いた。

in vitro分化誘導

iPS細胞を7.5 × 10^3 個/mlになるようにES細胞用培地（LIFは含まない）に懸濁した。この細胞液100 μlを超低接着表面96well dish（Coster)に移し、5日から6日間培養することで胚様体を作製した。胚葉体をゼラチンでコートしたdish上に移し、10日間培養することで分化を誘導した。免疫染色により、三胚葉への分化能を評価した。

FACS解析

アストロサイトおよびリプログラミング過程の細胞をアキュターゼ(Gibco)を用いて分散し、35 μmナイロンメッシュ(BD Biosciences)に通して単一細胞にした。FACSAria II (BD Biosciences)を用いてセルソーティングを行った。死細胞はDAPI染色、あるいはFCSとSSCのプロットをもとに除去した。いくつかの実験(図5D右、図6E、図18C)では、細胞を4%パラホルムアルデヒドを含むPBSで固定した後、BD LSRFortessa(BD Biosciences)を用いて解析した。ゲート設定は、野生型のマウス由来の細胞を用いた。解析ソフトは、FCS express4 ソフトウェア（De Novo Software)、BD FACSDivaソフトウェア(BD Biosciences)、FlowJoを用いた。

定量的 RT-PCR

RNAはRNeasy Kit (QIAGEN)を用いて調整した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、SYBR Green PCR kit (QIAGEN)とLight Cycler (Roche Diagnostics) を用いてリアルタイム定量的 PCRを行った。遺伝子発現レベルは、β-Actinにより補正を行った。使用したプライマー配列は以下の通りである。

β–Actin, 5′-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3′ and 5′-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3′;

Sox2, 5′-ATGGCCCAGCACTACCAG-3′ and 5′-CCTCCCAATTCCCTTGTATC-3′;

GFP, 5′-GACGACGGCAACTACAAGAC-3′ and 5′-TCGGCCATGATATAGACGTT-3′;

Gfap, 5′-AGGTTGAATCGCTGGAGGAG-3′ and 5′-GCTTGGCCACATCCATCTC-3′;

Sox1, 5′-TGCAGGAGGCACAGCTGGCCTAC-3′ and 5′-TGCCGCCACCGCCGAGTTCTGG-3′;

Bmi1, 5′-AAGAAATGGCCCACTACCTTTG-3′ and 5′-CCAGCATTCGTCAGTCCATC-3′;

Nestin, 5′-GCAACTGGCACACCTCAAGA-3′ and 5′-CCCAAGGAAATGCAGCTTCA-3′;

c-Myc, 5′-TGTCCATTCAAGCAGACGAG-3′ and 5′-CACGAGAGATTCCAGCTCCT-3′;

N-Myc, 5′-AGTGTGTCTGTTCCAGCTACTGC-3′ and 5′-TCATCTTCCTCCTCGTCATCCT-3′;

Nanog, 5′-CCTCCATTCTGAACCTGAGC-3′ and 5′-GGGATACTCCACTGGTGCTG-3′.

マイクロアレイ解析

神経幹細胞とiPS細胞株のサンプルはduplicateで行った。アストロサイトと、リプログラミング過程の*Sox1*-GFP陽性細胞のサンプルはtriplicateで行った。細胞からのtotalRNAの抽出はRNeasy Kit (QIAGEN)を用いて行った。50-100 ngのtotal RNAからGeneChip WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix)を用いてプローブを作製した。プローブはGeneChip Mouse Gene 1.0 ST アレイ(Affymetrix)にhybridizeさせ、Affymetrix

GeneChip Scannerを用いてシグナルをスキャンした。プローブセットのシグナル値は、GeneSpring GX 12.6 ソフトウェア(Agilent)のrobust multi-array average (RMA)アルゴリズムを用いて計算した。クラスタリング解析はGeneSpring GX 12.6 ソフトウェアを用いて行った。アストロサイトのリプログラミング過程で発現量が増加あるいは減少した遺伝子群は、統計解析と発現変化の倍率をもとに絞り込んだ。統計解析は、one-way analysis of variance (ANOVA)により行い、Benjamini-Hochberg法を用いて多重検定の補正を行った。組織ごとの発現解析およびGO解析は、NIH DAVID Bioinformatics toolを用いて行った。論文では、プローブセットのことを「遺伝子」と表記している。シグナル値が100以下の遺伝子は発現していないとみなした。マイクロアレイのデータはNCBI GEOデータベースにGSE69237として登録されている。

<u>レンチウィルスの作製</u>

LacZ (コントロール)とN-Mycに対するshRNAの配列はCSII-U6-MCS-EGFPベクター(Okamoto et al., 2006)にサブクローニングした。pCAG-HIVgpベクターとpCMV-VSV-G-RSV-Revベクターをレンチウィルス用パッケージングプラスミドとして用いた。293T細胞にベクターをトランスフェクションし、48時間後にレンチウィルスを含む培地を回収した。PEG-it(System Biosciences)を用いてウィルス液を濃縮し、タイターを測定した後、実験に使用した。使用したshRNAの配列は以下の通りである。

Control-sense,

5′-AAGGCCAGACGCGAATTATTTCAAGAGAATAATTCGCGTCTGGCCTTTTTTTT-3′;

Control-antisense,

5′-AATTAAAAAAAAGGCCAGACGCGAATTATTCTCTTGAAATAATTCGCGTCTGGCCTTGGCC-3′;

N-Myc#1-sense,

5′-TCACTAGTGTGTCTGTTCCTTCAAGAGAGGAACAGACACACTAGTGACCTTT
TTT-3′;

N-Myc#1-antisense,

5′-AATTAAAAAAGGTCACTAGTGTGTCTGTTCCTCTCTTGAAGGAACAGACACA
CTAGTGAGGCC-3′;

N-Myc #2-sense,

5′-CAGCAGCAGTTGCTAAAGATTCAAGAGATCTTTAGCAACTGCTGCTGCCTTT
TTT-3′;

N-Myc #2-antisense,

5′-AATTAAAAAAGGCAGCAGCAGTTGCTAAAGATCTCTTGAATCTTTAGCAACT
GCTGCTGGGCC-3′.

スフィアの形成と神経細胞への分化誘導

アキュターゼ(Gibco)を用いて細胞を分散し、35 μmナイロンメッシュ(BD Biosciences)に通して単一細胞にした。40,000個/mlになるように神経幹細胞用培地に懸濁し、10日間培養しスフィアを形成させた。二日に一回、培地交換と増殖因子(bFGFとEGF)の添加を行った。スフィアはpoly-L-ornithin(Sigma)/Fibronectin(Life Technologies)でコートしたチャンバー(zell-kontakt)に移し、増殖因子を含まない培地で5日間培養し、分化を誘導した。免疫染色により、分化能を評価した。

結果

アストロサイトから 3 因子（OKS）を用いて iPS 細胞を作製した

これまでに、マウスのアストロサイト、および、ヒトのアストロサイトに 4 因子(OKSM)を導入することで、iPS 細胞が作製できることが報告されている(Ruiz et al., 2010; Tian et al., 2011)。OKSM を用いた細胞プログラミングでは、部分的にリプログラミングされた不完全な iPS 細胞が多数生じ、c-Myc がその原因であることが報告されている(Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008)。そこで、c-Myc を除いた 3 因子(OKS)を用いることにより、細胞リプログラミングの過程をより正確に解析できるのではないかと考え、アストロサイトに OKS を導入し、リプログラミング誘導することを試みた。アストロサイトはマウスの新生仔の脳から採取して培養し、アストロサイトのマーカー遺伝子である GFAP と S100βを発現していることを確認した(図 2A)。アストロサイトにレトロウィルスを用いて OKS と GFP を導入し、Leukemia inhibitory factor(LIF）を含む ES 細胞用培地で培養することにより、リプログラミングを誘導した(図 2B)。GFP はレトロウィルスによる外来遺伝子の発現の指標として用いた。リプログラミング因子を導入した日を 0 日目としている。リプログラミング誘導を開始して 7 日から 10 日程度で、細胞の形態変化と細胞増殖能の向上が観察された。さらに、誘導開始から 2 週間後には、iPS 細胞コロニーの特徴である三次元に盛り上がったコロニーが形成された。コロニーは成長を続け、誘導開始から 3 週間後には GFP のサイレンシングが観察された。ES 細胞や iPS 細胞では、レトロウィルスによる外来遺伝子の発現がサイレンシングされることが知られているため、GFP の発現が消えたことは、すなわち iPS 細胞になったことを意味する。さらに、iPS 細胞コロニーを継代することで、iPS 細胞株を樹立した。アストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株は、ES 細胞に非常によく似た形態を示し(図 2C)、多能性マ

図 2

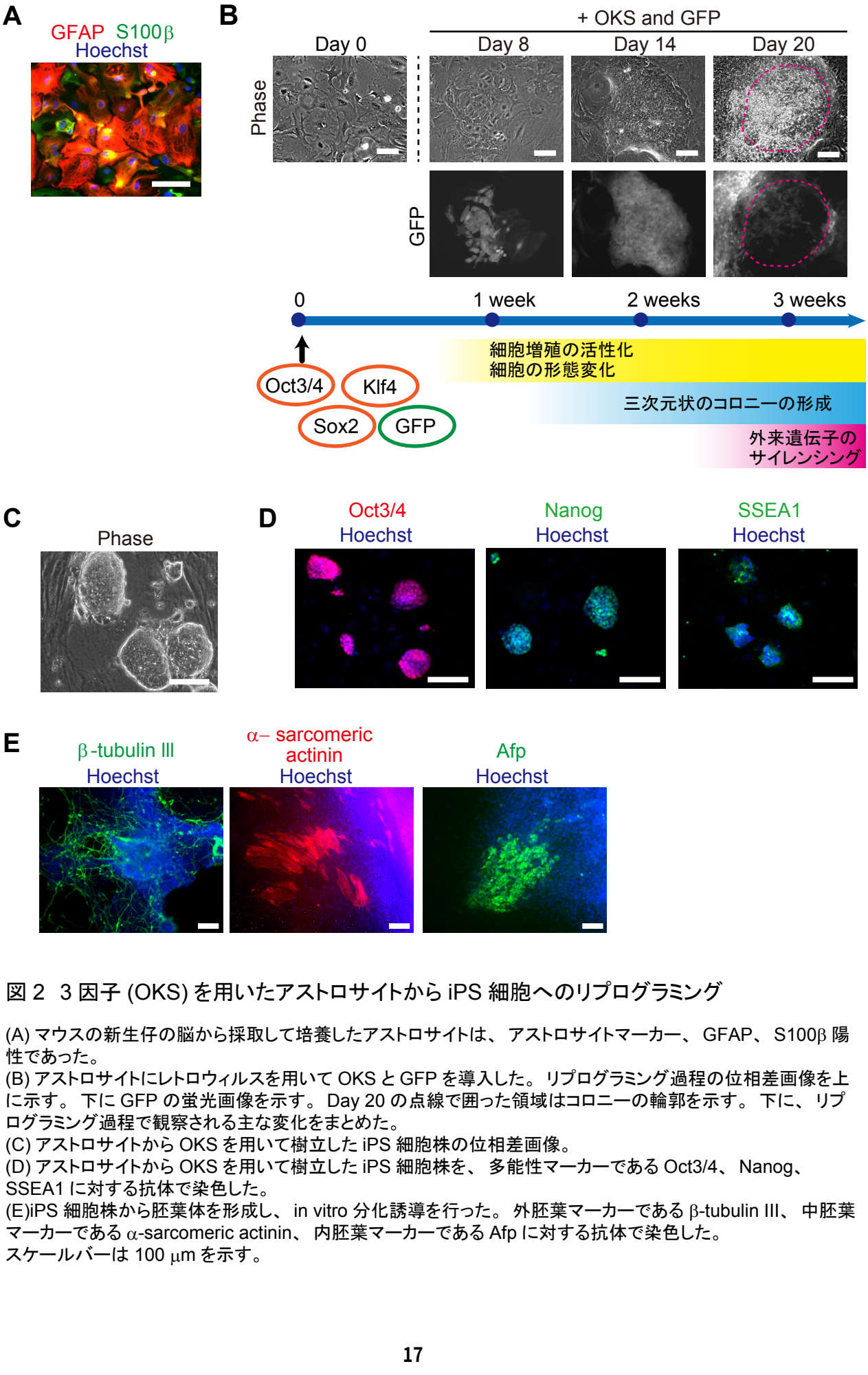


図 2　3 因子 (OKS) を用いたアストロサイトから iPS 細胞へのリプログラミング

(A) マウスの新生仔の脳から採取して培養したアストロサイトは、 アストロサイトマーカー、 GFAP、 S100β 陽性であった。
(B) アストロサイトにレトロウィルスを用いて OKS と GFP を導入した。 リプログラミング過程の位相差画像を上に示す。 下に GFP の蛍光画像を示す。 Day 20 の点線で囲った領域はコロニーの輪郭を示す。 下に、 リプログラミング過程で観察される主な変化をまとめた。
(C) アストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株の位相差画像。
(D) アストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株を、 多能性マーカーである Oct3/4、 Nanog、 SSEA1 に対する抗体で染色した。
(E)iPS 細胞株から胚葉体を形成し、 in vitro 分化誘導を行った。 外胚葉マーカーである β-tubulin III、 中胚葉マーカーである α-sarcomeric actinin、 内胚葉マーカーである Afp に対する抗体で染色した。
スケールバーは 100 μm を示す。

ーカー遺伝子である Oct3/4、Nanog、SSEA1 を発現していた(図 2D)。さらに、胚葉体形成による in vitro 分化誘導を行い、外胚葉マーカーであるβ-tubulin III、中胚葉マーカーであるα-sarcomeric actinin、内胚葉マーカーである Afp の発現が観察されたことから、この iPS 細胞株が分化多能性を持つことが示された (図 2E)。

アストロサイトから 2 因子（OK）を用いて iPS 細胞を作製した

神経幹細胞は内在性の Sox2 を高く発現しているため、神経幹細胞から iPS 細胞を誘導する場合は、リプログラミング因子として Sox2 を導入する必要がないことがこれまでに報告されていた(Eminli et al., 2008; Kim et al., 2008; Shi et al., 2008)。アストロサイトにおいて、ある程度の Sox2 の発現が見られたことから(図 3A)、Sox2 を除いた Oct3/4 と Klf4 の 2 因子(OK)を用いて、アストロサイトから iPS 細胞が誘導できるのではないかと考えた。アストロサイトに OK を導入した結果、アルカリフォスファターゼ(AP)陽性の iPS 細胞コロニーが形成された(図 3B)。しかしながら、iPS 細胞コロニー数は、OKS を用いた場合と比較して少なかった。アストロサイトから OK を用いて樹立した iPS 細胞株は、OKS を用いて樹立した iPS 細胞株と同様、ES 細胞に非常によく似た形態を示し(図 3C)、多能性マーカー遺伝子である Oct3/4、Nanog、SSEA1 を発現していた(図 3D)。さらに、胚葉体形成による in vitro 分化誘導を行ったところ、この iPS 細胞株が三胚葉への分化能を有することが示された(図 3E)。

アストロサイトのリプログラミング過程において、神経幹細胞特異的な転写因子 Sox1 が一過的に発現する

アストロサイトが iPS 細胞へとリプログラミングされる際に神経幹細胞様状態を経由するのかどうかを調べるために、神経幹細胞特異的な転写因子である Sox1 に着目

図 3

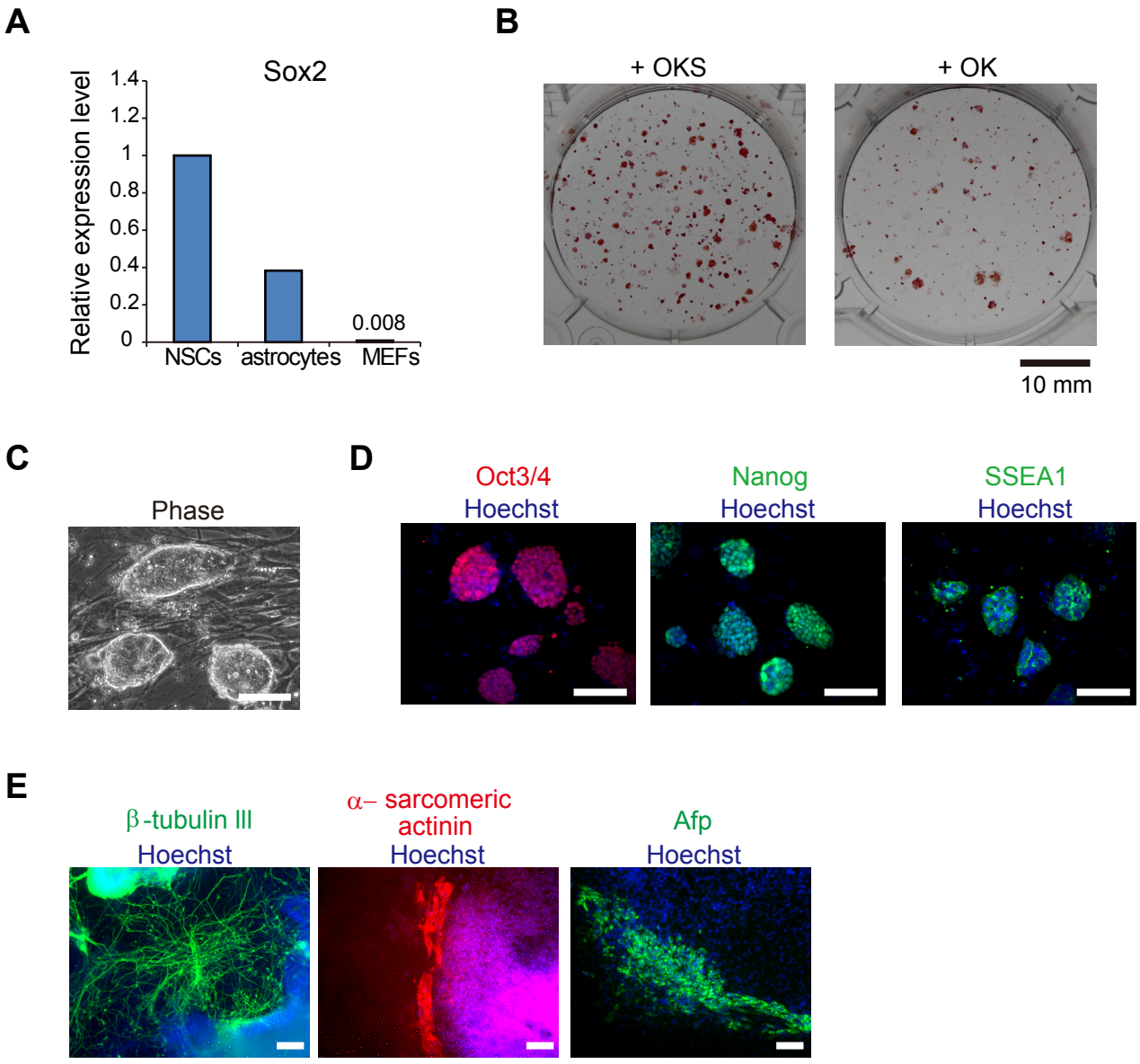


図 3　2 因子 (OK) を用いたアストロサイトから iPS 細胞へのリプログラミング

(A) 神経幹細胞（NSCs）、アストロサイト、 MEF における Sox2 の発現量を定量的 RT-PCR で調べた。
(B) アストロサイトに OKS または OK を導入し、24 日目に固定し、アルカリフォスファターゼ (AP) 染色を行った。
(C) アストロサイトから OK を用いて樹立した iPS 細胞株の位相差画像。
(D) アストロサイトから OK を用いて樹立した iPS 細胞株を、 多能性マーカーである Oct3/4、 Nanog、 SSEA1 に対する抗体で染色した。
(E)iPS 細胞株から胚葉体を形成し、in vitro 分化誘導を行った。 外胚葉マーカーである β-tubulin III、中胚葉マーカーである α-sarcomeric actinin、 内胚葉マーカーである Afp に対する抗体で染色した。
スケールバーは 100 μm を示す。

した。Sox1 は、Sox2 と Sox3 と共に SoxB1 ファミリーを形成し、SoxB1 転写因子は神経幹細胞の維持に重要の役割を果たすことが知られている(Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003)。Sox2 が様々な組織の幹細胞に(Sarkar and Hochedlinger, 2013)、Sox3 が生殖腺においても発現しているのに対し(Raverot et al., 2005)、Sox1 は神経幹細胞にのみ発現する。胚発生において、Sox1 はまず神経板に発現し、その後神経上皮細胞（＝神経幹細胞）に発現する。そして、ニューロンやグリア細胞への分化が進行するに従い、Sox1 の発現は減少する(Pevny et al., 1998; Wood and Episkopou, 1999)。また、in vitro にて、ES 細胞をニューロンやグリア細胞に分化させると、神経幹細胞の段階で Sox1 が一過的に発現することが報告されている(Ying et al., 2003)。

アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 の発現を免疫染色により調べた。同時に、E-cadherin に対する抗体を用いて免疫染色を行った。E-cadherin はリプログラミング過程で発現が上昇し、iPS 細胞コロニーの形成に重要であることが知られているため、E-cadherin の発現はリプログラミングが進行している細胞の指標となる(Chen et al., 2010; Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010)。リプログラミング誘導前のアストロサイトは Sox1 と E-cadherin を発現していなかった(図 4A、Day 0)。リプログラミング因子を導入せずに、LIF を含んだ ES 細胞用培地で培養したコントロールの細胞では、Sox1 の発現はほとんど見られなかった(図 4A、コントロール)。一方で、OKS を用いてリプログラミングを誘導した細胞では、リプログラミング過程において Sox1 が一過的に発現した（図 4B)。リプログラミング誘導 12 日目には、細胞増殖が活発に起きている細胞において、Sox1 の発現が上昇した(図 4B、Day 12)。16 日目には、E-cadherin 陽性のコロニーにおいて、Sox1 の強い発現が見られた(図 4B、Day 16 と図 4C)。18 日目には、E-cadherin 陽性の大きなコロニーにおいて、Sox1 の発現が減少した(図 4B、Day 18)。アストロサイトから OKS を用い

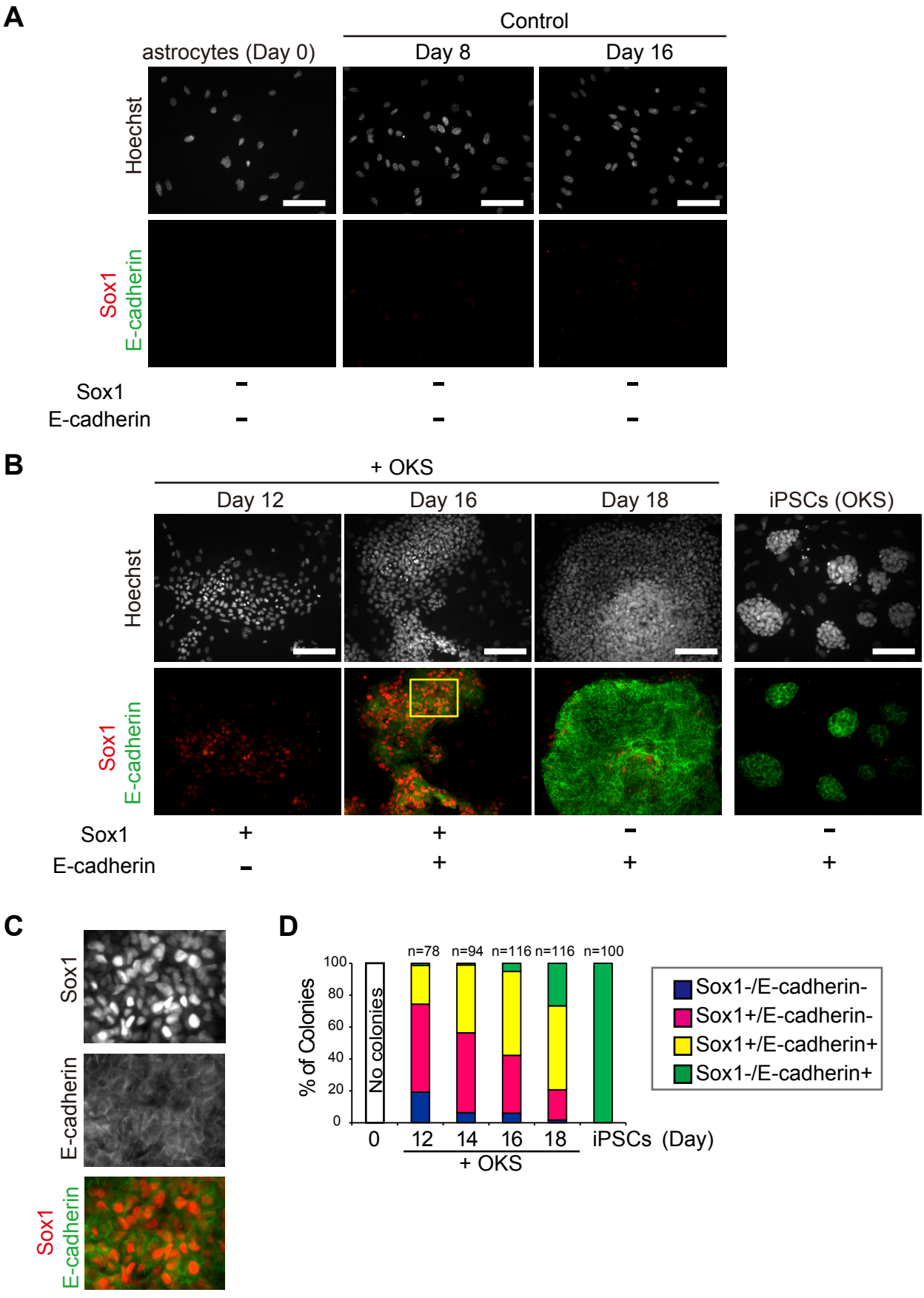


図 4　アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 の一過的な発現上昇

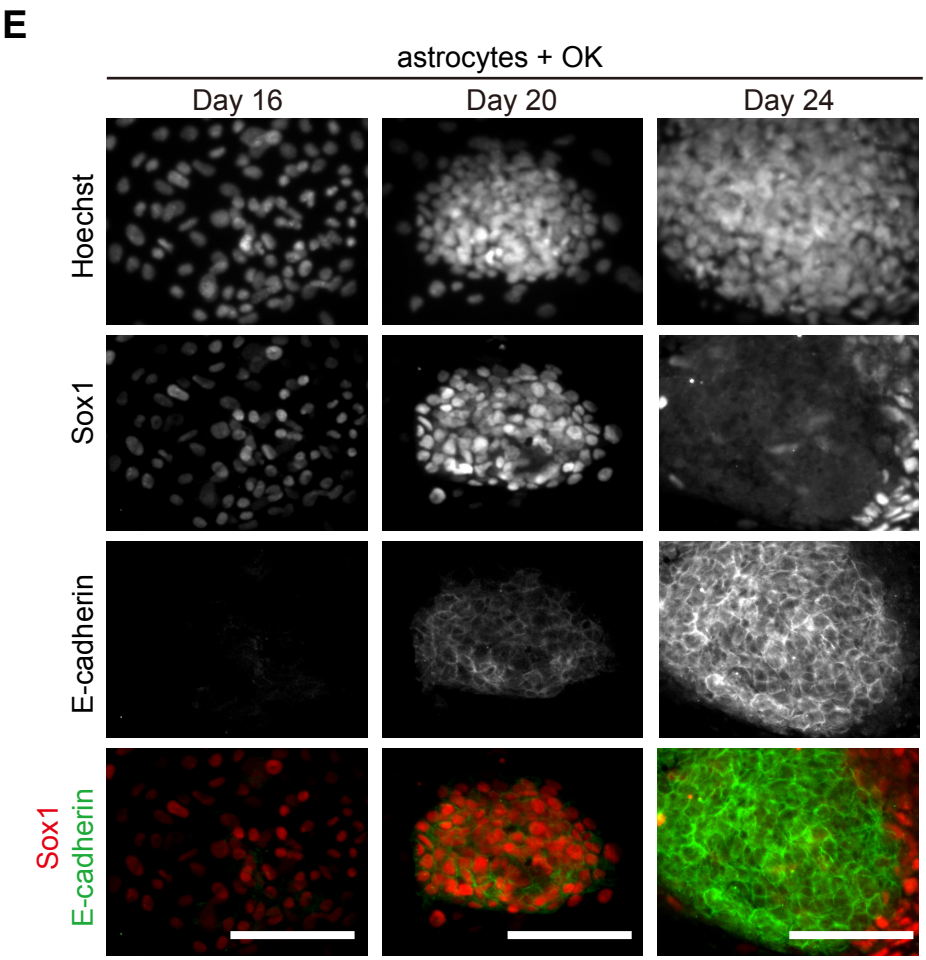


図 4　アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 の一過的な発現上昇

(A) リプログラミング因子を導入していないアストロサイト (コントロール) を ES 細胞用培地で培養し、Sox1(赤) と E-cadherin(緑) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。
(B)OKS を導入したアストロサイトと、 アストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株を Sox1(赤) と E-cadherin(緑) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。
(C)(B) の Day 16 の黄線で囲った領域の拡大図を示す。
(D) 核が密集している部分をコロニーと定義し、 Sox1 と E-cadherin の発現の有無で 4 つのグループに分け、コロニー数を定量した。
(E)OK を導入したアストロサイトを Sox1(赤) と E-cadherin(緑) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。
スケールバーは 100 μm を示す。

て樹立された iPS 細胞株においては、Sox1 は全く発現していなかった(図 4B、iPSCs)。細胞増殖が活発になり核が密集している部分をコロニーと定義し、Sox1 と E-cadherin の発現の有無で 4 つのグループに分け、コロニー数を定量した(図 4D)。その結果、コロニーにおいて、まず Sox1 の発現が上昇し、続いて E-cadherin の発現が上昇し、最終的には Sox1 の発現が低下することが示された。さらに、OK を用いたアストロサイトのリプログラミング過程においても、Sox1 が一過的に発現することがわかった(図 4E)。OK を用いた場合、Sox1 の発現がピークに達するのはリプログラミング誘導から約 20 日であり、OKS を用いた場合よりも少し遅かった。以上の結果から、アストロサイトのリプログラミング過程において Sox1 の発現が一過的に上昇することが示された。

<u>アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 の一過的な発現上昇は転写レベルで制御されている</u>

次に、アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 の一過的な発現上昇が転写レベルで制御されているのかについて検証した。そこで、Sox1 の発現のレポーターとして、*Sox1*-GFP マウスを用いた(Aubert et al., 2003)。*Sox1*-GFP マウスは、Sox1 の open reading frame (ORF)に EGFP がノックインされた *Sox1*+/-マウスである(図 5A)。*Sox1*-GFP マウスからアストロサイトを採取したところ、*Sox1*-GFP 陽性細胞と *Sox1*-GFP 陰性細胞が存在していた(図 5B)。*Sox1*-GFP 陰性細胞は *Sox1*-GFP 陽性細胞よりもアストロサイトのマーカー遺伝子である GFAP を高く発現していた(図 5C)。*Sox1*-GFP 陽性細胞を FACS セルソーターにより分取し、さらに 20 日間培養した結果、約半分の細胞が *Sox1*-GFP 陰性となった(図 5D)。以上の結果は、*Sox1*-GFP 陰性細胞がより成熟したアストロサイトであることを示唆している。以降の実験では、まず *Sox1*-GFP 陰性のアストロサイトを採取し、二日後にリプログラミ

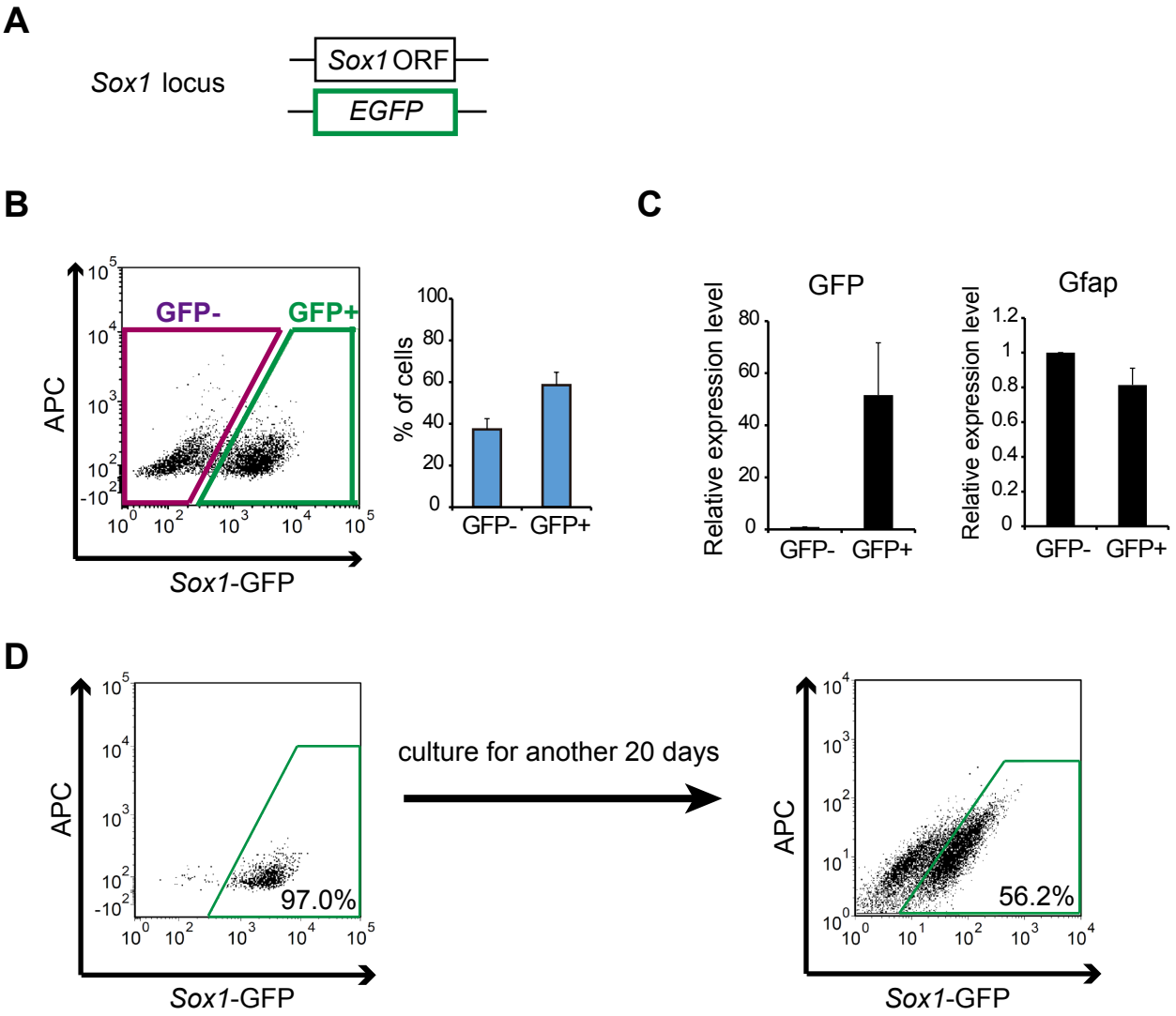


図 5　*Sox1*-GFP マウス由来のアストロサイト

(A)*Sox1*-GFP マウスは、 Sox1 の open reading frame (ORF) に EGFP がノックインされた *Sox1*+/- マウスである。
(B)*Sox1*-GFP の発現の FACS プロット図。 GFP 陽性の領域を緑、 GFP 陰性の領域を紫で示す。 *Sox1*-GFP マウス由来のアストロサイトは *Sox1*-GFP 陽性細胞と *Sox1*-GFP 陰性細胞を含んでいた。右にその割合を示す。 5 回の実験の平均値を示す。 エラーバーは標準偏差を示す。
(C)*Sox1*-GFP 陰性細胞と *Sox1*-GFP 陽性細胞における GFP と GFAP の発現量を定量的 RT-PCR で調べた。 3 回の実験の平均値を示す。
(D)*Sox1*-GFP 陽性細胞を FACS セルソーターにより分取し、 さらに 20 日間培養した結果、 約半分の細胞が *Sox1*-GFP 陰性となった。 *Sox1*-GFP の発現の FACS プロット図を示す。
APC は自家蛍光を示す。

ング因子あるいは mCherry を細胞に導入した。mCherry はレトロウィルスが感染した細胞の指標として用い、mCherry 陽性細胞における *Sox1*-GFP 陽性細胞の割合を計測した(図 6A)。*Sox1*-GFP 陰性アストロサイトに OKSM を導入した場合、6 日後には 10%弱の細胞が *Sox1*-GFP 陽性となった（図 6B、C、D)。OKS を導入した場合は、18 日後に 10%程度の細胞が *Sox1*-GFP 陽性となった。*Sox1*-GFP 陰性アストロサイトに mCherry のみを導入したコントロールの細胞を 18 日間、ES 細胞用の培地で培養した場合は、*Sox1*-GFP 陽性細胞はほとんど出現しなかった(図 6E)。さらに、GFP に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、*Sox1*-GFP 陽性細胞は比較的大きなコロニーにのみ存在し、小さいコロニーには存在しないことがわかった(図 6F)。この結果は、細胞増殖能の上昇が Sox1 の発現上昇の前に起こることを示唆している。さらに、*Sox1*-GFP 陽性細胞を含むコロニーの数と割合がリプログラミングの進行に伴い増加した（図 6G)。*Sox1*-GFP マウス由来のアストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株では、*Sox1*-GFP の発現は見られなかった(図 6H)。以上の結果から、Sox1 の発現上昇は転写レベルで制御されており、Sox1 がアストロサイトのリプログラミング中間期のマーカーであることが示された。

<u>Oct3/4 と Sox2 の単独発現は Sox1 の発現をわずかに誘導する</u>

アストロサイトに OKSM、OKS、OK の組み合わせで導入することにより、Sox1 の発現が上昇することが示された。そこで、アストロサイトにリプログラミング因子を単独で導入した場合に、Sox1 の発現上昇が生じるのかどうか調べた。図 6 の実験と同様、まず *Sox1*-GFP 陰性アストロサイトをセルソーターにより採取し、空ベクター（コントロール)、Oct3/4、Klf4、Sox2 をそれぞれ単独で導入し、16 日から 18 日後に FACS 解析を行った。その結果、Oct3/4 または Sox2 を単独で導入した場合に、*Sox1*-GFP 陽性細胞がわずかに出現することがわかった(図 7A)。しかし、その割合は、

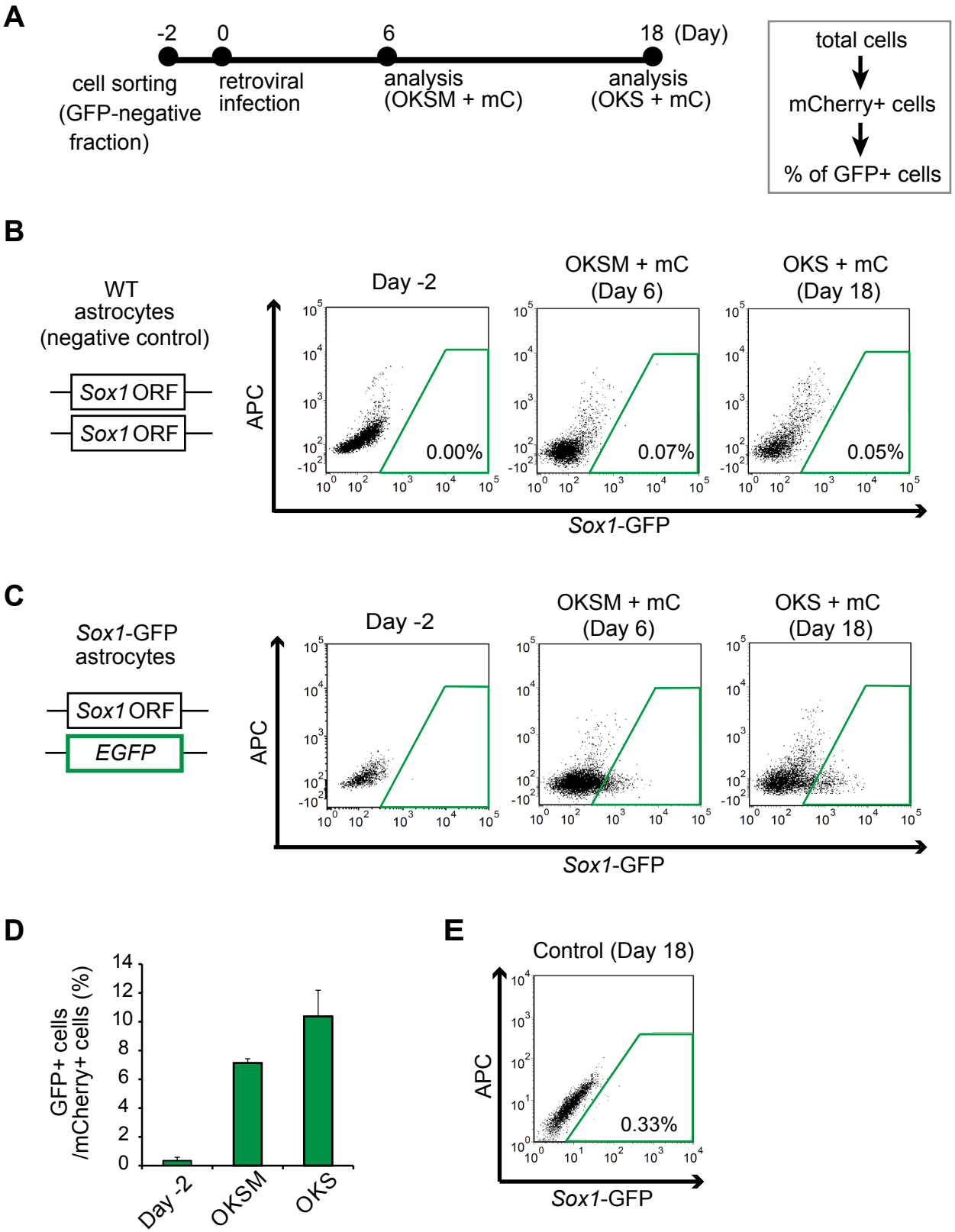


図 6 アストロサイトのリプログラミング過程における *Sox1*−GFP の発現解析

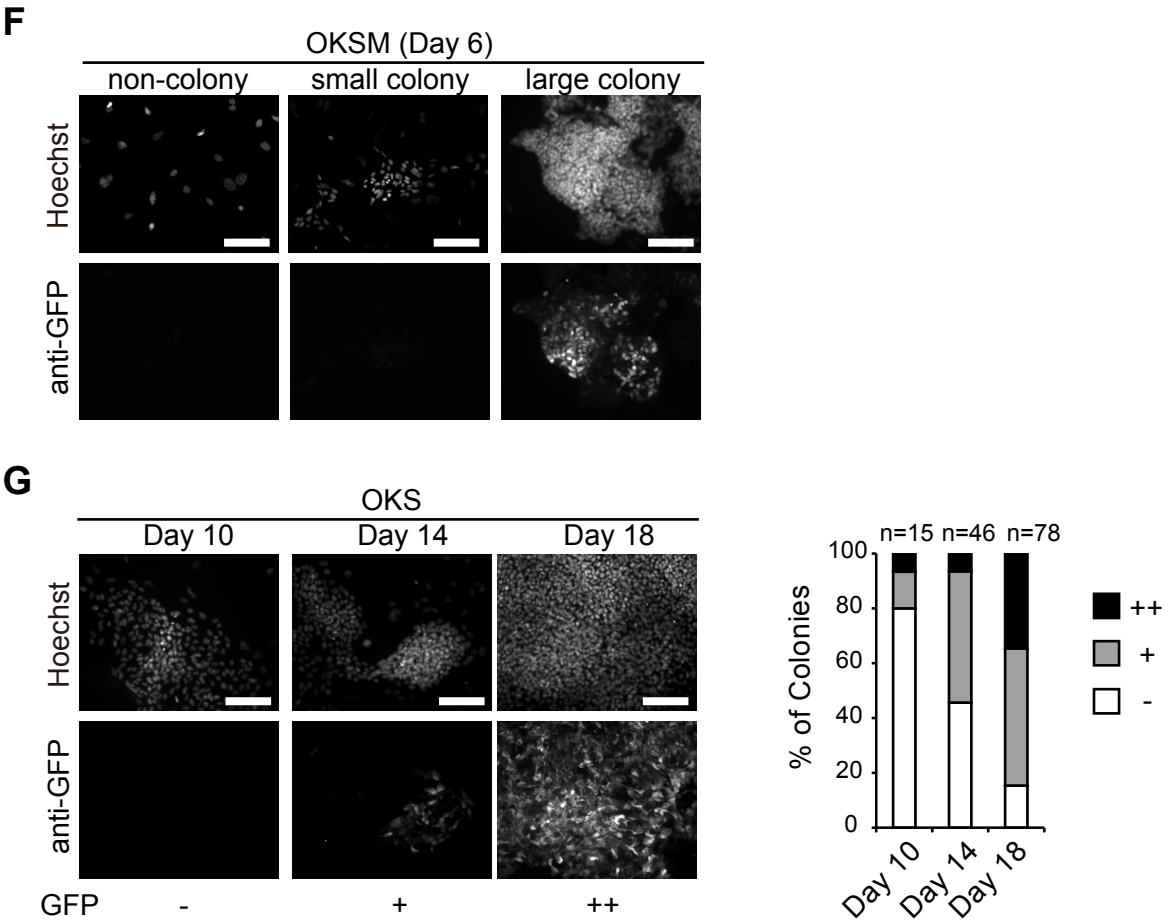


図 6 アストロサイトのリプログラミング過程における *Sox1*−GFP の発現解析

(A) 実験のスキームを示す。 *Sox1*-GFP 陰性のアストロサイトを採取し、 二日後にリプログラミング因子あるいは mCherry を細胞に導入した。 mCherry 陽性細胞における *Sox1*-GFP 陽性細胞の割合を FACS により解析した。 mC は mCherry を指す。
(B) 野生型マウス由来のアストロサイトを FACS のネガティブコントロールとして用いた。 *Sox1*-GFP 陽性の領域を緑色で示す。
(C)OKSM あるいは OKS に導入により、 *Sox1*-GFP 陽性細胞が出現した。
(D)(C) の *Sox1*-GFP 陽性細胞の割合を示す。 Day -2 と OKSM については 4 回、 OKS については 3 回の平均値を示す。 エラーバーは標準偏差を示す。
(E) リプログラミング因子を導入していない *Sox1*-GFP 陰性のアストロサイトを 18 日間培養して、 FACS 解析を行った。
(F)*Sox1*-GFP 陰性アストロサイトに OKSM を導入して 6 日後に細胞を固定し、 GFP に対する抗体で免疫染色を行った。 *Sox1*-GFP の蛍光強度が弱いため、GFP 抗体を用いてシグナルを増幅した。 コロニーでない部分、小さなコロニー、 大きなコロニーの代表例を示す。
(G)*Sox1*-GFP 陰性アストロサイトに OKS を導入して、 10 日後、 14 日後、 18 日後の細胞を GFP に対する抗体で免疫染色した。 GFP の強度を三段階に分類し、 定量した結果を右側に示す。
(H)*Sox1*-GFP マウス由来のアストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株を GFP と Nanog に対する抗体を用いて免疫染色した。
スケールバーは 100 μm を示す。

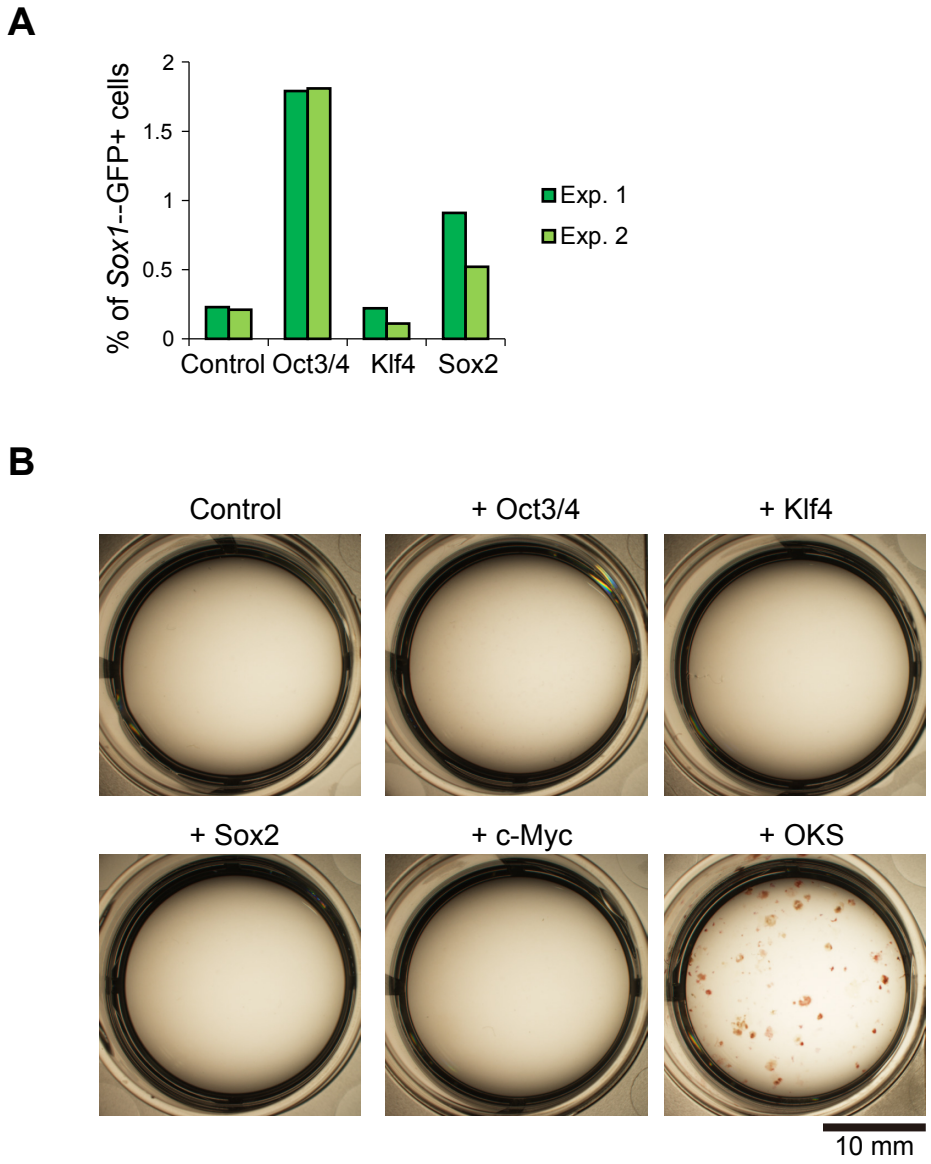


図 7 単独因子による Sox1 の発現変化とリプログラミングへの影響

(A)*Sox1*-GFP 陰性アストロサイトに空ベクター（コントロール）、Oct3/4、Klf4、Sox2 をそれぞれ単独で導入し、16 日から 18 日後に FACS 解析を行った。 2 回の実験の結果を示す。
(B) 空ベクター（コントロール）、 Oct3/4、 Klf4、 Sox2、 c-Myc をそれぞれ単独で導入し、 OKS の組み合わせで導入した場合と比較した。 因子を導入してから 21 日後に細胞を固定し、 AP 染色を行った。

図 6D で見られた OKSM あるいは OKS 導入時における *Sox1*-GFP 陽性細胞の割合と比較して、低いものであった。さらに、単独因子の導入が iPS 細胞へのリプログラミングを誘導できるかについて調べた。リプログラミング誘導を開始して 3 週間後、OKS を導入した場合は多数の AP 陽性 iPS 細胞コロニーが形成されたのに対し、どのリプログラミング因子も単独では iPS 細胞コロニーを形成することができなかった(図 7B)。以上の結果から、Oct3/4 あるいは Sox2 は、Sox1 の発現をわずかに上昇させることが可能だが、多能性状態へと誘導することはできないということが示された。

アストロサイトのリプログラミング過程で Sox1 陽性となった細胞が iPS 細胞へと変化する

アストロサイトのリプログラミング過程で Sox1 の発現が一過的に上昇すること、E-cadherin 陽性のコロニーで Sox1 が発現することをこれまでに明らかにした。しかしながら、E-cadherin 陽性のコロニーの全てが iPS 細胞コロニーになるわけではない。Sox1 陽性細胞を含むコロニーが本当に iPS 細胞コロニーになるのかを調べるために、Sox1 と多能性マーカー遺伝子である Nanog の発現について免疫染色を用いて解析した。リプログラミング誘導を開始して 2 週間後、少数の Nanog 陽性細胞が Sox1 陽性コロニーの中に出現した(図 8A、左)。さらに時間が経過すると、コロニーにおける Nanog 陽性細胞の割合が増加し、Sox1 陽性細胞の割合が減少した(図 8A、中央の 2 つのパネル)。誘導開始から 3 週間後には、Nanog 陽性細胞のみを含むコロニーが多数観察された(図 8A、右)。さらに、単一細胞レベルで解析した結果、Nanog の強い発現と Sox1 の強い発現は排他的であった(図 8B)。また、Nanog と Sox1 の両方を弱く発現する細胞があることを見出した。以上の結果は、Sox1 陽性細胞が Nanog 陽性細胞へと変化することを示唆するものである。

次に、*Sox1*-GFP マウス由来のアストロサイトを用いて、リプログラミング過程で

図 8

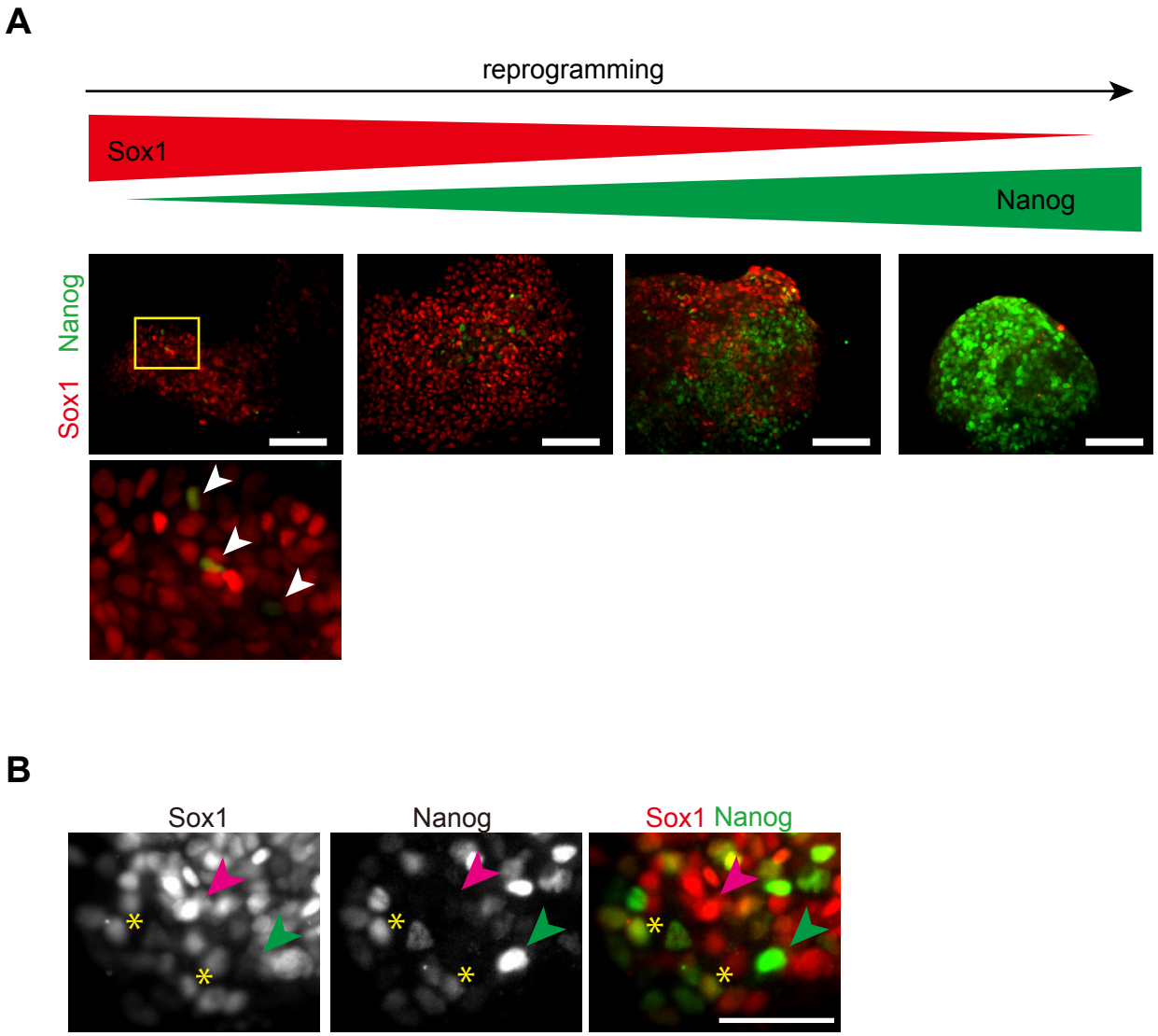


図 8 アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 と Nanog の発現解析

(A)OKS を用いたリプログラミング過程の細胞を固定し、Sox1(赤) と Nanog(緑) に対する抗体で免疫染色した。右側のパネルほどリプログラミングが進んだ細胞を示す。 左のパネルの黄線で囲った領域の拡大図を下に示す。白い矢頭は Nanog 陽性細胞を示す。 スケールバーは 100 μm を示す。
(B)Sox1(赤) と Nanog(緑) に対する免疫染色。 緑の矢頭は Nanog を強く発現する細胞を示す。 マゼンダの矢頭は Sox1 を強く発現する細胞を示す。 黄色のアスタリスクは Nanog と Sox1 の両方を弱く発現する細胞を示す。 スケールバーは 50 μm を示す。

Sox1-GFP 陽性となった細胞が iPS 細胞に変化するのか調べた。そこで、OKSM を用いてリプログラミングを誘導し、6 日後に、*Sox1*-GFP 陽性細胞と *Sox1*-GFP 陰性細胞をセルソーターにより採取し、等量の細胞をフィーダー細胞上に播種した(図 9A)。そして約 1 週間、ES 細胞用培地で培養し、iPS 細胞に変化したかどうかを AP 染色および Nanog 染色を行い検証した。その結果、*Sox1*-GFP 陰性細胞に比べて、*Sox1*-GFP 陽性細胞の方がより多くの AP 陽性コロニー、および Nanog 陽性コロニーを形成した(図 9B、C)。以上の結果から、リプログラミング過程で Sox1 陽性となった細胞が、iPS 細胞になる運命にあることが示唆された。

OKSM を導入して 6 日目に、*Sox1*-GFP 陰性であった細胞を約 1 週間、ES 細胞用培地で培養し、GFP に対する抗体で免疫染色を行った結果、形成されたコロニーのうち約半分が *Sox1*-GFP 陽性であった (図 9D)。細胞リプログラミングは確率の低い現象であり、同調性も良くないため、iPS 細胞になるまでの速さは細胞ごとに少しずつ異なる。したがって、この結果は、Sox1 の発現が上昇するタイミングが細胞によって異なるということを示している。

Sox1 は、OKSM および OKS によるアストロサイトのリプログラミングには必要ではない

次に、アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 の発現上昇が、リプログラミングの進行に必要なのかどうかについて検証した。Sox1 の発現のレポーターとして用いていたのは、Sox1 の open reading frame (ORF)に EGFP がノックインされた *Sox1*+/-マウスである。そこで、*Sox1*+/-の雄マウスと *Sox1*+/-の雌マウスを掛け合わせることにより、Sox1 ホモノックアウトマウス(*Sox1*-/-マウス)を得た(図 10A)。各遺伝子型のマウスの脳における mRNA 量を調べることにより、Sox1 がノックアウトされていることを確認した(図 10B)。*Sox1*+/-マウスと *Sox1*-/-マウス由来のアスト

図 9

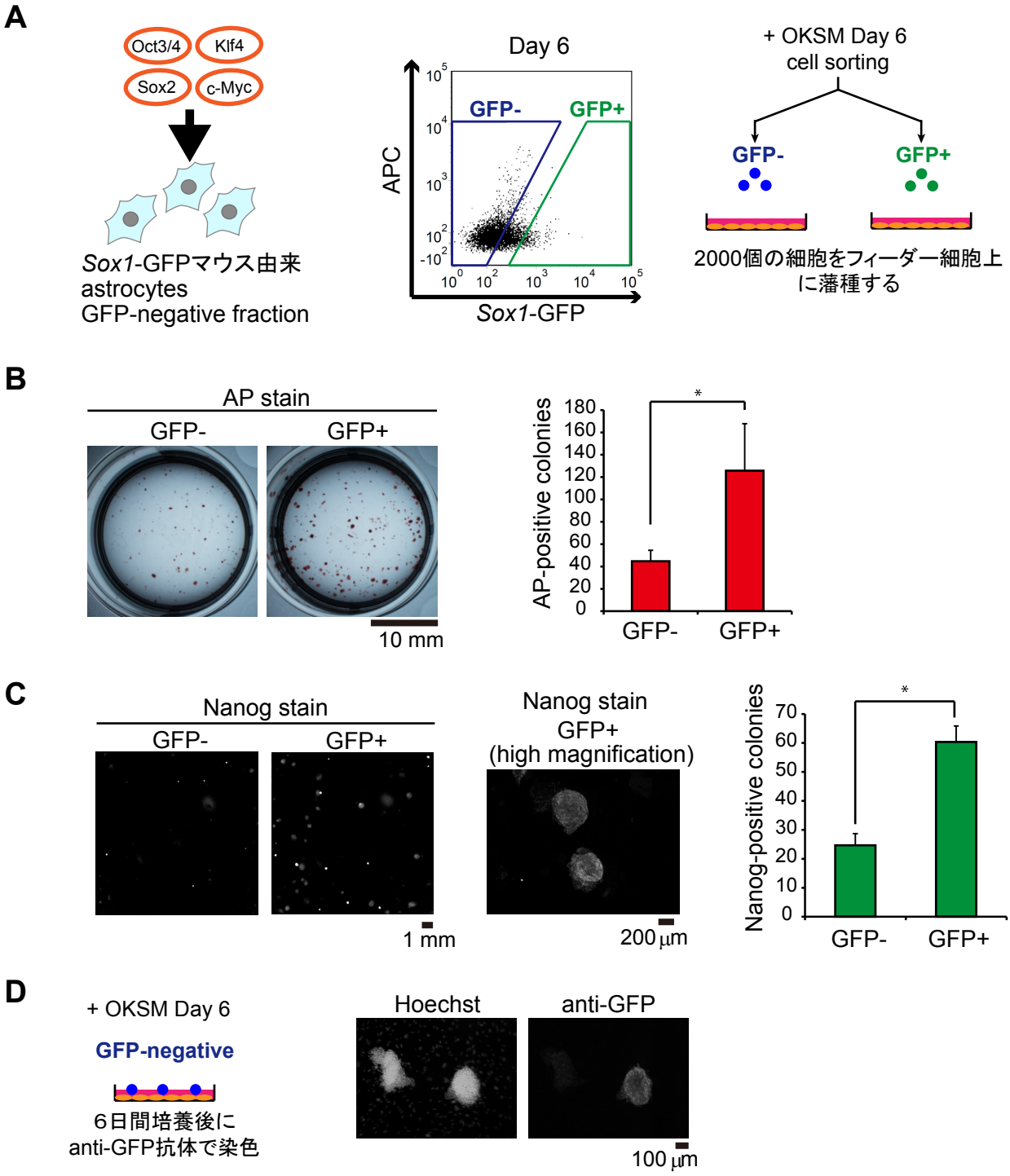


図 9 アストロサイトのリプログラミング過程の細胞の運命追跡実験

(A)*Sox1*-GFP 陰性アストロサイトに OKSM を導入して 6 日後に、FACS セルソーターを用いて *Sox1*-GFP 陽性細胞と *Sox1*-GFP 陰性細胞を採取した。それぞれ 2000 個の細胞を MEF フィーダー細胞上に播種した。ES 細胞用培地で培養し、6 日後に AP 染色、7 日後に Nanog 染色を行った。
(B)AP 染色の結果。左に well 全体の写真、右に定量結果を示す。4 回の実験の平均値を示す。
(C)Nanog 染色の結果。左に染色写真、中央に *Sox1*-GFP 陽性細胞由来の Nanog 陽性コロニーの拡大図を示す。右に定量結果を示す。3 回の実験の平均値を示す。
(B) と (C) のグラフについて、エラーバーは標準偏差を示す。対応のある t 検定を行い、* は p 値が 0.05 より小さいことを示す。
(D) OKSM を導入して 6 日目に *Sox1*-GFP 陰性であった細胞をさらに 6 日間培養し、固定後、GFP に対する抗体で染色した。2 個のコロニーのうち、右側のコロニーが GFP 陽性であった。

ロサイトを採取し、OKSM あるいは OKS を導入してリプログラミング効率を比較した。その結果、Sox1 のノックアウトはリプログラミング効率に影響を与えないことが示された(図 10C、D)。さらに、*Sox1*-/-マウス由来のアストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株は、Nanog 、Oct3/4、 SSEA1、 E-cadherin を発現しており、Sox1 がなくても正常な iPS 細胞が誘導できることが示された(図 10E)。

Sox1 は OK によるアストロサイトのリプログラミングに必要である

さらに、*Sox1*+/+マウス、*Sox1*+/-マウス、*Sox1*-/-マウス由来のアストロサイトに OK を導入してリプログラミング効率を比較した。その結果、Sox1 の発現量の減少に伴って、AP 陽性コロニーの数および Nanog 陽性コロニーの数が減少することを見出した(図 10F)。Sox1 ノックアウトのアストロサイトでは、iPS 細胞コロニーがほとんど形成されなかった。以上の結果から、OK によるアストロサイトのリプログラミングには Sox1 の発現上昇が必要であることが示された。胚発生において、Sox1、Sox2、Sox3 はリダンダントに機能することが知られている(Graham et al., 2003)。したがって、リプログラミング因子として Sox2 を導入しない場合は、Sox1 が代わりに機能し、リプログラミングを促進すると考えられる。

アストロサイトのリプログラミング過程における神経幹細胞特異的遺伝子の発現

ここまでは、神経幹細胞特異的な転写因子 Sox1 に着目して実験を行った。そこで、Sox1 以外の神経幹細胞マーカー遺伝子の発現について解析を行った。用いたサンプルは、①リプログラミング誘導前のアストロサイト(*Sox1*-GFP 陰性アストロサイト、図 6 参照)、②OKSM を導入して、リプログラミング過程で *Sox1*-GFP 陽性となった細胞、③*Sox1*-GFP マウス由来の神経幹細胞、④*Sox1*-GFP マウス由来アストロサイトから樹立した iPS 細胞株(iPSCs-A)、⑤MEF から樹立した iPS 細胞株 (iPSCs-M)

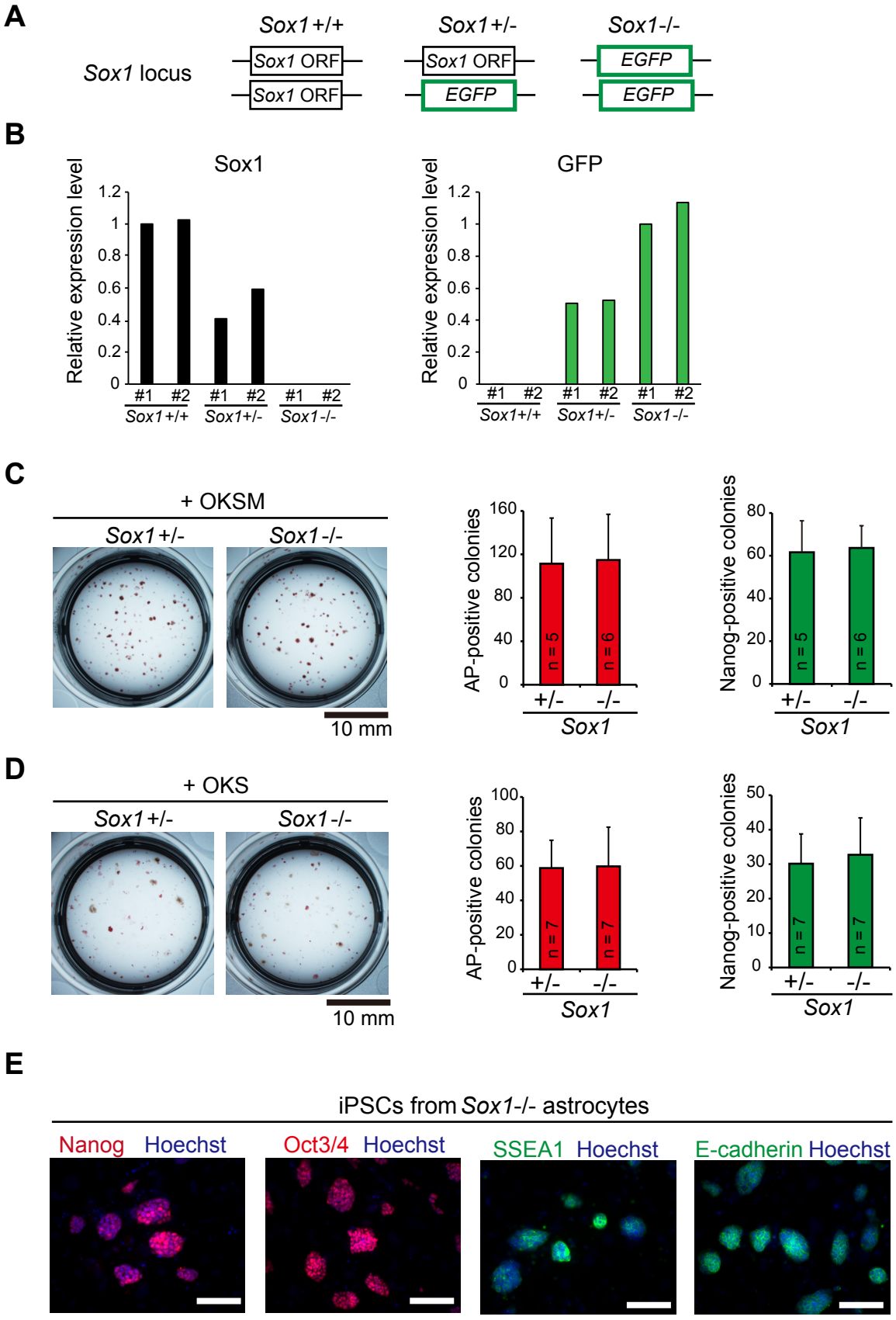


図 10 Sox1 のノックアウトがアストロサイトのリプログラミングに与える影響

F

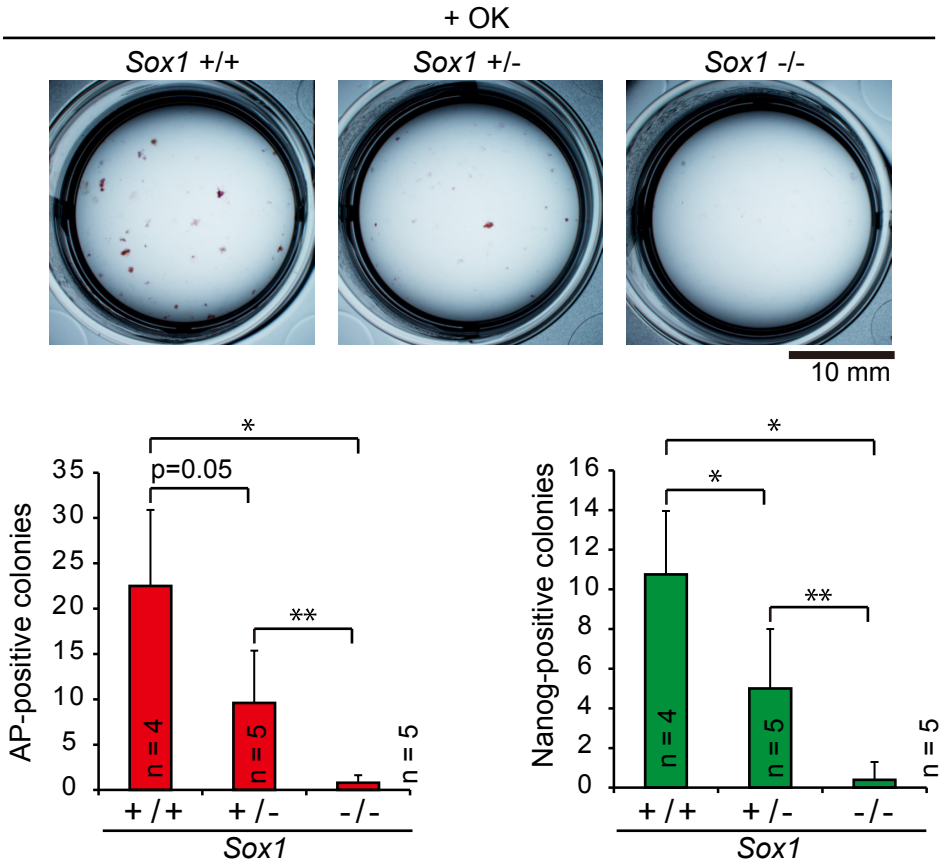


図 10 Sox1 のノックアウトがアストロサイトのリプログラミングに与える影響

(A)*Sox1*+/+、 *Sox1*+/-、 *Sox1*-/- マウスにおける Sox1 の遺伝子座の模式図。
(B) マウスの脳における Sox1 と GFP の発現量を定量的 RT-PCR で調べた。 各遺伝子型につき 2 個体 (#1、#2) を使用した。
(C、D、 F) における n はアストロサイトの培養に用いたマウスの個体数を示す。 グラフのエラーバーは標準偏差を示す。
(C)*Sox1*+/- マウス、 *Sox1*-/- マウス由来のアストロサイトに OKSM を導入し、 AP 染色と Nanog 染色を行い、コロニー数を定量した。
(D)*Sox1*+/- マウス、 *Sox1*-/- マウス由来のアストロサイトに OKS を導入し、 AP 染色と Nanog 染色を行い、コロニー数を定量した。
(E)*Sox1*-/- マウス由来のアストロサイトに OKS を導入して樹立した iPS 細胞株を多能性マーカー遺伝子 (Nanog、Oct3/4、SSEA1、E-cadherin) に対する抗体を用いて免疫染色した。 スケールバーは 100 μm を示す。
(F)*Sox1*+/- マウス、 *Sox1*+/- マウス、 *Sox1*-/- マウス由来のアストロサイトに OK を導入し、 AP 染色と Nanog 染色を行い、コロニー数を定量した。 マン・ホイットニーの U 検定を行い、＊は p 値が 0.05 より小さいこと、＊＊は p 値が 0.01 より小さいことを示す。

の 5 つである(図 11A)。リプログラミング過程の細胞における *Sox1*-GFP および Sox1 の発現レベルは神経幹細胞における発現レベルと同等であった(図 11B、*Sox1*-GFP、Sox1)。また、神経幹細胞の自己複製と分化に重要な役割を果たすポリコーム遺伝子、Bmi1(Molofsky et al., 2003)の発現も Sox1 と同様に、リプログラミング過程で一過的に上昇することを見出した(図 11B、Bmi1)。さらに、OKS を用いたアストロサイトのリプログラミング過程においても Bmi1 の発現が一過的に上昇することがわかった(図 11C、D、E)。中間径フィラメントタンパク質である Nestin は神経幹細胞のマーカー遺伝子として広く用いられている。しかしながら、アストロサイトを脳から採取し、*in vitro* で培養した場合は、アストロサイトにおいても Nestin が発現することが報告されていた(Imura et al., 2006)。今回用いたアストロサイトにおいても、神経幹細胞と同程度の高い Nestin の発現が観察された(図 11B、Nestin)。そして、リプログラミング過程においては、iPS 細胞と同程度まで発現が減少した。リプログラミング過程の細胞において、Sox1 や Bmi1 が発現する一方で、Nestin は発現しなかったことから、リプログラミング過程の細胞が神経幹細胞と同一ではなく、アストロサイトのリプログラミング過程が、神経発生過程の単純な逆戻りではないことが示唆された。

<u>アストロサイトのリプログラミングの初期から中期にかけて Sox1 の発現が上昇する</u>

アストロサイトのリプログラミング過程における遺伝子発現プロファイルを、より詳細に解析するため、マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。用いたサンプルは先述の 5 サンプルである。細胞リプログラミングは、2-3 週間程度を要する非常に時間のかかる過程であり、体細胞はいくつもの段階を経て iPS 細胞に至ると言われている。MEF を用いてリプログラミング過程の遺伝子発現変化を網羅的に解析した先行研究では、リプログラミングの過程を初期、中期、後期の三つのステ

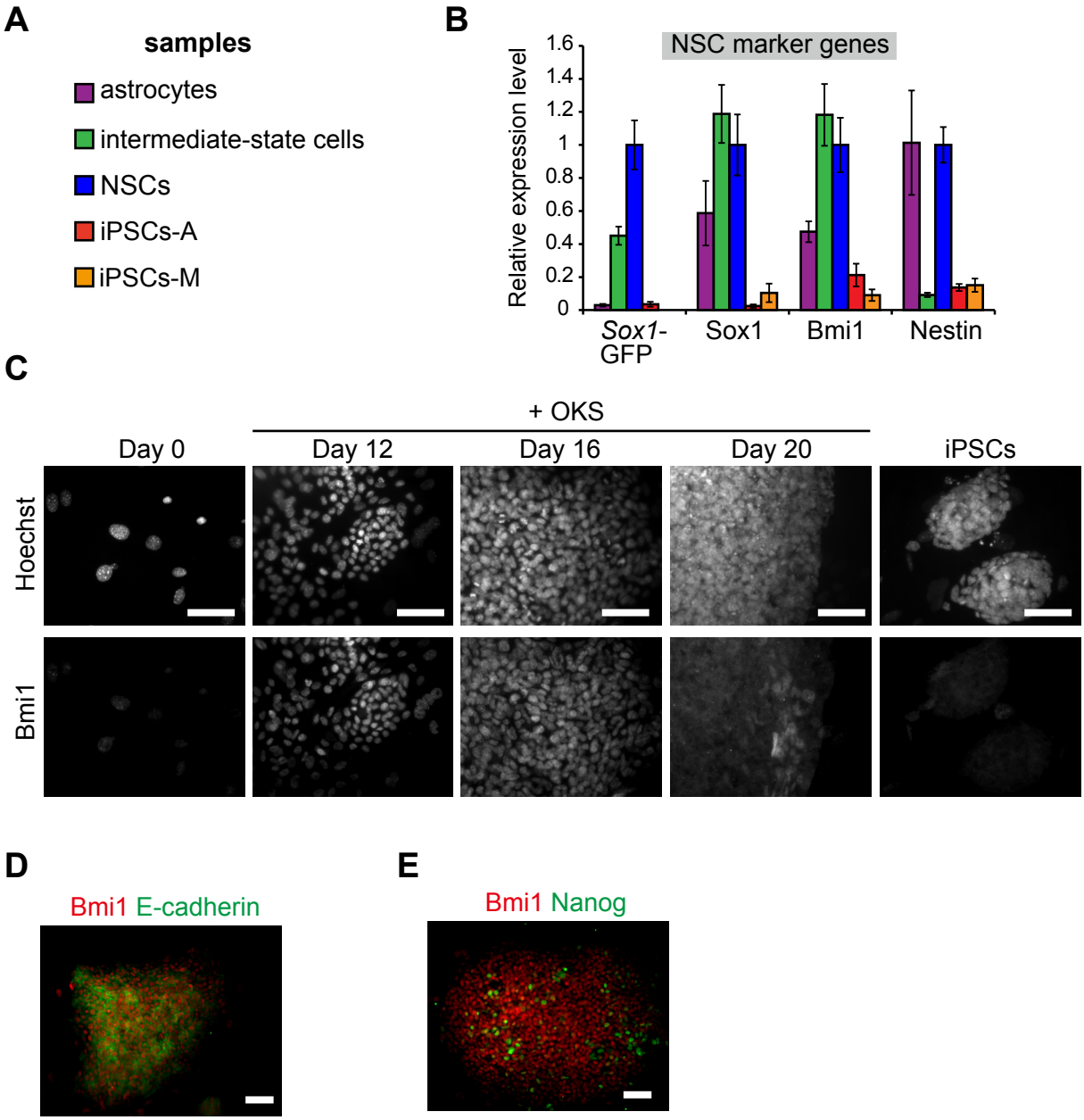


図 11 アストロサイトのリプログラミング過程における神経幹細胞特異的遺伝子の発現

(A) 定量的 RT-PCR とマイクロアレイ解析に用いた 5 つのサンプル。 astrocytes; *Sox1*-GFP 陰性のアストロサイト。 intermediate-state cells; OKSM を用いてリプログラミングを誘導し、 6 日後に *Sox1*-GFP 陽性となった細胞。 NSCs; *Sox1*-GFP マウス由来の神経幹細胞。 iPSCs-A; *Sox1*-GFP マウス由来アストロサイトから樹立した iPS 細胞株。 iPSCs-M; MEF から樹立した iPS 細胞株 (iPS-MEF-Ng-20D-17)。
(B) 神経幹細胞マーカー遺伝子の定量的 RT-PCR の結果。 3 回の実験の平均値を示す。 エラーバーは標準偏差を示す。
(C) アストロサイトに OKS を導入した細胞とアストロサイトから樹立した iPS 細胞株を固定し、 Bmi1 に対する抗体で免疫染色を行った。
(D) アストロサイトのリプログラミング過程の細胞を、 Bmi1 と E-cadherin に対する抗体を用いて免疫染色した。 E-cadherin 陽性コロニーにおいて Bmi1 の発現が観察された。
(E) アストロサイトのリプログラミング過程の細胞を、 Bmi1 と Nanog に対する抗体を用いて免疫染色した。 Bmi1 陽性コロニーの中に Nanog 陽性細胞が出現した。
スケールバーは 50 μm を示す。

ージに分類し、特徴となる遺伝子発現パターンを記述していた(Samavarchi-Tehrani et al., 2010)。そこで、アストロサイトのリプログラミング過程で *Sox1*-GFP 陽性となった細胞が、リプログラミングのどのステージにあたるのかを解析した。MEF のリプログラミングの初期に発現が上昇すると言われている上皮系遺伝子、Cdh1(E-cadherin)や Epcam の発現は、アストロサイトのリプログラミング過程の Sox1 陽性細胞においても発現の上昇が見られた(図 12A、early stage)。また、MEF のリプログラミングの中期から発現が上昇すると言われている多能性遺伝子、Sall4 と Nanog についても、アストロサイトのリプログラミング過程の Sox1 陽性細胞において少し発現が上昇していた (図 12A、middle stage)。一方で、MEF のリプログラミングの後期に発現が上昇すると言われている多能性遺伝子(Utf1、Dnmt3l、Lin28a、Dppa3、Dppa4)は、Sox1 陽性細胞においてほとんど発現が見られなかった(図 12A、late stage)。以上の結果から、アストロサイトのリプログラミング過程における Sox1 陽性細胞は、MEF のリプログラミング中期に相当することが示された。また、MEF のリプログラミングの初期には、繊維芽細胞特異的な遺伝子の発現が失われることが知られている。アストロサイトのリプログラミング過程の細胞において、GFAP 、Aqp4、 Aldh1l1 といったアストロサイトマーカー遺伝子の発現が顕著に落ちていたことから(図 12B)、リプログラミングの初期から中期にかけて、ドナー細胞特異的な遺伝子の発現が抑制されることは、MEF とアストロサイトのリプログラミングに共通する現象であることが示唆された。

<u>アストロサイトのリプログラミング過程の細胞の遺伝子発現プロファイルは神経細胞系譜に最も近い</u>

次に、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞が、どの細胞系譜に最も類似しているのかについて解析を行った。細胞系譜特異的な遺伝子群は、多能性幹細胞に

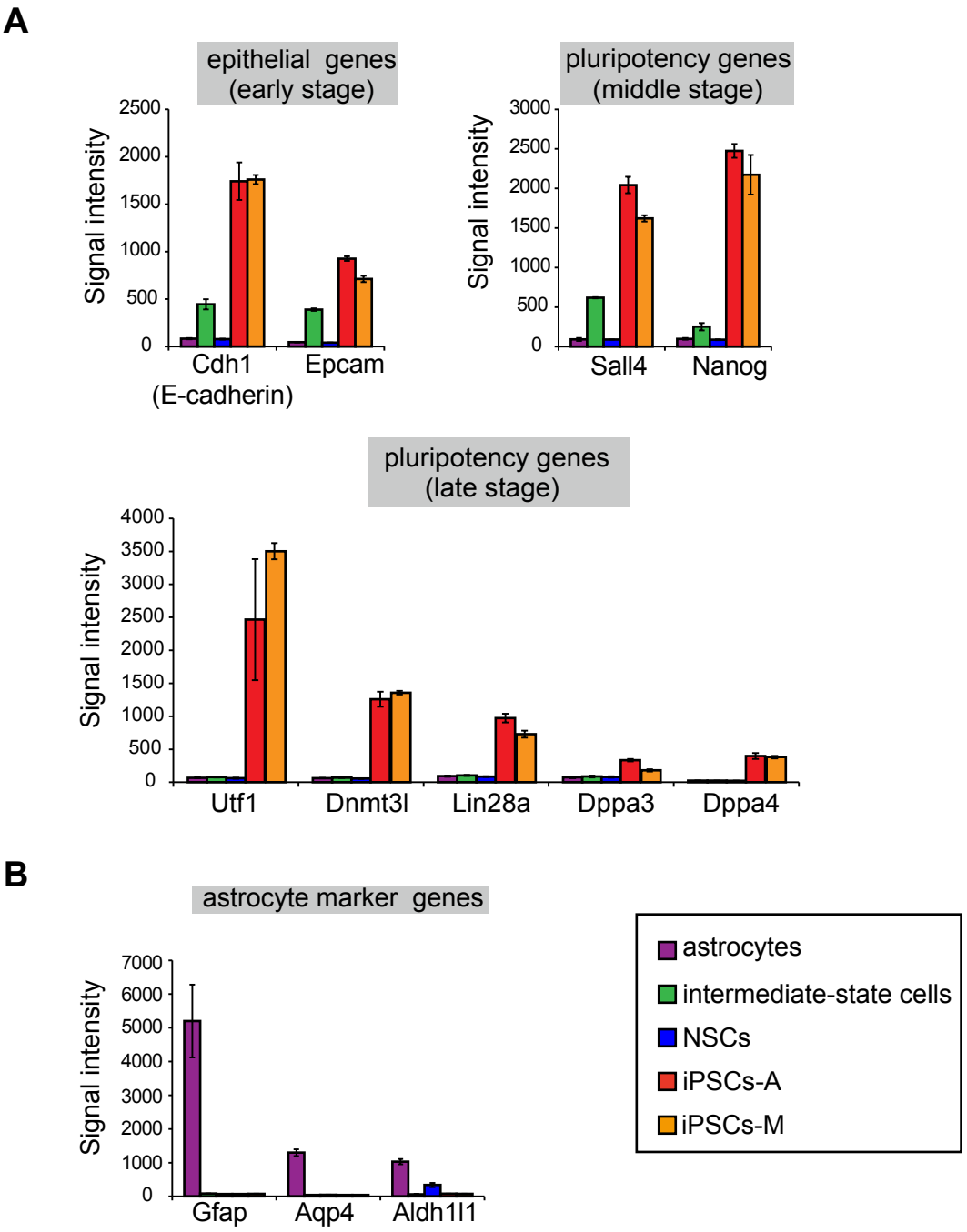


図 12 リプログラミングの時期特異的マーカー遺伝子の発現解析

(A) 図 11A で示した 5 つのサンプルについてマイクロアレイ解析を行った。繊維芽細胞のリプログラミング過程の遺伝子発現変化を解析した先行研究において、リプログラミングの初期、中期、後期に上昇することが示されていた遺伝子の発現解析。
(B) アストロサイトのマーカー遺伝子の発現解析。
マイクロアレイ解析によるシグナル値を示す。astrocyte と intermediate-state cells については 3 回、NSCs、iPSCs-A、iPSCs-M については 2 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

おいて発現が低い。そこで、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞で発現しており、iPS 細胞になると発現が減少する遺伝子群(501 遺伝子)に着目した(表 1)。アストロサイトのリプログラミング過程の細胞におけるこれらの遺伝子の発現パターンは、アストロサイトや神経幹細胞における発現パターンと類似していた(図 13A)。さらに、501 遺伝子について、NIH DAVID Bioinfomatics tools を用いて、様々な組織の遺伝子発現プロファイルと比較した結果、小脳や脳に発現する遺伝子が多く含まれていることが示された(図 13B)。また、Gene Ontology(GO)解析を用いて、「ニューロンの移動」「軸索形成」「神経発生」に関わる遺伝子が、501 個の遺伝子群の中に濃縮されていることを見出した(表 2)。さらに、神経外胚葉、中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子の発現について解析した(図 13C)。神経外胚葉のマーカー遺伝子はアストロサイトと神経幹細胞に発現するが、iPS 細胞株には発現していなかった。興味深いことに、Pax6 、Zic1、 Pou3f2 (Brn2)、Pou3f4(Brn4)、Foxg1、Otx1 といった神経外胚葉マーカー遺伝子は、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞においても高い発現が見られた。一方で、中胚葉と内胚葉のマーカー遺伝子は、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞では発現していなかった。以上の結果から、アストロサイトのリプログラミング過程の Sox1 陽性細胞は、多くの神経細胞特異的な遺伝子を発現しており、神経細胞系譜に最も近いことが示唆された。

<u>アストロサイトのリプログラミング過程の細胞は、神経幹細胞様の遺伝子発現プロファイルを示す</u>

マイクロアレイを行った 5 つのサンプルにおける全遺伝子の発現パターンについて、階層的クラスタリング解析を行った結果、リプログラミング過程の細胞は、神経幹細胞と iPS 細胞の間に位置することを見出した(図 14A)。

スタートのアストロサイトとリプログラミング過程の細胞の遺伝子発現を比較し

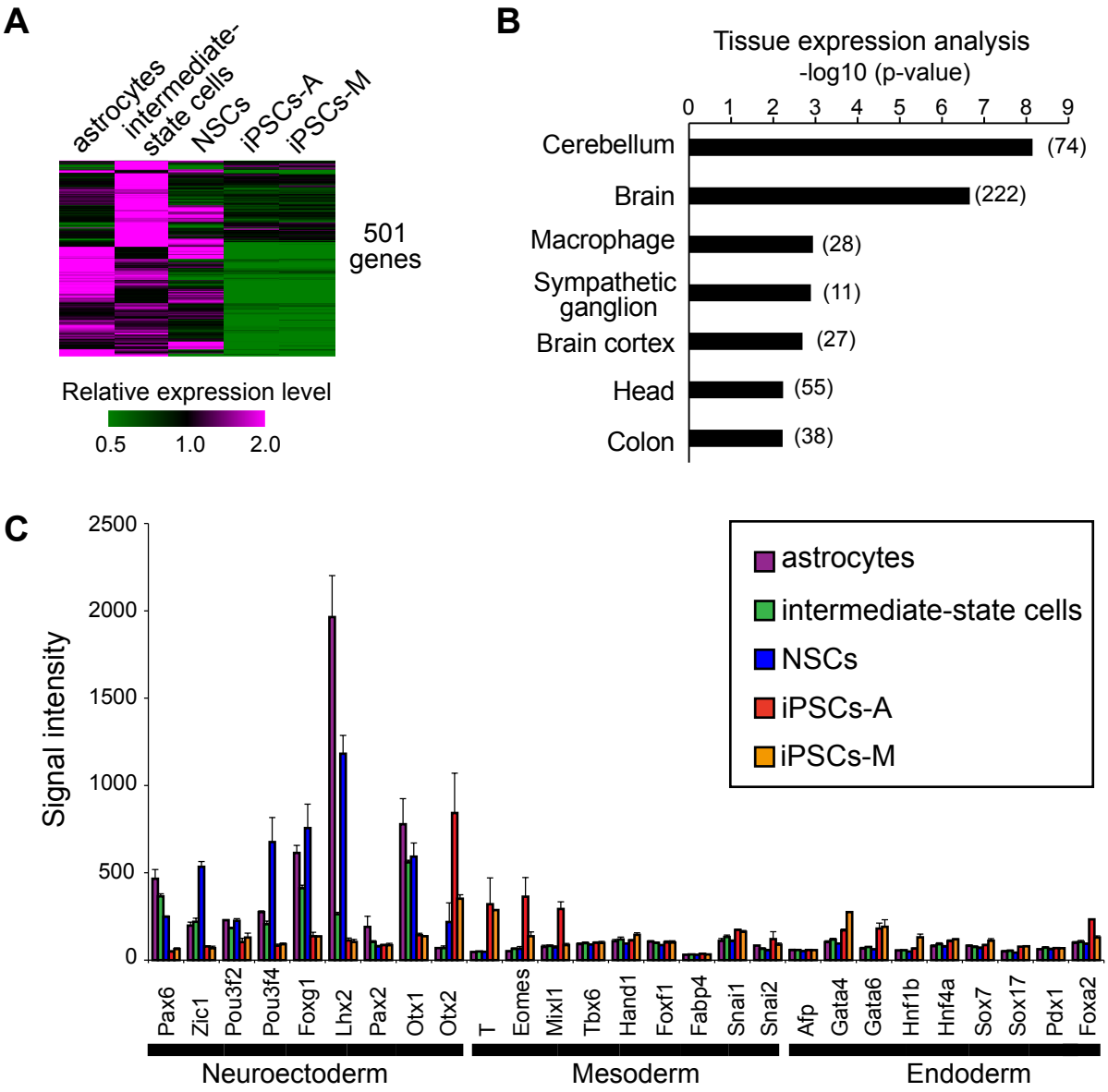


図 13　細胞系譜特異的遺伝子の発現解析

(A) アストロサイトのリプログラミング途中の細胞で発現しており、iPS 細胞になると発現が減少する遺伝子群 (501 遺伝子) の発現プロファイル。
(B) 様々な組織の遺伝子発現プロファイルとの比較。NIH DAVID Bioinfomatics tools を用いて解析した。() の中の数字は、そのカテゴリーに含まれる遺伝子数を示す。
(C) 神経外胚葉、中胚葉、内胚葉のマーカー遺伝子の発現解析。マイクロアレイ解析によるシグナル値を示す。astrocyte と intermediate-state cells については 3 回、NSCs、iPSCs-A、iPSCs-M については 2 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

たところ、リプログラミング誘導によって、1922 個の遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加し(図 14B)、2315 個の遺伝子の発現量が 2 倍以下に減少した(図 14C)。発現が上昇した 1922 個の遺伝子のうち、約半数の遺伝子(903 個、47%)が神経幹細胞においても高い発現を示し、発現が低下した 2314 個の遺伝子のうち、約半数の遺伝子(1307 個、56%)が神経幹細胞においても低い発現を示した。神経幹細胞の自己複製と分化能に重要な遺伝子は、神経幹細胞で高く発現しているものが多いことから、アストロサイトに比べて神経幹細胞とリプログラミング過程の細胞で発現が高い遺伝子に注目した。神経幹細胞とリプログラミング過程の細胞で共通に発現が高い遺伝子群（903 個）は、二つのグループに分けることができる。iPS 細胞においても発現が高い遺伝子群(グループ B、表 4)と iPS 細胞においては発現が低い遺伝子群(グループ A、表 3)である(図 14D)。グループ A には、これまでに神経幹細胞における働きが報告されていた Sox11、Fabp5、Tet3、Fut9 などの遺伝子が含まれており(Bergsland et al., 2011; Li et al., 2015; Matsumata et al., 2012; Wang et al., 2013; Yagi et al., 2012)、Sox1 と同様、リプログラミング過程で一過的に発現が上昇していた(図 14E、グループ A)。一方で、グループ B には細胞周期や幹細胞性に関わる遺伝子が多く含まれており、リプログラミング過程の細胞が幹細胞の性質を持っていることを示唆していた。グループ B には神経幹細胞で重要な役割を果たすことが報告されている Tet1、Mycn(N-Myc)、Ezh2、Hmga2 等が含まれており(Knoepfler et al., 2002; Nishino et al., 2008; Pereira et al., 2010; Zhang et al., 2013)、これらの発現は、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞において、神経幹細胞における発現と同程度まで上昇していた(図 14E、グループ B)。以上の結果から、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞が神経幹細胞と類似した遺伝子発現プロファイルを示すことが示された。

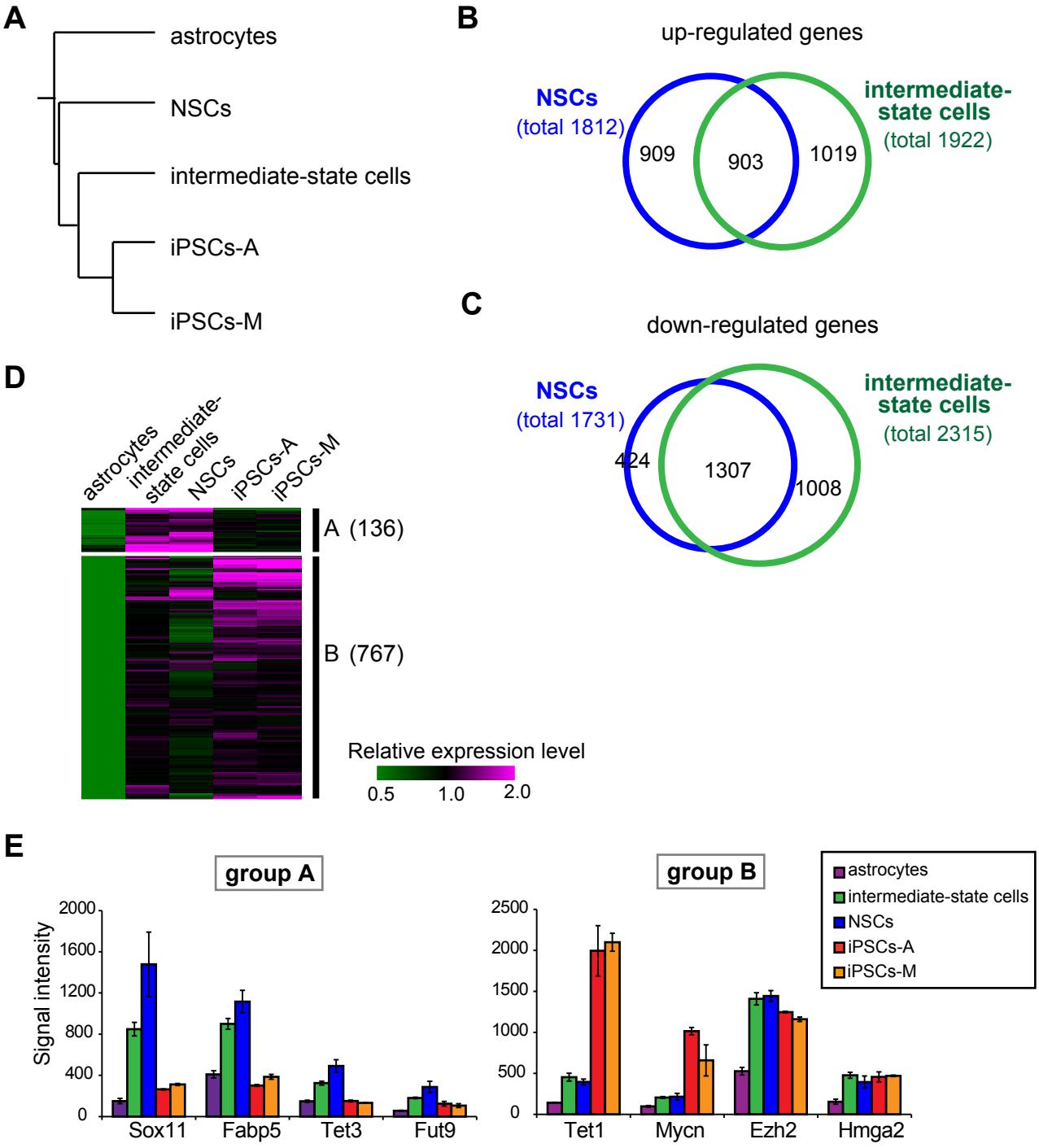


図 14　アストロサイトのリプログラミング途中の細胞と神経幹細胞の遺伝子発現プロファ イルの比較

(A)5 つのサンプルの全遺伝子発現についての階層的クラスタリング解析。
(B) アストロサイトと比較して、 神経幹細胞とリプログラミング途中の細胞において発現量が 2 倍以上の遺伝子のベン図。
(C) アストロサイトと比較して、 神経幹細胞とリプログラミング途中の細胞において発現量が 2 倍以下の遺伝子のベン図。
(D) 神経幹細胞とリプログラミング途中の細胞で共通に発現が高い遺伝子群（903 個）のヒートマップ。 903 個の遺伝子は、 二つのグループに分けることができる。 iPS 細胞においても発現が高い遺伝子群 (グループ B) と iPS 細胞においては発現が低い遺伝子群 (グループ A) である。
(E) グループ A とグループ B に含まれる遺伝子の発現解析。 マイクロアレイ解析によるシグナル値を示す。 astrocyte と intermediate-state cells については 3 回、 NSCs、 iPSCs-A、 iPSCs-M については 2 回の実験の平均値を示す。 エラーバーは標準偏差を示す。

Mycの発現上昇は神経幹細胞様状態の獲得とリプログラミングに必要である

リプログラミング過程において、細胞周期や幹細胞性に関連する遺伝子の発現が上昇したのは、リプログラミング因子としてc-Mycを導入していることが原因の一つと考えられる。興味深いことに、c-Mycをリプログラミング因子として含まない、OKSを用いたアストロサイトのリプログラミング過程において、内在性のc-MycとN-Mycの発現がNanogの発現に先立って上昇することを見出した(図15A)。そこで、Mycの発現上昇が、神経幹細胞様状態の獲得に必要なのかどうかを調べるために、Mycのドミナントネガティブ型であるMadMyc(Hermeking et al., 2000)がSox1の発現上昇に与える影響を検証した。図6で示した実験と同様に、まず*Sox1*-GFP陰性のアストロサイトを採取し、OKSとMadMycを導入して12日目、14日目、16日目に*Sox1*-GFP陽性細胞の割合を計測した結果、MadMycの導入によって*Sox1*-GFP陽性となる細胞が減少することがわかった(図15B、C)。さらに、MadMycによってMycの活性を阻害することで、AP陽性コロニーおよびNanog陽性iPS細胞コロニーの形成が阻害された(図16A、B)。また、shRNAを用いてN-Mycの発現を阻害した場合も、リプログラミング効率が減少した(図16C)。以上の結果から、Mycの発現上昇は、神経幹細胞様状態の獲得とリプログラミングの進行の両方に必要であることが示された。

アストロサイトのリプログラミング中期の細胞は、ニューロンとグリア細胞に分化可能なニューロスフィアを形成することができる

神経幹細胞はニューロンとグリア細胞（アストロサイトとオリゴデンドロサイト）に分化することができる。そこで、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞が神経幹細胞と同様の分化能を持つのかについて検証した。リプログラミング因子を導入していないアストロサイト（コントロール）、あるいはOKSを導入したアストロサイトを複数のタイムポイントで単一細胞レベルに分離し、神経幹細胞培地（無血清培

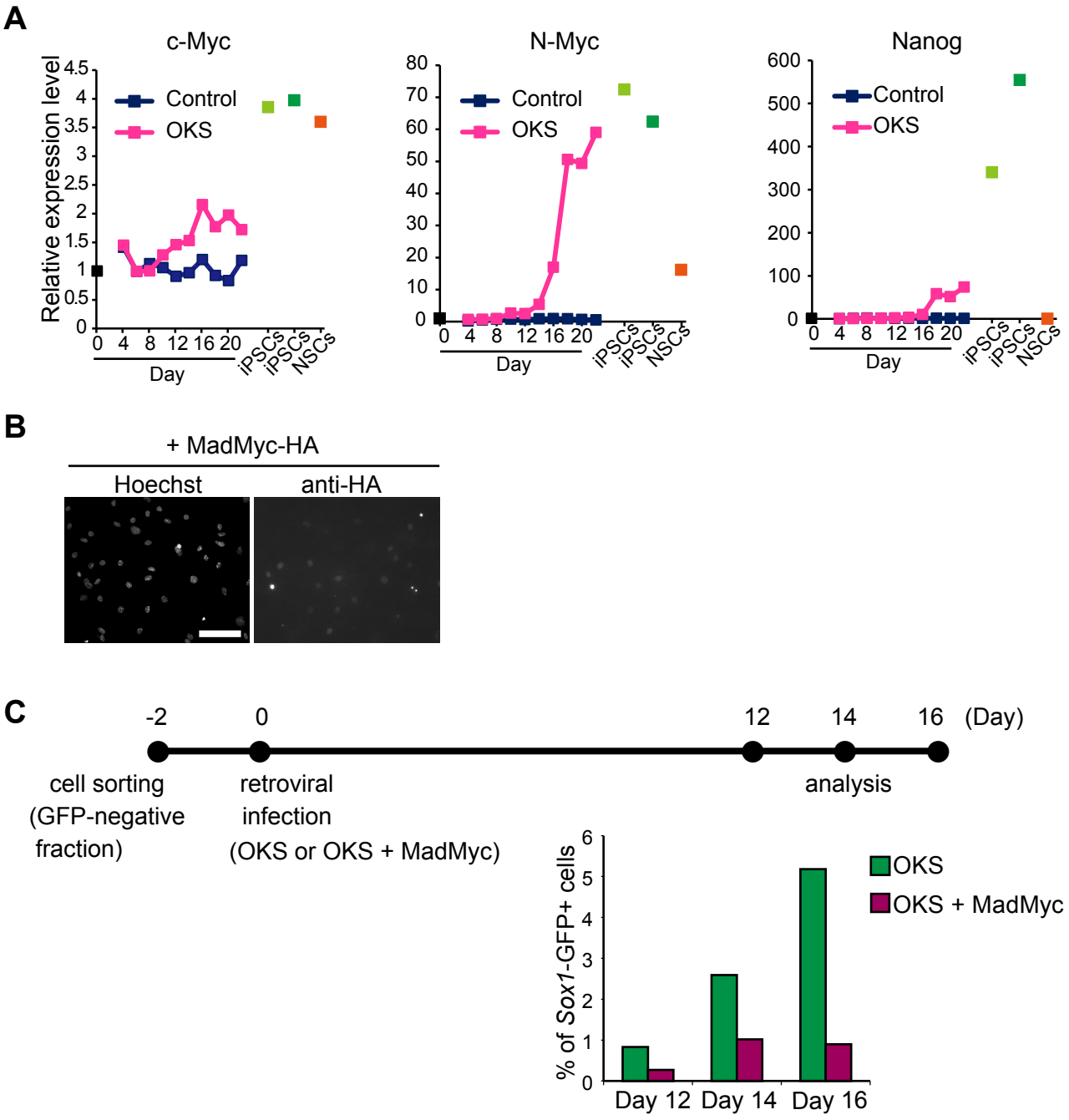


図 15　リプログラミング過程における内在性 Myc の発現上昇が Sox1 の発現に与える影響

(A) コントロールのアストロサイト、 OKS を導入したアストロサイト、 アストロサイト由来の iPS 細胞株、 MEF 由来の iPS 細胞株、 神経幹細胞における内在性の c-Myc、 N-Myc、 Nanog の発現を定量的 RT-PCR により解析した。
(B)MadMyc は融合タンパク質であり、 Myc のドミナントネガティブ型である。 C- 末端に HA タグが付いている。レトロウィルスを用いて MadMyc-HA をアストロサイトに導入し、HA に対する抗体を用いて免疫染色した。スケールバーは 100 μm を示す。
(C) 図 6 の実験と同様、まず *Sox1*-GFP 陰性アストロサイトを採取し、二日後に OKS と MadMyc を導入した。12 日目、 14 日目、 16 日目に *Sox1*-GFP 陽性細胞の割合を FACS で解析した。

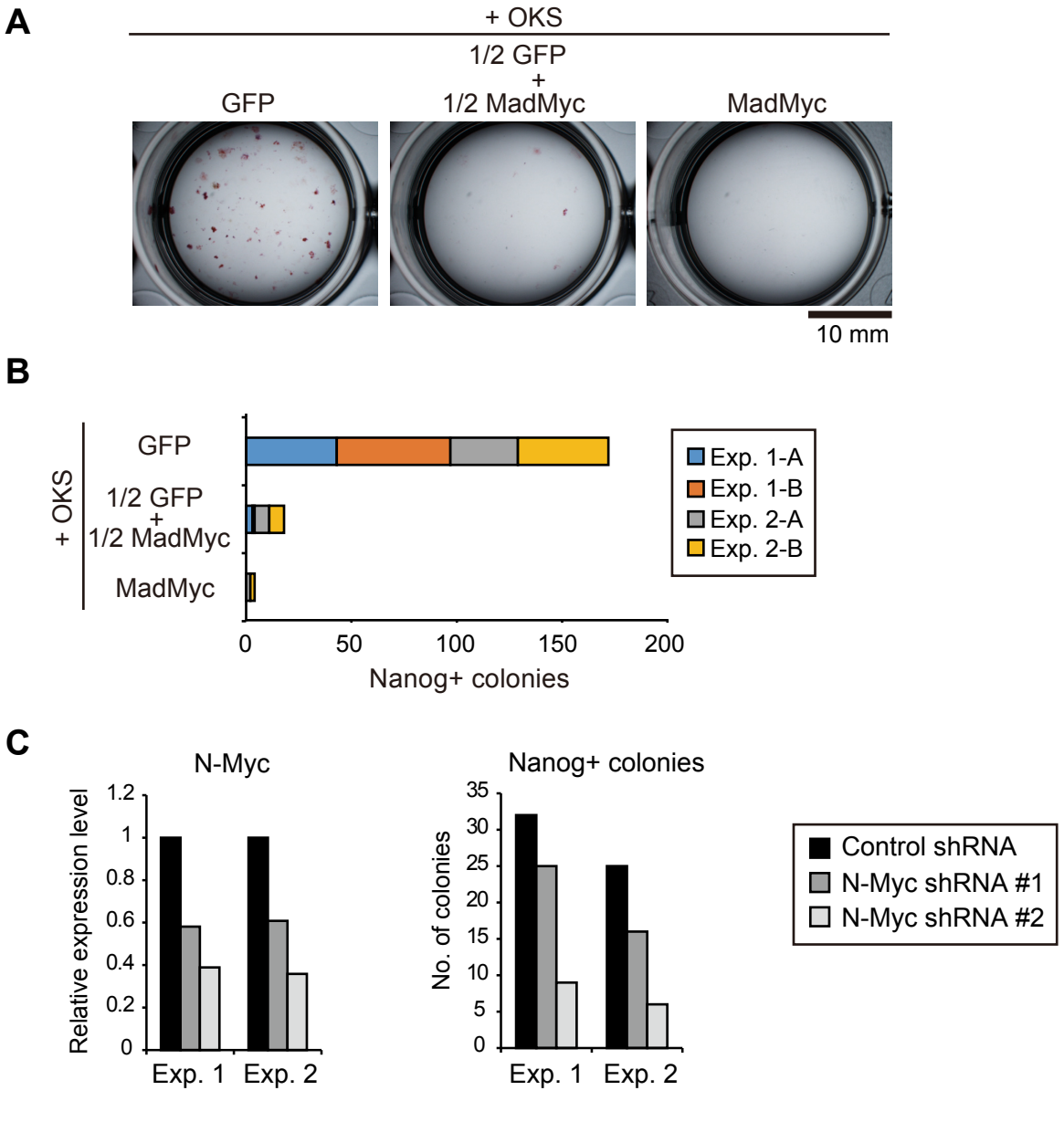


図 16　リプログラミング過程における内在性 Myc の発現上昇がリプログラミングに与える影響

(A) アストロサイトに OKS と GFP あるいは OKS と MadMyc を導入し、 AP 染色を行った。
(B) アストロサイトに OKS と GFP あるいは OKS と MadMyc を導入し、 Nanog 染色を行った。 Nanog 陽性コロニー数を示す。 2 回の独立した実験 (Exp.1 と Exp.2) の 2 サンプル (A と B) の結果を示す。
(C) レンチウィルスを用いて、 N-Myc に対する shRNA 配列 (N-Myc shRNA #1 と N-Myc shRNA #2) を導入し、 OKS を用いてリプログラミングを誘導した。 N-Myc のノックダウン効果を左に示す。 Nanog 陽性コロニー数を右に示す。 2 回の実験結果を示す。

地に bFGF と EGF を添加したもの）で約 10 日間培養して、スフィアを形成させた(図 17A)。コントロールの細胞も、OKS を導入した細胞も培地中に浮遊するスフィアを形成した(図 17B)。次に、スフィアを接着させ、5 日間分化を誘導し、ニューロンのマーカーであるβ-tubulin III に対する抗体と、アストロサイトのマーカーである GFAP に対する抗体を用いて免疫染色を行い、スフィアの分化能を評価した。コントロールの細胞から形成されたスフィアの大部分(95%以上)は、GFAP 陽性のアストロサイトにのみ分化した(図 17C、コントロールの左パネル)。少数のスフィアはβ-tubulin III 陽性のニューロンに分化したが、ニューロンの数は少なく、ニューロンの突起も短かった(図 17C、コントロールの右パネル、図 17D)。したがって、コントロールの細胞は、アストロサイトの前駆細胞としての能力はあるが、ニューロンへの分化能力は極めて低いことが示された。また、Oct3/4、 Klf4、 Sox2 を単独で導入した場合も、ニューロンへの分化能は低いままであった(図 17D)。それに対し、OKS を導入した細胞から形成されたスフィアは、ニューロンへの分化能が高いことがわかった(図 17C、OKS、図 17D)。特に、リプログラミング中期（12 日目から 14 日目）の細胞は、ニューロンとアストロサイトの両方に分化することのできるニューロスフィアを最も効率よく作製することができた(図 17C、OKS、Day 12 と Day 14)。リプログラミング中期の細胞から形成されたスフィアはニューロンとアストロサイトだけではなく、O4 陽性のオリゴデンドロサイトにも分化することができた(図 17E)。リプログラミング後期の細胞は、β-tubulin III 陽性のニューロンにのみ分化するニューロスフィアを多数形成した(図 17C、OKS、Day 16)。アストロサイトに OKSM を導入してリプログラミングを誘導した場合も、リプログラミング過程の細胞は、ニューロンとアストロサイトの両方に分化可能なニューロスフィアを形成することができた(図 17F)。また、iPS 細胞株から、同じプロトコルを用いてスフィア形成を試みたところ、多くの細胞は神経幹細胞用培地で生存することができなかった。わずかなが

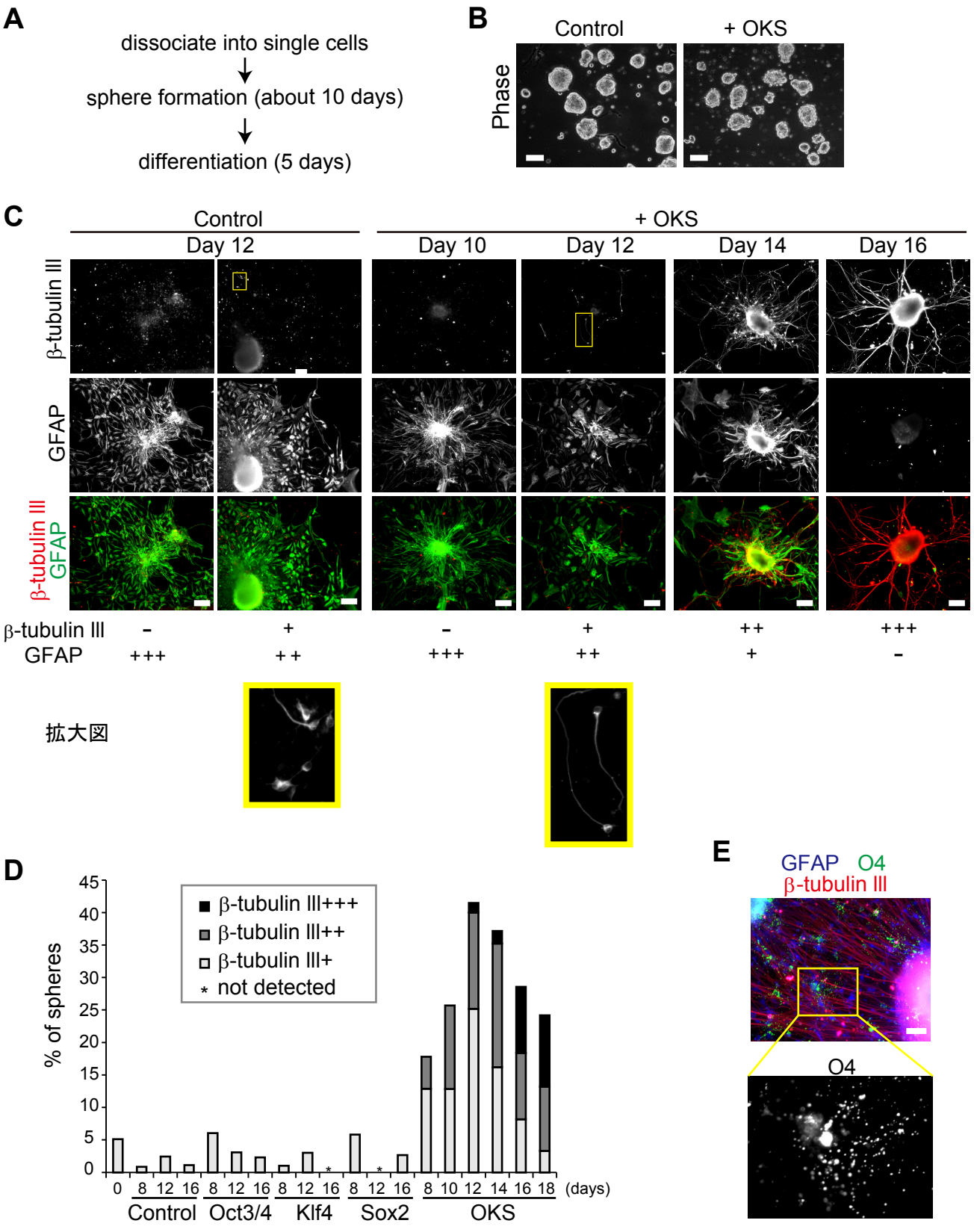


図 17　アストロサイトのリプログラミング過程の細胞のニューロスフィア形成能と分化能の解析

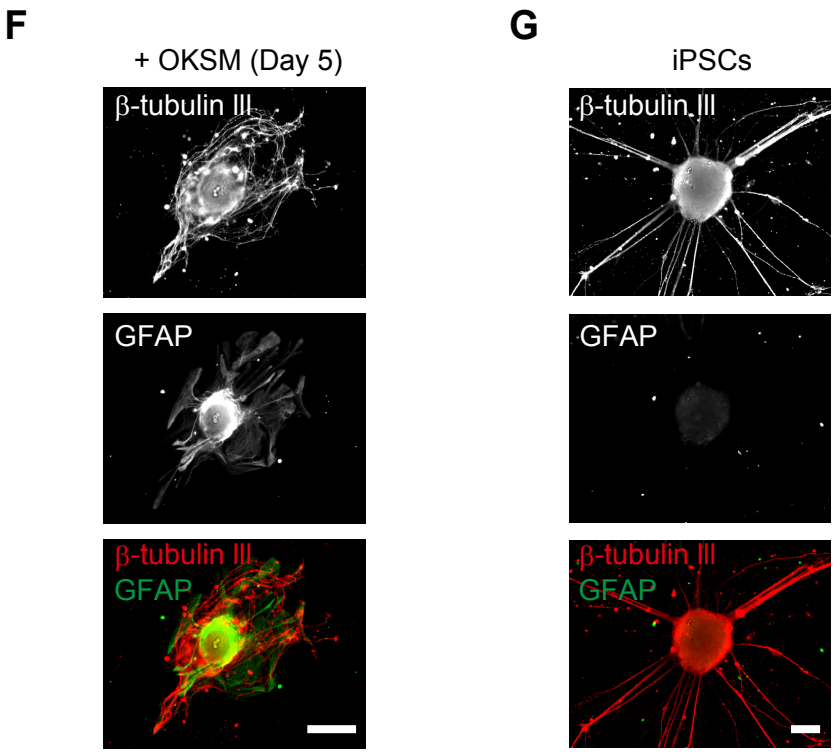


図 17　アストロサイトのリプログラミング過程の細胞のニューロスフィア形成能と分化能の解析

(A) スフィア形成と分化能評価の実験の流れ。
(B) リプログラミング因子を導入していないアストロサイト (コントロール) と OKS を導入したアストロサイトから形成されたスフィアの位相差画像。 スフィアは培地中に浮遊している。
(C) ニューロンのマーカーである β-tubulin III(赤) に対する抗体と、 アストロサイトのマーカーである GFAP(緑) に対する抗体を用いて免疫染色を行い、 ニューロン、 アストロサイトへの分化の程度を四段階 (ー、 + 、 ++、 +++) で評価した。 黄線で囲った領域の拡大図を下に示す。
(D) ニューロンへの分化能の定量結果。 各条件につき 80 個以上のスフィアの分化能を調べた。
(E) アストロサイトのリプログラミング中期の細胞から形成されたスフィアから分化を誘導し、 GFAP(青)、 β-tubulin III(赤)、 オリゴデンドロサイトのマーカー遺伝子 O4(緑) に対する抗体で免疫染色した。 黄線で囲った領域の拡大図を下に示す。
(F) アストロサイトに OKSM を導入して 5 日後の細胞からスフィアを形成し、 分化を誘導した。 β-tubulin III(赤) に対する抗体と GFAP(緑) に対する抗体を用いて免疫染色した。
(G) アストロサイトから OKS を用いて樹立した iPS 細胞株からスフィアを形成し、 分化を誘導した。 β-tubulin III (赤) に対する抗体と GFAP(緑) に対する抗体を用いて免疫染色した。
スケールバーは 100 μm を示す。

ら生き残った細胞から形成されたスフィアは、β-tubulin III 陽性のニューロンにのみ分化した(図 17G)。以上の結果から、アストロサイトのリプログラミング中期の細胞は、神経幹細胞と同様、ニューロンとグリア細胞両方に分化する能力を有することが示された。

<u>MEF のリプログラミング過程においては、Sox1 の一過的な発現上昇は起こらない</u>

次に、神経細胞系譜以外の細胞からリプログラミングを誘導した場合に、神経幹細胞様状態を経由するのかについて検討した。MEF から OKS を用いてリプログラミングを誘導し、免疫染色を用いて、リプログラミング過程における Sox1 の発現を解析した(図 18A)。リプログラミング誘導を開始して 12 日から 14 日で E-cadherin 陽性のコロニーが出現した。しかしながら、E-cadherin 陽性コロニーにおいて Sox1 の発現は見られなかった。*Sox1*-GFP マウス由来の MEF を用いてリプログラミングを誘導したところ、18 日後には、多数の Nanog 陽性コロニーが観察されたため、MEF が iPS 細胞へとリプログラミングされたことが確認できた(図 18B)。そして、MEF のリプログラミングの全期間を通して、*Sox1*-GFP 陽性細胞は観察されなかった(図 18C)。

さらに、Sox1 のノックアウトが MEF のリプログラミングに与える影響を調べた。*Sox1*+/+マウス、*Sox1*+/-マウス、*Sox1*-/-マウス由来の MEF に OKS を導入してリプログラミングを誘導した結果、Sox1 のノックアウトは Nanog 陽性 iPS 細胞コロニーの数に影響を与えないことが示された(図 19、OKS)。*Sox1*+/+マウス由来の MEF に OK を導入した場合は、これまでの報告と同様(Takahashi and Yamanaka, 2006)、iPS 細胞コロニーを形成することができなかった(図 19、OK)。これは MEF における内在性の Sox2 の発現が神経幹細胞やアストロサイトと比較し低いためであると考えられる(図 3A)。*Sox1*+/-マウス、*Sox1*-/-マウス由来の MEF に OK を導入した場合も iPS

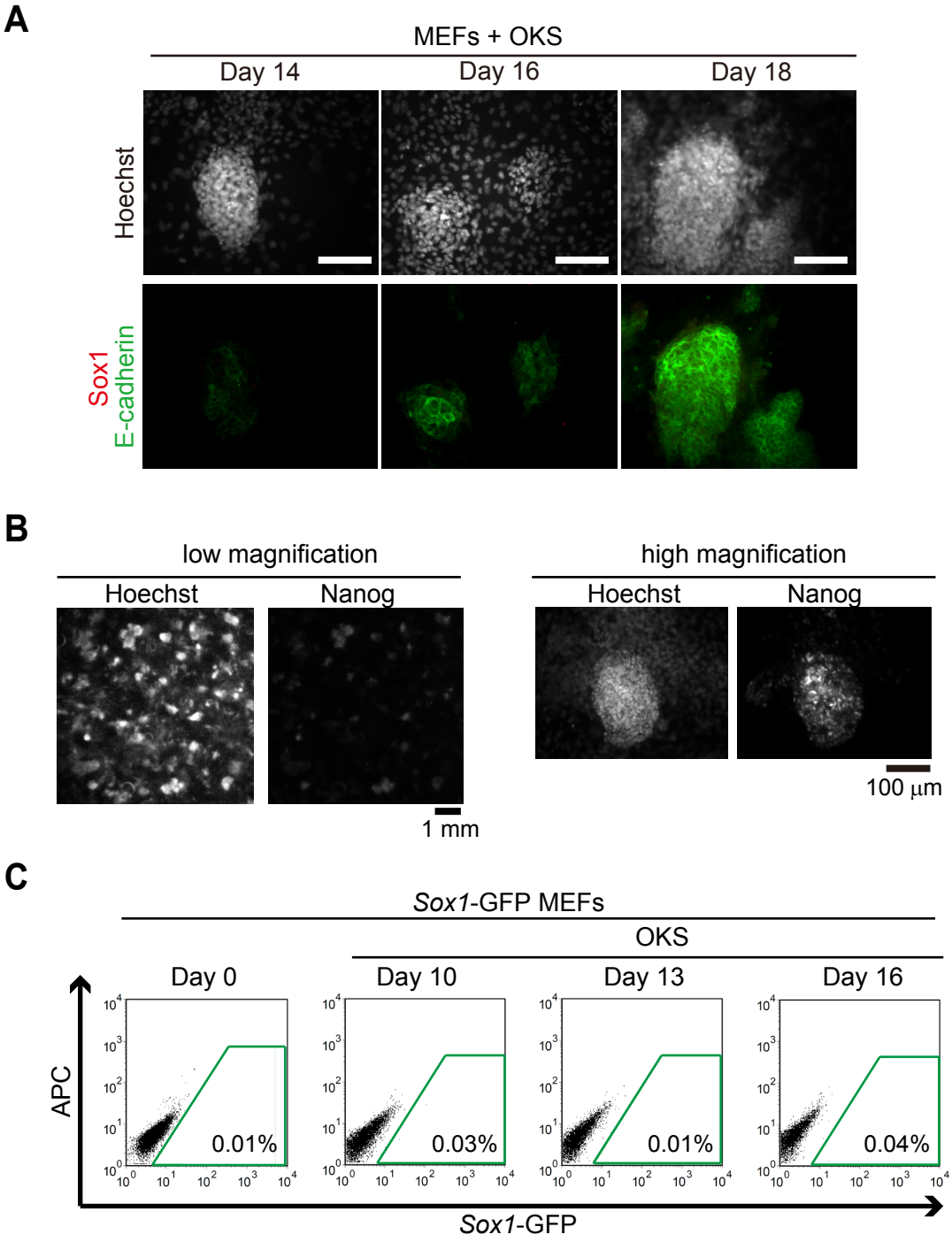


図 18　MEF のリプログラミング過程における Sox1 の発現解析

(A) 野生型マウス由来の MEF に OKS を導入し、 14 日目、 16 日目、 18 日目に細胞を固定し、 Sox1(赤) と E-cadherin(緑) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。 スケールバーは 100 μm を示す。
(B)*Sox1*-GFP マウス由来の MEF に OKS を導入し、 18 日後に固定し、 Nanog に対する抗体を用いて免疫染色を行った。 低倍率の写真を左に、 高倍率の写真を右に示す。
(C)*Sox1*-GFP マウス由来の MEF に OKS を導入し、 *Sox1*-GFP の発現を FACS により解析した。 *Sox1*-GFP 陽性の領域を緑色で示す。

細胞コロニーは形成されなかった。

以上の結果から、MEF のリプログラミング過程において Sox1 の発現は上昇せず、Sox1 はリプログラミングに必要でないことが示された。したがって、Sox1 の一過的な発現上昇はアストロサイトのリプログラミングに特異的な現象であり、リプログラミング全般に共通する現象ではないことが示唆された。

MEF のリプログラミング過程の細胞は、ニューロンやグリア細胞に分化するニューロスフィアを形成することができない

次に、MEF のリプログラミング過程の細胞が、ニューロンやグリア細胞への分化能を獲得するのかについて調べた。図 17A で示した方法を用いてスフィア形成を試みたところ、細胞は dish の底面に接着し、dish 上に細胞塊が形成された(図 20A)。アストロサイトのリプログラミング過程の細胞から形成されたような、培地中に浮遊するスフィアは得られなかった。細胞塊を分化誘導培地で培養した結果、大部分の細胞塊（約 97%）は、ニューロンにもアストロサイトにも分化することはできなかった(図 20B)。わずかな細胞塊はニューロンに分化したが、ニューロンとなった細胞は 1、2 個であった(図 20C)。MEF のリプログラミング全期間を通じて、ニューロンへの分化能は低く、GFAP 陽性のアストロサイトへの分化は全く観察されなかった。以上の結果から、MEF のリプログラミング過程の細胞は、ニューロンとグリア細胞への多分化能を持ったニューロスフィアを形成できないことが示された。

先行研究では、繊維芽細胞に OKSM を導入してリプログラミング誘導した細胞は、多分化能をもった神経幹細胞に分化転換できることが示されていた(Kim et al., 2011; Matsui et al., 2012)。OKSM を用いたリプログラミングでは、不完全にリプログラミングされた細胞が多数生じることが知られているため、iPS 細胞への道筋から外れた細胞が神経幹細胞に分化転換した可能性がある。今回のように OKS を用いた MEF

図 19

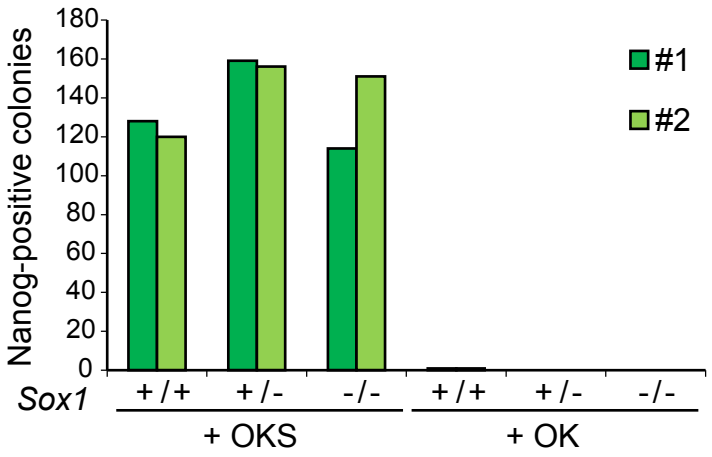


図 19　Sox1 のノックアウトが MEF のリプログラミングに与える影響

Sox1+/+、 *Sox1*+/-、 *Sox1*-/- マウス由来の MEF に OKS または OK を導入し、 Nanog に対する抗体で免疫染色を行った。 2 回の実験 (#1 と #2) における Nanog 陽性コロニー数を示す。

図 20

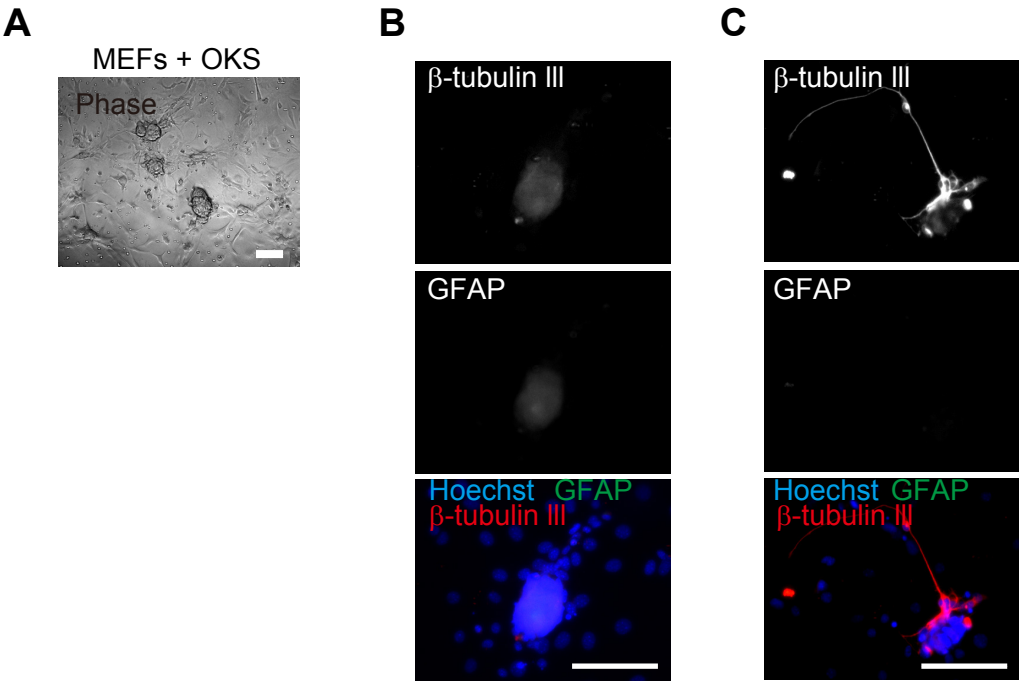


図 20　MEF のリプログラミング過程の細胞のニューロスフィア形成能と分化能の解析

(A) 図 17A の方法を用いて、 MEF のリプログラミング過程の細胞からスフィア形成を試みた。 培養 dish 上に形成された細胞塊の位相差画像。
(B) 細胞塊を分化誘導培地で培養し、 ニューロンのマーカーである β-tubulin III(赤) に対する抗体と、 アストロサイトのマーカーである GFAP(緑) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。 大部分の細胞塊（約 97%）は、 ニューロンにもアストロサイトにも分化することはできなかった。 その代表例を示す。
(C) わずかな細胞塊は β-tubulin III 陽性ニューロンに分化した。
スケールバーは 100 μm を示す。

のリプログラミングにおいては、不完全にリプログラミングされた細胞が少ないため、ニューロンとグリア細胞に分化可能な神経幹細胞様の細胞ができなかったのではないかと考えられる。

表 1 アストロサイトのリプログラミング過程の細胞より iPS 細胞で発現が低い遺伝子群 (1/2)

Probeset_ID	Gene symbol
10345065	Gsta3
10346330	Plcl1
10346668	Fam117b
10346843	Nrp2
10348354	Ugt1a9|Ugt1a
10348739	Sned1
10348829	Farp2|Stk25
10349174	Serpinb8
10349724	Rab7l1
10349752	Elk4
10350977	4930523C07Rik
10351119	Vamp4
10352066	Sdccag8
10353010	Mybl1
10353117	Slco5a1
10353252	Gm106
10353460	Kcnq5
10353632	Bai3
10354003	Mgat4a
10354472	Gls
10354494	Nab1
10354506	Mfsd6
10354521	Inpp1
10354777	Satb2
10355536	Tns1
10355567	Tmbim1
10356084	Irs1
10356932	D1Ertd622e
10357043	Bcl2
10357870	Prelp
10357965	Lgr6
10358124	Pkp1
10358339	Cfh
10358389	Rgs2
10360506	Akt3
10360684	Ephx1
10360806	Capn2
10360848	Mosc2
10360920	Tgfb2
10361887	Perp
10361897	Ifngr1
10362294	Arhgap18
10362379	Echdc1
10362520	Hdac2
10362538	Lama4
10362596	Fyn
10362717	Wasf1
10362896	Cd24a
10363161	Tmem229b
10363379	Cbara1
10365482	Timp3
10365601	Gnptab
10367772	Samd5
10367973	Aig1
10367982	Gpr126
10368199	Myb
10368289	Enpp1
10368534	Ncoa7
10368577	Rnf217

Probeset_ID	Gene symbol
10368675	Marcks
10368836	
10369252	42257
10371959	Elk3|Cdk17
10372177	Tmtc2
10372497	Thap2
10372781	Irak3
10374197	Ramp3
10374366	Egfr
10375065	Sh3pxd2b
10375951	9530068E07Rik
10376765	Aldh3a1
10376899	Trim16|Fbxw10
10378216	Atp2a3
10380477	Ppp1r9b
10381006	Thra|Nr1d1
10382713	Itgb4
10383289	Baiap2
10384150	Purb
10384504	Meis1
10384615	Otx1
10384691	0610010F05Rik
10385557	Cnot6
10386909	Cenpv
10387100	Shisa6
10387170	Ntn1
10388591	Cpd
10389238	Dusp14
10389300	Dhrs11
10389590	Gdpd1
10391119	1110036O03Rik
10394699	Rock2
10394862	Asap2|Itgb1bp1
10395596	Foxg1
10396485	Syne2
10396511	Syne2
10396606	Syne2
10396608	Syne2
10396645	Zbtb1
10396740	Gphn
10396800	Plekhh1
10397606	Tshr
10397633	Flrt2
10397763	9030617O03Rik
10399465	Fam84a
10399691	Id2
10399725	Sox11
10400057	Arl4a
10400357	Baz1a
10401028	Sgpp1
10401160	Tmem229b
10401987	Kcnk10
10402117	Rps6ka5
10402648	Brp44l
10402766	Akt1
10403291	Akr1c14
10404152	Fam65b
10404359	Mboat1
10404763	Tmem170b

Probeset_ID	Gene symbol
10404792	Phactr1
10406423	Mblac2
10406551	Ssbp2
10406663	Arsb
10406845	Foxd1
10407358	Paip1
10407435	Akr1c18
10407707	Gm10336
10407709	Mtr
10407955	Epdr1
10408798	Tcfap2a
10408850	Nedd9
10408902	Ccdc90a
10409076	Phf2
10409222	Shc3
10409345	Cltb
10409660	Gkap1
10410766	Nr2f1
10411126	Jmy
10411171	Pde8b
10411235	Iqgap2
10412844	Top2b
10412882	Thrb
10414065	Anxa8
10414417	Peli2
10415176	Dhrs4
10415187	Lrrc16b
10415446	Atp12a
10416175	Nefl
10416340	Gfra2
10416700	Pcdh17
10416974	Gpc6
10417273	Esd
10419240	Ddhd1
10420413	Lats2
10420457	Efha1
10420846	Fzd3
10420988	Dpysl2
10421046	Dock5
10421293	Ppp3cc
10421526	Rb1
10422185	Rnf219
10422272	Sox21
10422436	Dock9
10423471	Ctnnd2
10423548	Sdc2
10424467	Phf20l1
10424485	Phf20l1
10426909	Letmd1
10427235	Prr13
10427471	Osmr
10427816	Pdzd2
10428534	Trps1
10428536	Trps1
10428755	Zhx1
10429564	Ly6a
10429568	Ly6c1|Ly6c2
10429573	Ly6c2|Ly6c1
10432006	Hdac7

Probeset_ID	Gene symbol
10434689	Ahsg
10434698	Fetub
10435237	Zfp148
10435271	Heg1
10435641	Fstl1
10435769	Zbtb20
10435789	Zbtb20
10435791	Mir568
10436169	Ift57
10437639	Emp2
10439276	Fam162a
10439483	Arhgap31
10440019	Tmem45a
10440099	St3gal6|Dcbld2
10440186	Crybg3|Mina
10440307	Chmp2b
10441740	Agpat4
10441815	Sod2
10442069	Lix1
10443786	Pde9a
10445293	Pla2g7
10446928	Ltbp1
10449989	Zfp422
10450904	Scoc
10452419	Efna5
10455292	2900055J20Rik
10455294	Kctd16
10455374	Stk32a
10457054	Zadh2
10457587	Zfp521
10457644	Cdh2
10458663	Dpysl3
10458906	Ppic
10459999	Sall3
10460057	Tshz1
10461369	Ahnak
10461856	Gna14
10462237	Smarca2
10462587	Stambpl1
10462957	Tbc1d12
10463070	Entpd1
10463462	Sfxn3
10463836	Gsto1
10463981	Rbm20
10464045	Acsl5
10464391	Emx2
10464949	Pacs1
10465853	Stxbp3a
10466441	Vps13a
10466606	Anxa1
10466659	Gda
10466779	Pip5k1b
10466925	Ak3
10466938	5033414D02Rik
10467768	Loxl4
10468691	Ablim1
10469505	Commd3
10469514	Bmi1
10469571	Otud1

Probeset_ID	Gene symbol
10469957	Tprn
10471457	St6galnac4
10471833	Lhx2
10472097	Fmnl2
10472289	Tank
10472893	B230120H23Rik
10473880	Lrp4
10474229	Cd59a|Cd59b
10474312	Pax6
10474361	Mpped2
10476042	Tgm3
10476163	Ptpra
10476401	Plcb1
10476814	Insm1
10477169	Id1
10480139	C1ql3|Pter
10480324	2810030E01Rik
10480347	Pip4k2a
10482030	Stom
10484197	Ccdc141
10484201	Ccdc141
10484203	Ccdc141
10484205	Ccdc141
10484207	Ccdc141
10484888	Ptprj
10484894	Ptprj
10485405	Cd44
10485445	Ehf
10485745	Ano3
10486041	Meis2
10487441	Mal
10488415	Cst3
10488879	Gss
10489660	Elmo2
10490818	Stmn2
10490838	Fabp5|Fabp5l2
10491313	Cldn11
10491329	4930429B21Rik
10491780	Hspa4l
10491970	Lhfp
10492180	Rnf13
10492310	Mbnl1
10493347	Ash1l
10493798	S100a16
10493803	S100a3
10493820	S100a6
10494288	Golph3l
10494445	Lix1l
10495896	Camk2d
10496324	Slc39a8
10496425	Adh7
10497222	Zfp704
10498024	Slc7a11
10498064	Setd7
10498210	Nbea
10498273	Tm4sf1
10498309	Pfn2
10498576	Lxn
10498775	Golim4

表 1 アストロサイトのリプログラミング過程の細胞より iPS 細胞で発現が低い遺伝子群（2/2）

Probeset_ID	Gene symbol
10498965	Npy2r
10498998	D930015E06Rik
10499138	Dclk2
10499168	Kirrel
10499394	Lmna
10499655	Il6ra
10499766	Slc27a3
10500666	Ptgfrn
10501420	Stxbp3a
10501734	Palmd
10501762	Snx7
10501924	Ndst3
10501971	Ank2
10502510	Lmo4
10502973	Tyw3
10503023	Cth
10503401	Tmem55a
10503410	Tmem64
10503508	Ggh
10503523	Ggh
10503593	6230409E13Rik
10503659	Epha7
10505568	Frmd3
10506031	Nfia
10506050	Nfia
10509500	Hp1bp3
10510260	Nppb
10511665	Necab1
10511739	Cpne3
10511810	Pou3f2
10512156	Aqp3
10512939	2610030H06Rik
10512949	Abca1
10513869	Megf9
10514049	Nfib
10514054	Nfib
10514255	Mllt3
10514340	Cdkn2a
10514510	Cyp2j6
10515090	Cdkn2c
10516064	Mfsd2a
10517600	Pink1
10519324	Cdk6
10519504	Sri
10519612	9330182L06Rik
10520048	Mll5
10521168	Nat8l
10522217	Limch1
10522250	Tmem33
10522288	Shisa3
10523468	Bmp2k
10523766	Lrrc8c
10526055	Gbas
10527012	Lfng
10528527	Fam126a
10529375	Mxd4
10530100	Arap2
10530306	Phox2b
10530406	Gabra2

Probeset_ID	Gene symbol
10530563	Fryl
10530615	Ociad2
10530733	Clock
10531437	Scarb2
10531529	Cnot6l
10532989	Gatc
10533050	Hspb8
10535065	Adap1
10535956	Stard13
10536505	Met
10536667	Ptprz1
10536949	Fam40b
10538082	Atp6v0e2
10538658	Herc3
10538842	Gng12
10541246	Il17ra
10542275	Etv6
10542355	Emp1
10542470	Mgst1
10542836	Klhdc5
10543306	Tspan12
10543512	Zfp800
10543791	Podxl
10544108	Klrg2
10544114	Hipk2
10544148	Jhdm1d
10544150	Jhdm1d
10544660	Osbpl3
10544875	Scrn1
10544891	Nod1
10545001	Ppm1k
10545682	Tet3
10545720	Stambp
10545862	Cml3
10545865	Cml3
10545869	Cml3
10546510	Lrig1
10546725	Pdzrn3
10547009	Vgll4
10547621	Apobec1
10548105	Ccnd2
10548146	Tead4
10548791	Grin2b
10549162	St8sia1
10552546	Klk1|Klk1b5
10553537	Luzp2
10554094	Igf1r
10554156	Fam174b
10554269	Abhd2
10554655	Mex3b
10554969	Odz4
10556426	Parva
10556812	Lyrm1
10557009	Eef2k
10557033	Eef2k
10561008	Ceacam1
10561104	Axl
10561369	BC089491
10561478	Nccrp1

Probeset_ID	Gene symbol
10563641	Rap1a|Gm9392
10564849	2610034B18Rik
10565193	Hdgfrp3|Tm6sf1
10565627	Aqp11
10566454	Prkcdbp
10567173	Pik3c2a
10567297	Itpripl2
10567546	Crym
10567725	Zkscan2
10568586	Fam53b
10569618	Ano1
10570516	Kbtbd11
10571567	Sorbs2
10571705	Irf2
10575693	Vat1l
10575844	Cdh13
10577996	Unc5d
10577999	Unc5d
10578324	Mtus1
10578572	Stox2
10578763	Sap30
10578904	Cpe
10579894	Hhip
10580010	Pkn1
10580191	Nfix
10580382	Neto2
10580418	Abcc12
10580522	Tox3
10580765	Pllp
10580990	Cdh8
10583207	Maml2
10584259	Fez1
10584271	Tmem218
10584827	Mpzl2
10585214	Cryab|Hspb2
10585610	Ptpn9
10585699	Fabp5|Fabp5l2
10586284	Dpp8
10586744	Anxa2
10587323	Gsta1|Gsta2
10587331	Gsta1|Gsta2
10587339	Gm10639
10587383	Cd109
10587639	Nt5e
10587880	Pcolce2
10589087	Prkar2a
10591781	Anln
10591884	Glb1l2
10592469	Olfr985
10592655	Arhgef12
10593293	Ncam1
10593591	Acat1
10593634	Elmod1
10593723	Acsbg1
10594645	Rab8b
10594758	Gcnt3
10595148	Gsta2
10595324	Htr1b
10595371	Hmgn3

Probeset_ID	Gene symbol
10595695	Zic1
10595979	Mras
10595981	Mras
10596403	Gm7455
10597309	Stac
10597461	Cmtm7|Gm9888
10598507	Slc38a5
10599120	Dock11
10599612	Phf6
10599962	Mamld1
10600024	Gpr50
10601091	Foxo4
10601152	Nlgn3
10601326	Uprt
10601328	Uprt
10601449	Sh3bgrl
10601459	Pou3f4
10601701	Tmem35
10601729	Drp2
10602068	Mid2
10602198	Pak3
10602454	Fam120c
10602772	Rps6ka3
10603151	Gpm6b
10603425	Glod5
10604451	Enox2
10606056	2610030H06Rik
10606178	Xist
10607910	Msl3

表 2 アストロサイトのリプログラミング過程の細胞より iPS 細胞で発現が低い遺伝子群の GO 解析

Annotation Cluster 1 Enrichment Score: 3.3313017147757016		
Term	Count	PValue
GO:0006928~cell motion	23	6.23E-05
GO:0016477~cell migration	17	1.90E-04
GO:0048870~cell motility	17	0.0012025
GO:0051674~localization of cell	17	0.0012025
GO:0001764~neuron migration	8	0.0012886

Annotation Cluster 2 Enrichment Score: 2.855423016763187		
Term	Count	PValue
GO:0006928~cell motion	23	6.23E-05
GO:0007409~axonogenesis	13	4.94E-04
GO:0048666~neuron development	18	5.86E-04
GO:0031175~neuron projection development	15	6.85E-04
GO:0048812~neuron projection morphogenesis	13	9.75E-04
GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron differentiation	13	0.0013038
GO:0030182~neuron differentiation	21	0.0013043
GO:0030030~cell projection organization	18	0.0015507
GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	14	0.0016252
GO:0007411~axon guidance	9	0.0022158
GO:0048858~cell projection morphogenesis	13	0.0031192
GO:0032990~cell part morphogenesis	13	0.0046491
GO:0000902~cell morphogenesis	16	0.0067923
GO:0032989~cellular component morphogenesis	17	0.0093849

Annotation Cluster 3 Enrichment Score: 2.254233766585647		
Term	Count	PValue
GO:0019899~enzyme binding	15	0.0013706
GO:0019900~kinase binding	8	0.0044363
GO:0019901~protein kinase binding	6	0.0284024

表 3 グループ A に含まれる遺伝子群

Probeset_ID	Gene symbol
10346843	Nrp2
10349637	Fam72a
10349834	Pik3c2b
10350392	Aspm
10350594	Ivns1abp
10350848	2810025M15Rik
10352954	Hmgb3
10353117	Slco5a1
10354286	Kdelc1
10354777	Satb2
10362520	Hdac2
10363161	Tmem229b|Gm5423
10368229	Tbpl1|Slc2a12
10371888	Tmpo
10378754	Fam57a
10382300	Map2k6
10384691	0610010F05Rik
10385557	Cnot6
10389606	Prr11
10389865	Nme1
10396485	Syne2
10396608	Syne2
10397818	Cpsf2
10399725	Sox11
10400357	Baz1a
10403959	Gm11277|Gm13646
10403980	Gm11277|Gm13646
10404024	Hist1h4h
10404049	Hist1h3d|Hist1h3h
10404051	Hist1h4d
10407081	Depdc1b
10408070	Gm11277|Gm13646
10408087	Gm11277|Gm13646
10408202	Hist1h3f|Hist1h3e
10408246	Hist1h3a|Hist1h3g
10408477	E2f3
10410452	Srd5a1
10410743	Ankrd32
10410756	Ankrd32
10416340	Gfra2
10422185	Rnf219
10431792	Pus7l
10436519	Robo1
10436608	Cxadr
10437432	Nmral1
10445558	BC048355
10450006	Hnrnpm|March2
10456184	Apcdd1
10457895	Celf4

Probeset_ID	Gene symbol
10458906	Ppic
10461391	Pcna
10461723	Fam111a
10461856	Gna14
10462752	Btaf1
10463112	Ccnj
10467470	Aldh18a1
10474361	Mpped2
10474381	Kif18a
10474825	D2Ertd750e
10474984	Nusap1|Oip5
10476252	Cdc25b
10476814	Insm1
10482762	Idi1
10484227	Sestd1
10487359	Itpripl1
10487930	Pcna
10490838	Fabp5|Fabp5l2
10492558	Smc4
10494402	Hist2h3c1|Hist2h3c2
10497122	Depdc1a
10498185	Tra2b
10499138	Dclk2
10500333	Hist2h4
10502058	Ap1ar
10503172	Chd7
10503178	Chd7
10503184	Chd7
10503186	Chd7
10503190	Chd7
10503200	Chd7
10503206	Chd7
10503208	Chd7
10503210	Chd7
10503218	Chd7
10503220	Chd7
10503264	Ccne2|Ints8
10503593	6230409E13Rik
10504703	Ncbp1
10508217	Sfpq
10511725	Cyb5r4
10511870	Fut9
10513381	Rod1
10520483	Ept1
10523012	Dck
10524676	Sfrs9
10530406	Gabra2
10530832	2610024G14Rik
10535852	Slc7a1

Probeset_ID	Gene symbol
10536595	Naa38
10537728	Casp2
10543120	Ica1
10545682	Tet3
10546834	Rad18
10554655	Mex3b
10555695	Rrm1
10557843	Fus
10561017	Pafah1b3
10562084	Haus5
10563883	Depdc1a
10568714	Mki67
10569618	Ano1
10570771	Vps36
10577996	Unc5d
10577999	Unc5d
10578193	Eri1
10579049	Gm10033
10579776	Arhgap10
10582809	Tk1
10585699	Fabp5
10586920	Rfx7
10590149	Xylb
10590968	Ankrd49
10593634	Elmod1
10595604	Syncrip
10599612	Phf6
10600017	Hmgb3
10601705	Cenpi
10602805	Mtap7d2
10603431	Suv39h1
10604057	42253
10604799	Atp11c
10604844	Sms
10605493	Prrg1
10606217	Abcb7
10606436	Hmgn5
10607524	Sms|Gm8234

表 4 グループ B に含まれる遺伝子群 (1/3)

Probeset ID	Gene symbol
10344713	Ahcy
10344741	Hnrnpa3
10345025	Iars
10346074	Wdr75
10346365	Sgol2
10346867	Eef1b2
10346878	Zdbf2
10347386	Rqcd1
10347460	Ttll4
10349832	Gm7246
10350297	Kif14
10350838	2810417H13Rik
10351039	Gas5
10351045	
10351138	Rpsa-ps1
10351515	Rnu1b1
10352048	Exo1
10352242	Parp1
10352267	Lin9
10352735	Ints7
10352767	Nek2
10353004	Cks2
10353420	Mcm3
10353674	Lsm5
10353733	Prim2
10354275	1700029F09Rik
10354432	Myo1b
10354542	Pms1
10354732	Hspd1
10355037	Wdr12
10355582	Usp37
10357436	Mcm6
10357808	Snrpe
10357917	Tmem183a
10358457	Bex4
10358849	Dhx9
10359648	Scyl3|BC055324
10359851	Uck2
10360589	Ahctf1
10360737	Rpl35a|Ino80
10360745	Lbr
10361110	Dtl
10361200	AA408296
10361375	Fbxo5
10361651	Nup43
10361995	Fam54a
10362717	Wasf1
10363118	Dcbld1
10363575	Dna2
10364051	Snrpd3
10364890	Sf3a2
10365230	Tdg|Gm5806
10365297	D10Wsu102e
10365450	Pwp1
10365833	Usp44
10365899	Ccdc41
10366301	Rpl6|Gm6807
10366337	Nap1l1
10366814	Cdk4
10367076	Prim1
10367179	Timeless
10367641	Mthfd1l
10368041	3110003A17Rik
10368199	Myb
10368270	Rps12|Gm10063
10368277	Rps12
10368317	Enpp3
10368370	Gm8681
10368508	2610036L11Rik
10368670	Amd1|Amd2
10368730	Rpf2
10368748	Amd1|Amd2
10368883	Tdg|Gm5806
10369206	Rps8
10369630	Ddx21
10369688	Tet1
10369690	Tet1
10369702	Tet1
10369815	Cdk1
10370021	Mif
10370632	Rnf126
10371591	4930547N16Rik
10371770	Gas2l3
10371981	Snrpf|Ccdc38
10372600	Cct2
10372656	Cpsf6
10372687	Nup107
10372796	Hmga2
10373202	Shmt2
10373454	Pa2g4
10373530	Cdk2
10373569	Rpsa|Gm9819
10374706	Pus10
10375487	Gnb2l1
10375497	
10375501	Snord95
10375880	Nhp2
10375903	Cdkn2aipnl
10376230	G3bp1
10376239	Gm12238
10376459	Gm12260
10377405	Aurkb
10378088	Mybbp1a
10378508	Tsr1|Srr
10378802	Blmh
10379127	Spag5
10379363	Atad5
10379564	Lig3|Rffl
10380210	Sfrs1
10380321	Mbtd1
10381072	Cdc6
10381526	Ppih
10381548	BC030867
10382542	Nup85|Hmgb1
10382888	2810008D09Rik
10382998	Birc5
10383479	Hmga1
10384032	Pold2
10384192	Tbrg4
10384398	Grb10
10384486	Etaa1
10385034	Rpsa
10385043	Npm1
10385248	Hmmr
10385375	Thg1l
10385686	Hnrnpab
10386125	Gemin5
10386543	Pabpc4
10386548	Pabpc
10386604	Shmt1
10387871	Pelp1
10388010	C1qbp
10388234	Gsg2
10388749	Traf4
10388784	Rpl23a
10388880	Tmem97
10389627	Rad51c
10389842	Utp18
10389875	Rpl27
10390050	Eme1
10390502	Rpl23
10390505	Snora21
10390707	Top2a
10391461	Brca1
10391811	Kif18b
10391985	Taf1d
10392098	Ftsj3
10392284	Kpna2
10392328	Nol11
10393387	Jmjd6
10393395	Sfrs2
10393406	Gm8624
10393431	Tk1
10393844	Thoc4
10394978	Rrm2
10395908	
10396030	Fancm
10396068	Ppil5
10397143	2410016O06Rik
10397719	Tdp1
10398173	Vrk1
10398451	Rps25
10398599	Rps19
10399087	Ncapg2
10399391	Gen1
10399421	Mycn
10399636	Mrto4
10400030	Bzw2
10400141	Zbed4
10400589	C79407
10400649	Pole2
10402650	Cinp
10403511	Heatr1
10403903	Trim27
10403941	Hist1h3g
10403943	Hist1h2bm
10403945	Gm11275
10403948	Hist1h2be
10403978	Gm11277
10404028	Hist1h3g
10404061	Hist1h2bb
10404063	Hist1h2ab
10404065	Hist2h3b
10404069	Hist1h1a
10404262	Rps8
10404354	Rps18|Gm10260
10404848	Jarid2
10405094	Iars
10405185	Cks2
10405236	Sfxn1
10405511	Ddx46
10405739	Taf1d
10405971	Nsun2
10406024	Rps28|Gm16417
10406226	Hnrnpa1l2
10406782	Fam169a
10407120	Rps3a|Gm9000
10408008	
10408077	Hist1h2ak
10408081	Hist1h1b
10408083	Hist1h3g
10408197	Hist1h2bh
10408200	Hist1h4f
10408210	Hist1h2bc
10408225	Hist1h4c
10408239	Hist1h3f
10408762	Eef1e1
10409968	Rps18
10409988	Taf1d
10410560	Trip13
10410877	Polr3g
10411432	Utp15
10411728	Cenph
10411739	Ccnb1|Gm5593
10412177	Skiv2l2
10413710	Nt5dc2|Stab1
10414256	Rbmxrt
10414522	Apex1
10414767	Rps19|Gm13143
10414874	Rps19|Gm13143
10415640	Snora65|Rpl12
10415660	Rpl13
10416175	Nefl
10416375	Med4
10416736	6720463M24Rik
10416958	Mir92-1|Mirhg1
10418480	Gnl3
10419296	Wdhd1
10419323	Dlgap5
10419611	Supt16h|Rpgrip1
10420390	Xpo4
10420426	F630043A04Rik
10420628	
10420877	Esco2
10421029	Cdca2
10421817	Naa16
10421908	Rps3a
10421917	Pabpc4
10421981	Dis3|Pibf1
10422854	Nup155
10423068	Rad1
10423629	Pop1
10424188	Mtbp
10424676	Ly6e
10424779	Cks2
10425012	Zfp7
10425018	Rpl8
10425046	Apol7e
10426093	Zbed4
10426669	Troap
10426689	Spats2
10427026	Grasp
10427166	Espl1
10427310	Hnrnpa1
10427606	Skp2
10427885	Gm5803
10428074	Rpl30
10428412	Nudcd1
10428672	Dscc1
10428763	Atad2
10429908	Bop1
10430778	Phf5a
10430871	Tdg|Gm5806
10432511	Racgap1
10433904	Yars2
10434252	Hira
10434668	Tmem97
10434741	
10434745	
10435075	Tfrc
10435455	Gm10237
10435581	Polq
10435897	BC027231
10436106	C330027C09Rik
10436348	Tomm70a
10436442	Fam60a
10437040	Chaf1b
10437222	Hnrnpa3
10437627	Rpl35a
10437934	Rpsa|Gm9819
10437945	Mcm4
10438091	2610318N02Rik
10438308	Ranbp1
10438378	Cdc45
10438603	Igf2bp2
10438690	Rfc4|Eif4a2
10439130	Umps
10439532	Qtrtd1
10439762	Ahcy
10440661	Rpl13
10440794	2610039C10Rik
10440929	Gart
10441107	Psmg1
10441811	
10441987	Chd1

表 4 グループ B に含まれる遺伝子群 (2/3)

Probeset ID	Gene symbol
10442435	Rnps1
10443459	Sfrs3
10443836	Rrp1b
10444098	Wdr46
10444595	Lsm2
10444605	Vars
10444927	Nrm
10445008	Lsm5
10445071	Zfp57
10445894	Erh
10446027	Chaf1a|Ubxn6
10446074	Uhrf1
10446693	Wdr43
10447395	Msh2
10447417	Msh6|Fbxo11
10447510	Amd1
10447515	U2af1
10447589	Fbl
10447702	Ppih|Gm10069
10448506	Ccnf
10448707	Tbl3
10449242	Snrpg
10449452	Fkbp5
10449471	Srpk1
10449549	Ino80|Rpl35a
10449731	U2af1
10449839	Akap8
10449999	Zfp101
10450050	Rps28|Gm16417
10450063	Rps18|Gm10260
10451123	Slc29a1
10451238	Polr1c
10451580	Bysl
10451805	Sgol1
10452709	Ndc80
10452867	Dpy30
10453102	Sfrs7
10453512	Kpna2
10453632	Rpl7a|Rpl7a-ps3
10453690	Rpl27
10453715	Rab18
10453825	Snrpd1
10454606	Wdr36
10454651	
10454709	Kif20a|Cdc23
10454807	Snora74a
10454984	Wdr55|Dnd1
10455346	Tcerg1
10455813	Lmnb1
10455967	2610318N02Rik
10457583	
10457920	Rps25|Gm4963
10458195	Cdc25c
10459389	Amd1|Amd2
10459930	Ctdp1
10460738	Cdca5
10461022	Ppp1r14b
10461057	Rcor2
10461148	Snhg1
10461150	
10461152	Snhg1
10461158	Snhg1
10461160	
10461164	Wdr74
10461191	Nxf1
10462346	Rcl1
10462632	Kif20b
10462796	Kif11
10462866	Cep55
10462973	Hells
10463517	Pprc1
10463535	Nolc1
10463739	Taf5
10464388	Rps12
10464819	Rbm14
10465005	Banf1
10465282	Pola2
10465638	Naa40
10465861	Incenp
10465912	Fen1|Gm10143
10466374	Tle4
10466423	Cep78
10467637	Arhgap19
10467941	Cwf19l1
10468081	Npm3|Npm3-ps1
10469070	Nudt5|Cdc123
10469712	Pdss1
10469849	Zmynd19
10470314	
10470893	Set|BC085271
10470911	
10470973	Nup188
10471191	Exosc2
10471503	Taf1d
10472058	Rif1
10472782	Hat1
10472916	Cdca7
10473008	Hnrnpa3
10473650	Nup160
10474526	Lpcat4
10474769	Bub1b
10474875	Casc5
10475362	Wdr76
10475610	Dut
10475965	Polr1b
10476093	Nop56
10476104	
10476989	Gins1
10477187	Tpx2
10478355	Mybl2
10478572	Ube2c|Tnnc2
10478799	Cse1l
10478825	Ddx27
10479041	Rbm38
10479174	Rps8|Rps8-ps1
10479187	Rps8|Rps8-ps1
10479215	Rps8|Rps8-ps1
10479560	Rtel1
10479765	Suv39h2|Dclre1c
10479809	Rps28|Gm16417
10479811	Mcm10
10480541	Ehmt1
10482496	Gm13487
10484425	2700094K13Rik
10485483	Nat10
10485685	Rpl35a|Ino80
10486255	Oip5|Nusap1
10487252	Gabpb1
10487340	Ncaph
10487480	Bub1
10488254	
10488816	Ahcy
10489186	Rpl35a
10489239	9430008C03Rik
10490104	Aurka
10490256	Rps8|Rps8-ps1
10490903	Car13
10491805	Plk4
10491860	Phf17
10492045	Hnrnpa3
10492229	Rpl13
10493103	Isg20l2
10493120	Gpatch4
10493245	Mex3a
10493770	Ilf2|Snapin
10494405	Hist2h3b
10494407	Hist2h2bb
10494411	Rnu1b1|Rnu1b2
10494413	Rnu1b1|Rnu1b2
10494417	Rnu1b1|Rnu1b2
10494421	Rnu1b1|Rnu1b2
10495111	Wdr77
10495596	Frrs1
10495935	4930422G04Rik
10495993	Elovl6
10496204	Cenpe
10496379	H2afz
10496892	Fubp1
10497503	Kpna2
10497520	Ect2
10497831	Ccna2
10498168	Exosc8
10499121	Rps3a
10499128	Rnu73a
10499366	Pmf1
10499639	Cks1b
10500157	Setdb1
10500343	Rnu1b1|Rnu1b2
10500356	Rnu1b1
10500358	Rnu1b1
10500582	Wdr3|Spag17
10500960	Ddx20
10501179	Rpl13
10501922	Snhg8|Snora24
10501963	Ugt8a
10502146	Gar1
10502787	Rpsa|Gm9819
10503166	Chd7
10503174	Chd7
10503176	Chd7
10503180	Chd7
10503182	Chd7
10503188	Chd7
10503194	Chd7
10503196	Chd7
10503198	Chd7
10503202	Chd7
10503212	Chd7
10503214	Chd7
10503222	Chd7
10503249	Rpl13
10503370	Hnrnpa3
10503617	F730047E07Rik
10503659	Epha7
10503711	Casp8ap2
10503723	Mdn1
10504470	Melk
10504891	Tmeff1
10504957	Smc2
10505282	Prpf4
10505705	Sh3gl2
10506118	Usp1
10506822	Orc1l
10506880	Kti12
10507112	Stil
10507557	Ebna1bp2
10507653	
10507851	Pabpc4
10508151	Clspn
10508465	Marcksl1
10508719	Snora16a
10508723	Snora61
10509161	
10509820	Rcc2
10510172	Hmgb2
10510391	Srm
10510629	Nol9
10510687	Acot7
10511325	Rps20
10512867	Tex10|Invs
10512935	Amd1|Amd2
10512937	Rnu1b1|Rnu1b2
10513397	1110054O05Rik
10513878	Rps18|Gm10260
10514201	Haus6
10514352	Elavl2
10515113	Hnrnpa3
10515257	Rad54l
10515337	Nasp
10515416	Rps8
10515425	Snord38a
10515431	Kif2c
10515744	Cdc20
10515836	Ccnb1|Gm5593
10515884	Ppih|Gm10069
10516246	Cdca8
10516479	Rps28|Gm16417
10516894	Rcc1
10517587	Alpl
10517706	Mrto4
10518350	Hmgb2
10518352	Hmgb2
10518532	Tardbp|Masp2
10518568	Gm13208
10519713	LOC635773
10520521	Cenpa
10520650	Cad
10521036	Ino80|Rpl35a
10521090	Tacc3
10521555	Lyar
10521690	Ppih|Gm10069
10521731	Ncapg
10523058	Eif5a|Eif5al3
10523802	Cdc7
10523905	Mtf2
10524169	Pole
10524266	Chek2
10524415	Rps28|Gm16417
10525271	Naa25
10525591	Kntc1
10525983	Ran
10526215	Rps28|Gm16417
10526217	Rfc2
10527455	Cpsf4
10527508	Cdk8
10527801	Brca2
10528077	Dbf4
10528143	Ppp1r14b
10528200	Hnrnpa3
10528238	Phtf2
10528840	Paxip1
10528915	Tyms|Tyms-ps
10529142	Ppm1g
10529995	Dhx15
10530806	Ppat
10531340	Rpl13
10531383	Sdad1
10531633	Hnrnpd
10532390	Noc4l
10532720	Sart3
10533090	Rfc5
10533626	Rpl35a
10534694	Srrt
10534974	Mcm7
10535979	Rfc3
10537246	Nup205
10538080	Ino80|Rpl35a
10538420	Gars
10538832	Mad2l1
10539042	Polr1a
10539574	Npm3-ps1
10539592	Smyd5
10539700	Rps28|Gm16417
10539702	Fam136a
10540227	Kbtbd8

表 4 グループ B に含まれる遺伝子群 (3/3)

Probeset ID	Gene symbol
10540542	Gm6134
10540738	Fancd2
10540999	H2afz
10541260	Cecr2
10541845	Nop2
10542722	Rps25|Gm4963
10543031	Slc25a13
10543067	Asns
10543080	Rnps1
10543471	Pot1a
10543572	Impdh1
10544106	Zc3hav1
10544501	Ezh2
10544971	Lsm5
10545479	Tmsb10
10545672	Mthfd2
10546163	Mcm2
10546294	Nup210
10546710	Shq1
10546805	Ddx18
10547073	Snora7a
10547251	Bms1
10547758	Emg1|Lpcat3
10547943	Ncapd2
10548086	Rad51ap1
10548194	Fkbp4
10548585	Csda
10548699	Gm8956
10548857	Hist4h4
10549222	Bcat1
10549497	Fam60a
10550052	Rps5
10550076	Trim28
10550102	Lig1
10550332	Slc1a5
10551009	Tmsb10
10551021	Rps19
10551464	Fbl
10552622	2410002F23Rik
10552740	Nup62
10552874	Tead2
10553993	Snrpa1
10554281	Fanci|Polg
10554325	5730590G19Rik
10554969	Odz4
10555087	
10556206	Snora3
10556242	
10556244	Snora23
10556246	Zfp143
10557156	Plk1
10557439	Ccdc101
10557519	Hirip3
10558134	Plekha1
10558773	B4galnt4
10558919	Snora52
10559818	
10560103	Rps8
10561806	Mif

Probeset ID	Gene symbol
10561956	Rps12
10562563	Ccne1
10562637	Ccnb1|Gm5593
10562818	Pold1
10563014	Prmt1
10563275	Ruvbl2|Gys1
10563780	E2f8
10564520	Snora21
10564663	Tdg|Gm5806
10564978	Blm
10565434	Rps13
10565570	4632434I11Rik
10565582	Rps8|Gm11353
10565811	Snord15b
10565813	Snord15a
10565862	Pold3
10567163	Rps13
10567343	2310008H09Rik
10567407	Thumpd1
10568150	Kif22
10568217	Dctpp1
10568731	
10570373	Tfdp1
10570432	Snora3
10571288	Gtf2e2
10571870	Hmgb2
10572432	Isyna1
10572449	Lsm4
10572906	Mcm5
10573217	Ddx39
10573261	Asf1b
10573451	Syce2
10573615	Orc6l
10573693	Rps13
10574427	Impdh2
10574985	Slc7a6
10574996	Prmt7
10575102	Cirh1a
10575733	Cenpn
10576140	Cdt1
10576210	Rpl13
10576246	Rps12|Gm10063
10576403	Urb2
10576883	Shcbp1
10578027	Mak16
10578964	1810029B16Rik
10579828	Rps25|Gm4963
10579830	Rbmxrt
10580274	Rnaseh2a
10581535	Rps18|Gm10260
10581547	Nob1
10582501	Fanca
10582599	Nup133
10582642	Taf5l
10582981	Tfdp1
10583297	Taf1d
10583312	Taf1d
10583314	Taf1d
10583316	Taf1d

Probeset ID	Gene symbol
10583318	Taf1d
10583496	Ppan
10583676	Yipf2|Carm1
10583952	Ncapd3
10584580	Snord14e
10584710	H2afx
10584752	Rps25|Gm4963
10585099	Usp28
10585381	Slc35f2
10585703	Rpp25
10586184	Tipin
10586448	2810417H13Rik
10587486	Set|BC085271
10587508	Ttk
10588294	Topbp1
10588707	Ifrd2
10589041	Impdh2
10589420	Cdc25a
10589466	Smarcc1
10590253	Rpsa|Gm9819
10590320	Rpl14
10590494	Kif15
10590549	Exosc7
10590972	Mif
10591369	Dnmt1
10591430	Raver1
10592201	Chek1
10594251	Kif23
10594426	Zwilch|Lctl
10594774	Ccnb2
10595614	2810026P18Rik
10597969	Gm10052
10598180	BC085271
10598794	
10598848	Phf16
10599498	Utp14a
10599554	Rbmx2
10600355	Snora70
10600485	Dkc1
10600593	Hnrnpa3
10601011	Kif4
10601335	2610029G23Rik
10601471	Gm5393
10601593	Gm7567
10601601	Gm7567
10601768	Armcx4
10601850	Bex4|Bex1
10602173	Gm5643
10602223	Alg13
10603627	Bcor
10604053	Nkrf
10605674	Pola1
10605986	Slc7a3
10606393	Brwd3
10606445	Rps6ka6
10606868	Bex1
10607089	Acsl4
10607116	Ammecr1
10607747	Siah1b

考察

本研究で私は、マウスのアストロサイトが神経幹細胞様状態を経由して iPS 細胞へとリプログラミングされることを明らかにした。これまでに OKSM を用いてアストロサイトから iPS 細胞を作製したという報告は存在したが、OKS や OK の組み合わせを用いてアストロサイトから iPS 細胞を作製したのは、本研究が初めてである。

アストロサイトのリプログラミング過程を詳細に調べることにより、神経幹細胞特異的な転写因子である Sox1 が、アストロサイトのリプログラミングの中間期のマーカーであることを明らかにした。Sox1 のノックアウトが OK を用いたリプログラミング効率を劇的に減少させたことから、リプログラミング過程における Sox1 の発現上昇の重要性が示唆された。また、リプログラミング過程で Sox1 陽性となった細胞からより多くの iPS 細胞コロニーが形成されたことから、Sox1 陽性となった細胞が後に iPS 細胞になる運命にあることが示唆された。Sox1 陽性状態を経由せずに、iPS 細胞になる細胞が存在するのかについては、本研究で明らかにすることはできなかった。OKSM 導入 6 日目時点で Sox1 陰性であった細胞からも一週間後に iPS 細胞コロニーが形成されたが(図 9C)、「一度も Sox1 を発現せずに iPS 細胞になったのか」あるいは「OKSM 導入後 6 日目以降に Sox1 の発現が上昇し、その後 iPS 細胞になったのか」についてはわからない。Sox1 のプロモーター制御下で Cre/loxP システムが作動する系を用いて、細胞運命追跡実験を行い、何%の iPS 細胞が Sox1 陽性細胞に由来するのかを明らかにすることが今後の課題である。

さらに、アストロサイトのリプログラミング過程において Sox1 陽性となった細胞における遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより解析した結果、リプログラミング過程の Sox1 陽性細胞は、多様な細胞系譜の中で神経細胞系譜に最も近く、神経幹細胞に類似していることを見出した。また、神経幹細胞で重要な役割を果たす幹

細胞性の遺伝子の発現がリプログラミング過程で上昇していることを見出した。アストロサイトのリプログラミング中間期の細胞において、神経細胞系譜の遺伝子と幹細胞性の遺伝子の両方が発現していることが、Sox1 のような神経幹細胞特異的遺伝子が一過的に発現する要因になっているのではないかと考えられる。また、アストロサイトのリプログラミング中期の細胞はニューロンとグリア細胞の両方に分化可能なニューロスフィアを形成することができたことから、分化能という点でも神経幹細胞に類似していることが示された。通常の神経発生では、まず神経幹細胞はニューロンに主に分化し、発生が進むに従い、ニューロンへの分化能を失い、逆にグリア細胞への分化能が上昇することが報告されている(Okada et al., 2008)。アストロサイトのリプログラミング過程の細胞は、まずグリア細胞に主に分化し、その後ニューロンへの分化能が上昇したことから、細胞の分化能が、神経発生過程とアストロサイトのリプログラミング過程で逆に変化する点が非常に興味深い。

先行研究において、アストロサイトから OKSM を用いて樹立した iPS 細胞株は、MEF から樹立した iPS 細胞株よりもニューロンへの分化能が高いことが報告されている(Tian et al., 2011)。また、継代数が少ない iPS 細胞株は、ドナー細胞のエピジェネティックな記憶を残しており、iPS 細胞の分化能にも影響があることが報告されている(Kim et al., 2010; Polo et al., 2010)。例えば、血球細胞から樹立した iPS 細胞株は、血球細胞特異的な DNA メチル化パターンを部分的に示し、繊維芽細胞から樹立した iPS 細胞株よりも造血能力が高い。したがって、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞は神経幹細胞様の遺伝子発現だけではなく、神経幹細胞様のエピジェネティックな状態を獲得している可能性がある。今後、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞における DNA メチル化状態やヒストン修飾状態を解析することで、リプログラミング過程の細胞がニューロンへの分化能を獲得し、アストロサイト由来の iPS 細胞がニューロンへの高い分化能を示す原因となる分子機構を明らかにするこ

とができると考えられる。

これまでに、様々な細胞種から iPS 細胞を作製できることが報告されていた。しかしながら、リプログラミング過程を詳細に解析した研究は少なく、異なるドナー細胞に由来するリプログラミング中間遷移状態に共通する性質、あるいは異なる性質はほとんどわかっていない。本研究では、アストロサイトのリプログラミング過程と MEF のリプログラミング過程を比較し、アストロサイトと MEF のリプログラミング過程の細胞が異なる性質を示すことを明らかにした。近年、iPS 細胞誘導の技術を応用して、分化細胞から別の細胞へと変換させるダイレクトリプログラミングの研究も盛んに行われている。これまでに、繊維芽細胞にリプログラミング因子を一過的に導入し、その後分化用培地で培養することで、神経幹細胞や心筋細胞に分化できることが報告されている(Efe et al., 2011; Kim et al., 2011; Matsui et al., 2012; Thier et al., 2012)。本研究では、アストロサイトのリプログラミング過程の細胞が神経幹細胞様の性質を獲得し、MEF のリプログラミング過程の細胞よりも高いニューロン分化能を有することが明らかとなった。したがって、様々な細胞種由来のリプログラミング過程の細胞の性質が明らかとなれば、ダイレクトリプログラミングに適したドナー細胞と目的細胞を選択できるようになるかもしれない。

本研究成果により、分化細胞が組織幹細胞・前駆細胞の状態を経由して多能性を獲得すること、リプログラミング過程が部分的に発生・分化過程を逆行することが示唆された(図 21)。別の研究グループにより、膵臓の分化細胞と肝臓の分化細胞に短期間リプログラミング因子を発現させることで、それぞれの組織前駆細胞様状態を誘導したという報告がなされた(Noguchi et al., 2015)。この結果は、アストロサイト以外の分化細胞を用いた場合にも、組織幹細胞・前駆細胞の状態を経由して iPS 細胞になる可能性を示唆している。また、最近では、ヒトの繊維芽細胞のリプログラミング過程における遺伝子発現、DNA メチル化状態、ヒストン修飾状態を網羅的に解析した結

果、胚発生を逆行するような変化が見られたことが報告された(Cacchiarelli et al., 2015)。したがって、リプログラミング過程が発生・分化過程を逆行することは、リプログラミング全般に共通する現象である可能性が高まった。今後、様々な細胞種由来のリプログラミング過程の性質が解明されることが期待される。

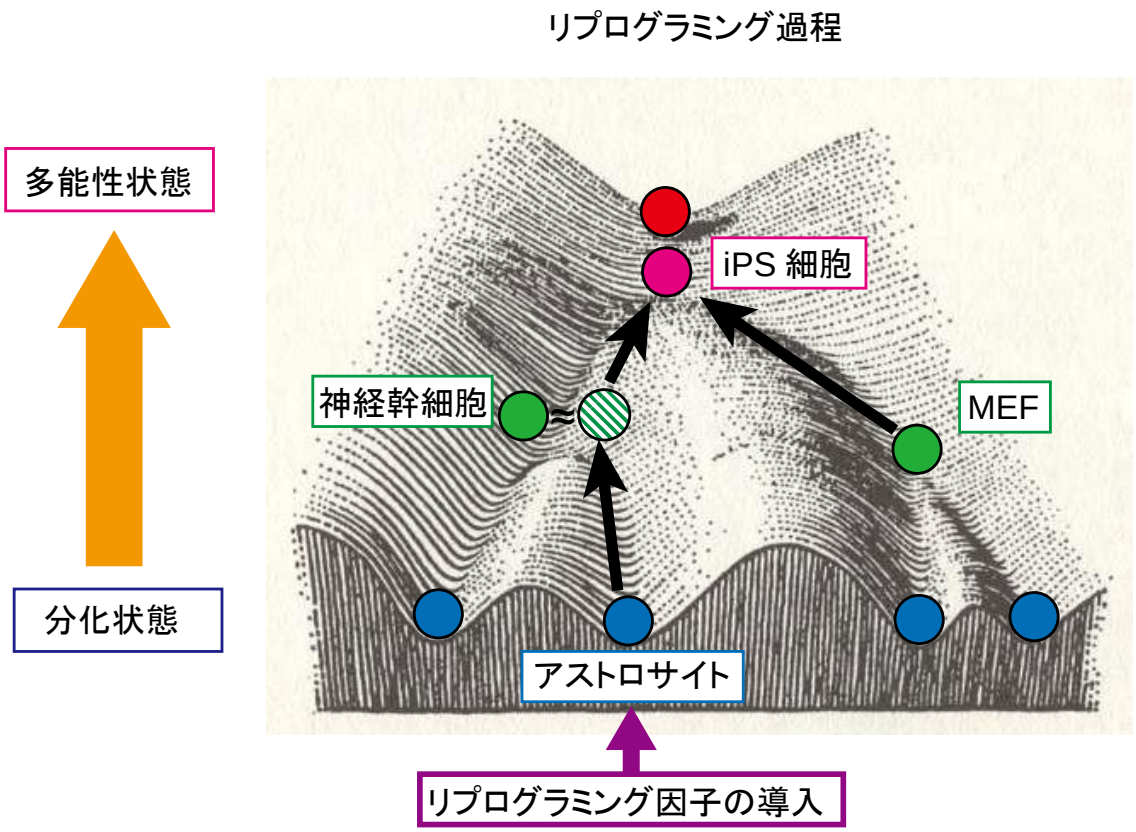


図 21　リプログラミング過程のモデル図

アストロサイトは神経幹細胞様状態を経由して iPS 細胞へとリプログラミングされる。
MEF は神経幹細胞様状態を経由せずに iPS 細胞へとリプログラミングされる。

引用文献

Aubert, J., Stavridis, M.P., Tweedie, S., O'Reilly, M., Vierlinger, K., Li, M., Ghazal, P., Pratt, T., Mason, J.O., Roy, D.*, et al.* (2003). Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100 Suppl 1*, 11836-11841.

Bergsland, M., Ramskold, D., Zaouter, C., Klum, S., Sandberg, R., and Muhr, J. (2011). Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. Genes Dev. *25*, 2453-2464.

Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S.L., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. Cell *150*, 1209-1222.

Buganim, Y., Faddah, D.A., and Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. Nat. Rev. Genet. *14*, 427-439.

Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B.G., and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. Nat. Neurosci. *6*, 1162-1168.

Cacchiarelli, D., Trapnell, C., Ziller, M.J., Soumillon, M., Cesana, M., Karnik, R., Donaghey, J., Smith, Z.D., Ratanasirintrawoot, S., Zhang, X.*, et al.* (2015). Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. Cell *162*, 412-424.

Chen, T., Yuan, D., Wei, B., Jiang, J., Kang, J., Ling, K., Gu, Y., Li, J., Xiao, L., and Pei, G. (2010). E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. Stem Cells *28*, 1315-1325.

Efe, J.A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., and Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. Nat. Cell Biol. *13*, 215-222.

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008).

Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. Stem Cells *26*, 2467-2474.

Golipour, A., David, L., Liu, Y., Jayakumaran, G., Hirsch, C.L., Trcka, D., and Wrana, J.L. (2012). A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. Cell Stem Cell *11*, 769-782.

Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. Neuron *39*, 749-765.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F.*, et al.* (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *97*, 2229-2234.

Hussein, S.M., Puri, M.C., Tonge, P.D., Benevento, M., Corso, A.J., Clancy, J.L., Mosbergen, R., Li, M., Lee, D.S., Cloonan, N.*, et al.* (2014). Genome-wide characterization of the routes to pluripotency. Nature *516*, 198-206.

Imura, T., Kornblum, H.I., and Sofroniew, M.V. (2003). The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. J. Neurosci. *23*, 2824-2832.

Imura, T., Nakano, I., Kornblum, H.I., and Sofroniew, M.V. (2006). Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes. Glia *53*, 277-293.

Kim, J., Efe, J.A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., Lipton, S.A., Zhang, K., and Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *108*, 7838-7843.

Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M.*, et al.* (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature *454*, 646-650.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature *467*, 285-290.

Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003). Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. Exp. Hematol. *31*, 1007-1014.

Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. Genes Dev. *16*, 2699-2712.

Koche, R.P., Smith, Z.D., Adli, M., Gu, H., Ku, M., Gnirke, A., Bernstein, B.E., and Meissner, A. (2011). Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. Cell Stem Cell *8*, 96-105.

Koga, M., Matsuda, M., Kawamura, T., Sogo, T., Shigeno, A., Nishida, E., and Ebisuya, M. (2014). Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. Nat. Commun. *5*, 3197.

Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., *et al.* (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell *7*, 51-63.

Li, T., Yang, D., Li, J., Tang, Y., Yang, J., and Le, W. (2015). Critical role of Tet3 in neural progenitor cell maintenance and terminal differentiation. Mol. Neurobiol. *51*, 142-154.

Matsui, T., Takano, M., Yoshida, K., Ono, S., Fujisaki, C., Matsuzaki, Y., Toyama, Y., Nakamura, M., Okano, H., and Akamatsu, W. (2012). Neural stem cells directly differentiated from partially reprogrammed fibroblasts rapidly acquire gliogenic competency. Stem Cells *30*, 1109-1119.

Matsumata, M., Sakayori, N., Maekawa, M., Owada, Y., Yoshikawa, T., and Osumi, N. (2012). The effects of Fabp7 and Fabp5 on postnatal hippocampal neurogenesis in the mouse. Stem Cells *30*, 1532-1543.

Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature *454*, 49-55.

Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F., and Morrison, S.J. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. Nature *425*, 962-967.

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

Nishino, J., Kim, I., Chada, K., and Morrison, S.J. (2008). Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. Cell *135*, 227-239.

Noguchi, H., Saitoh, I., Tsugata, T., Kataoka, H., Watanabe, M., and Noguchi, Y. (2015). Induction of tissue-specific stem cells by reprogramming factors, and tissue-specific selection. Cell Death Differ. *22*, 145-155.

O'Malley, J., Skylaki, S., Iwabuchi, K.A., Chantzoura, E., Ruetz, T., Johnsson, A., Tomlinson, S.R., Linnarsson, S., and Kaji, K. (2013). High-resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells. Nature *499*, 88-91.

Okada, Y., Matsumoto, A., Shimazaki, T., Enoki, R., Koizumi, A., Ishii, S., Itoyama, Y., Sobue, G., and Okano, H. (2008). Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell-derived neural stem/progenitor cells. Stem Cells *26*, 3086-3098.

Okamoto, K., Fujisawa, J., Reth, M., and Yonehara, S. (2006). Human T-cell leukemia virus type-I oncoprotein Tax inhibits Fas-mediated apoptosis by inducing cellular FLIP through activation of NF-kappaB. Genes Cells *11*, 177-191.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent

induced pluripotent stem cells. Nature *448*, 313-317.

Pereira, J.D., Sansom, S.N., Smith, J., Dobenecker, M.W., Tarakhovsky, A., and Livesey, F.J. (2010). Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *107*, 15957-15962.

Pevny, L.H., Sockanathan, S., Placzek, M., and Lovell-Badge, R. (1998). A role for SOX1 in neural determination. Development *125*, 1967-1978.

Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J.*, et al.* (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. Cell *151*, 1617-1632.

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T.*, et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *28*, 848-855.

Raverot, G., Weiss, J., Park, S.Y., Hurley, L., and Jameson, J.L. (2005). Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. Dev. Biol. *283*, 215-225.

Ruiz, S., Brennand, K., Panopoulos, A.D., Herrerias, A., Gage, F.H., and Izpisua-Belmonte, J.C. (2010). High-efficient generation of induced pluripotent stem cells from human astrocytes. PloS one *5*, e15526.

Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.K., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J.L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. Cell Stem Cell *7*, 64-77.

Sarkar, A., and Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. Cell Stem Cell *12*, 15-30.

Shi, Y., Do, J.T., Desponts, C., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008). A

combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *2*, 525-528.

Smith, Z.D., Nachman, I., Regev, A., and Meissner, A. (2010). Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. Nat. Biotechnol. *28*, 521-526.

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. Cell *136*, 364-377.

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

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Sasaki, A., Yamamoto, M., Nakamura, M., Sutou, K., Osafune, K., and Yamanaka, S. (2014). Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. Nat. Commun. *5*, 3678.

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

Thier, M., Worsdorfer, P., Lakes, Y.B., Gorris, R., Herms, S., Opitz, T., Seiferling, D., Quandel, T., Hoffmann, P., Nothen, M.M.*, et al.* (2012). Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. Cell Stem Cell *10*, 473-479.

Tian, C., Wang, Y., Sun, L., Ma, K., and Zheng, J.C. (2011). Reprogrammed mouse astrocytes retain a "memory" of tissue origin and possess more tendencies for neuronal differentiation than reprogrammed mouse embryonic fibroblasts. Protein Cell *2*, 128-140.

Waddington, C.H. (1957). The strategy of the genes. Allen & Unwin, London.

Wang, Y., Lin, L., Lai, H., Parada, L.F., and Lei, L. (2013). Transcription factor Sox11 is essential for both embryonic and adult neurogenesis. Dev. Dyn. *242*,

638-653.

Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell *2*, 10-12.

Wood, H.B., and Episkopou, V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. Mech. Dev. *86*, 197-201.

Yagi, H., Saito, T., Yanagisawa, M., Yu, R.K., and Kato, K. (2012). Lewis X-carrying N-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the Notch signaling pathway. J. Biol. Chem. *287*, 24356-24364.

Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. Cell *137*, 13-17.

Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. Nat. Biotechnol. *21*, 183-186.

Zhang, R.R., Cui, Q.Y., Murai, K., Lim, Y.C., Smith, Z.D., Jin, S., Ye, P., Rosa, L., Lee, Y.K., Wu, H.P.*, et al.* (2013). Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. Cell Stem Cell *13*, 237-245.

謝辞

本研究を進めるにあたり、学部生時代から長きにわたり、多くのご指導ご鞭撻を賜りました西田栄介教授に厚く御礼申し上げます。西田先生には、実験や論文作成に対して多くのご助言をいただいただけでなく、研究者としての姿勢や心構えなど様々な面で親身にご指導いただきました。また、私が研究と育児を両立できるように多大なるご配慮をいただきました。本研究を遂行することができましたのもひとえに西田先生の温かいご支援のおかげです。

李俊成博士には、実験系の立ち上げから日々の実験のサポートまで、多くの面で助けていただきました。山本拓也博士には、本研究を進めていく中でFACS解析、マイクロアレイ解析について多くの貴重なご助言をいただきました。山本先生がレポーターマウスを用いた実験を勧めてくださったおかげで、この研究を進展させることができました。太田翔博士には、セルソーティングの実験にご協力いただきました。御三方の協力なしには、実験を遂行することはできませんでした。深く感謝いたします。

今城正道博士には、研究室に配属された当初、右も左もわからなかった私に、研究の進め方や考え方、実験手技について一から丁寧にご指導いただきました。また、戎家美紀博士には、マイクロアレイの解析方法、リプログラミング誘導の系の立ち上げについてご指導いただき、多くの貴重なご助言をいただきました。私が研究者としての素養を磨くことができましたのも、先輩方のご指導のおかげです。深く感謝いたします。また、修士課程・博士課程の間、副指導教員として折々にご助言いただいた上村匡教授に感謝いたします。そして、国際学生セミナーの実行委員会でご一緒して以来、折に触れて激励のお言葉をいただいた米原伸教授に感謝いたします。西田研究室の皆様には常日頃から建設的な議論をしていただき、感謝しております。

最後に、いつも温かく見守り、支えてくれた夫と両親にこの場を借りて心から感謝し

ます。そして、息子の健太朗、いつも元気をくれてありがとう。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

May Nakajima-Koyama, Joonseong Lee, Sho Ohta, Takuya Yamamoto,

and Eisuke Nishida

Induction of Pluripotency in Astrocytes through a Neural Stem Cell-Like State

The Journal of Biological Chemistry, 290(52), 31173-31188, 2015.

This research was originally published in The Journal of Biological Chemistry. May Nakajima-Koyama, Joonseong Lee, Sho Ohta, Takuya Yamamoto, and Eisuke Nishida. Induction of Pluripotency in Astrocytes through a Neural Stem Cell-Like State. *The Journal of Biological Chemistry,* 290(52), 31173-31188, 2015. © The American Society for Biochemistry and Molecular Biology