

博士論文

低分子化合物と無血清培地を用いた
多能性幹細胞からの骨芽細胞分化誘導法の開発

菅家 康介

低分子化合物と無血清培地を用いた
多能性幹細胞からの骨芽細胞分化誘導法の開発

菅家 康介

目次

序文	p6~
第1章 マウス ES 細胞を用いた中胚葉誘導及び骨芽細胞誘導の最適化	p12~
背景と目的	
1-1 材料と方法	
1-1-1 細胞培養	
1-1-2 Real-time PCR	
1-1-3 統計学的解析	
1-2 結果	
1-2-1 CHIR99021 の曝露による中胚葉誘導効果の検討	
1-2-2 CHIR による中胚葉誘導後、SAG と TH の同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果の検討	
1-2-3 中胚葉誘導期間が中胚葉分化マーカー遺伝子及び骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現に与える影響の検討	
1-2-4 Cyclopamine 及び CHIR の同時曝露による外胚葉分化阻害と骨芽細胞分化促進効果の検討	
1-3 小括	
図	
第2章 マウス ES 細胞を用いた骨芽細胞分化誘導法の検証	p28~
背景と目的	
2-1 材料と方法	
2-1-1 細胞培養	
2-1-2 Real-time PCR	
2-1-3 細胞免疫染色及びマーカー陽性細胞の定量	
2-1-4 von Kossa 染色及び Alizarin red 染色	
2-1-5 統計学的解析	
2-2 結果	
2-2-1 本誘導法による多能性期、中胚葉期、骨芽細胞期の遺伝子変化の検証	
2-2-2 従来の骨芽細胞誘導法との比較	

- 2-2-3 誘導期間内の遺伝子変化の挙動の検証
 - 2-2-4 細胞免疫染色を用いたタンパクの発現の検証と定量
 - 2-2-5 von Kossa 染色及び Alizarin red 染色を用いた石灰化の検証
 - 2-2-6 *Runx2*^{-/-}マウス ES 細胞を用いた検証
 - 2-3 小括
- 図

第 3 章 マウス iPS 細胞を用いた骨芽細胞誘導法の検証

p50~

背景と目的

3-1 材料と方法

- 3-1-1 細胞培養
- 3-1-2 Real-time PCR
- 3-1-3 細胞免疫染色
- 3-1-4 von Kossa 染色及び Alizarin red 染色
- 3-1-5 統計学的解析

3-2 結果

- 3-2-1 誘導方法及び各ステージにおける遺伝子変化の検証
- 3-2-2 細胞免疫染色を用いた骨芽細胞関連タンパクの発現の検証
- 3-2-3 Alizarin red 染色を用いた石灰化の検証

3-3 小括

図

第 4 章 ヒト iPS 細胞を用いた骨芽細胞誘導法の検証

p60~

背景と目的

4-1 材料と方法

- 4-1-1 細胞培養
- 4-1-2 Real-time PCR
- 4-1-3 細胞免疫染色
- 4-1-4 von Kossa 染色及び Alizarin red 染色
- 4-1-5 統計学的解析

4-2 結果

- 4-2-1 誘導方法及び各ステージにおける遺伝子変化の検証
- 4-2-2 細胞免疫染色を用いたタンパクの発現の検証
- 4-2-3 Alizarin red 染色を用いた石灰化の検証

4-3 小括
図

考察 p72~

謝辞 p83~

参考文献 p84~

要旨

多能性幹細胞は、組織分化・発生研究、薬剤のスクリーニング、希少疾患の病態解明、幹細胞を用いた再生医療において有望なツールである。本研究では、血清及びフィーダー細胞等を除いた環境下で、4つの低分子化合物、CHIR99021 (GSK-3 β 阻害薬)、cyclopamine (Hh シグナル阻害剤)、SAG (Hh シグナル活性化剤) 及び TH (ヘリオキサンチン誘導体) を段階的に用いることで、多能性幹細胞であるマウス胚性幹細胞 (マウス ES 細胞)、マウス人工多能性幹細胞 (マウス iPS 細胞)、ヒト人工多能性幹細胞 (ヒト iPS 細胞) から中胚葉を経由し、骨芽細胞を分化させる高効率かつ大量に採取可能な方法を開発した。さらに、骨形成に必須の転写因子である、*Runx2* を欠失させたマウス ES 細胞に本手法を用いた場合、*Runx2* ノックアウトマウスの表現型を一部模倣したことから、本手法は、骨芽細胞分化の生理的な過程を投影している可能性が示唆された。本研究は、骨の発生学、骨関連疾患の病態解明及び個別化医療、さらには骨の再生医療の進歩への足掛かりになる一つの方法を提案するものである。

序文

多能性幹細胞は、成体を構成する全ての細胞に分化できる能力 (多能性) とほぼ無限の自己複製能を持つとされ、組織分化・発生研究、治療用薬剤のスクリーニング、希少疾患の病態解明、幹細胞を用いた再生医療において有望な細胞源である。特に、骨格組織の分化・発生研究においては、骨芽細胞分化の初期段階にある細胞集団を生体で同定・単離することが困難であることや、マウスなどのモデル個体より採取できる初代細胞の数そのものに限界があるといった技術的制約が存在する。細胞の単離をしたとしても、目的とする細胞数を獲得するために生体外 (*in vitro* 環境) で長期継代培養した細胞が、骨芽細胞の形質を保持しているかという点においても疑問が残る。不死化された細胞株を用いれば細胞数に関する技術的制約は解決されるが、これらが本来の形質を保持しているかについては疑問が残り、生理的な状態を反映しているとは言い難い。

最近、プロテオーム、転写ネットワーク、及びエピゲノムに関する大規模データを利用して組織の分化や発生を理解しようという試みが盛んである。これらの解析を正確に行うためには、生体を反映した形で、目的とする細胞を大量に獲得する必要があるが、骨格組織においては上述の理由により困難である。すなわち、この点において、多能性及び自己複製能を持つ多能性幹細胞は有望な細胞源となりうる。多能性幹細胞から生体を反映した形で骨芽細胞を分化さ

せるプロトコールを開発すれば、細胞数の限界や目的とする細胞集団を単離することなどの技術的制約を一部解決することができる可能性を持つ。

これまでに、マウス ES 細胞やマウス iPS 細胞などの多能性幹細胞から骨芽細胞へ分化させる方法がいくつか報告されている¹⁻⁹。しかしながら、これらの多くは、血清やフィーダー細胞を使用しており、シグナル因子の組換えタンパク質や遺伝子導入法と胚様体形成を組み合わせることで分化を誘導している。さらに、これら過去の手法が生理的な分化過程を模倣しているかは不明であり、誘導効率に関しても低いもしくは調査されていない。

組織発生研究のみならず多能性幹細胞を用いた再生医療を目指す際の技術的要件として、血清やフィーダー細胞などに含まれている未知の成分を極力排除することが求められる。また、従来から用いられてきた遺伝子導入による分化誘導の効率は、ベクターの遺伝子導入効率に大きく依存する。誘導できたとしても遺伝子導入が骨芽細胞の生理的な発生過程を模倣していない可能性があるため、発生学研究のツールとしては用いにくい。加えて、ゲノムへの挿入による変異のリスクが考えられるために、安全性という観点においても問題が存在する。組換えタンパク質に関しては、多能性幹細胞の組織誘導において骨芽細胞に限らず他の組織誘導でも一般的に用いられているが、分解あるいは翻訳後修飾による生理活性の低下の問題があり、取り扱いや保存法に注意を要する。

さらに、大腸菌もしくは哺乳類細胞より作成されるため、大量生産が困難であり、高コストであることに加え、ロット間で差異が現れる可能性がある。これらの問題の解決策の一つは、安定性が高く、低コストである低分子化合物を用いて、多能性幹細胞の維持から目的組織への分化までを行うことであると考えられる。

2008年にYingらによって、mitogen-activated protein kinase (MEK)阻害薬であるPD0325901 (以下PD03)及びglycogen synthase kinase 3 (GSK3)阻害薬であるCHIR99021 (以下CHIR)の2つの阻害薬 (以下2i)を用いることで、マウスES細胞の基底状態が維持されることが報告された¹⁰。CHIRは、他のGSK3阻害薬に比べ特異的な阻害剤であると報告されており、GSK3 β を阻害することで β -cateninの分解を抑制し、古典的Wntシグナルを活性化する¹¹。古典的Wntシグナルは、多能性の維持のみならず分化の開始にも関与し、特に、多能性幹細胞の中胚葉への運命決定において重要な役割を担っていることが知られている^{12,13}。

中胚葉由来の骨格形成において、外側中胚葉もしくは沿軸中胚葉に由来する骨格前駆細胞が、骨芽細胞や軟骨細胞へ分化することが知られている¹⁴。骨芽細胞分化のプロセスにおいて、Hedgehogシグナル (以下Hh)は、骨格系のすべての細胞になる能力をもつ骨格系前駆細胞から骨芽前駆細胞への運命決定機構に

関与する。特に骨形成に必須の転写因子である、**runt-related transcription factor 2** (*Runx2*)の発現に関与し、通常の骨芽細胞の発生・分化にとって必須なシグナルであることが知られている¹⁵⁻¹⁷。**Hh** シグナル伝達経路の初期段階では **Hh** タンパクが膜貫通型受容体 **Patched** と結合することによって、膜貫通型蛋白 **Smoothed (SMO)**が活性化する¹⁸。低分子化合物である **Smoothed Agonist (SAG)**は強力な **SMO** 作動薬であり、**Hh** シグナルを活性化することで知られている¹⁹。**Hojo** らは、**Hh** の刺激は、**Hh** シグナル伝達経路の下流で働く転写因子である **Gli** の活性型を介して初期の骨芽細胞分化を促進することを報告した¹⁷。**SAG** による刺激は間葉系細胞において、骨芽細胞初期分化マーカーの発現を促進したものの、成熟骨芽細胞の分化を誘導することができないことも同時に報告されている。一方、**Ohba** らは、**Hh** シグナル同様に骨芽細胞分化に重要な役割を持つ **BMP** シグナル依存的に、骨芽細胞分化の中期から後期段階にかけて作用する低分子化合物としてヘリオキサンチン誘導体 (**TH**)を発見した²⁰。最近、**Maeda** らによって、**SAG** 及び **TH** の組み合わせによって骨髄間葉系幹細胞や間葉系細胞株が骨芽細胞分化を促進することが報告された²¹。すなわち、**SAG** 及び **TH** の組み合わせを用いることにより、中胚葉系の細胞は骨芽細胞へ分化する可能性が示唆された。

これらの背景を踏まえ、本研究では、骨格組織の分化・発生研究と骨再生医療への応用を視野に入れた、多能性幹細胞から骨芽細胞への新しい分化系の開発を目指した。従来の分化誘導法が有する問題点を解決するため、安定かつ低コストな低分子化合物の使用に着目した。既知の成分のみを含んだ培養条件下(無血清、無フィーダー)で、多能性幹細胞の維持あるいは骨芽細胞分化に関わる各シグナル (図 1)を活性化/阻害する低分子化合物を段階的に用いることで、多能性幹細胞の維持から中胚葉分化、引き続き骨芽細胞分化を誘導できるのではないかという仮説を立てた。具体的には、MEK 阻害剤及び GSK 阻害剤を用いた 2i 培養法にて多能性幹細胞を基底状態で維持し、Wnt シグナルの活性化剤である GSK 阻害剤及び 1-2-4 の項で示す Hh シグナル阻害剤によって外胚葉誘導を阻害しながら中胚葉誘導し、Hh シグナルの活性化及び BMP シグナルによる骨芽細胞分化の効果を強めることで、多能性幹細胞の中胚葉誘導、骨芽細胞分化を段階的に行うことを目標とした。

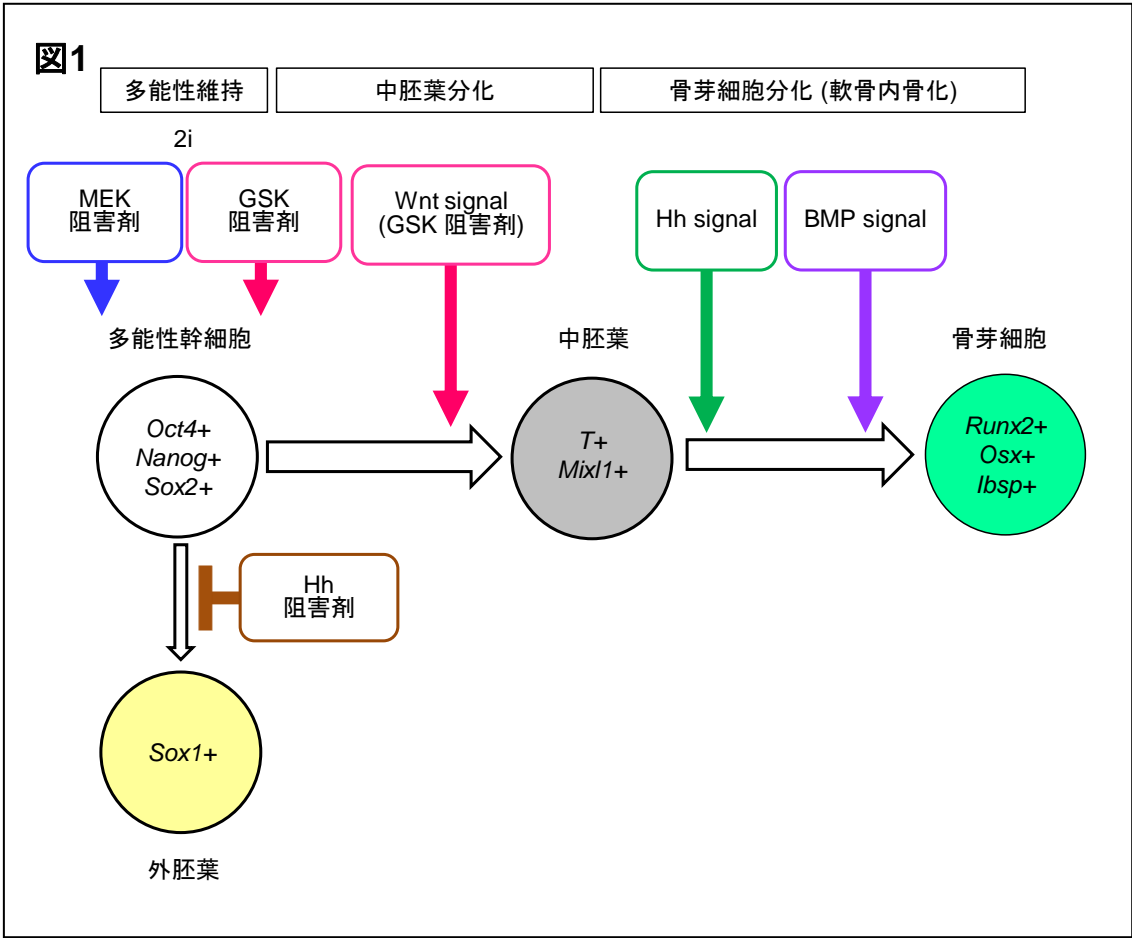


図1：骨芽細胞分化誘導に用いる、段階的シグナル活性化及び阻害の模式図
 MEK 阻害剤及び GSK 阻害剤を用いた 2i 培養法にて多能性を維持されているマウス ES 細胞に、Wnt シグナルを活性化する GSK 阻害剤及び外胚葉分化を阻害する Hh シグナルの阻害を行うことで、効率的な中胚葉分化を誘導し、Hh シグナルの活性化及び BMP シグナルの効果を助長することで、骨芽細胞分化を誘導する。

第1章 マウス ES 細胞を用いた中胚葉誘導及び骨芽細胞誘導の最適化

背景と目的

骨格系の骨芽細胞は中胚葉に由来する。細胞内シグナルを中胚葉分化、骨芽細胞分化にそれぞれ適切 (十分)な状態に調整することにより、多能性幹細胞から中胚葉、骨芽細胞へと段階的に誘導できるのではないかという仮説を立てた。そこで本章では、細胞内シグナル調節活性を有する数種の低分子化合物を用いて、マウス ES 細胞から無血清培地下で中胚葉及び骨芽細胞を段階的に誘導するプロトコールの最適化をすることを目的とした。

1-1 材料と方法

1-1-1 細胞培養

1-1-1A マウス ES 細胞の培養及び未分化性維持

本研究に用いたマウス ES 細胞 (2.3kb *Coll1a1*-GFP マウス ES 細胞)は、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻大庭伸介特任准教授より供与された²²。マウス ES 細胞は、Ying らが過去に報告した 2i 培養法に従い、ゼラチンコートディッシュ上で培養した。2i 培養法に用いる基本培地 (2i 培地)は、DMEM high glucose/F-12 (Gibco)及び neurobasal medium (Gibco)を 1:1 に調整したのち、抗生剤、0.5x N2 supplement (Gibco)、0.5x B27 supplement (Gibco)及び 50

μg/mL BSA fraction V、純度 98%以上 (Sigma-Aldrich)を加えて作製した。2i 培地に、1 μM PD0325901 (Wako)及び3 μM CHIR99021 (Wako もしくは Axon)、10³ units/mL 白血病阻止因子 (Leukemia inhibitory factor-LIF; Millipore)を回事添加した培地中、37°C 5% CO₂ の環境で培養することで、未分化性を維持しながらマウス ES 細胞を継代培養した¹⁰。継代に際しては Accutase (ICT, AT104)による分離を行い、細胞を回収した。継代は2、3日に1度、1:5~1:10の継代比率で行った。

1-1-1B CHIR99021の曝露による中胚葉誘導効果の検討 (結果1-2-1の項と関連)

マウス ES 細胞をゼラチンコートした6ウェルプレートに100,000 cells/cm²となるように播種し、1-1-1の項で示した CHIR99021、PD0325901 及び LIF を含む 2i 培地にて24時間培養した。PBS を用いて細胞を洗浄した後、RNA を回収し誘導前 (Day 0)のサンプルとした。2i 培地に、3 μM、9 μM、15 μM、30 μM の CHIR99021 (Wako もしくは Axon)を加え、5日間培養したものを CHIR99021 曝露群とし、溶媒である DMSO を同量加え 2i 培地にて5日間培養したものを非曝露群とした。培地交換は毎日行った。

1-1-1C CHIR99021による中胚葉誘導後、SAG と TH の同時曝露による骨芽細

胞分化誘導効果の検討 (結果 1-2-2 の項と関連)

マウス ES 細胞の播種及び多能性維持は 1-1-1B と同様の条件で行った。PBS による細胞の洗浄の後、2i 培地に 30 μ M の CHIR99021 を加えて、さらに 5 日間培養することで中胚葉誘導を行った。中胚葉誘導後、細胞を PBS で洗浄し、2i 培地に 50 μ g/mL アスコルビン酸 2 リン酸 (AsAP; Sigma-Aldrich)、10 mM β -グリセロリン酸 (β -GP; Sigma-Aldrich)、0.1 μ M デキサメタゾン (Dex; Wako)、1 μ M SAG (Calbiochem)及び 1 μ M TH (武田薬品工業より供与)を添加した培地中で、さらに 14 日間培養した (SAG 及び TH 同時曝露群)。中胚葉誘導を同様に行い、SAG と TH の代わりにそれらの溶媒である DMSO を同量添加し、14 日間培養した群を薬剤非曝露群とした。培地交換は毎日行った。

1-1-1D 中胚葉誘導期間が中胚葉分化マーカー遺伝子及び骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現に与える影響の検討 (結果 1-2-4 の項と関連)

マウス ES 細胞の播種及び多能性維持は 1-1-1B と同様の条件で行った。CHIR99021、PD0325901 及び LIF を含む 2i 培地にて 24 時間培養し、PBS による洗浄後に、RNA を回収したものを誘導前 (Day 0)サンプルとした。2i 培地に、30 μ M CHIR99021 を加え 5 日間培養したものを 5 日 CHIR 曝露群、7 日間培養したものを 7 日 CHIR 曝露群とした。さらに、5 日曝露群及び 7 日 CHIR 曝露群に

対し、1-1-1C で示した SAG 及び TH 同時曝露した骨芽細胞誘導条件で 14 日間培養したものそれぞれ 5+14 日培養群及び 7 日 CHIR+14 日培養群とした。培地交換は毎日行った。

1-1-1E Cyclopamine 及び CHIR99021 の同時曝露による外胚葉分化阻害と骨芽細胞分化促進効果に関する検討 (結果 1-2-4 の項と関連)

マウス ES 細胞の播種及び多能性維持は 1-1-1B と同様の条件で行った。PBS による細胞の洗浄後、30 μ M の CHIR99021 を含む 2i 培地に、さらに 5 μ M cyclopamine (Cyc; Enzo Life Sciences) を添加して 5 日間培養した群を Cyc 曝露群、溶媒である DMSO を添加した群を Cyc 非曝露群とした。それぞれに対し、1-1-1C で示した SAG 及び TH 同時曝露した骨芽細胞誘導条件で 14 日間培養した。

1-1-2 Real-time PCR

ISOGEN (ニッポンジーン) 及び RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて培養細胞より全 RNA を回収した。ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix kit (TOYOBO) を用いて、回収 RNA の 1 μ g を逆転写反応させ一本鎖 cDNA を合成した。反応条件は 55 $^{\circ}$ C 15 分、99 $^{\circ}$ C 5 分とした。Real time PCR は 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて行った。反応液は FastStart Universal SYBR Green

Master kit (Roche)、0.3 μ M プライマー及び 1 μ L cDNA 溶液からなり、反応条件は 94 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒で 40 サイクルとした。内在性コントロールとして *Actb* 遺伝子を用い mRNA 発現量を補正し $2^{-\Delta Ct}$ を算出したのち、コントロールサンプルの相対的発現量を 1 X とした場合の相対的発現量を示した。各 PCR 反応は 2 回試行し、平均 \pm 標準誤差として表記した。解析に使用したプライマーの配列を表 1 に示す。

1-1-3 統計学的解析

2 群間の平均値の検定に、独立 t 検定を用いた。

表 1 本研究で使用したプライマーの配列 (RT-PCR, マウス用)

Gene	Primer sequences (forward and reverse, 5'-3')
<i>Actb</i>	TTGCTGACAGGATGCAGAAG
	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
<i>Pou5f1</i>	CACGAGTGGAAAGCAACTCA
	AGATGGTGGTCTGGCTGAAC
<i>Nanog</i>	AAGTACCTCAGCCTCCAGCA
	GTGCTGAGCCCTTCTGAATC
<i>Sox2</i>	CACAACCTCGGAGATCAGCAA
	CCGGGAAGCGTGTACTTATC
<i>Sox1</i>	CACAACCTCGGAGATCAGCAA
	GTCCTTCTTGAGCAGCGTCT
<i>Sox17</i>	TAAAGGTGAAAGGCGAGGTG
	GCTTCTCTGCCAAGGTCAAC
<i>Gata4</i>	CAGCAGCAGTGAAGAGATGC
	GCGATGTCTGAGTGACAGGA
<i>T</i>	GAACCTCGGATTCACATCGT
	TTCTTTGGCATCAAGGAAGG
<i>Mixl1</i>	CGACAGACCATGTACCCAGA
	AGGGCAATGGAGGAAAATC
<i>Runx2</i>	CCCAGCCACCTTTACCTACA
	TATGGAGTGCTGCTGGTCTG
<i>Sp7</i>	ACTCATCCCTATGGCTCGTG
	GGTAGGGAGCTGGGTAAAGG
<i>Coll1a1</i>	CACCCTCAAGAGCCTGAGTC
	GTTCGGGCTGATGTACCAGT
<i>Ibsp</i>	CAGAGGAGGCAAGCGTCACT
	CTGTCTGGGTGCCAACACTG
<i>Bglap</i>	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT
	TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC
<i>Dermo1</i>	ACAGTCTGGGCACCAGTGAG
	CTGCAGCTCCTCGAAAGACT

1-2 結果

1-2-1 CHIR99021 の曝露による中胚葉誘導効果の検討

多能性幹細胞の中胚葉分化への運命決定には、古典的 Wnt シグナルの活性化が重要な役割を担っていることが知られている^{12,13}。GSK3 β を阻害することで β -catenin の分解を抑制し、古典的 Wnt シグナルを活性化する CHIR99021 (以下 CHIR)¹¹ を中胚葉誘導性低分子化合物とした際の、効果の検討及び濃度の最適化を行った。

3 μ M、9 μ M、15 μ M、30 μ M の濃度の CHIR と共に、マウス ES 細胞をマウス ES 細胞維持培地にて 5 日間培養した。中胚葉分化マーカー遺伝子である *T* 及び *Mixl1* は、誘導前 (Day 0) や非曝露群と比べ、CHIR の濃度依存的に上昇し、多能性マーカー遺伝子である *Nanog*、*Pou5f1* 及び *Sox2* は、誘導前 (Day 0) に比べ、5 日目に高濃度の CHIR 群で減少した (図 2)。この CHIR の濃度依存的な *T* 及び *Mixl1* の発現上昇、ならびに *Nanog*、*Pou5f1* 及び *Sox2* の発現減少の相関は、高濃度 CHIR による中胚葉誘導の促進及び多能性の減少を示唆した。

1-2-2 CHIR による中胚葉誘導後、SAG と TH の同時曝露による骨芽細胞分化誘導効果の検討

過去の報告より、初期の骨芽細胞分化を促進する低分子化合物である SAG 及び骨芽細胞分化の後期段階を促進する低分子化合物 TH を同時曝露することで、間葉系細胞の骨芽細胞分化が促進することが明らかとなっている^{20,21,23}。そのため、マウス ES 細胞を 30 μ M CHIR と共にマウス ES 細胞維持培地にて 5 日間培養することで中胚葉誘導を行ったのち、SAG 及び TH を 14 日間同時曝露することで骨芽細胞が誘導されるかを検討した。薬剤非曝露群と比べ、SAG 及び TH の 14 日間同時曝露群は骨芽細胞分化マーカー遺伝子である *Runx2*、*Sp7* 及び *Ibsp* の遺伝子発現が上昇させた (図 3)。このことから、2i 培養法にて多能性を維持されたマウス ES 細胞は CHIR によって中胚葉に誘導され、その後 SAG 及び TH の同時曝露によって骨芽細胞に分化することが示唆された。

1-2-3 中胚葉誘導期間が中胚葉分化マーカー遺伝子及び骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現に与える影響の検討

中胚葉誘導の期間を延長することで、中胚葉誘導とそれに引き続く骨芽細胞分化誘導の効率が上がるか、マウス ES 細胞に 30 μ M CHIR を 5 日間もしくは 7 日間曝露した群で比較した。5 日間 CHIR 曝露群は、7 日間 CHIR 曝露群に比べ、中胚葉分化マーカー遺伝子である *T* の発現が高かった (図 4a)。さらにその後、両群に SAG 及び TH を 14 日間曝露した場合、5 日間 CHIR 曝露群で 7 日間 CHIR 曝露群と比べ、骨芽細胞分化マーカー遺伝子である *Runx2*、*Sp7* 及び *Ibsp* の遺伝子発現が高いことが分かった (図 4b)。つまり、中胚葉分化マーカー遺伝子である *T* の発現と引き続く骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現は相関していること、そして 5 日間の 30 μ M CHIR 曝露が骨分化誘導に最適であることが示唆された。

1-2-4 Cyclopamine 及び CHIR の同時曝露による外胚葉分化阻害と骨芽細胞分化促進効果に関する検討

Hh シグナルが神経外胚葉への運命決定、特に神経管の腹側化、運動神経などの特定の神経分化において重要な役割を果たすことが過去に報告されており²⁴、さらに Hh の組換えタンパクや SAG は多能性幹細胞のドーパミン神経分化に用いられている²⁵。さらに、2i 培養法で維持された ES 細胞は、中胚葉系より外胚葉系に分化しやすいことが報告されている²⁶。そのため、中胚葉誘導期に Hh シグナルの阻害による外胚葉分化を抑えることで、効率的な中胚葉誘導および引き続き骨芽細胞分化誘導を行うことができるのではないかと考えた。2i 培養法にて維持されているマウス ES 細胞に、Hh シグナル阻害薬である 5 μ M cyclopamine (以下 Cyc)と CHIR と同時に曝露した群と Cyc 非曝露群 (CHIR 単独曝露)において、培養 5 日目 (Day 5)での外胚葉マーカー遺伝子 (*Sox1*)の相対的遺伝子発現量を比較した。Cyc 非曝露群 (CHIR 単独曝露)に比べ、CHIR 及び Cyc 同時曝露群では、外胚葉マーカー遺伝子である *Sox1* の発現抑制が認められた (図 5a)。さらに、CHIR 単独曝露後に SAG 及び TH の曝露を行った群に比べ、CHIR 及び Cyc 同時曝露後に SAG 及び TH の曝露を行った群において、骨芽細胞分化マーカー遺伝子である *Runx2*、*Sp7* 及び *Ibsp* の遺伝子発現が高いことが分かった (図 5b)。このことから、中胚葉誘導期に Cyc を曝露することで外胚葉の分化が抑制され、引き続き骨芽細胞分化も促進することが示唆された。過去の

報告から、Cyc は Hh シグナルを阻害するにもかかわらず、SMO の一次繊毛における移行を誘導することが Wang らによって報告されている²⁷。本誘導においては、Cyc によって SMO が一次繊毛において蓄積したため、引き続き SAG の効果を増幅し、骨芽細胞誘導効率を上げた可能性も考えられる。図 5c にこれまでに有効性が確認された化合物による骨芽細胞分化誘導の方法の略図を示す。

1-3 小括

マウス ES 細胞に 3 種類の低分子化合物 CHIR、SAG 及び TH を段階的に曝露することにより、無血清培地下で、多能性幹細胞から中胚葉を介し、骨芽細胞へ分化させることが可能であり、中胚葉誘導期に Cyc を用いることで骨芽細胞誘導効率は促進する。

図2

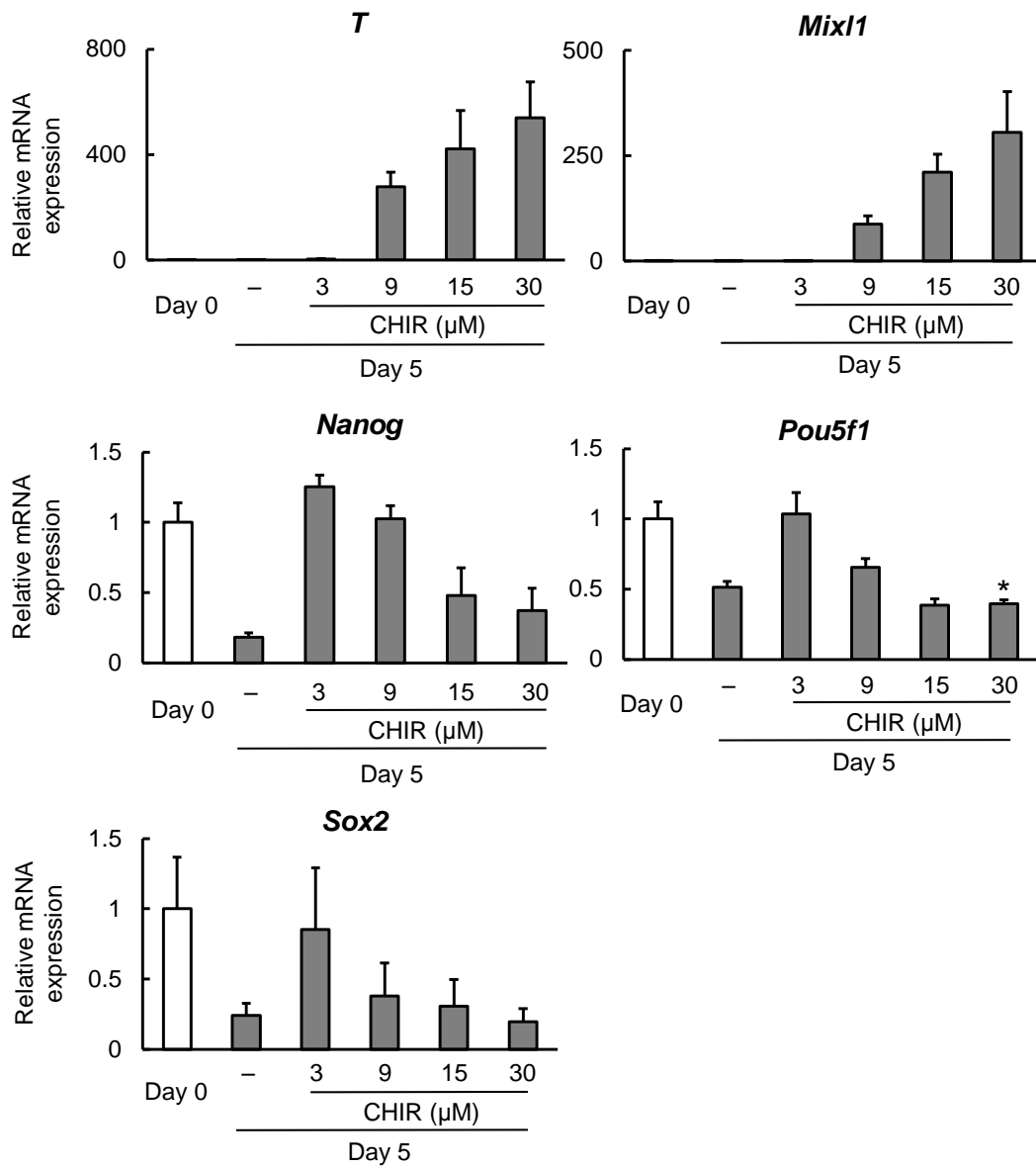


図 2 : CHIR99021 の中胚葉誘導効果及び多能性抑制効果

2i 培養法にて維持されているマウス ES 細胞の誘導開始前 (Day 0)、CHIR 非曝露にて 5 日間培養した群、及び CHIR99021 (CHIR) を異なる濃度 (3 μM、9 μM、15 μM、30 μM) で 5 日間曝露した群における、中胚葉マーカー (*T* 及び *Mixl1*) 及び多能性マーカー (*Nanog*、*Pou5f1* 及び *Sox2*) の相対的遺伝子発現量の比較を示す。n=3、mean±S.E.M. *P < 0.05 vs. day 0

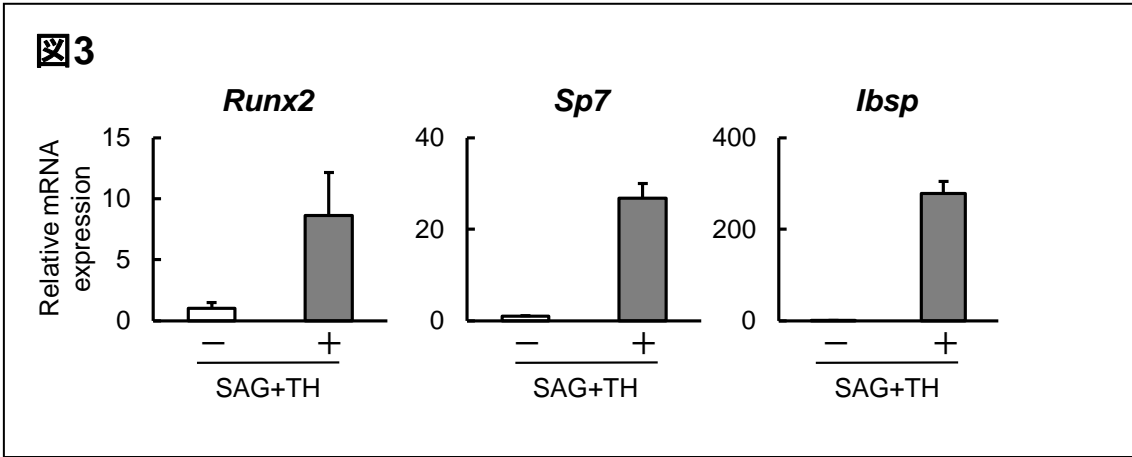


図3 : SAG 及び TH の骨芽細胞誘導効果
 2i 培養法にて維持されているマウス ES 細胞に 30 μ M CHIR99021 を 5 日間曝露し中胚葉を誘導した後、薬剤非曝露にて 14 日間培養した群及び 1 μ M SAG 及び 1 μ M TH を 14 日間同時曝露した群における骨芽細胞マーカー (*Runx2*、*Sp7* 及び *Ibsp*) の相対的遺伝子発現の比較を示す。n=4、mean \pm S.E.M.

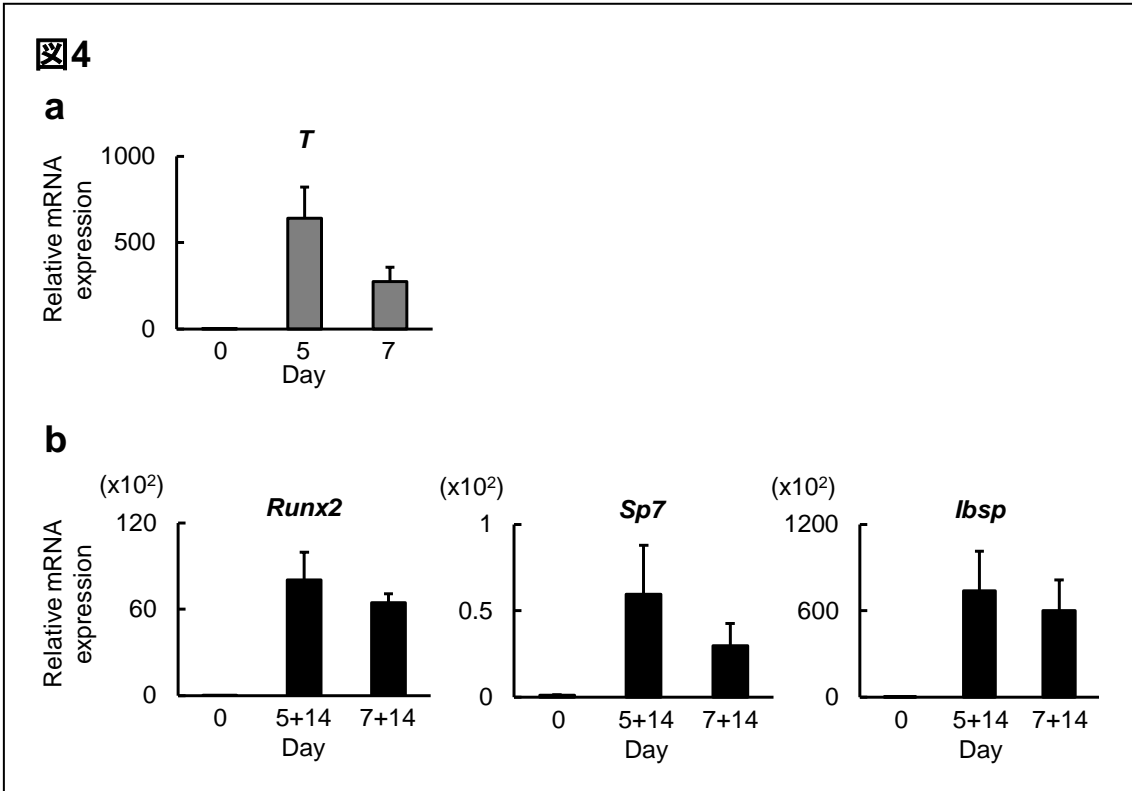


図4 : CHIR による中胚葉誘導期間の最適化

(a) 2i 培養法にて維持されているマウス ES 細胞に CHIR99021 を 5 日間曝露した群と 7 日間曝露した群と誘導前における、中胚葉マーカー (*T*) の相対的遺伝子発現量の比較をしめす。n=4、mean±S.E.M.

(b) CHIR を 5 日間曝露した群と 7 日間曝露した群それぞれに 1 μM SAG 及び 1 μM TH を 14 日間同時曝露した場合の骨芽細胞マーカー (*Runx2*、*Sp7* 及び *Ibsp*) の相対的遺伝子発現量の比較をしめす。n=4、mean±S.E.M.

図5

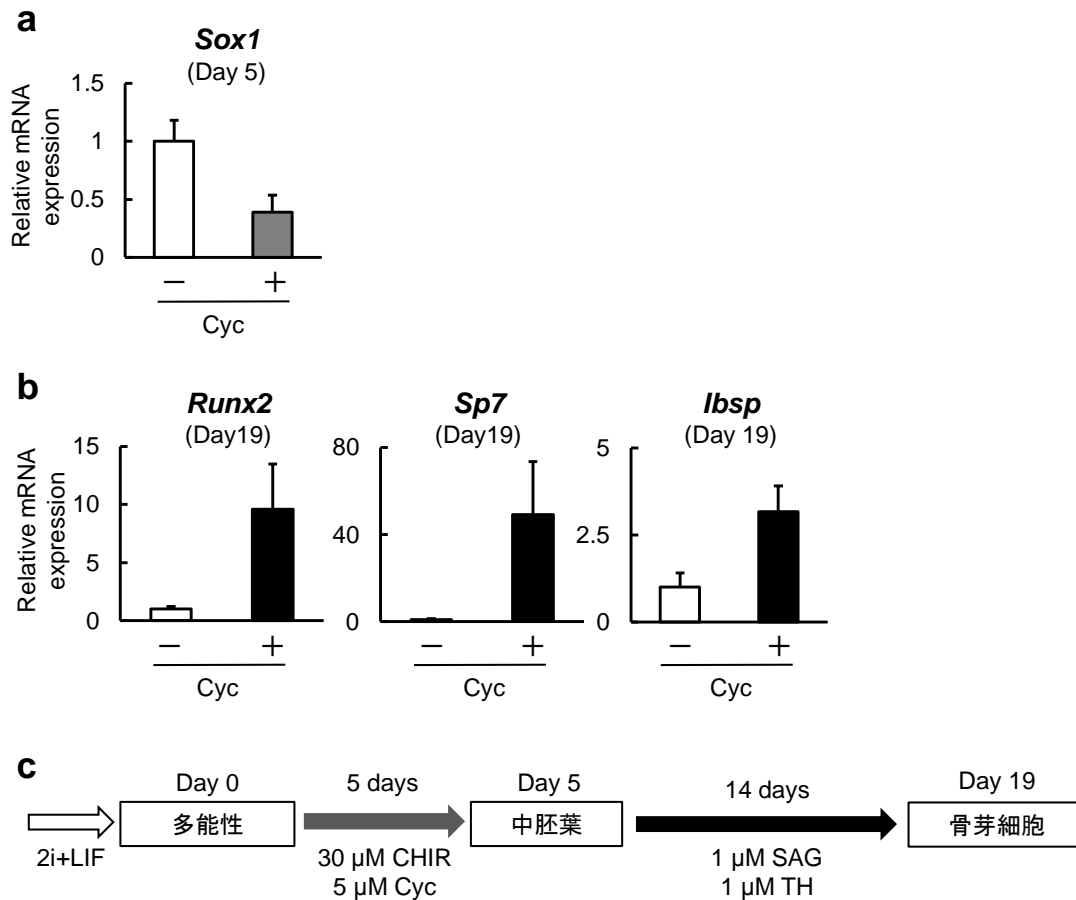


図5 : Cyclopamine (Cyc)による外胚葉分化抑制効果及び骨芽細胞誘導促進効果

(a) 2i 培養法にて維持されているマウス ES 細胞に CHIR を 5 日間曝露している環境下で、5 μ M Cyc の非曝露群 (CHIR 単独曝露)及び曝露群 (CHIR 及び Cyc 同時曝露)における 5 日目での外胚葉マーカー (*Sox1*)の相対的遺伝子発現量の比較を示す。n=4、mean \pm S.E.M.

(b) 30 μ M CHIR の 5 日間曝露による中胚葉誘導下で、Cyc 非曝露群と 5 μ M Cyc の 5 日間曝露群を行った後、両群に 1 μ M SAG 及び 1 μ M TH を 14 日間同時曝露した場合の骨芽細胞マーカー (*Runx2*、*Sp7* 及び *Ibsp*)の相対的遺伝子発現量の比較を示す。n=4、mean \pm S.E.M.

(c) 有効性が示された低分子化合物を用いた骨芽細胞分化誘導法の略図

第2章 マウス ES 細胞を用いた骨芽細胞分化誘導法の検証

背景と目的

骨芽細胞は、骨芽細胞関連遺伝子・タンパクの発現及び骨基質の石灰化という 2 つの生理的な特徴を持つ。そこで本章では、前章で開発した骨芽細胞分化誘導法によりマウス ES 細胞から作製した細胞を、上記の骨芽細胞の生理的な特徴に基づいて検証することを目的とした。その際、従来の方法と比較し効率的な分化誘導を達成できるか、生理的な骨芽細胞分化過程を一部模倣しているかという点に着目した。

2-1 材料と方法

2-1-1 細胞培養

2-1-1A マウス ES 細胞の培養及び未分化性維持

本研究に用いたマウス ES 細胞 (2.3kb *Coll1a1*-GFP マウス ES 細胞)は、バイオエンジニアリング専攻大庭伸介准教授より供与され (1-1-1 の項を参照)、*Runx2*^{+/+} マウス ES 細胞は Imperial Cancer Research Fund Dr. M. Owen より供与された。

1-1-1A で記載した方法と同様に 2i 培養法の馴化、培養を行った。

2-1-1B マウス ES 細胞の中胚葉誘導及び骨芽細胞分化

ゼラチンコートした 6 ウェルプレートに、マウス ES 細胞を 100,000 cells/cm² となるように播種し、1-1-1 の項で示した CHIR99021、PD0325901 及び LIF を含む 2i 培地にて 24 時間培養した。中胚葉誘導は、PBS による洗浄後、30 μ M CHIR99021 及び 5 μ M cyclopamine を添加した 2i 培地で 5 日間培養することで行った。引き続き骨芽細胞分化誘導では、1-1-1C で示した 2i 培地に 50 μ g/mL AsAP、10 mM β -GP 及び 0.1 μ M Dex、1 μ M SAG、1 μ M TH を添加し、14 日間培養した。成熟骨芽細胞分化誘導には、AsAP、 β -GP、及び Dex を添加した 2i 培地で 4 日間培養した。培地交換は毎日行った。

初代骨芽細胞の単離及び培養

マウス頭蓋骨初代細胞は Ogata らの方法により採取した²⁸。採取後、10% ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum-FBS; Sigma-Aldrich) と抗生剤を含む α -MEM 培地 (Sigma-Aldrich) 中にて 37°C 5% CO₂ で 7 日培養した細胞を *in vitro* 培養環境における初代骨芽細胞とし、培養を介さないものを *in vitro* 培養を介さずに回収した初代骨芽細胞とした。それぞれに対し RNA を抽出した。

従来 of 骨芽細胞誘導法

2i に馴化した 2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞を用い、Kawaguchi らの報告に

準じて誘導を行った⁵。

2-1-2 Real-time PCR

1-1-2 で記載した方法と同様に行った。

2-1-3 細胞免疫染色及びマーカー陽性細胞の定量

4%パラホルムアルデヒド (PFA)で固定 (室温 20 分)した細胞塊をランダムに採取し、OCT コンパウンドに包埋した。凍結マイクロームにて凍結切片を作製し、免疫染色を行った。RUNX2、SP7 及び GFP の同時染色には rabbit IgG Labeling Kit Zenon®を用いた。免疫染色に際しては、まず 0.1% TritonX-100/PBS (PBST) で 5 分間、3 回洗浄した。次にブロッキング溶液 (3% BSA (Sigma) +1% heat inactivated sheep serum (Sigma) in PBST)で 1 時間反応させた後、一次抗体として rabbit anti-RUNX2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:50)を 4 °Cで一晩反応させた。翌日、PBST で 5 分、3 回洗浄した後、2 次抗体 (Anti-rabbit (IgG) Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1:500))を室温で 1 時間反応させた。その後、GFP の免疫染色には、rabbit IgG Labeling Kit Zenon® Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Z25302) を使い、SP7 の免疫染色には、rabbit IgG Labeling Kit Zenon® Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, Z25308)を用い、抗体の蛍光ラベリングを行い、室温で 2 時間反応させた。PBST

で5分、3回洗浄した後、VECTASHIELD Mounting Medium containing DAPI (Vector Laboratories)にて核染色を行った。OCT4、NANOG 及び SOX2 の免疫染色には、連続切片を使用し、同様の方法で洗浄、一次抗体を反応させた。一次抗体には、rabbit anti-OCT4 (Santa Cruz Biotechnology, 1:200)、 rabbit anti-NANOG (ReproCELL, 1:500)、 rabbit anti-SOX2 (Millipore, 1:200)を併記した濃度に希釈し用いた。洗浄した後、2次抗体 (Anti-rabbit (IgG) Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1:500))を室温で1時間反応させ、洗浄した後、同様に DAPI にて核染色を行った。画像の取得及び解析には、 BIOZERO-9000 (KEYENCE) 及び BZ Analyzer Software (KEYENCE) を用いた。

細胞塊における骨芽細胞マーカータンパク発現細胞の割合の算出には、ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 及び ITCN (image-based tool for counting nuclei) (<http://www.bioimage.ucsb.edu/downloads/automatic-nuclei-counter-plugin-for-imagej>) software を用い、DAPI 陽性細胞及び骨芽細胞マーカータンパク発現細胞の細胞数をカウントし、割合を算出した。画像は、3回の独立した培養から、ランダムに10視野の画像を取得し、合計5000個以上の DAPI 陽性細胞から算出した。

2-1-4 von Kossa 染色及び Alizarin red 染色

von Kossa 染色

100%エタノールにて、ディッシュ上の細胞を固定後、5% 硝酸銀 (Wako)水溶液中で 10 分間紫外線を照射して染色した。5 分間の流水洗浄後、5% チオ硫酸ナトリウム (Wako)溶液で 5 分間処理することで還元・定着を行い、水洗した。

Alizarin red 染色

Osteogenesis Assay Kit (Millipore)を用い、プロトコールに従い染色及び定量を行った²⁹。

2-1-5 統計学的解析

1-1-3 で記載した方法と同様に行った。

2-2 結果

2-2-1 本誘導法による多能性期、中胚葉期、骨芽細胞期の遺伝子変化の検証

図 5c に示した骨芽細胞誘導法が多能性期、中胚葉期、骨芽細胞期の各ステージにおいてどのような遺伝子変化をするかを検討すると共に、さらに本法で誘導された骨芽細胞マーカー遺伝子の遺伝子発現量を初代骨芽細胞のものと比較した。多能性マーカー遺伝子である *Nanog*、*Pou5f1* 及び *Sox2* は、Day 0 で最も高く、中胚葉誘導期 (Day 5)、骨芽細胞期 (Day 19)と分化が進むにつれ減少する (図 6a)。また、中胚葉マーカー遺伝子である *T* 及び *Mixl1* は、Day 0 では発現が

低いものの、中胚葉期である Day 5 で有意に上昇し、Day 19 では発現が減少する (図 6b)。一方、外胚葉マーカー遺伝子である *Sox1*、内胚葉マーカー遺伝子である *Sox17* 及び *Gata4* は培養期間中大きな変動はなく、有意な上昇等は認めなかった (図 6b)。これらの結果は、本方法が多能性幹細胞を中胚葉細胞に特異的に誘導していることを示唆している。骨芽細胞マーカー遺伝子については、Day 19 までに *Runx2*、*Sp7*、*Colla1* 及び *Ibsp* が Day 0 に比較してそれぞれ 128 倍、91 倍、7680 倍、147300 倍の発現上昇をみとめた。しかし、成熟骨芽細胞のマーカー遺伝子である *Bglap* は Day 19 までに上昇を認めず、その後 4 日間 SAG 及び TH を除いた環境で培養した場合 (Day 23) に 145 倍の発現上昇を認めた。骨芽細胞マーカー遺伝子である *Runx2*、*Sp7*、*Colla1*、*Ibsp* 及び *Bglap* の遺伝子発現レベルを初代骨芽細胞における発現レベルと比較した場合、本法にて誘導した細胞では、*in vitro* 培養環境における初代骨芽細胞と同等ないし、高い遺伝子発現となった (図 6c)。一方、*in vitro* 培養を介さずに回収した初代骨芽細胞と比較した場合、骨基質関連遺伝子である *Colla1*、*Ibsp* 及び *Bglap* は、本法にて誘導した細胞は低い値となったが、骨芽細胞関連転写因子である *Runx2* 及び *Sp7* は同等の遺伝子発現量であった (図 6d)。この結果から、骨基質関連遺伝子の発現には改善が求められるものの、骨芽細胞関連転写因子に関しては、生体に存在する骨芽細胞に匹敵する高い発現が認められたことより、本方法は骨芽細胞を誘

導する有効な手法であることが示唆された。

さらに、骨芽細胞特異的に GFP の蛍光発現が認められる 2.3kb Coll1a1-GFP マウス ES 細胞を用いることで、誘導された骨芽細胞の可視化を試みた。2.3kb Coll1a1 はプロモーター解析により骨芽細胞特異的に反応する領域として同定されたプロモーター断片であり、2.3kb Coll1a1-GFP マウス ES 細胞を用いることで、骨芽細胞分化をモニターすることが可能である²²。図 6e にこれまでに確立した誘導ストラテジー、細胞の位相差コントラスト像及び Day 19、Day 23 における GFP の蛍光像を示す。誘導開始前 (Day 0)には、2i 培養法に特徴的な小さいコロニーを示し、CHIR 及び Cyc により 5 日間誘導した場合 (Day 5)、円形の辺縁粗なコロニーを示す。中胚葉誘導後、SAG 及び TH を同時曝露し、14 日間培養した場合 (Day 19)、コロニーの巨大化を認め、さらにコロニーにおいて 2.3kb Coll1a1-GFP の発現 (緑色蛍光)を認めた。また、Day 23 においても同様に 2.3kb Coll1a1-GFP の発現は確認された (図 6e)。2.3kb Coll1a1 は骨芽細胞特異的に発現することから、Day 19 及び Day 23 において、骨芽細胞への分化が誘導されていることが確認された。

2-2-2 従来の骨芽細胞誘導法との比較

今回の方法が、これまでに Kawaguchi らが報告している一般的な骨芽細胞分化誘導法と比較し⁵、どれほど有効な誘導法であるかを確認した。Kawaguchi らの方法において 2.3kb *Coll1a1*-GFP マウス ES 細胞を用いた場合、2.3kb *Coll1a1*-GFP の発現、誘導前と比較した場合の骨芽細胞マーカー遺伝子の上昇は確認できた。しかしながら、骨芽細胞マーカー遺伝子 (*Runx2*、*Sp7*、*Coll1a1*、*Ibsp* 及び *Bglap*) の発現は、本方法で誘導した細胞において有意に高かった。さらに、目的としない系統である内胚葉マーカー遺伝子(*Sox17* 及び *Gata4*)は、本方法で誘導した細胞で有意に低かった。したがって、本方法では、これまでに用いられてきた方法とは異なり、目的としない胚葉への分化を抑制しつつ、より効率的に骨芽細胞を誘導できることが分かった (図 7)。これは、我々の方法が胚様体を形成しない単層培養による誘導法であるため、目的としない組織への分化が抑えられたことが一つの原因と考えられる。

2-2-3 誘導期間内の遺伝子変化の挙動の検証

誘導期間中の経時的な遺伝子変化を追跡し、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現プロファイルが、遺伝子改変マウスの解析から示された骨芽細胞分化過程のモデルを模倣しているかを確認した。図6で示した結果と同様に、多能性マーカー遺伝子である *Nanog* の5日目以降での減少、中胚葉マーカー遺伝子である *T* の5日目での一時的な上昇を認めた。骨芽細胞分化マーカー遺伝子については、骨格系前駆細胞に発現する *Dermo1* の9日目での発現に引き続いて、骨芽細胞分化初期マーカー遺伝子である *Runx2* の9日目以降の上昇を認めた。骨芽細胞分化中期マーカー遺伝子である *Sp7*、*Colla1* 及び *Ibsp* の発現は、*Runx2* の発現上昇とほぼ同期して上昇し、培養期間を経るに従って上昇を続けた。成熟骨芽細胞マーカー遺伝子である *Bglap* に関しては、先述したとおり Day 19 以降 (SAG 及び TH を除いた環境で4日間培養)に急速な発現上昇を認めた (図8)。この遺伝子変化プロファイルは、ES細胞の中胚葉誘導を経て形成された *Dermo1* 陽性の骨格系前駆細胞が、Hh シグナルを介して *Runx2* 陽性骨芽細胞前駆細胞へと分化し、引き続いて骨芽細胞中期・後期分化へと進むことを示唆しており、Roddaらによって提唱された骨芽細胞分化のモデルに一致した³⁰。

2-2-5 細胞免疫染色を用いたタンパクの発現の検証と定量

2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞に 19 日間骨芽細胞分化誘導を行い、作成された細胞塊における骨芽細胞マーカーのタンパクの発現及び骨芽細胞マーカーの発現の割合を調べた。細胞塊において骨芽細胞マーカーである RUNX2 及び SP7 の発現及び GFP 抗体にて標識される 2.3kb-Col1a1 の高い発現を認めた (図 9a)。この免疫染色に基づいて、細胞全体に対する RUNX2、SP7 及び 2.3kb-Col1a1-GFP の発現細胞数の比率を定量したところ、それぞれ、 $78 \pm 3\%$ 、 $66 \pm 5\%$ 、 $45 \pm 1\%$ であった (図 9b)。一方、多能性マーカーである OCT4、NANOG 及び SOX2 の発現は低く (図 9c)、発現比率はそれぞれ、 $2.3 \pm 0.6\%$ 、 $1.5 \pm 0.7\%$ 及び $9.0 \pm 3.1\%$ であった。このことから、前骨芽細胞や骨芽細胞を含む細胞は高確率で誘導され、多能性マーカーを示す細胞は消失する傾向があったことから、本方法は効率的な骨芽細胞誘導であることが分かった。

2-2-6 von Kossa 染色及び Alizarin red 染色を用いた石灰化の検証

2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞を用い、誘導 5 日目 (Day 5)、誘導 19 日目 (Day 19)、誘導 23 日目 (Day 23)での石灰化を von Kossa 染色及び Alizarin red 染色を用い評価したところ、Day 19、Day 23 において、一様に石灰化した細胞塊を両染色において認めた (図 10a, b)。

2-2-7 *Runx2*^{-/-}マウス ES 細胞を用いた検証

本方法が骨発生研究に用いることができるツールの一つになりうるかを調べるため、*Runx2*^{-/-}マウス ES 細胞を本方法に従って培養し、過去に報告されている *Runx2*^{-/-}マウスで見られる骨芽細胞分化の異常を模倣するかを調べた。野生型 (*Runx2*^{+/+})マウス ES 細胞、*Runx2*^{-/-}マウス ES 細胞ともに、中胚葉誘導後の中胚葉マーカー遺伝子である *T* の一時的な上昇を認めた。しかし、*Runx2*^{-/-}マウス ES 細胞では野生型細胞と異なり、骨芽細胞誘導後における骨芽細胞マーカー遺伝子 *Sp7* 及び *Bglap* の発現上昇を認めなかった。同じく骨芽細胞マーカー遺伝子である *Ibsp* は、誘導 19 日目で 212 倍の遺伝子上昇を認めたものの、野生型と比較すると低い発現レベルであった (図 11a)。さらに、Alizarin red 染色による石灰化評価において、野生型と比較した場合、*Runx2*^{-/-}マウス ES 細胞では石灰化の程度は低く、相対的な石灰化の定量値も低いことが明らかとなった (図 11b、c)。これらの結果は、過去に報告されている *Runx2*^{-/-}マウス ES 細胞で見られる骨芽細胞分化の異常と一致した^{31,32}。これらの結果と 2-2-3 誘導期間内の遺伝子変化の挙動に関する結果と併せると、本方法は、生理的な骨芽細胞分化過程を一部模倣していることが考えられ、骨発生研究に用いることができるツールの一つになりうることが示唆された。

2-3 小括

本方法は、マウス ES 細胞において、骨芽細胞関連遺伝子・タンパクの発現及び骨基質の石灰化を誘導する。さらに、本方法は、生理的な骨芽細胞分化過程を一部模倣しており、骨発生研究に用いることができるツールの一つになりうる。

6

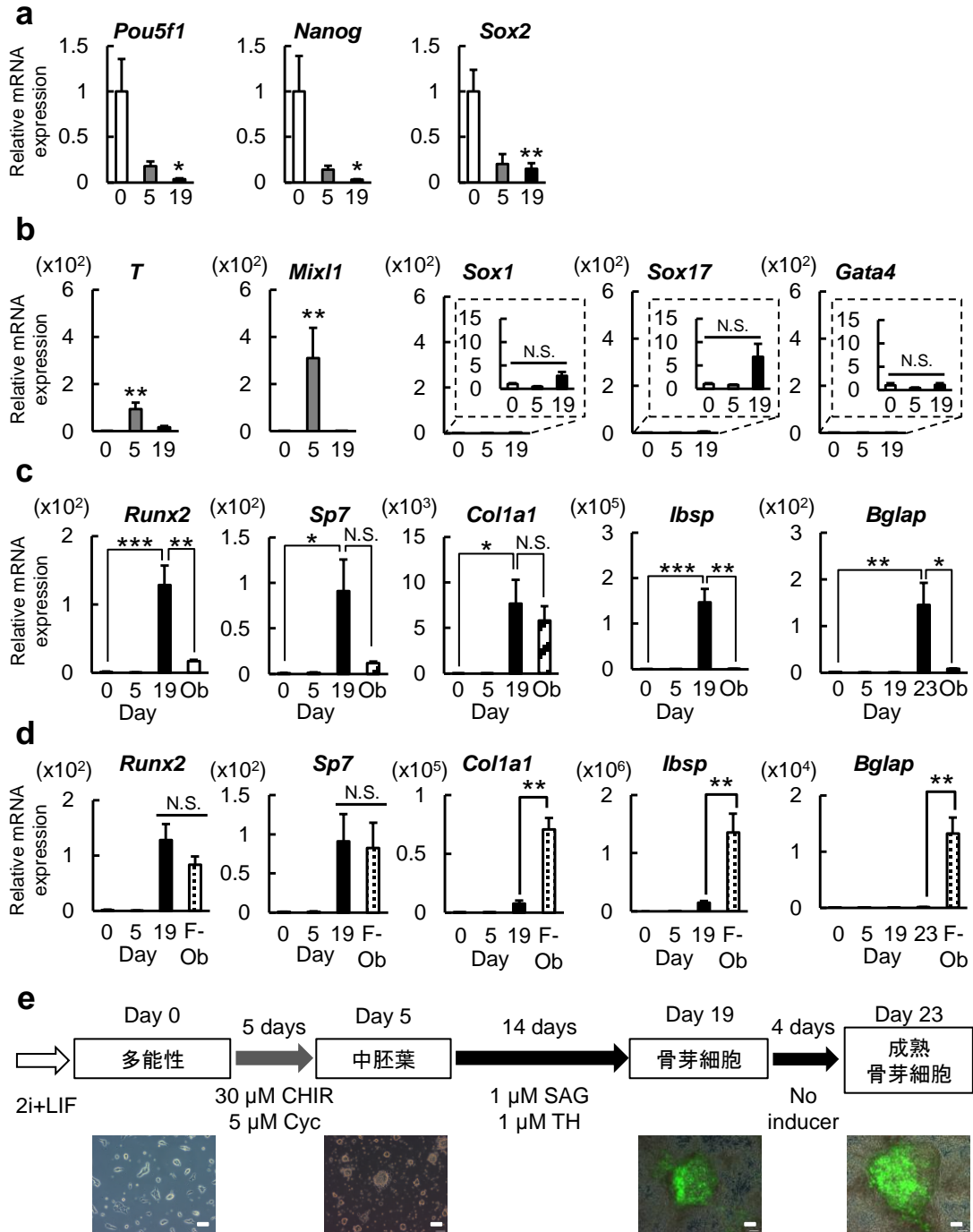


図6：本誘導法による多能性期、中胚葉期、骨芽細胞期の遺伝子変化

2i 培養法にて維持されているマウス ES 細胞の誘導開始前 (多能性期、Day 0)、30 μ M CHIR 及び 5 μ M Cyc にて 5 日間誘導した群 (中胚葉期、Day 5)、その後 1 μ M SAG 及び 1 μ M TH にて 14 日間誘導した群 (骨芽細胞期、Day 19)、その後誘導因子なしで 4 日間培養した群 (成熟骨芽細胞期、Day 23)、*in vitro* 培養環境における初代骨芽細胞 (Ob) 及び *in vitro* 培養を介さず採取した初代骨芽細胞 (F-Ob) における各マーカーの相対的遺伝子発現量の比較を示す。
n=8, mean \pm S.E.M. *P < 0.05 vs. day 0; **P < 0.01 vs. day 0; ***P < 0.001 vs. day 0; N.S., non-significant vs. day 0.

(a) 多能性マーカーの相対的遺伝子発現量

(b) 中胚葉・外胚葉・内胚葉マーカーの相対的遺伝子発現量。*Sox1*, *Sox17*, *Gata4* に関しては、枠内に相対的遺伝子発現量の上限を低く設定した図を表示。

(c) 骨芽細胞マーカーの相対的遺伝子発現量と *in vitro* 培養環境における初代骨芽細胞における骨芽細胞マーカーの相対的遺伝子発現量との比較

(d) 骨芽細胞マーカーの相対的遺伝子発現量と *in vitro* 培養を介さず採取した初代骨芽細胞における骨芽細胞マーカーの相対的遺伝子発現量との比較

(e) 低分子化合物を用いた成熟骨芽細胞分化誘導法の略図、各ステージにおける位相差像 (Day0、5、19 及び 23) 及び 2.3kb *Coll1a1*-GFP の発現を示す GFP 蛍光像 (Day 19 及び Day 23)。Bar, 100 μ m

図7

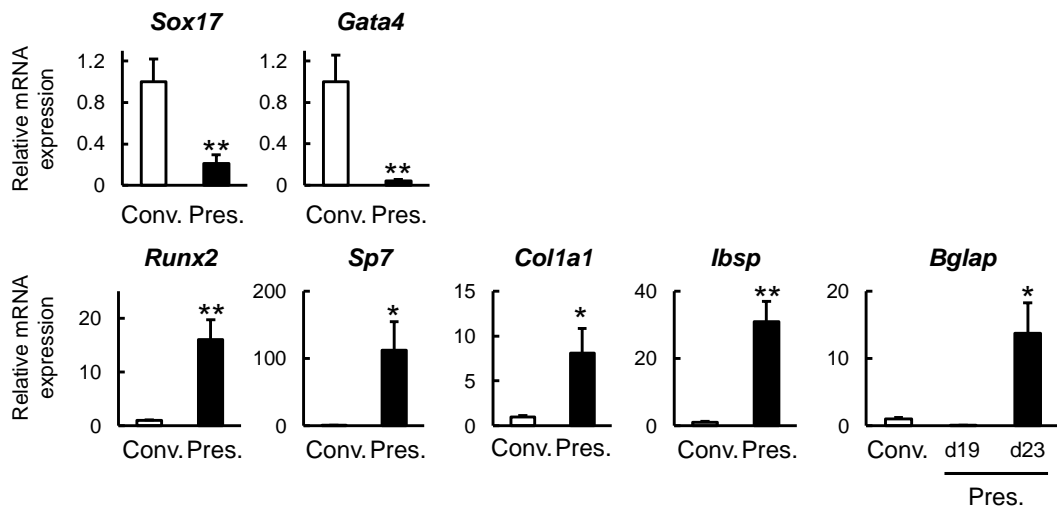


図7：従来の骨芽細胞誘導法との比較

Kawaguchi らが過去に報告した誘導法 (Conv.)と、今回の誘導法 (Pres.)の内胚葉マーカー (*Sox17* 及び *Gata4*)及び骨芽細胞マーカー (*Runx2*、*Sp7*、*Col1a1*、*Ibsp*、*Bglap*)の相対的遺伝子発現の比較。n=8、mean±S.E.M. *P < 0.05 vs. Conv.; **P < 0.01 vs. Conv.

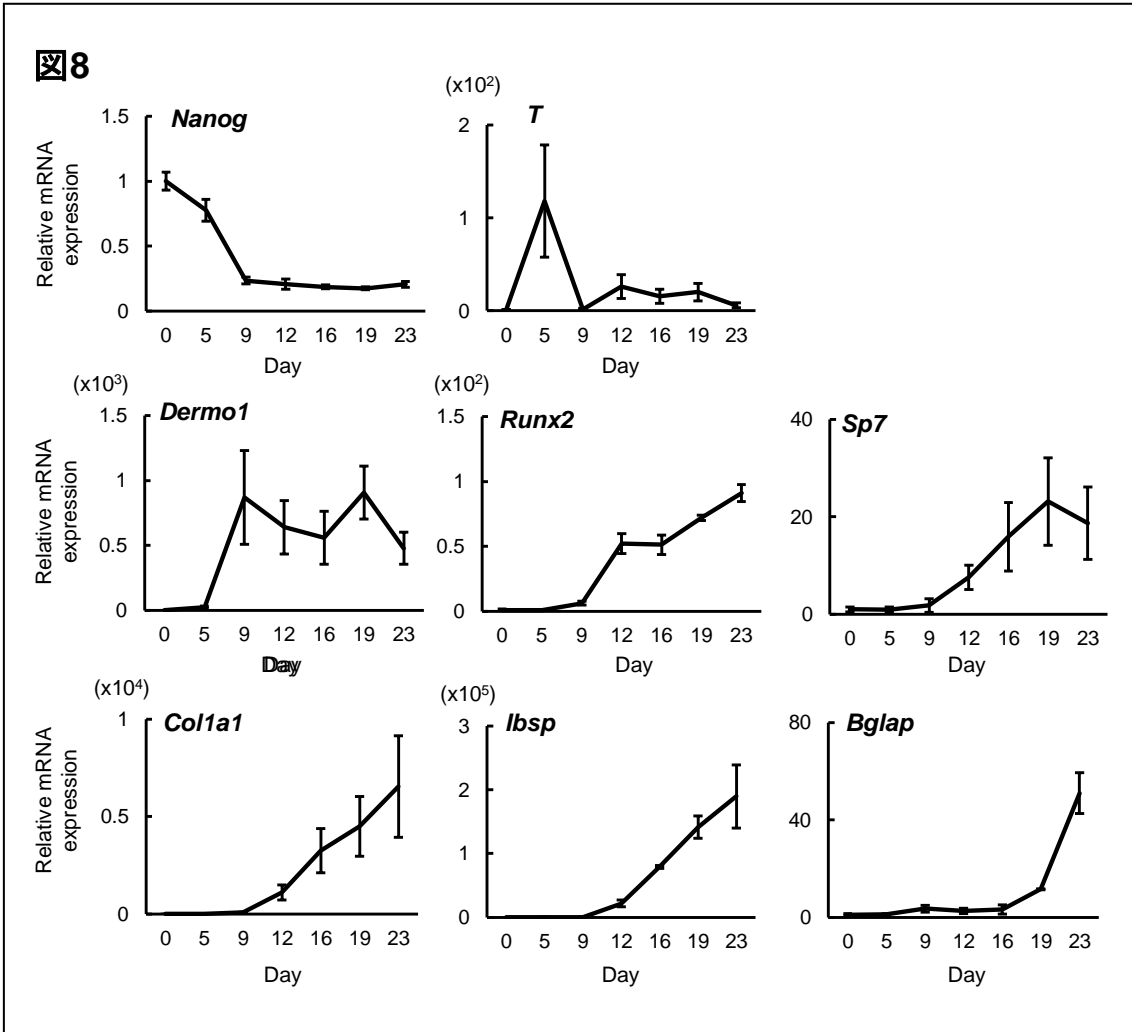


図8：誘導期間内の遺伝子変化の挙動

多能性期 (Day 0)、中胚葉誘導期 (Day 5)、骨芽細胞誘導期 (Day 9、12、16、19、23)における多能性マーカー (*Nanog*)、中胚葉マーカー (*T*)、骨格系前駆細胞マーカー (*Dermo1*)、骨芽細胞マーカー (*Runx2*、*Sp7*、*Col1a1*、*Ibsp*、*Bglap*)の相対的遺伝子変化の挙動。n=3、mean±S.E.M.

9

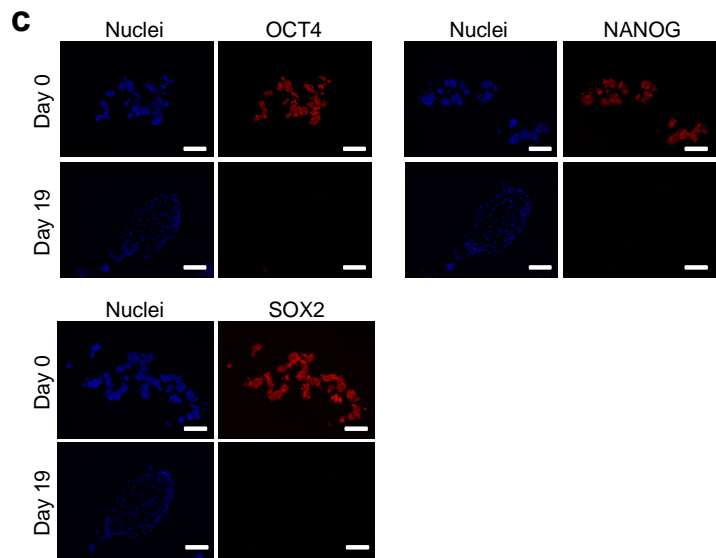
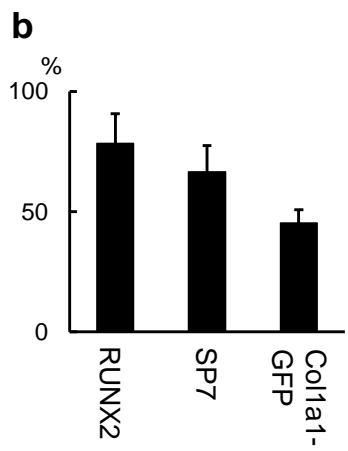
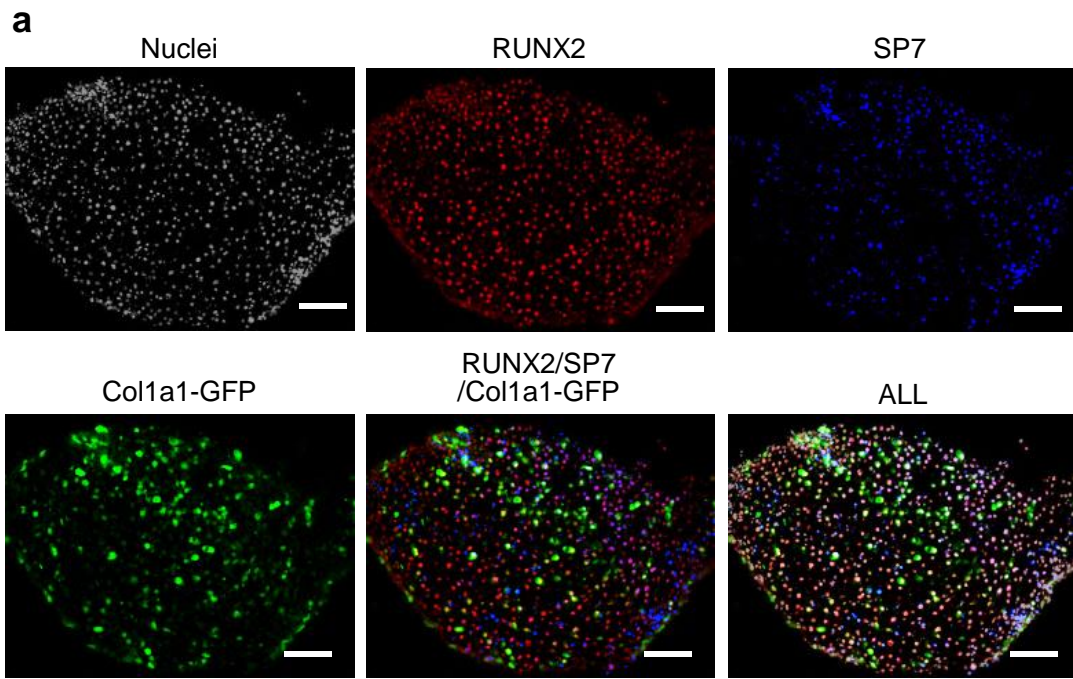


図 9 : 細胞免疫染色を用いたタンパクの発現

(a) 2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞に対し 19 日間骨芽細胞分化誘導を行い、RUNX2、SP7 及び GFP の細胞免疫染色を行った。Bar、100 μ m。示している像は全て疑似カラーで表示。

(b) 2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞に対し 19 日間骨芽細胞分化誘導を行った際の RUNX2、SP7 及び 2.3kb Col1a1-GFP 陽性細胞の細胞塊における割合。DAPI 陽性の細胞数を全細胞数とし、各マーカー陽性細胞の割合を算出。n=3、mean \pm S.E.M.

(c) Day 0 及び Day 19 における OCT4、NANOG 及び SOX2 の発現及び Day 19 における RUNX2 の発現。Bar、100 μ m。示している像は全て疑似カラーで表示。

図10

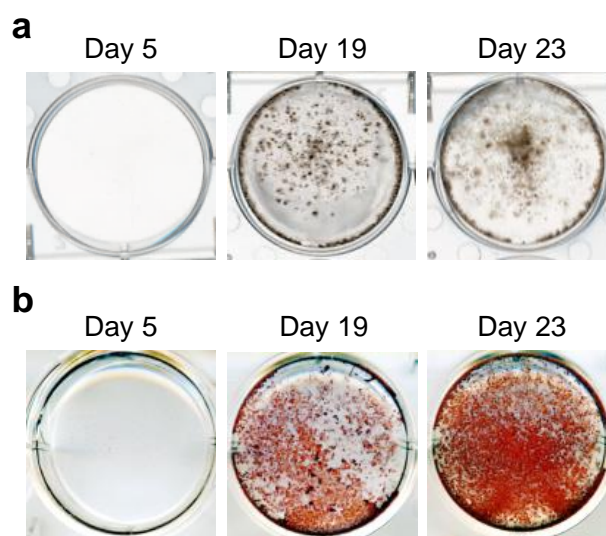


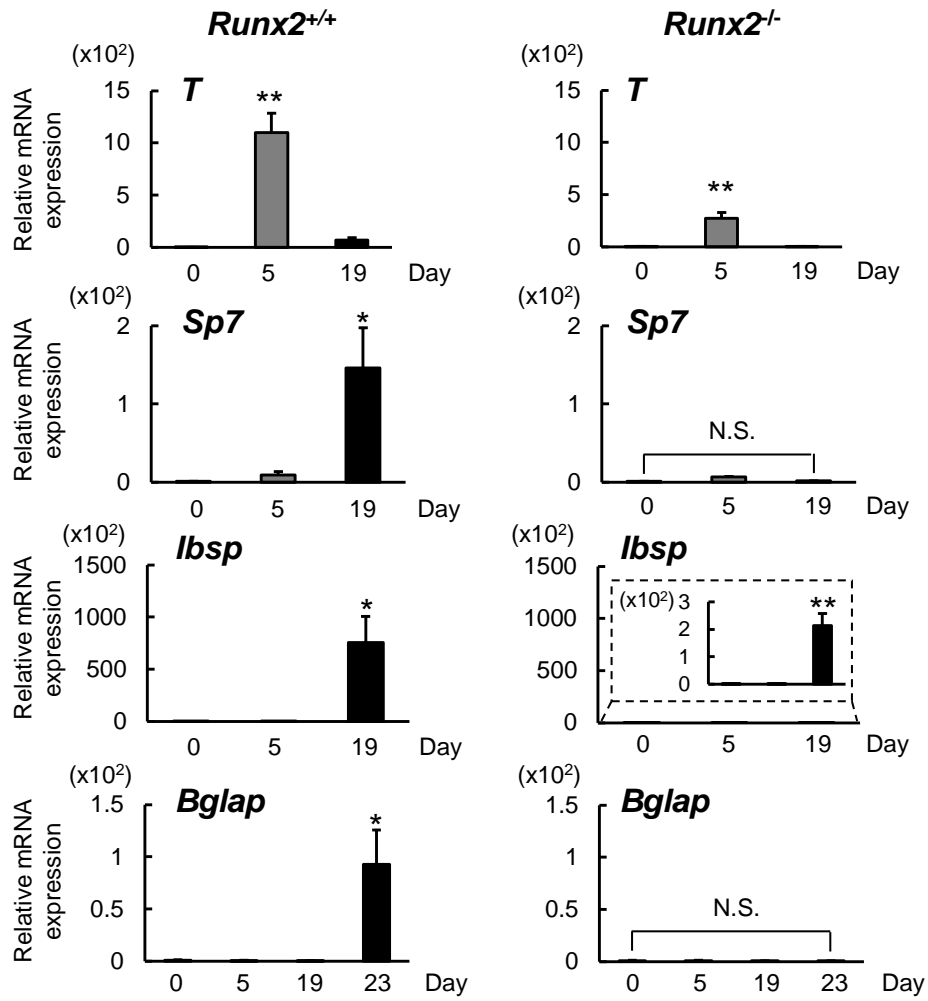
図 10 : von Kossa 染色及び Alizarin red 染色を用いた石灰化の評価

(a) 中胚葉期 (Day 5)、骨芽細胞誘導期 (Day 19 及び 23)における von Kossa 染色による石灰化

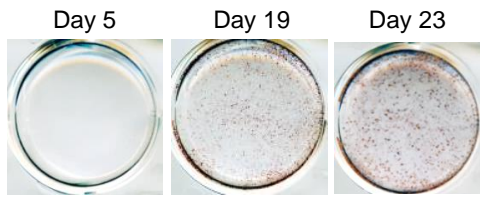
(b) 中胚葉期 (Day 5)、骨芽細胞誘導期 (Day 19 及び 23)における Alizarin red 染色による石灰化

11

a



b



c

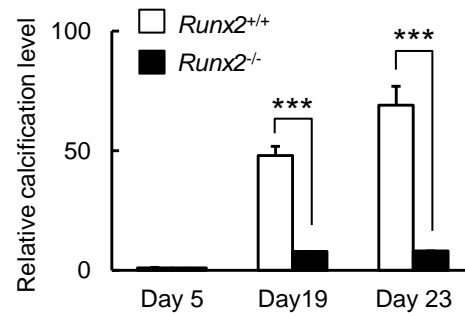


図 11 : *Runx2*^{-/-} マウス ES 細胞を用いた検証

(a) 野生型 (*Runx2*^{+/+})及び *Runx2*^{-/-} マウス ES 細胞において本誘導法を用いた場合の Day 0、Day 5、Day 19、Day 23 (*Bglap* のみ)における中胚葉マーカー (*T*) 及び骨芽細胞マーカー (*Sp7*、*Ibsp* 及び *Bglap*)の相対的遺伝子発現の比較。n=8、*P < 0.05 vs. day 0; **P < 0.01 vs. day 0; N.S., non-significant vs. day 0. *Runx2*^{-/-} マウス ES 細胞における *Ibsp* の発現に関しては、枠内に相対的遺伝子発現量の上限を低く設定した図を表示。

(b) *Runx2*^{-/-} マウス ES 細胞における中胚葉期 (Day 5)、骨芽細胞誘導期 (Day 19 及び 23)における Alizarin red 染色による石灰化の評価

(c) 野生型 (*Runx2*^{+/+})及び *Runx2*^{-/-} マウス ES 細胞間の石灰化の程度の比較
n=6、mean ± S.E.M. ***p<0.001

第3章 マウス iPS 細胞を用いた骨芽細胞誘導法の検証

背景と目的

マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞同様に、分化万能性を持つ細胞である。そこで本章では、マウス iPS 細胞においても、今回開発した骨芽細胞誘導法が有効であるかを検証することを目的とした。その際、マウス ES 細胞及びマウス iPS 細胞間でどちらが優位に石灰化を誘導するかについても評価した。

3-1 材料と方法

3-1-1 細胞培養

マウス iPS 細胞は、Green マウス³³より採取した線維芽細胞に pMxs-mOct4-mSox2-mKlf4 を導入して作製された (東京大学医科学研究所の正木英樹博士より供与)^{34,35}。マウス iPS 細胞は、フィーダー細胞 (マウス胎児線維芽細胞) 上で、抗生剤、15% FBS (Sigma-Aldrich)、2 mM L-Glutamine (Gibco)、1% NEAA (Gibco)、0.1 mM β -mercaptoethanol (Gibco) 及び 10^3 U/mL LIF (Millipore) を含む DMEM 中にて 37°C 5% CO₂ で未分化性を維持して継代培養し、1-1-1A に示す 2i 培養法に馴化した³⁶。

3-1-2 Real-time PCR

1-1-2 で記載した方法と同様に行った。

3-1-3 細胞免疫染色

2-1-3 で記載した方法と同様にサンプルを取得した。RUNX2、SP7 及び GFP の同時染色には 2-1-3 で記載した方法と同様に、rabbit IgG Labeling Kit Zenon® を用い、発色には rabbit anti-RUNX2 (Santa Cruz Biotechnology, 1:50) を 4 °C で一晩反応させたのち、2 次抗体 (Anti-rabbit (IgG) Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1:500)) を室温で 1 時間反応させた。その後、GFP の免疫染色には、rabbit IgG Labeling Kit Zenon® Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Z25302) を用い、SP7 の免疫染色には、rabbit IgG Labeling Kit Zenon® Alexa Fluor® 647 (Invitrogen, Z25308) を用い、DAPI にて核染色を行った。画像の取得及び解析には、BIOZERO-9000 (KEYENCE) 及び BZ Analyzer Software (KEYENCE) を用いた。

3-1-4 Alizarin red 染色

2-1-4 で記載した方法と同様に行った。

3-1-5 統計学的解析

1-1-3 で記載した方法と同様に行った。

3-2 結果

3-2-1 誘導方法及び各ステージにおける遺伝子変化の検証

本誘導法がマウス ES 細胞だけでなくマウス iPS 細胞においても応用可能かを 2i 培養法に馴化したマウス iPS 細胞を用い検証した。

誘導のストラテジー及び位相差コントラスト像による各ステージの細胞形態を示す (図 12a)。マウス ES 細胞同様、マウス iPS 細胞においても誘導開始前 (Day 0)には、2i 培養法に特徴的な小さいコロニーを示し、CHIR 及び Cyc により 5 日間誘導した場合 (Day 5)、円形の辺縁粗なコロニーを示す。中胚葉誘導後、SAG 及び TH を同時曝露し、14 日間培養した場合 (Day 19)、その後 4 日間誘導因子を除き培養した場合 (Day 23)において、マウス ES 細胞同様、巨大化したコロニーの存在を認めた。

各ステージにおける遺伝子発現変化を調べた。多能性マーカー遺伝子である *Nanog* は、Day 0 で最も高く、分化誘導が進むにつれ減少する。また、中胚葉マーカー遺伝子である *T* 及び *Mixl1* は、Day 0 では発現が低く、中胚葉期である Day 5 で有意に上昇し、Day 19 では発現が減少する。Day 19 までに、骨芽細胞分化マーカー遺伝子である *Runx2*、*Sp7*、*Coll1a1* 及び *Ibsp* は、Day 0 と比較して有意な遺伝子上昇を認めた。成熟骨芽細胞のマーカー遺伝子である *Bglap* は、マウス ES 細胞と同様に、Day 19 までに上昇を認めず、その後 4 日間誘導因子を除

いた環境で培養した場合 (Day 23)に発現上昇を認めた (図 12b)。遺伝子発現の結果から、マウス iPS 細胞においても骨芽細胞は誘導されることが示唆された。さらに、遺伝子変化のパターンは、マウス ES 細胞の遺伝子変化のパターンと類似した。

3-2-2 細胞免疫染色を用いた骨芽細胞関連タンパクの発現の検証

骨芽細胞マーカーである RUNX2 及び SP7 のタンパクの発現を用い細胞免疫染色にて調べたところ、誘導 23 日目において、細胞塊の中に骨芽細胞マーカーである RUNX2 及び SP7 の発現を認めた。RUNX2 及び SP7 の発現は CAG-GFP と共発現しており、誘導された細胞はマウス iPS 細胞由来であり、その細胞は骨芽細胞マーカーを強く発現していることが示唆された (図 13)。

3-2-3 Alizarin red 染色を用いた石灰化の検証

CAG-GFP マウス iPS 細胞を用い、誘導 5 日目 (Day 5)、誘導 19 日目 (Day 19)、誘導 23 日目 (Day 23)での石灰化を Alizarin red 染色を用い評価したところ、Day 19、Day 23 において、一様に石灰化した細胞塊を認めた (図 14a)。

さらに、同じ多能性維持法及び骨芽細胞誘導方法を用いた際に、マウス ES 細胞とマウス iPS 細胞の間で石灰化能に違いがあるかどうかを比較したところ、Day 19 においては、両者において石灰化能に差は認められなかったものの、Day 23 においては、マウス ES 細胞の方がマウス iPS 細胞に比べ、有意に石灰化した (図 14b)。つまり、マウス ES 細胞の方が石灰化の効率が低い可能性が示唆された。

3-3 小括

本方法は、マウス ES 細胞のみならずマウス iPS 細胞においても、低分子化合物のみを用いて、無血清培地下で段階的に骨芽細胞を誘導することができる。

さらに、マウス iPS 細胞と比較しマウス ES 細胞の石灰化能の優位性が示唆された。

図12

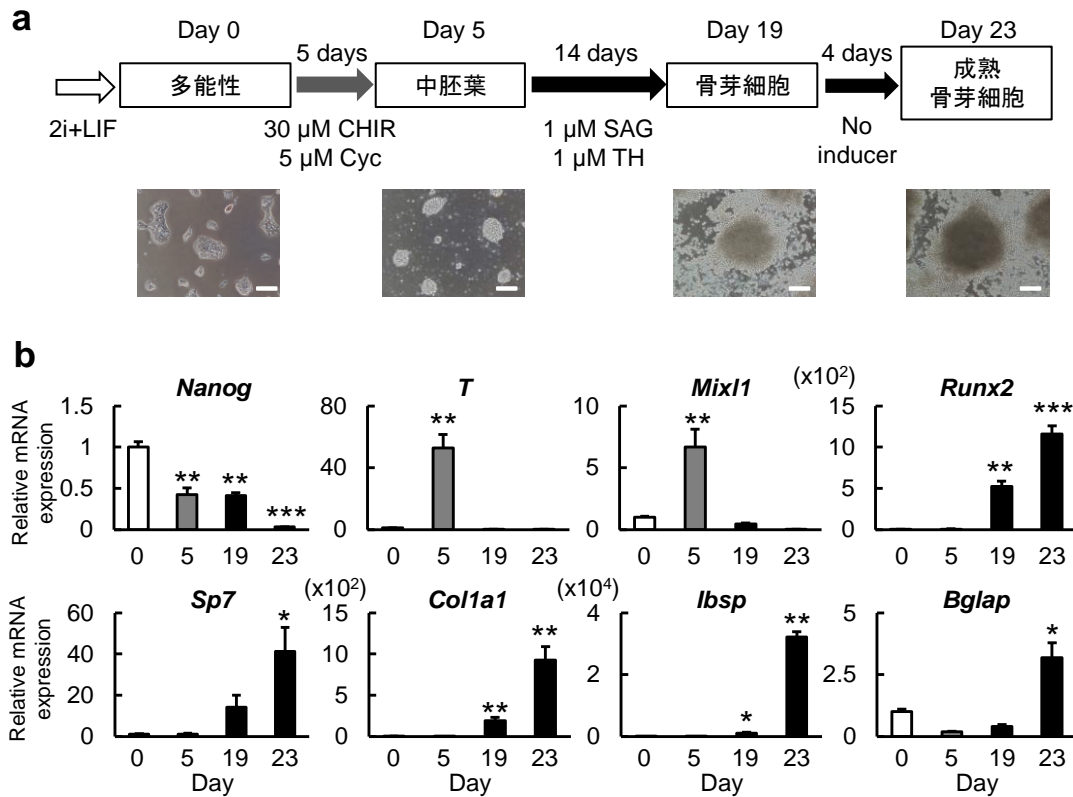


図 12 : マウス iPS 細胞における誘導方法及び各ステージにおける遺伝子変化

(a) 低分子化合物を用いた誘導法の略図及び各ステージにおける位相差像。

Bar, 100 μ m

(b) 2i 培養法にて維持されているマウス iPS 細胞の誘導開始前 (多能性期、Day 0)、30 μ M CHIR 及び 5 μ M Cyc にて 5 日間誘導した群 (中胚葉期、Day 5)、その後 1 μ M SAG 及び 1 μ M TH にて 14 日間誘導した群 (骨芽細胞期、Day 19)、その後誘導因子なしで 4 日間培養した群 (成熟骨芽細胞期、Day 23)における各マーカーの相対的遺伝子発現量の比較を示す。n=6、mean \pm S.E.M. *P < 0.05 vs. day 0; **P < 0.01 vs. day 0; ***P < 0.001 vs. day 0.

図13

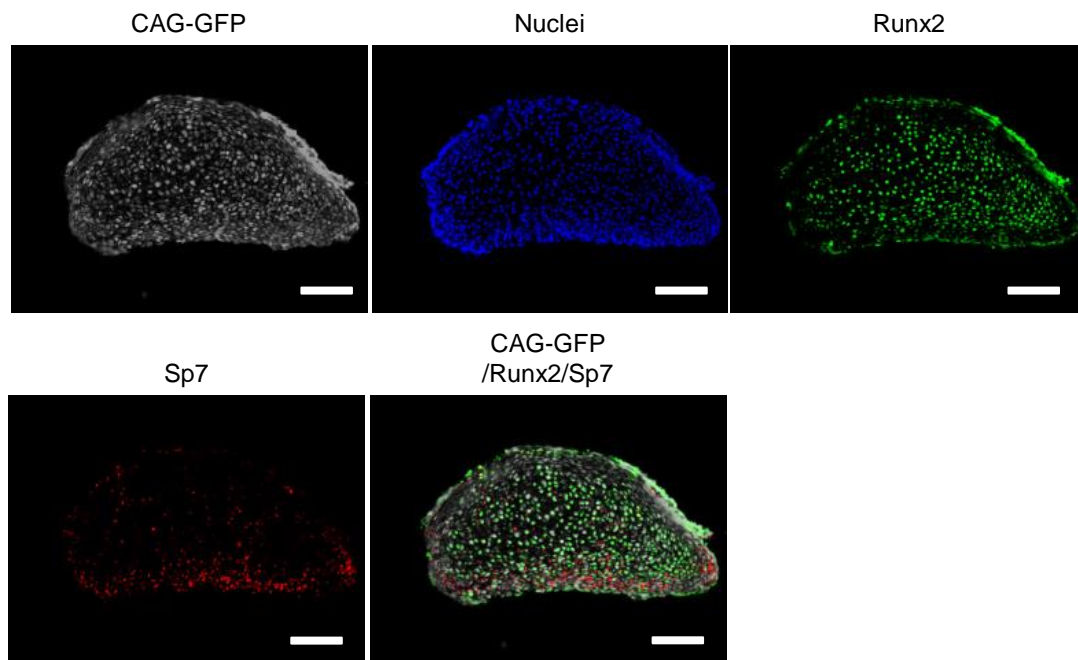


図 13 : 細胞免疫染色によるタンパクの発現

CAG-GFP マウス iPS 細胞に対し 23 日間骨芽細胞分化誘導を行い、RUNX2、SP7 及び GFP の細胞免疫染色を行った。Bar、100 μm 。示している像は全て疑似カラーで表示。

図14

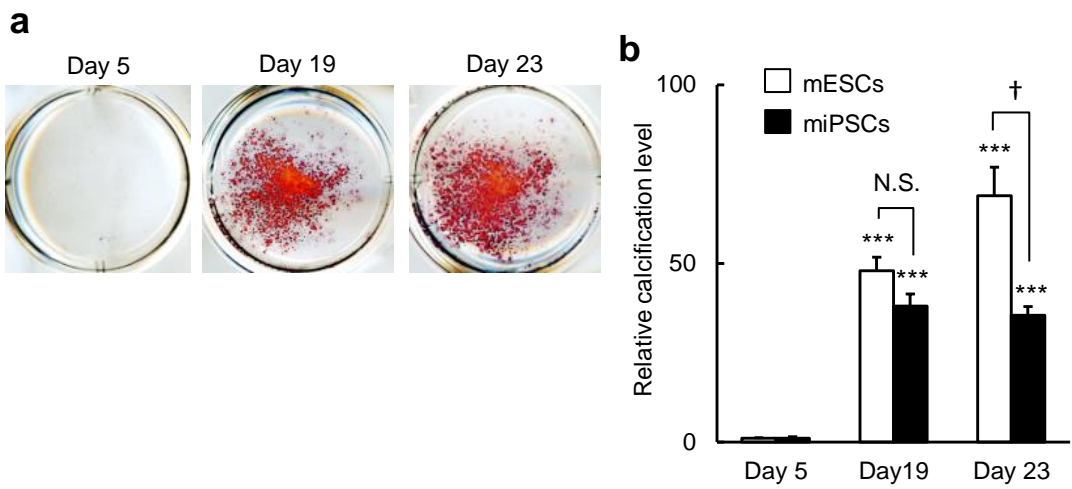


図 10 : マウス iPS 細胞における細胞塊の石灰化の評価

(a) 中胚葉期 (Day 5)、骨芽細胞誘導期 (Day 19 及び 23)における Alizarin red 染色による石灰化

(b)マウス ES 細胞及びマウス iPS 細胞間の石灰化の程度の比較。n=6、mean ±S.E.M. ***P<0.001 vs. day 5; N.S., non-significant; †P<0.05.

第4章 ヒト iPS 細胞を用いた骨芽細胞誘導法の検証

背景と目的

ヒト iPS 細胞からの骨芽細胞誘導法を確立することは、骨関連疾患の病態解明及び骨の再生医療の進歩への足掛かりとなる。これまでに、ヒト iPS 細胞から無血清培地と低分子化合物のみを誘導剤として用いた骨芽細胞誘導法は、渉猟しうる限り報告がない。そこで本章では、本方法が、ヒト iPS 細胞においても有効であるか検証することを目的とした。

4-1 材料と方法

4-1-1 細胞培養

ヒト iPS 細胞は、東京大学医科学研究所の正木英樹博士より、新生児皮膚繊維芽細胞 (Lonza) から、2A sequence を結合させた human *OCT4*、*KLF4* 及び *SOX2* pMXs ベクター (pMXs-hOKS) 及び human *MYC* pMXs ベクター (pMXs-hMYC) の導入により作成されたヒト iPS 細胞をご供与いただいた。ヒト iPS 細胞は、マイトマイシン C 処理したフィーダー細胞上で、抗生剤、20% knockout serum replacement (KSR; Gibco)、2 mM Glutamax (Gibco)、1% NEAA (Gibco)、0.1 mM β -mercaptoethanol (Gibco) 及び 5 ng/ml bFGF (Gibco) を含む DMEM/F12 (Gibco) 中にて、37°C 5% CO₂ で未分化性を維持して継代培養した。継代には、20% KSR

及び 1 mM CaCl₂ を含む 0.25% trypsin (Invitrogen)を用いた。Matrigel (BD Biosciences)コートしたディッシュに細胞塊を播種し、10 μM ROCK inhibitor (Y-27632; Calbiochem)を添加した mTeSR1 medium (STEMCELL Technologies)にて 5 日間培養し、細胞密度が 50-70%になった後に 2-1-1 で記した方法に従い誘導を開始した。

4-1-2 Real-time PCR

内在性コントロールとして *GAPDH* 遺伝子を用い、その他は 1-1-2 で記載した方法と同様に行った。解析に使用したプライマーの配列を表 2 に示す。

4-1-3 細胞免疫染色

2-1-3 で記載した方法と同様にサンプルを取得した。RUNX2 及び SP7 の同時染色には、mouse anti-RUNX2 (Abcam, 1:200)及び rabbit anti-SP7 (Abcam, 1:500)を 4 °Cで一晩反応させたのち、2 次抗体 anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 488 及び anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 546 (Invitrogen, 1:500)を室温で 1 時間反応させ、洗浄した後、同様に DAPI にて核染色を行った。画像の取得及び解析には、BIOZERO-9000 (KEYENCE) 及び BZ Analyzer Software (KEYENCE)を用いた。

4-1-4 Alizarin red 染色

2-1-4 で記載した方法と同様に行った。

4-1-5 統計学的解析

1-1-3 で記載した方法と同様に行った。

表 2 本研究で使用したプライマーの配列 (RT-PCR, ヒト用)

Gene	Primer sequences (forward and reverse, 5'-3')
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA
	GAAGATGGTGATGGGATTTTC
<i>NANOG</i>	AACTGGCCGAAGAATAGCAA
	TGCACCAGGTCTGAGTGTTTC
<i>T</i>	CAGTCAGTACCCCAGCCTGT
	ACTGGCTGTCCACGATGTCT
<i>MIXL1</i>	GGATCCAGGTATGGTTCCAG
	GGGCAGGCAGTTCACATCTA
<i>RUNX2</i>	CAGACCAGCAGCACTCCATA
	CAGCGTCAACACCATCATTC
<i>SP7</i>	AAGCTGATCTGGTGGTGCAT
	GACTCCACAAAGGGCATGAT
<i>COL1A1</i>	GTGCTAAAGGTGCCAATGGT
	CTCCTCGCTTTCCTTCCTCT
<i>IBSP</i>	TTCATTGAATGGTTTGAGGTTG
	AGTGTTGCATAGGTAGTGCGATT
<i>BGLAP</i>	GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG
	AGCAGAGCGACACCCTAGAC

4-2 結果

4-2-1 誘導方法及び各ステージにおける遺伝子変化の検証

ヒト iPS 細胞を用いた骨再生療法を目指し、本誘導法がヒト iPS 細胞に応用できるかどうかを調べた。マウス多能性細胞で用いていた 2i 培養法は、ヒト多能性細胞の多能性を維持せず、外胚葉分化を誘導するという報告が存在する²⁶。そのため、2i 培養法に代わって、これまでに多能性維持に有効と報告されている mTeSR1 培地及び ROCK インヒビターを用いた維持培養法を用い、足場として Matrigel®を用いた^{37,38}。誘導のストラテジー及び各ステージにおける細胞の形態を位相差コントラスト像で示す (図 15a)。同維持法で 5 日間培養したヒト iPS 細胞は、マウス多能性幹細胞と異なり、Day 0 において扁平なコロニーを示す。中胚葉誘導期間中、大半のコロニーは分解し、Day 5 において小さいコロニーを形成する。骨芽細胞分化誘導期では、細胞の増殖を認め、巨大なコロニーを形成する。

各ステージにおける遺伝子発現変化を調べた。多能性マーカー遺伝子である *NANOG* は、Day 0 で高く、分化誘導が進むにつれ減少する。また、中胚葉マーカー遺伝子である *T* 及び *MIXL1* は、Day 0 では発現が低く、中胚葉期である Day 5 で有意に上昇し、Day 19 では発現が減少する。骨芽細胞関連転写因子である *RUNX2* 及び *SP7* は共に、中胚葉誘導期から上昇し、Day 23 まで遺伝子発現は維持される、骨芽細胞基質関連因子である *IBSP* 及び *COL1A1* は、Day 19 もしく

は Day 23 までに、有意な上昇を認めた (図 15b)。遺伝子発現の結果から、ヒト iPS 細胞においては、RUNX2 や SP7 に代表される骨芽細胞関連転写因子の遺伝子変化の挙動はマウス ES 細胞及びマウス iPS 細胞と異なるものの、本方法によって骨芽細胞への分化が進んでいることが示唆された。

4-2-2 細胞免疫染色を用いた骨芽細胞関連タンパクの発現の検証

ヒト iPS 細胞を用い、骨芽細胞分化誘導を行った後、骨芽細胞マーカーである RUNX2 及び SP7 のタンパクの発現を細胞免疫染色にて調べた。誘導 23 日目において、細胞塊に骨芽細胞マーカーである RUNX2 及び SP7 の発現を認めた。RUNX2 は、細胞塊に一様に発現を認めるものの、同じく骨芽細胞マーカーである SP7 は、細胞塊の辺縁にのみ発現を認め、RUNX2 と共発現した (図 16)。

4-2-3 Alizarin red 染色を用いた石灰化の検証

ヒト iPS 細胞を用い、誘導 5 日目 (Day 5)、誘導 19 日目 (Day 19)、誘導 23 日目 (Day 23)での石灰化を Alizarin red 染色を用い評価した。Day 19 から Alizarin red 陽性の石灰化した細胞塊をいくつか認め、Day 23 において、一様に石灰化した細胞塊を認めた (図 17a)。

石灰化の定量においては誘導期間に応じた有意な石灰化を認めたものの (図 17b)、マウス ES 細胞、マウス iPS 細胞と比べると低い石灰化能を示し、石灰化誘導に関しては改善の余地を認める結果となった。

4-3 小括

本方法は、ヒト iPS 細胞においても、骨芽細胞を低分子化合物と無血清培地、無フィーダー環境下で段階的に誘導することができるものの、骨芽細胞マーカーの発現及び石灰化能に関してはさらなる改善が必要である。

図15

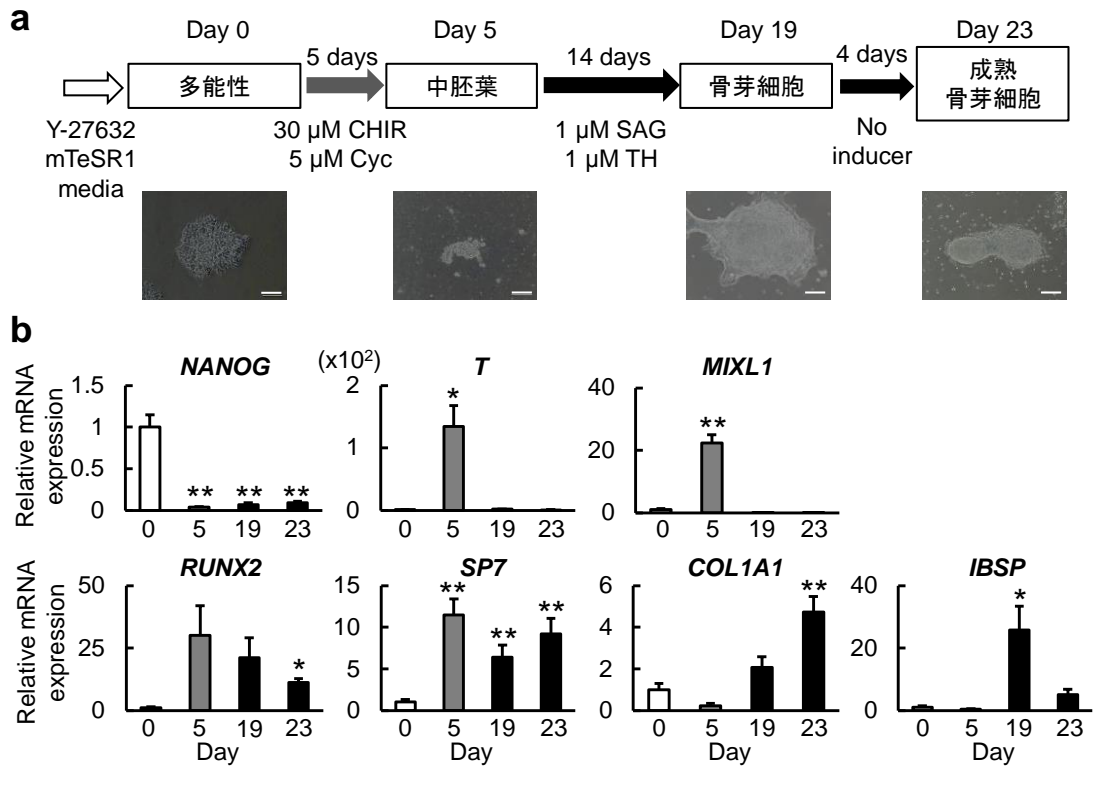


図 15 : ヒト iPS 細胞における誘導方法及び各ステージにおける遺伝子変化

(a) 低分子化合物を用いた誘導法の略図及び各ステージにおける位相差像。

Bar, 100 μm

(b) 5 日間 mTeSR 培地及び Y-27632 にて維持されているヒト iPS 細胞の誘導開始前 (多能性期、Day 0)、30 μM CHIR 及び 5 μM Cyc にて 5 日間誘導した群 (中胚葉期、Day 5)、その後 1 μM SAG 及び 1 μM TH にて 14 日間誘導した群 (骨芽細胞期、Day 19)、その後誘導因子なしで 4 日間培養した群 (成熟骨芽細胞期、Day 23)における各マーカーの相対的遺伝子発現量の比較を示す。n=6、mean±S.E.M. *P < 0.05 vs. day 0; **P < 0.01 vs. day 0.

図16

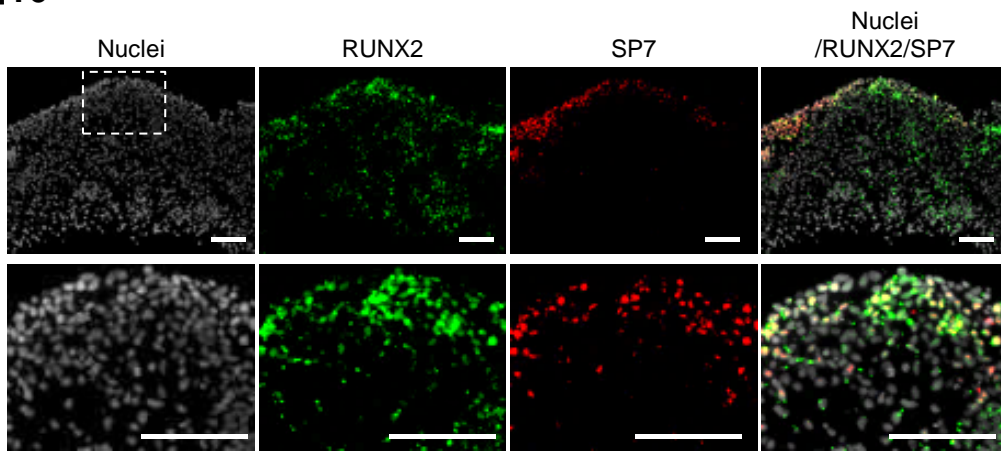


図 16 : 細胞免疫染色によるタンパクの発現

ヒト iPS 細胞に対し 23 日間骨芽細胞分化誘導を行い、RUNX2 及び SP7 の細胞免疫染色を行った。Bar、100 μm 。示している像は全て疑似カラーで表示。

図17

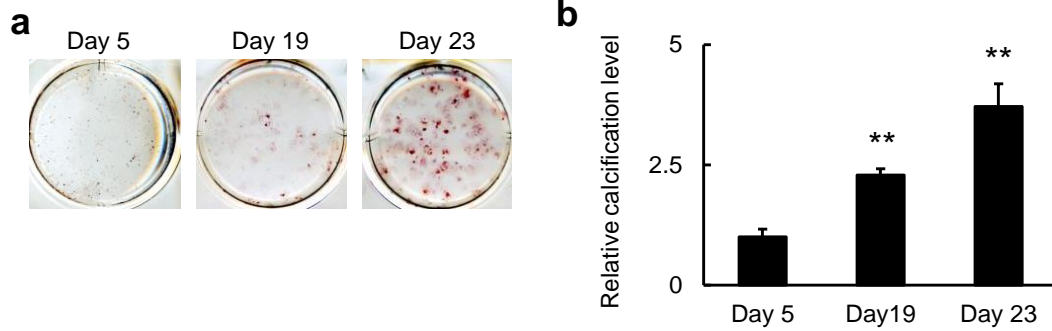


図 17 : ヒト iPS 細胞における細胞塊の石灰化の評価

(a) 中胚葉期 (Day 5)、骨芽細胞誘導期 (Day 19 及び 23)における Alizarin red 染色による石灰化

(b)ヒト iPS 細胞間の石灰化の定量。n=6、mean±S.E.M. **P<0.01 vs. day 5.

考察

1. 本法の新規性と利点

本研究で開発したマウス ES 細胞、マウス iPS 細胞及びヒト iPS 細胞の骨芽細胞誘導に用いる材料及び誘導法の略図を図 18 に示し、本法の新規性と利点及びその根拠を以下に列挙する。

① 低分子化合物のみを誘導因子として用いた誘導法

- タンパクを用いた誘導法に比べ低コスト
- タンパクを用いた誘導法に比べ安定的
- 骨芽細胞誘導に必要なベクターの作成などが不要

② 無フィーダー、無血清の培養環境。

- マウス ES 細胞及びマウス iPS 細胞における誘導に関しては、既知の成分のみを使用
- ヒト iPS 細胞に関しては、未知の成分を限りなく取り除いた方法

③ マウス ES 細胞、マウス iPS 細胞及びヒト iPS 細胞に応用可能な誘導法

- マウス ES 細胞に関しては、過去の報告にある骨芽細胞誘導法より効率的な分化誘導が可能
- マウス ES 細胞を本誘導法にて誘導した場合、骨芽細胞関連転写因子の遺伝子発現レベルは、*in vivo* から採取した骨芽細胞の発現レベルと同等

④ 生理的な骨芽細胞の分化を一部模倣した誘導法

- 遺伝子改変多能性幹細胞と組み合わせることで骨発生学研究の新たなツールとなる可能性

本研究の知見から、本誘導法が骨の発生学、骨関連疾患の病態解明及び治療、さらには骨の再生医療の進歩への足掛かりとなる可能性が示唆された。

2. 本法のさらなる改善に向けて

1.で示した新規性・利点・今後の可能性の一方で、このコンセプトをさらに改善するためには、いくつかの検討が必要であると考えている。以下に順を追って説明する。

- ① 使用した4つの化合物のうち、THの標的分子は解明されておらず、これを解明する必要がある。

Ohbaらが、THがBMPや*Runx2*の濃度依存性に骨芽細胞前駆細胞の成熟を促進するTHの効果を発見しているものの²⁰、THの直接的な標的分子は未だ同定されていない。TH結合タンパク質を同定するため、現在、ナノ磁性ビーズ結合型THを用いたTHと相互作用するタンパク質のアフィニティ精製と、液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS/MS)を用いた精製物の解析を行っている。このアプローチは、サリドマイドの標的分子の同定を通じ、新たな四肢形成関連

分子としてセレブロンを同定した研究に支持されており、科学的に妥当な方法である³⁹。標的分子の候補が同定された場合は、その妥当性を検証するため、候補分子の精製タンパク質と TH との結合を確認する予定である。さらに、候補因子の siRNA を用いた機能喪失実験、遺伝子発現系を用いた機能獲得実験を行い、TH の骨分化促進作用を解明する必要がある。

② ヒト iPS 細胞における骨芽細胞分化誘導効率の改善

マウス ES 細胞及びマウス iPS 細胞に用いた条件は、全て既知の成分で構成される培養環境であるが、ヒト iPS 細胞においては未知の成分を含む Matrigel® を用いた。これは、誘導期間中のヒト iPS 細胞の生着率及び生存率が改善するためである。Matrigel® は、EHS マウス肉腫細胞由来の基底膜マトリックスであり、いくつかの増殖因子を含むタンパクが同定されているものの、全ての構成成分の同定までは至っていない⁴⁰。Matrigel® に含まれる増殖因子が骨芽細胞の分化を制御している可能性も考えられるため、今後増殖因子を含まない既知の成分で構成された足場材料を用いた誘導法を確立する必要がある。

さらに、マウス多能性幹細胞の維持培養法である 2i 培養法は、4-2-1 の項で述べたように、ヒト多能性幹細胞の維持培養に応用できない。今回用いた mTeSR1 培地を用いた多能性の維持の方法は、一般的に用いられている手法であるもの

の、不均一な細胞集団であることが一細胞解析によって明らかとなっている⁴¹。近年、Gafni 及び Chan らによってヒト ES 細胞及びヒト iPS 細胞を用いた基底状態での多能性維持の方法が報告されている^{42,43}。しかし、ヒト多能性幹細胞の多能性維持の方法に関しては一定の見解が得られておらず、未だ議論の分かれるところである。マウス ES 細胞やマウス iPS 細胞の間では、骨芽細胞分化における遺伝子発現の挙動は類似していたが、ヒト iPS 細胞とは異なっていた。このことは、遺伝子発現挙動には、多能性幹細胞の種類ではなく、維持の方法が影響を与えている可能性を示唆している。ヒト多能性幹細胞の基底状態での多能性維持の方法の動向を今後も追いながら、より良い多能性維持法を選択することで、骨芽細胞への誘導効率の改善が認められる可能性があると考えている。

さらに、今回の誘導法では、これまでのマウス遺伝学や *in vitro* の報告に基づいて、Hh シグナルを利用した骨芽細胞誘導を行った。しかし、ヒト間葉系幹細胞において Hh シグナルは骨芽細胞分化を負に制御するという報告も存在する⁴⁴。つまり、ヒトにおける骨芽細胞の発生・分化における Hh シグナルの寄与機構はマウスのそれと異なる可能性が考えられる。したがって、ヒト多能性幹細胞の骨芽細胞分化に関しては、骨芽細胞分化に用いるシグナルの最適化を行う必要がある。遺伝子改変マウスを用いた研究から、これまでに様々なシグナルの骨形成、骨代謝における寄与が報告されている。Long らによる代表的な骨形成性

シグナルとその機能に関する報告では、Wnt シグナル及び BMP シグナルは、*Runx2* 陽性細胞から *Sp7* 陽性細胞への分化を誘導し、FGF シグナルは骨芽細胞の増殖や分化に関与するとされている⁴⁵。これらのシグナルを段階的かつ適切な時期に用いることで、ヒト多能性幹細胞の骨芽細胞分化効率が改善される可能性がある。

③ 今回誘導された細胞が生体内で骨芽細胞として機能を果たすかの検討

今回の誘導法はそれぞれの細胞において、骨芽細胞マーカーの発現、石灰化の発現を *in vitro* において認めているが、生体内で骨芽細胞として機能するかどうかに関しての検証を行うまでに至っていない。骨芽細胞特異的に GFP の蛍光発現が認められる 2.3kb *Col1a1*-GFP マウス ES 細胞を用い、GFP 発現細胞を単離し、生体吸収性を持つ足場材料に内包し、マウス頭蓋冠欠損モデルを用いて、細胞移植を行い、同所性骨治癒がなされるかを観察することを検討している。

3. 本法の今後の応用について

先述したように、多能性幹細胞は、組織分化・発生研究、希少疾患の病態解明及び治療、幹細胞を用いた再生医療において有望なツールとなる。本誘導法の開発によってどのような研究に応用できるか、3点列挙し考察する。

① 骨発生学研究の新たなツールとしての応用

骨芽細胞分化初期マーカー発現前後は細胞の単離が困難であり、生体から目的の細胞を採取することは難しい。このような技術的制約から、新規制御因子の探索や転写ネットワークの解析が困難であった。Paigeらは最近、生体からの採取が困難な細胞集団に対して、多能性幹細胞を用いた組織誘導法とクロマチン免疫沈降 (ChIP) と次世代シーケンサーによるエピゲノム解析 (ChIP-seq) を組み合わせたアプローチを報告している。Paigeらは、ヒト ES 細胞より心筋細胞を誘導し、心筋分化過程におけるヒストン修飾の変化を ChIP-seq にて追跡することにより、心筋分化に関わる新規制御因子を同定している⁴⁶。さらに、Petersonらは、マウス ES 細胞を用いた神経管誘導法と ChIP-seq を用い、転写因子である *Gli1* と *Sox2* の神経特異的な新規結合領域を同定し、神経管分化における Hh シグナルと *Sox2* の遺伝子相互ネットワークを示している⁴⁷。このように、ChIP-seq と本骨芽細胞誘導法を組み合わせることで、骨芽細胞分化に関与する新規の制御因子の同定や骨芽細胞分化における転写ネットワークの理解が進む可能性がある。

② 骨関連疾患の病態解明及び治療への応用

希少疾患患者から作成したヒト iPS 細胞から目的組織を誘導して病態解明の

ツールとする試みや、新規治療薬を同定する試みが広くおこなわれている。近年 Yamashita らは、軟骨形成不全患者由来の線維芽細胞から作成したヒト iPS 細胞から誘導した軟骨細胞を用いて薬剤のスクリーニングを行い、軟骨形成不全患者に対する新規治療薬の候補を報告している⁴⁸。骨代謝の異常により引き起こされる疾患として、骨粗鬆症、骨軟化症・くる病、Paget 病、骨形成不全症、大理石骨病、McCune-Albright 症候群などが知られている。本誘導法の開発によって治療薬が見出される可能性の高い疾患として、進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP) や進行性骨異形成 (Osseous heteroplasia progressive; POH) が知られている。これまでに、FOP 患者由来のヒト iPS 細胞が樹立され、健常者の細胞と比べて FOP 患者由来の細胞の方が、骨化が促進しているという報告がなされている⁴⁹。本誘導法とこれら患者由来の iPS 細胞を組み合わせることにより、FOP に有効な薬剤のスクリーニングが有利になる可能性を秘めている。さらに、近年 TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) や CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術を用いた疾患モデル細胞作製法が報告されており、患者から細胞を採取することなく、疾患モデル細胞を作成することが可能になっている⁵⁰⁻⁵²。ゲノム編集技術による疾患モデルは、同じ遺伝的背景を持つ非遺伝子改変株と遺伝子改変株との比較が可能であることから、より特異性の高い治療法が開発される可能性がある。本誘導法と

ゲノム編集技術による疾患モデルの作製により、そのほかの骨系統疾患の病態
解明及び新規治療薬が同定される可能性が広がると考えられる。

③ ヒト iPS 細胞を用いた骨再生医療の臨床応用及び課題

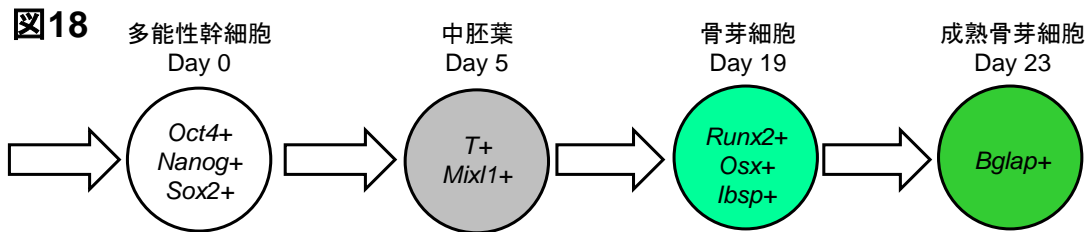
ヒト iPS 細胞の臨床応用を考えた場合、効率的な誘導法を用いるだけでなく、
癌化の抑制及び奇形腫の抑制を考慮しなければならない。癌化は、レトロウイ
ルスやレンチウイルスベクターによる遺伝子導入の際に、染色体にランダムに
挿入され、その際に遺伝子の変異が起こることが原因の一つであると報告され
ている⁵³。これを解決するために、外来遺伝子のゲノムへの組み込みを起こさな
いベクターであるセンダイウイルスやエピソーマルベクターなどを用い、多能
性の獲得を行う試みが報告されている^{54,55}。これらのベクターは、ホストゲノム
への挿入を起こさないため、外来遺伝子の挿入により起こる癌化の問題は一部
解決するものと考えられる。さらに、奇形腫の抑制に関しては、目的としない
未分化細胞などの細胞を除去すること、及び目的とする細胞の選択をする必要
がある。前者に対しては、未分化細胞特異的な細胞表面マーカーである TRA-1-60
などを標識し除去する。後者に対しては、骨芽細胞を特異的に採取する必要が
ある。そのためには、2.3kb Col1a1-GFP マウス ES 細胞のように、骨芽細胞特異
的に GFP を発現する細胞を作成する必要がある。しかし、高等真核細胞ではゲ

ノム DNA を含むターゲティングベクターを導入しても、相同組換えの頻度が非常に低いため作成効率が悪い。これらを解決するために、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN)、TALEN 及び CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト多能性幹細胞に対する効率的な遺伝子改変法が報告されている⁵⁶⁻⁵⁸。このような技術を用い、骨芽細胞特異的に GFP を発現する 2.3kb COL1A1-GFP ヒト iPS 細胞を作成し、未分化な細胞の除去及び骨芽細胞を分離・採取することで、細胞治療に用いることができる骨芽細胞特異的な細胞集団を得ることができる。

小規模の骨欠損には、現在、骨髄間葉系幹細胞の移植が用いられている。しかし、一度に採取できる細胞の量に限度があり、大型の骨欠損や骨喪失症例には用いることが困難となる。このような症例に対して、ヒト iPS 細胞は適応となる可能性を秘めている。しかし、大型の骨欠損の場合、細胞だけでなく適切な足場素材と組み合わせスペースを補填する必要がある。人工骨やアテロコラーゲンスポンジのような有形の足場材料と多能性幹細胞より誘導された骨芽細胞を組み合わせることにより *in vitro* にて骨組織を再現し、人工的に作成された骨を移植片として用いることが、大型骨欠損に対する骨再生戦略にとって有効ではないかと考える。

今回開発した低分子化合物と無血清培地を用いた多能性幹細胞からの骨芽細胞分化誘導法は、骨発生学・骨関連疾患の病態解明及び治療・骨再生医療のツ

ールとして有望であると考えられるが、いくつかの課題は残されている。しかし、本研究がこれらの研究を加速させる可能性は十分にあり、骨格組織の基礎研究と応用研究の両方に貢献するものと考えられる。



マウスES細胞及びマウスiPS細胞を用いた低分子骨芽細胞誘導法
無血清、無フィーダーかつ既知の成分のみを用いた (Defined) 培養法

足場素材

Gelatin

基本培地

2i culture media

β -GP、AsAp、Dex

維持試薬

CHIR
PD03
LIF

誘導薬

30 μ M CHIR
5 μ M Cyc

1 μ M SAG
1 μ M TH

なし

ヒトiPS細胞を用いた低分子骨芽細胞誘導法
無血清かつ無フィーダー培養法

足場素材

Matrigel®

基本培地

mTeSR™1
media

2i culture media

β -GP、AsAp、Dex

維持試薬

Y-27632

誘導薬

30 μ M CHIR
5 μ M Cyc

1 μ M SAG
1 μ M TH

なし

図 18 : マウス ES 細胞、マウス iPS 細胞及びヒト iPS 細胞の骨芽細胞誘導に用いる材料及び誘導法の略図

謝辞

本研究は主に東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門で行いました。本研究を行う機会を与えて下さり、4年間にわたり御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科口腔外科学分野 高戸毅教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行において、その立案から実験方法及び論文作成にわたって終始、直接親身に御指導並びに御鞭撻を賜りました東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 鄭雄一教授、大庭伸介特任准教授に心より感謝申し上げます。また御懇篤な御指導と貴重な御助言を賜りました骨・軟骨再生医療寄付講座 斎藤琢准教授、獨協医科大学 小宮山雄介博士、University of Southern California Dr. A. McMahon、北條宏徳博士に謹んで感謝申し上げます。

また貴重な実験材料を供与して頂いた、東京大学医科学研究所 中内 啓光教授、正木英樹博士、University of Connecticut Health Center: Dr. A. Lichtler、Imperial Cancer Research Fund: Dr. M. Owen に謹んで感謝申し上げます。

最後に、医学系研究科臨床医工学部門において共に研究し、実験の技術的指導と貴重な御助言を賜りました諸先生方、研究室の皆様に深謝致します。

参考文献

- 1 Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Engineering* **7**, 89-99, (2001).
- 2 Phillips BW, Belmonte N, Vernechet C, Ailhaud G, Dani C. Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **284**, 478-484 (2001).
- 3 zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* **71**, 18-27, (2003).
- 4 Tai G, Polak JM, Bishop AE, Christodoulou I, Buttery LD. Differentiation of osteoblasts from murine embryonic stem cells by overexpression of the transcriptional factor osterix. *Tissue Engineering* **10**, 1456-1466, (2004).
- 5 Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* **36**, 758-769, (2005).
- 6 Kao, C.-L. *et al.* Resveratrol Promotes Osteogenic Differentiation and Protects Against Dexamethasone Damage in Murine Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development* **19**, 247-258, (2010).
- 7 Li F, Bronson S, Niyibizi C. Derivation of Murine Induced Pluripotent Stem Cells (iPS) and Assessment of Their Differentiation Toward Osteogenic Lineage. *Journal of Cellular Biochemistry* **109**, 643-652, (2010).
- 8 Bilousova G, Jun du H, King KB, De Langhe S, Chick WS, Torchia EC, Chow KS, Klemm DJ, Roop DR, Majka SM. Osteoblasts Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Form Calcified Structures in Scaffolds Both in Vitro and in Vivo. *Stem Cells* **29**, 206-216, (2011).
- 9 Ye JH, Xu YJ, Gao J, Yan SG, Zhao J, Tu Q, Zhang J, Duan XJ, Sommer CA, Mostoslavsky G, Kaplan DL, Wu YN, Zhang CP, Wang L, Chen J. Critical-size calvarial bone defects healing in a mouse model with silk scaffolds and SATB2-modified iPSCs. *Biomaterials* **32**, 5065-5076, (2011).
- 10 Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-523, (2008).
- 11 Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochemical Journal* **408**, 297-315, (2007).
- 12 Davis LA, Zur Nieden NI. N. I. Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 2658-2674, (2008).
- 13 Zhang X, Peterson KA, Liu XS, McMahon AP, Ohba S. Gene Regulatory Networks Mediating Canonical Wnt Signal Directed Control of Pluripotency and Differentiation in Embryo Stem Cells. *Stem*

- Cells* **31**, 2667-79, (2013).
- 14 Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrughe B. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14665-14670, (2005).
- 15 St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development* **13**, 2072-2086, (1999).
- 16 Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* **131**, 1309-1318, (2004).
- 17 Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Gli1 Protein Participates in Hedgehog-mediated Specification of Osteoblast Lineage during Endochondral Ossification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 17860-17869, (2012).
- 18 Wang Y, McMahon AP, Allen BL. Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 159-165, (2007).
- 19 Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14071-14076, (2002).
- 20 Ohba S, Nakajima K, Komiyama Y, Kugimiya F, Igawa K, Itaka K, Moro T, Nakamura K, Kawaguchi H, Takato T, Chung UI. A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **357**, 854-860, (2007).
- 21 Maeda Y, Hojo H, Shimohata N, Choi S, Yamamoto K, Takato T, Chung UI, Ohba S. Bone healing by sterilizable calcium phosphate tetrapods eluting osteogenic molecules. *Biomaterials* **34**, 5530-5537, (2013).
- 22 Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *Faseb Journal* **21**, 1777-1787, (2007).
- 23 Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI. Hedgehog-Gli Activators Direct Osteo-chondrogenic Function of Bone Morphogenetic Protein toward Osteogenesis in the Perichondrium. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 9924-9932, (2013).
- 24 Martí E, Bovolenta P. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends in Neurosciences* **25**, 89-96, (2002).

- 25 Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Locatelli F, Riboldi G, Comi GP, Corti S. Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 3837-3847, (2010).
- 26 Marks H, Kalkan T, Menafrá R, Denissov S, Jones K, Hofemeister H, Nichols J, Kranz A, Stewart AF, Smith A, Stunnenberg HG. The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell* **149**, 590-604, (2012).
- 27 Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, McMahon AP. Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2623-2628, (2009).
- 28 Ogata N, Chikazu D, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Azuma Y, Ohta T, Kadowaki T, Nakamura K, Kawaguchi H. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *Journal of Clinical Investigation* **105**, 935-943, (2000).
- 29 Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry* **329**, 77-84, (2004).
- 30 Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* **133**, 3231-3244, (2006).
- 31 Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755-764, (1997).
- 32 Tu X, Joeng KS, Long F. Indian hedgehog requires additional effectors besides Runx2 to induce osteoblast differentiation. *Developmental Biology* **362**, 76-82, (2012).
- 33 Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *Febs Letters* **407**, 313-319, (1997).
- 34 Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, Kumagai H. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: Powerful tools in functional genomics. *Experimental Hematology* **31**, 1007-1014, (2003).
- 35 Tahara-Hanaoka S, Sudo K, Ema H, Miyoshi H, Nakauchi H. Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34(-) hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology* **30**, 11-17, (2002).
- 36 Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of Reprogramming to Ground State Pluripotency by Signal Inhibition. *Plos Biology* **6**, 2237-2247, (2008).
- 37 Harb N1, Archer TK, Sato N. The Rho-Rock-Myosin Signaling Axis Determines Cell-Cell Integrity of Self-Renewing Pluripotent Stem Cells. *Plos One* **3**, (2008).
- 38 Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ,

- Palecek SP. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1848-1857, (2012).
- 39 Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a Primary Target of Thalidomide Teratogenicity. *Science* **327**, 1345-1350, (2010).
- 40 Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **10**, 1886-1890, (2010).
- 41 Hough SR, Thornton M, Mason E, Mar JC, Wells CA, Pera MF. Single-Cell Gene Expression Profiles Define Self-Renewing, Pluripotent, and Lineage Primed States of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **2**, 881-895, (2014).
- 42 Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **504**, 282-286, (2013).
- 43 Chan YS, Göke J, Ng JH, Lu X, Gonzales KA, Tan CP, Tng WQ, Hong ZZ, Lim YS, Ng HH. Induction of a Human Pluripotent State with Distinct Regulatory Circuitry that Resembles Preimplantation Epiblast. *Cell Stem Cell* **13**, 663-675, (2013).
- 44 Plaisant M, Fontaine C, Cousin W, Rochet N, Dani C, Peraldi P. Activation of Hedgehog Signaling Inhibits Osteoblast Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **27**, 703-713, (2009).
- 45 Long, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 27-38, (2012).
- 46 Paige SL, Thomas S, Stoick-Cooper CL, Wang H, Maves L, Sandstrom R, Pabon L, Reinecke H, Pratt G, Keller G, Moon RT, Stamatoyannopoulos J, Murry CE. A Temporal Chromatin Signature in Human Embryonic Stem Cells Identifies Regulators of Cardiac Development. *Cell* **151**, 221-232, (2012).
- 47 Peterson KA, Nishi Y, Ma W, Vedenko A, Shokri L, Zhang X, McFarlane M, Baizabal JM, Junker JP, van Oudenaarden A, Mikkelsen T, Bernstein BE, Bailey TL, Bulyk ML, Wong WH, McMahon AP. Neural-specific Sox2 input and differential Gli-binding affinity provide context and positional information in Shh-directed neural patterning. *Genes & Development* **26**, 2802-2816, (2012).
- 48 Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* **513**, 507-511, (2014).
- 49 Matsumoto Y, Hayashi Y, Schlieve CR, Ikeya M1, Kim H, Nguyen TD, Sami S, Baba S, Barruet E, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Yamanaka S, Conklin BR, Toguchida J, Hsiao EC. Induced

pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **8**, 190, (2013).

50 Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, Trevisan M, Gupta RM, Moisan A, Banks E, Friesen M, Schinzel RT, Xia F, Tang A, Xia Y, Figueroa E, Wann A, Ahfeldt T, Daheron L, Zhang F, Rubin LL, Peng LF, Chung RT, Musunuru K, Cowan CA. A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. *Cell Stem Cell* **12**, 238-251, (2013).

51 Ding Q, Regan SN, Xia Y, Ostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced Efficiency of Human Pluripotent Stem Cell Genome Editing through Replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* **12**, 393-394, (2013).

52 Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, Yan Z, Li D, Li J. Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* **13**, 659-662, (2013).

53 Sugiura M, Kasama Y, Araki R, Hoki Y, Sunayama M, Uda M, Nakamura M, Ando S, Abe M. Induced Pluripotent Stem Cell Generation-Associated Point Mutations Arise during the Initial Stages of the Conversion of These Cells. *Stem Cell Reports* **2**, 52-63, (2014).

54 Macarthur CC, Fontes A, Ravinder N, Kuninger D, Kaur J, Bailey M, Taliana A, Vemuri MC, Lieu PT. Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells by a Nonintegrating RNA Sendai Virus Vector in Feeder-Free or Xeno-Free Conditions. *Stem Cells International*, (2012).

55 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* **324**, 797-801, (2009).

56 Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKever RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, Meng X, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* **27**, 851-857, (2009).

57 Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassidy JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology* **29**, 731-734, (2011).

58 Rong Z, Zhu S, Xu Y, Fu X. Homologous recombination in human embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 nickase and a long DNA donor template. *Protein & Cell* **5**, 258-260, (2014).