

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞(iPS細胞)作製・
制御等の医療基盤技術」
研究課題「分化細胞に多能性を誘導する転写因子
ネットワークの構造解析」

研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成26年3月

研究代表者:丹羽 仁史
(独立行政法人理化学研究所、プロジェクトリーダー)

§ 1. 研究実施の概要

(1) 実施概要

我々は本研究提案に於いて、従来の手法に iPS 的手法を組み合わせることにより、可逆的に多能性を喪失／獲得させ、この過程に於ける転写因子ネットワークの動的変化を解析することにより、より精緻にその構造を解明することを目指す。

研究計画は、以下の6つの部分から成る。

- (1) 多能性幹細胞の分化過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (2) 分化細胞における多能性誘導過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- (3) ヒト型とマウス型多能性幹細胞の違いを規定する転写因子ネットワークの解析
- (4) 転写因子ネットワークのノード構造の解明
- (5) 多能性獲得の指標となる遺伝子の同定
- (6) 多能性転写因子ネットワークモデルの構築

これらの各研究項目に関連して、これまでに以下の結果を得た。

- (1) マウスES細胞の多能性維持に必要なサイトカインLIFの入力は、Jak-STAT3-Klf4-Sox2 と PI3K-Akt-Tbx3-Nanog というカスケードが並列に入力する事により、多能性を規定するコア転写因子ネットワークへと入力している事を明らかにした(4)。さらに、Klf2, Klf4, Klf5, Tbx3 の順列組み合わせ誘導型ノックアウトES細胞を樹立し、これらの転写因子が LIF 依存的な多能性維持に重複機能ならびに並列機能を有する事を見いだした(論文未発表)。これに関連して、ホモ変異ES細胞を効率よく作成する技術開発に成功した(14)。また、マウスES細胞では、X染色体不活性化などのエピジェネティック制御が中立的な状態に置かれており、そのことが転写因子ネットワークの優位性を担保している事を示し(7)、マウスES細胞の多能性維持に寄与する Wnt シグナル入力の特異的転写因子 Esrrb であることを証明した(10)。一方で、このような多能性維持に関わる転写因子の機能が、分化過程で劇的に変換される事を、Sox2 のケースについて報告した(15)。
- (2) Piggy-Bac transposon を用いた誘導遺伝子発現システムを構築し、これを用いて iPS 細胞を樹立した。次に、この 1 次 iPS 細胞を用いて作成したキメラ胚から得た胎児性線維芽細胞で遺伝子発現を誘導する事により、2次 iPS 細胞が得られる事を確認した。さらにこの2次 iPS 細胞誘導システムを用いて、ヒストンアセチル化酵素 *Myst2* を山中4因子と同時に発現誘導すると、リプログラミング速度が亢進し、かつ効率も向上することを見いだした(論文作成中)。また、1 次 iPS 細胞にホルモン誘導型転写因子 *Gata6GR* を導入する事により、シャーレ内で分化誘導～2次 iPS 細胞誘導できるシステムを構築した。
- (3) ヒトES細胞ならびにヒト型多能性幹細胞のマウスモデルである EpiSC の安定かつ簡便な培養条件を確立し、ES細胞から胚様体形成を経て EpiSC を誘導するシステムを作成した。さらに、これを用いて、Oct3/4 誘導型ノックアウトES細胞から EpiSC を樹立し、EpiSC における Oct3/4 の機能喪失は、ES 細胞における場合と同様に栄養外胚葉分化を誘導するものの、これらの細胞は栄養外胚葉幹細胞としては維持できないことを見いだした(論文作成中)。また、これまではキメラ個体形成に寄与できないとされてきたマウス EpiSC を効率よくキメラ寄与させる方法を開発し、ヒト型多能性幹細胞も潜在的にはマウス ES 細胞に匹敵する多能性を有している事を証明した(11)。
- (4) Oct3/4 プロモーターに結合し、その転写活性を100倍活性化できる5つの転写因子の組み合わせを同定した。また、この組み合わせが生理的活性化状態をほぼ模倣している事を、Oct3/4 プロモーターの deletion mutants の活性化パターンから証明した(論文未発表)。
- (5) 遺伝子同定のために用いるジーントラップベクターを構築し、その動作を確認した。また、1コピーのベクターを効率よく導入する手段として、Tol2 transposon vector の有用性を検討した。
- (6) (1)で示したLIFシグナル入力下に機能する転写因子の発現パターンについて、共同研究によりブリーアンネットワークモデル構築を検討した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. マウスES細胞における LIF シグナル入力を司るシグナル伝達-転写因子並列回路の解

(Niwa et al, Nature, 2009)

概要: マウスES細胞の多能性維持に必須なサイトカイン LIF のシグナル入力が、3つの細胞内シグナル伝達機構を経て、異なる転写因子の発現/活性を制御し、多能性関連転写因子ネットワークを維持している事を明らかにした。発表から4年で200回以上の引用を受けていることから、基礎的知見として高い評価を受けていると考えられる。

2. マウスES細胞における Wnt シグナル入力標的としての転写因子 Esrrb の同定

(Martello, Sugimoto et al, Cell Stem Cell, 2012)

概要: マウスES細胞の多能性維持には Wnt シグナル入力も寄与するが、その作用機構は不明であった。本研究では、Wnt シグナルは Gsk3 の抑制~ β catenin の安定化を経て転写抑制因子 Tcf3 の機能を阻害し、その標的遺伝子である転写因子 Esrrb の発現を脱抑制させることにより、多能性関連転写因子ネットワークの維持に寄与している事を解明した。

3. 分化過程において転写因子 Sox2 の機能を転換する機構の解明

(Adachi et al, Mol Cell, in press)

概要: 多能性関連転写因子は、多能性幹細胞以外でも発現が見いだされるが、その機能は明らかではなかった。本研究では、マウス ES 細胞と TS 細胞において転写因子 Sox2 の機能を比較した。その結果、Sox2 の発現がこれらの細胞でそれぞれ異なるシグナル入力の制御を受け、さらに異なる転写因子と協調する事により、異なる標的遺伝子群の発現を制御している事を証明した。これは、一般的に、転写因子の機能を考える上で重要な知見であると考えられる。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 可溶性フィブロネクチンを用いたヒトES細胞のフィーダーを用いない培養系の開発

(Kitajima et al, BBRC, 2010)

概要: ヒトES細胞は通常マウス胎児性線維芽細胞をフィーダーとして培養される。本研究では、細胞を分散させるときに誘導されるアポトーシスを阻止する ROCK 阻害剤と可溶性フィブロネクチンを組み合わせる事により、単一細胞に解離されたヒトES細胞が、ゼラチンコートした基質上で効率よくコロニー形成できるようになる事を報告した。この方法は、ヒトES細胞の遺伝子操作を簡便に行う技術開発につながると考えられる。

2. マウスエピプラスト幹細胞からのキメラ個体作出法の開発

(Ohtsuka et al, PLoS One, 2012)

概要: マウスエピプラスト幹細胞 (EpiSC) は、胚盤胞に注入されてもキメラ個体発生に寄与できない事から、マウスES細胞より限定された多能性しか有していないと考えられてきた。本研究は、EpiSC に E-カドヘリンを一過性に発現させる事により、EpiSC から胚盤胞注入を経て再現性よくキメラ個体が作成できる事を証明した。このことは、ヒト型多能性幹細胞も潜在的にはマウス ES 細胞に匹敵する多能性を有している事を証明するとともに、ヒト型多能性幹細胞からキメラ個体を作成する新規技術開発の基盤ともなりうると考えられる。

3. ピューロマイシン耐性遺伝子を用いた高効率ホモ変異体ES細胞選択法の開発

(Nakatake et al, BMC Biotechnol, 2013)

概要: マウスES細胞において、片アレルに変異を持つES細胞から、稀に自発的 gene conversion により生じるホモ変異ES細胞を選択する手法は、ネオマイシン耐性遺伝子/G418系において原理的には確立されていたが、その効率は高くなかった。本研究では、ピューロマイシンとその耐性遺伝子を用いる事により、極めて効率よくホモ変異ES細胞が選択できることを報告した。この方法はマウスES細胞の遺伝子操作の簡便化につながる事が期待できる。

§ 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「丹羽」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
丹羽 仁史	(独) 理化学研究所	チームリーダー	H20. 6～
杉村 逸朗	同上	研究員	H20. 6～H21. 5
村上 和弘	同上	研究員	H20. 6～H24. 3
川口 実太郎	同上	研究員	H21. 1～H24. 3
西川 聡美	同上	研究員	H21. 11～
杉本 敏美	同上	研究員 (予定)	H21. 4～
藤井 勢津子	同上	テクニカルスタッフ	H22. 4～
伊藤 俊介	神戸大学大学院医学系 研究科博士課程	大学院生 (D3)	H23. 4～
浦 大樹	(独) 理化学研究所	研究員	H24. 4～

研究項目

- ・多能性幹細胞の分化過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- ・分化細胞における多能性誘導過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析
- ・ヒト型多能性幹細胞とマウス型多能性幹細胞の違いを規定する転写因子ネットワークの解析
- ・転写因子ネットワークのノード構造の解明
- ・多能性転写因子ネットワークモデルの構築

② 「長田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
長田 智治	三菱化学メディエンス 先端技術研究部	主任研究員	H21. 4～
館野 実	同上	副主任研究員	H21. 4～H25. 2

研究項目

- ・多能性獲得の指標となる遺伝子の同定

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・平成22～24年度に、戦略的国際科学技術協力推進事業 日本～英国研究交流 研究課題「多能性幹細胞のシステムズバイオロジー：転写因子ネットワークのメタ解析とシミュレーションによるロバストネスを持つ不均一性の理解」の支援を受けて、本CREST研究で得られた成果を基に、英国ケンブリッジ大学スミス博士のグループとの交流を進め、共同研究成果を得た。
- ・平成25年度より、日本-カナダ共同研究「幹細胞のエピジェネティクス」支援課題「多能性幹細胞と栄養外胚葉幹細胞の運命を分ける転写因子とエピジェネティクスの階層性」に採択され、カナダ・トロント小児病院ロサン博士との共同研究を開始した。本研究では、CREST課題で作成した誘導型ノックアウトES細胞株ならびにその作製技術を転用する予定である。

§ 3. 研究実施内容及び成果

(1)「丹羽」グループ（独立行政法人理化学研究所・多能性幹細胞研究プロジェクト）研究項目(1)～(6)を担当する。

(1)多能性幹細胞の分化過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析

A 過剰発現系による LIF シグナル伝達に關与する転写因子ネットワークの構造解析

- ① マウスES細胞において、多能性關連転写因子を外來遺伝子から構成的に発現させ、LIF 非存在下における自己複製維持能を検討した。また、得られた LIF 非依存性ES細胞における内在性遺伝子の発現パターンから、ネットワークの構造を推測した。
- ② マウスES細胞の多能性維持に必要なサイトカインLIFの入力は、Jak-STAT3-Klf4-Sox2 と PI3K-Akt-Tbx3-Nanogというカスケードが並列に入力する事により、多能性を規定するコア転写因子ネットワークへと入力している事を明らかにした(4)。

B LIF シグナル入力ノイズと転写因子ネットワークの構成転写因子の発現の不均一性の關係の解明

- ① A で同定された LIF 非存在下における自己複製維持能を示す転写因子は、Oct3/4 陽性未分化細胞集団において、異なる程度の不均一な蛋白発現パターンを示した。このような不均一な発現が、LIF シグナル入力そのもののノイズに起因するのかどうかを明らかにするために、STAT3 標的遺伝子 Socs3 に蛍光蛋白遺伝子 dCherry を相同遺伝子組み換えによりノックインした。
- ② dCherry の発現は LIF 存在下では確認できたが、LIF 除去により速やかに消失した。これより、LIFシグナル入力を可視化できるES細胞が樹立できたと考えた。
- ③ 高濃度薬剤選択により得られた Socs3 欠損ES細胞(14)は、これまでの報告とは逆に、LIF 存在下で未分化状態維持能が亢進していた。これは、過去の報告にある Socs3 欠損ES細胞と我々が作成した Socs3 欠損ES細胞の遺伝的背景の違いによるものと考えられた。

C LIF シグナル入力に遺伝的背景が与える影響の解析 <非公開>

- ① B③に關連して、LIF シグナル入力に遺伝的背景が与える影響を解析するために、129Sv, C57BL6, Balbc, NOD など様々な遺伝的背景の新規マウス ES 細胞株を、2iLIF 培養で樹立し、これらがキメラ形成能を有することを、胚盤胞注入法で確認した。
- ② これらの異なる遺伝的背景のマウス ES 細胞において、LIF シグナルに対する細胞内シグナル伝達経路の応答を見たところ、そのバランスが大きく異なることを見出した。たとえば、129Sv では Jak-Stat3 経路が強く活性化され、MAPK 経路の活性化は弱かったが、NOD では全く逆で、MAPK 経路が強く活性化され、Jak-Stat3 経路の最大活性化量は 129Sv の10%に過ぎなかった(論文未発表)。このような遺伝的背景の影響が、Socs3 欠損に対する ES 細胞の応答性を変えていると考えられ、現在も解析を進めている。

D LIF シグナル伝達に關与する転写因子ネットワーク構成因子の機能解析

- ① A で同定された LIF 非存在下における自己複製維持能を示す転写因子のうち、これまでマウス ES細胞で機能欠損の表現型が解析されていない Klf4 と Tbx3 について、誘導型ノックアウトES細胞の作成を試みた。両遺伝子とも、まず loxPをもつ誘導型欠失遺伝子で両遺伝子座を置換し、次にホルモン誘導型 Cre リコンビナーゼを導入する事により、誘導型ノックアウトES細胞を作成し、その表現型を解析した。
- ② Klf4 の誘導型ノックアウトES細胞は樹立を完了し、表現型を解析した。その結果、Klf4 の機能喪失は、その後48-72時間の間、一過性に多能性を不安定化させることを見いだした。一方で、Klf4 欠損 ES 細胞はキメラ形成能を維持していた。
- ③ Tbx3 についても、誘導型ノックアウトES細胞を樹立し、その表現型を解析したところ、Tbx3 欠

損 ES 細胞は樹立可能で、キメラ形成能も維持していた。

- ④ Klf4:Tbx3 両遺伝子の誘導型ノックアウト ES 細胞も樹立し、その表現型を解析したところ、Klf4:Tbx3 欠損 ES 細胞は樹立可能で、キメラ形成能も維持していた。
- ⑤ ①～④の結果は、Klf4 と Tbx3 の並列機能以外に、これらと機能重複している遺伝子による機能補償を示唆するものと考えられた。そこで、これまでに Klf4 との機能重複が知られている Klf2 と Klf5 についても、誘導型ノックアウト ES 細胞を作製した。
- ⑥ 現在、Klf4, Tbx3, Klf2, Klf5 の4つの遺伝子の組み合わせノックアウト ES 細胞の作製が進行しており、すでに可能な16通りの組み合わせのうち14通りは作成・解析が完了している。これまでの結果は、Klf2 と Klf4 が大きな機能重複を示し、これが Tbx3 と並列機能を有すること、そして Klf5 は Klf2, Klf4 と部分的に重複しながら固有の機能も有することを示している(論文作成中)。

E Wnt シグナル伝達に関与する転写因子ネットワーク構成因子の機能解析

- ① 本プロジェクトの開始後、マウス ES 細胞の多能性維持への Wnt シグナルの寄与について分子機構の解析が進み、Wnt シグナルは GSK3 キナーゼ活性の抑制から β カテニンの安定化・核移行を経て、転写抑制因子 Tcf3 の機能を阻害し、その標的遺伝子の脱抑制をしていることが明らかになった。
- ② 我々は、JST 国際協力事業で連携していたケンブリッジ大学 Smith 博士と共同して、彼らがパイオインフォマティクスで同定した Tcf3 標的遺伝子候補の一つであった Esrrb について、機能解析を行った。
- ③ Esrrb 誘導型ノックアウト ES 細胞は CREST 研究の一環としてすでに樹立されていたため、これを用いて Wnt シグナル入力における Esrrb の役割を検討した。その結果、Esrrb の脱抑制は、Wnt シグナル入力が多能性維持に寄与するうえで必須であり、Esrrb が Wnt シグナル入力をつかさどる機能標的遺伝子であることが明らかになった(10)。

F 多能性関連転写因子ネットワークによる多能性維持のための機能遺伝子の制御<非公開>

- ① 多能性維持に働く転写因子ネットワークの機能を解明するためには、これがどのような機能遺伝子を制御して多能性維持を司るのかを解く必要がある。多能性維持に重要な機能としては、無限増殖能に関わるテロメア維持機構や細胞周期制御機構、あるいはクロマチンの中立的状態を維持するエピジェネティック制御機構などが挙げられる。
- ② 我々はこれまでに多能性維持機構の関与が示唆されていた転写因子 Nr0b1/Dax1(5)について、誘導型ノックアウト ES 細胞を作成して解析を行った。その結果、Nr0b1 欠損細胞は増殖能が低下するものの、キメラ形成能は維持していることが分かった。
- ③ Nr0b1 欠損 ES 細胞における遺伝子発現パターンをマイクロアレイ法で解析したところ、Zscan4 など2細胞期で特異的に発現する一群の遺伝子の発現が顕著に増加していた。Zscan4c は最近の解析から、ES 細胞集団の数%で周期的に発現し、テロメア伸長に関与することが知られている。そこで、Nr0b1 欠損 ES 細胞における Zscan4 陽性細胞の頻度を測定したところ、これも顕著に増加していた。
- ④ Zscan4 陽性細胞集団の詳細な解析から、Zscan4 陽性細胞は細胞周期の G2/M 期にとどまりやすく、アポトーシスに向かう頻度が高いことを見出した。また、レポーター解析から、Nr0b1 は Zscan4c プロモーターを直接抑制していることも明らかにした。これより Nr0b1 欠損 ES 細胞では、Zscan4c の脱抑制が起こり、その結果として細胞周期パターンの変化と細胞死の行進が起こり、集団としての増殖能が低下していると結論された(in revision)。
- ⑤ 現在、Nr0b1 が属する核受容体ファミリー転写因子(Nr2c1, Nr2c2, Nr5a1, Nr5a2)について誘導型ノックアウト ES 細胞を作製し、その解析を進めている。また、Zscan4c の転写活性化因子として知られている転写因子 Zfp206 についても同様に解析を進めている。

G 転写因子ネットワークの活性の「場」としてのエピジェネティックな状態の解析

- ① マウス ES 細胞では、X 染色体不活性化などのエピジェネティック制御が中立的な状態に置かれていることが、転写因子ネットワークが有意に働くための条件と考えられる。そこで、この仮

説が正しいかどうかを、雌ES細胞の X 染色体のエピジェネティックな状態の詳細な解析により検討した。この目的で、雌ES細胞にホルモン誘導型 Gata6 ならびに Cdx2 遺伝子を導入し、胚体外細胞系譜に分化誘導された場合、生体内同様雄性 X 染色体が選択的に不活性化されるのか、あるいはエピジェネティックに中立的になった結果として、ランダムな X 染色体不活性化が起こるのかを検討した。

- ② 雌ES細胞は胚体外細胞系譜に分化誘導されたときでも、ランダムな X 染色体不活性化を起こす事が証明された。これにより、ES細胞において X 染色体上の imprinted X inactivation に必要なエピジェネティックマークは完全に消去されていると考えられた(7)。
- ③ マウス ES 細胞ではクロマチン全体が機能的に中立な開放状態にあると考えられているが、そのような状態を作り出す機構はこれまで明らかにはされていなかった。そこでまず、ES 細胞で未分化状態特異的に発現し、クロマチンを開放する機能を有する制御因子の同定を試みた結果、Myst ファミリーのヒストンアセチル化酵素 Myst2 が候補として抽出された。
- ④ マウス ES 細胞で Myst2 を強制発現させると、LIF 非存在下で多能性が維持された。また、この ES 細胞では、Klf4 や Tbx3 といったシグナル伝達に関与する転写因子の発現は減少しているにもかかわらず、Oct3/4 や Sox2 といったコア転写因子の発現は維持されていた。これより、Myst2 は、クロマチンを開放してコア転写因子の自己活性化回路を活性化することにより、多能性維持に寄与していると推測され、現在さらなる解析を進めている。

H 転写因子の機能を規定するネットワーク構造の解明

- ① A で明らかにした多能性維持に関わるネットワークでは、転写因子 Sox2 は LIF シグナルにより Klf4 を経て制御されていることが示唆された。一方で、Sox2 の発現は、ES 細胞を栄養外胚葉幹細胞 (trophoblast stem cells: TS 細胞) に分化誘導しても維持される (Niwa et al, Cell, 2005)。そこで、TS 細胞における Sox2 の機能を解析し、これを ES 細胞における機能と比較することにより、転写因子の機能を規定するネットワーク構造の解明を試みた。
- ② TS 細胞は FGF4 依存的に自己複製することが知られている。TS 細胞では Sox2 の発現は FGF4 により制御されており、Sox2 と Esrrb を同時に強制発現させた TS 細胞は FGF4 非存在下でも自己複製できたことから、TS 細胞において、Sox2 は FGF4 シグナルの機能標的転写因子のひとつと考えられた。
- ③ ES 細胞と TS 細胞における Sox2 のゲノム上の結合部位を ChIP-seq 法で解析したところ、これらの細胞では Sox2 の結合部位が大きく異なり、わずかな共通性しか認められなかった。ES 細胞特異的な Sox2 結合部位の近傍には Oct3/4 結合配列が有意に濃縮していたことから、ES 細胞では Oct3/4 との協調が Sox2 の結合部位特異性を規定していると考えられた。これに対し、TS 細胞特異的な Sox2 結合部位の近傍には Oct3/4 結合配列の濃縮は認められず、代わりに AP2 結合配列の濃縮が認められた。このことから、TS 細胞では AP2 ファミリー転写因子との協調が Sox2 の結合部位特異性を規定していると考えられた。
- ④ TS 細胞で Sox2 と協調する AP2 ファミリー転写因子として、Tfap2c/AP2 γ を同定した。
- ⑤ ①～④より、転写因子の機能は上流のシグナルとの連結と下流の標的遺伝子との連結の双方の面で大きく変更が可能であることが証明された。これより、転写因子の機能は融通性が高く、最終的にはネットワーク構造により規定されるといえる(15)。

I 多能性維持への関与が示唆された転写因子の機能解析

- ① Trp53 はこれまでに Nanog の発現抑制を介した多能性維持への寄与が示唆されていたが、本プロジェクト開始後 iPS 誘導への抑制機能が示され、多能性維持への負の作用が強調された。そこで、Trp53 欠損 ES 細胞を作成して解析したところ、これらの細胞は試験管内2次元分化誘導では過去の報告のような分化マーカーの発現異常を示すものの、それは3次元分化誘導では解消された。さらに、この Trp53 欠損 ES 細胞は正常なキメラ形成能を保持していた。このことから、Trp53 の機能は多能性幹細胞の維持ならびに分化には必須ではないことが証明された(16)。
- ② DNA 修復に関与する XPC 複合体が、Oct3/4 と協調してその転写活性化能に寄与することが

ノックダウン法により示唆された。そこで、Xpcの誘導型ノックアウト ES 細胞を作成して解析したところ、Xpc 欠損 ES 細胞は樹立可能で、Oct3/4標的遺伝子の発現にも変化はなく、正常なキメラ寄与能も保持していた。このことから、XPC 複合体の機能は Oct3/4 の転写活性化能ならびに多能性維持に必須ではないと考えられた(17)。

- ③ 転写因子 FoxP1 はマウス ES 細胞において特異的な splicing isoform を発現し、その機能が多能性維持に必要であることが、ノックダウン法により示唆された。そこで、FoxP1 の ES 細胞特異的 Exon の誘導型ノックアウト ES 細胞を作成して解析したところ、この欠損 ES 細胞は樹立可能で、多能性関連遺伝子の発現にも変化はなかった。現在、論文作成のためのさらなる解析を進めている。

(2)分化細胞における多能性誘導過程における転写因子ネットワークの動態とその機能の解析

A 2次 iPS 細胞誘導システムの構築

- ① transposon を用いた誘導遺伝子発現システムにより、Rosa26-rtTA;Oct3-EGFPg マウス由来胎児性線維芽細胞に、Piggy-Bac transposon system を用いてテトラサイクリン誘導型山中4因子を導入し、これで得られた1次 iPS 細胞を用いて作成したキメラ胚から得た胎児性線維芽細胞で遺伝子発現を誘導する事により、2次 iPS 細胞が得られる系の構築を試みた。
- ② 1次 iPS 細胞由来胎児性線維芽細胞を Doxycycline 存在下で培養すると、播種した細胞数の3-5%に相当する数の Oct3-EGFP 陽性で未分化細胞様のコロニー形態を示す iPS 細胞が得られた。この割合は、異なるキメラ胚から得られた胎児性線維芽細胞において、元の1次 iPS 細胞ごとに一定であり、再現性のある実験系である事が確認できた。

B 2次 iPS 細胞誘導システムを用いた転写因子ならびにエピジェネティック因子の機能解析

- ① A で構築した2次 iPS 細胞誘導システムを用いて、(1)A で同定した転写因子や、エピジェネティック因子について、山中4因子との協調作用を定量的に評価することを試みた。すなわち、任意の因子をテトラサイクリン誘導型 Tol2 vector に挿入して、1次 iPS 細胞を用いて作成したキメラ胚から得た胎児性線維芽細胞に導入し、Doxycycline により山中因子と同時に誘導したときの、iPS 細胞形成速度ならびに効率に与える効果を検討した。
- ② (1)G③で同定したヒストンアセチル化酵素 *Myst2* を、2次 iPS 細胞誘導システムを用いて山中4因子と同時に発現誘導すると、リプログラミング速度が亢進し、かつ効率も向上することを見いだした。
- ③ (1)D⑤の一連の機能喪失実験から想定されたモデルに基づき、iPS 細胞誘導における *Klf4* の機能を *Tbx3+Klf5* で置換できることを、2次 iPS 細胞誘導系を用いて証明した。

C 試験管内2次 iPS 細胞誘導システムの構築

- ① A で得られた1次 iPS 細胞に、ホルモン誘導型転写因子 *Gata6GR* を導入し、シャーレ内で原始内胚葉へと分化誘導し、そこから2次 iPS 細胞が誘導できるかどうかを検討した。
- ② *Gata6GR* を導入した1次 iPS 細胞は、dexamethasone により80%が原始内胚葉細胞へと分化誘導された。これらの細胞を Oct3-EGFP 陰性を指標として FACS 選別後、doxycycline 存在下で培養すると、その1-3%が Oct3-EGFP 陽性で未分化細胞様のコロニー形態を示す iPS 細胞となった。これより、この実験系はジーントラップスクリーニングに適用可能と判断された(項目(5)へ)。

(3)ヒト型とマウス型多能性幹細胞の違いを規定する転写因子ネットワークの解析

A ヒトES細胞ならびにヒト型多能性幹細胞のマウスモデルであるEpiSCの安定かつ簡便な培養条件の確立

- ① これまで、ヒトES細胞や iPS 細胞は、フィーダー細胞上での培養が主流であった。そこで、これをマウスES細胞と同様にゼラチンコート上で培養する事を目指し、様々な基質や接着促進効果が期待される液性因子の効果を検討した。
- ② 可溶性フィブロネクチンを培養液に添加すると、ROCK 阻害剤を用いて細胞死を抑制した状

態で単一細胞に分散されたヒトES細胞や iPS 細胞がゼラチンコートに接着し増殖できる事を見いだした。さらに、この培養法が、マウス EpiSC にも適用可能である事を確認した(6)。

B マウスES細胞から再現性よく EpiSC を誘導するシステムの確立

- ① マウスES細胞との厳密な比較において EpiSC における転写因子ネットワークの構造を解析するためには、これまでに作成した様々な転写因子の誘導型ノックアウトES細胞から EpiSC を誘導し、機能解析に用いる事が望ましい。そこで、効率よくマウス ES 細胞から EpiSC を誘導するべく、正常発生過程を模倣できる胚様体誘導を経る方法について検討した。
- ② マウスES細胞を浮遊培養に移して4日目の胚様体を回収し、胚からの樹立時と同様に外側の原始内胚葉層を顕微鏡下で機械的に除去し、EpiSC 培養条件に移したところ、20-40%の胚様体から EpiSC 様細胞が取得できた。さらに、この方法を用いて、Oct3/4 ならびに Sox2 の誘導型ノックアウトES細胞から EpiSC を樹立した。
- ③ EpiSC における Oct3/4 の機能喪失は、ES 細胞における場合と同様に栄養外胚葉分化を誘導するものの、これらの細胞は TS 細胞としては維持できないことを見いだした。また、このような ES 細胞と EpiSC の違いは、Esrrb の発現の有無が主な原因であり、EpiSC で Oct3/4 のノックアウトと同時に Esrrb を誘導性に発現させると、TS 細胞への分化が誘導されることを見出した(論文作成中)。

C EpiSC が潜在的に有する多能性の証明

- ① マウス EpiSC は、胚盤胞に注入されてもキメラ個体発生に寄与できない事から、マウスES細胞より限定された多能性しか有していないと考えられてきた。しかし、EpiSC の起原である原始外胚葉細胞は胎児形成に寄与することから、高い多能性を有すると考えられた。この矛盾を解く鍵は、EpiSC の胚盤胞への注入は異所性移植であり、そこでの生着率の低さにあると考えられた。
- ② そこで、過去の報告において EpiSC では E カドヘリンの発現が低いとされていたこともあり、EpiSC で E カドヘリンを一過性に発現させる事により、胚盤胞注入後の生着率の改善を試みた。この結果、胚盤胞に注入された単一の EpiSC はそのままでも内部細胞塊に接着できるが、着床後の原始外胚葉からは排除されること、そして E カドヘリンの一過性発現は原始外胚葉への寄与を可能にすることがわかった。
- ③ 複数の EpiSC 細胞株を用いて、E カドヘリンを一過性に発現させた EpiSC からは、再現性よくキメラ個体が作成できる事を証明した。このことは、ヒト型多能性幹細胞も潜在的にはマウス ES 細胞に匹敵する多能性を有している事を証明するとともに、ヒト型多能性幹細胞からキメラ個体を作成する新規技術開発の基盤ともなりうると思われる(11)。

(4) 転写因子ネットワークのノード構造の解明

A Oct3/4 プロモーターを活性化する転写因子のコンビネーションの同定

- ① これまでに、複数の転写因子が協調して1つのプロモーターを活性化する事を、Cdx2 遺伝子において見いだした。そこで、同様の協調的転写活性化を Oct3/4 プロモーター上で発揮する転写因子の組み合わせを同定する事を試みた。このために、候補転写因子発現ベクターを様々な組み合わせで Oct3/4 promoter-luciferase レポーターとともに 293T 細胞に導入し、その活性可能を dual luciferase assay により検討した。
- ② Oct3/4+Sox2+Nr5a2+Sp1+x の5つの転写因子の組み合わせにより、マウスES細胞における場合と同様に、basal level から100倍の活性化が誘導できる事を見いだした。さらに、欠失型ならびに変異型レポーターの活性化パターンの比較から、この組み合わせが、ES細胞における活性化パターンをほぼ模倣しうる事を証明した。

B 複数の転写因子が協調的に機能する分子機構の解析

- ① A で同定した転写因子のうち、xは Nr2f2/Couptf2 を改変した人工転写活性化因子であり、この機能解析には、ES 細胞における生理的条件下での解析が不可欠と考えられた。Oct3/4 の

プロモーター領域ならびに近位エンハンサーには種々の核受容体ファミリー転写因子が結合することが知られている。そこで、(1)F⑤にも記載したように、核受容体ファミリー転写因子(Nr2c1, Nr2c2, Nr5a1, Nr5a2)について誘導型ノックアウト ES 細胞を作製し、その解析を進めている。

- ② ゲノム上での転写因子の協調的結合と機能の相関を解析するためには、ChIP-seq 法の適用が必要である。そこでまず、免疫沈降に用いる転写因子を認識する抗体の特異性を、これまでに作成した誘導型ノックアウト ES 細胞を用いて検定した。その結果、免疫染色において、野生型 ES 細胞でシグナルを検出し、当該転写因子のノックアウト ES 細胞では検出しない理想的な抗体は、市販の抗体の2割以下にすぎず、Oct3/4, Sox2, Klf4, Esrrb については抗体を確保できたものの、Klf2, Klf5, Tbx3, Nr5a2, Nr0b1 についてはこれまでのところ確保できていない。これらについては現在さらなる抗体の検討を進めるとともに、モノクローナル抗体の作成とスクリーニングを行っている。

(5) 多能性獲得の指標となる遺伝子の同定

本研究項目は計画当初長田チームのみが担当する予定であったが、(2)C で示した試験管内2次 iPS 細胞誘導システムの構築が順調に進んだことから、補完的に丹羽チームにおいても研究を進めた。

- ① 2次 iPS 細胞誘導システムに適用可能な Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子トラップベクター (Tol2-IRES-neo-tk) を構築した。
- ② ES 細胞で発現する遺伝子をトラップしたクローン集団を G418 選択で作成し、これらを Gata6GR 活性化で分化誘導したのち、トラップした遺伝子の発現が消失するものを、Gancyclovir 選択で濃縮した。また、これらの細胞が G418 感受性であることを確認した。
- ③ ②の分化細胞に Dox を投与して山中因子を活性化し、2日目から G418 選択を開始して、リプログラミング早期に発現が活性化する遺伝子をトラップした iPS 細胞を濃縮した。
- ④ ③で得られた iPS 細胞20ラインについて、トラップされた遺伝子を inverse PCR 法で同定した。現在これらの遺伝子のリプログラミング過程での発現パターンを検討している。

(6) 多能性転写因子ネットワークモデルの構築

- ① 現実の定量的データに基づく転写因子ネットワークモデルを構築し、そのシミュレーションから新たな検証可能な摂動パターンを抽出し、その結果がモデルと合致するかを検討する事により、真に理解と結びつくモデルの構築を試みる。その一つとして、上記(4)A で得られた Oct3 promoter 活性化の定量データからのモデル構築を共同研究で着手した。
- ② 今後、(1)B についても同様のモデル構築へと進む予定である。

(2)「長田」グループ (三菱化学メディエンス株式会社)

①研究のねらい

研究計画／実施概要に示す項目のうち、(5)以外を担当する。

②研究実施方法

薬剤耐性遺伝子で遺伝子トラップを濃縮し、かつそのトラップ遺伝子の転写活性をモニターできる表面マーカーを発現するトラップベクターを構築する。次に、このベクターを(2)C の体外2次 iPS 細胞誘導系に導入し、iPS 細胞が未分化状態で発現している遺伝子をトラップしたクローンのプールを、薬剤選択+表面マーカー陽性分画選別で得る。そして、dexamethasone 誘導後、Oct3/4EGFP 陰性分画のうち、トラップ遺伝子の発現が陰性化したものを表面マーカー陰性分画として取得する。この細胞集団を Doxycycline 処理で iPS 化するとき、その初期(3-5日目)で表面マーカーを再発現するものを分取し、そこから iPS 細胞を得る。この後、分化誘導-iPS 化を同様に繰り返す事により、リプログラミング早期の発現が prospective に iPS 化とリンクしている遺伝子を濃縮し、その同定を行う。

③当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況(§ 2. と関連します)と得られた成果

SA-IRES-HAhCD2-P2A-neo-pAトラップベクターを、丹羽グループ(2)Aと同様の2次 iPS 細胞システムを導入した iPS 細胞に piggy-Bac transposon system を用いて導入し、まず G418 選択により未分化状態の iPS 細胞で発現する遺伝子をトラップしたクローンのプールを得た。次に、この iPS 細胞を dexamethasone 投与により原始内胚葉細胞に分化誘導し、ここから FACS により GFP(-)分化細胞集団を純化したのち、さらに MACS により hCD2(-)のトラップされた遺伝子の発現が消失したクローン集団を得た。最後に、これらの細胞を doxycycline で処理して山中因子を活性化し、3日目に hCD2(+)となった細胞を選別し、これらをさらに培養して得られた2次 iPS 細胞コロニーを単離した。これらのクローンではリプログラミング初期に発現が誘導される遺伝子がトラップされていることが期待されるが、これまでに 5'RACE 法により7つの遺伝子を同定し、解析を進めている。

§ 4. 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 件、国際(欧文)誌17件)

1. Aiba, K., Nedorezov, T., Piao, Y., Nishiyama, A., Matoba, R., Sharova, L.V., Sharov, A.A., Yamanaka, S., Niwa, H. and KO, M.S.: Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.*, **16**, 73-80, 2009. (DOI:10.1093/dnares/dsn035)
2. Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, H., Stephenson, R.O., Ogoniki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E.M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H. and Sasaki, H.: The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell*, **16**, 398-410, 2009. (DOI:10.1016/j.devcel.2009.02.003)
3. Yuri, S., Fujimura, S., Nimura, K., Takeda, N., Toyooka, Y., Fujimura, Y., Aburatani, H., Ura, K., Koseki, H., Niwa, H. and Nishinakamura, R.: Sall4 is essential for stabilization, but not for pluripotency of embryonic stem cells by repressing aberrant trophectoderm gene expression. *Stem Cells*, **27**, 796-805, 2009. (DOI:10.1002/stem.14)
4. Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. and Adachi, K.: A parallel circuit of LIF signaling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, **460**, 118-122, 2009. (DOI:10.1038/nature08113)
5. Sun, C., Nakatake, Y., Akagi, T., Ura, H., Matsuda, T., Nishiyama, A., Koide, H., Ko, M.S.H, Niwa, H. and Yokota, T.: Dax1 binds to Oct3/4 and inhibits its transcriptional activity in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 4574-4583, 2009. (DOI:10.1128/MCB.01863-08)
6. Kitajima, H. and Niwa, H.: Clonal expansion of human pluripotent stem cells on gelatin-coated surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **396**, 933-938, 2010. (DOI:10.1016/j.bbrc.2010.05.026)
7. Murakami, K., Araki, K., Ohtsuka, S., Wakayama, T. and Niwa, H.: Choice of random rather than imprinted X inactivation in female ES cell-derived extra-embryonic cells. *Development*, **138**, 197-202, 2011 (DOI:10.1242/dev.056606)
8. Hirota T, Ohta H, Shigeta M, Niwa H, Saitou M.: Drug-inducible gene recombination by the Dppa3-MER Cre MER transgene in the developmental cycle of the germ cell lineage in mice. *Biol. Reprod.*, **85**, 367-377, 2011 (DOI:10.1095/biolreprod.110.090662)
9. Ura H, Murakami K, Akagi T, Kinoshita K, Yamaguchi S, Masui S, Niwa H, Koide H and Yokota T.: Eed/Sox2 regulatory loop controls ES cell self-renewal through histone methylation and acetylation. *EMBO J.*, **30**, 2190-2204, 2011 (DOI:10.1038/emboj.2011.126)
10. Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E., Joshi, A., Hannah, R., Ohtsuka, S., Gottgens, B.*, Niwa, H. * and Smith, A. *: Esrrb is a pivotal target of the GSK3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, **11**, 491-504, 2012 (DOI:10.1016/j.stem.2012.06.008)
11. Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S. and Niwa, H. *: E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS One*, **7**, e45220, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0045220)
12. Iwafuchi-Doi, M., Matsuda, K., Murakami, K., Niwa, H., Tesar, P. J., Aruga, J., Matsuo, I. And Kondoh, H.: Transcriptional regulatory networks in epiblast cells and during anterior neural plate development as modeled in epiblast stem cells. *Development*, **139**, 3926-3937, 2012. (DOI:10.1242/dev.085936)
13. Oda, M., Kumaki, Y., Shigeta, M., Jakt, L.M., Matsuoka, C., Yamagiwa, A., Niwa, H. and Okano, M. *: DNA methylation restricts lineage-specific functions of

- transcription factor Gata4 during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Genet*, **9**, e1003574, 2013. (DOI: 10.1371/journal.pgen.1003574)
14. Nakatake, Y., Fujii, S., Masui, S., Sugimoto, T., Torikai-Nishikawa, S., Adachi, K. and Niwa, H.*: Kinetics of drug selection systems in mouse embryonic stem cells. *BMC Biotechnol*, **13**, 64, 2013. (DOI: 10.1186/1472-6750-13-64)
 15. Adachi, K., Nikaido, I., Ohta, H., Ohtsuka, S., Ura, H., Wakayama, T., Ueda, H.R. and Niwa, H.*: Context-dependent wiring of Sox2 regulatory networks for self-renewal of embryonic and trophoblast stem cells. *Mol Cell*, **52**, 380-392, 2013 (DOI:10.1016/j.molcel.2013.09.002)
 16. Shigeta, M., Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S., Yamane, M., Fujii, S., Murakami, K. and Niwa, H.*: Maintenance of pluripotency in mouse ES cells without Trp53. *Sci Rep*, **3**, 2944, 2013 (DOI:10.1038/srep02944)
 17. Ito, S., Yamane, M., Ohtsuka, S. and Niwa, H.: The C-terminal region of Xpc is dispensable for the transcriptional activity of Oct3/4 in mouse embryonic stem cells. *FEBS Letters*, **588**, 1128-1135, 2014. (DOI:10.1016/j.febslet.2014.02.033)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Niwa, H.: Mouse ES cell culture system as a model of development. *Dev Growth Differ*, **52**, 275-283, 2010
2. 丹羽仁史：マウスES細胞の多能性を維持するシグナル転写因子ネットワーク、*実験医学*, **29**, 9-14, 2011.
3. Niwa, H.: Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal, *HANDBOOK OF STEM CELLS*, Second Edition, Academic Press, 2012.
4. 成体細胞が多能性に初期化されることの発見、丹羽仁史、*現代化学*2012年12月号 No. 501
5. 丹羽仁史：幹細胞の多能性を規定する分子機構、*領域総合レビュー*、**1**、e008、2012 (DOI:10.7875/leading.author.1.e008)
6. Nakai-Futatsugi, Y. and Niwa, H.*: Transcription factor network in embryonic stem cells: heterogeneity under the stringency. *Biol Pharm Bull*, **36**, 166-70, 2013.
7. Adachi, K. and Niwa, H.: A liaison between intrinsic and extrinsic regulators of pluripotency. *EMBO J*, 2013. (DOI:10.1038/emboj.2013.196)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 13 件、国際会議 16 件)

1. Niwa H.: Transcription factor network for self-renewal and differentiation of mouse ES cells, 6th International Society for Stem cell Research Annual Meeting, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA, 2008.6.11-14
2. Niwa H.: The transcriptional network of pluripotency, European Summer School; Stem Cells & Regenerative Medicine, Hydra, Greece, 2008.9.5-11
3. Niwa H.: Transcription factor network to maintain pluripotency, The 2nd Global COE International Symposium joint with the 18th Hot Spring Harbor Symposium of Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University: Stem Cells and Regenerative Medicine, 国立病院機構九州医療センター, 2008.11.9-10
4. Niwa H.: Structure of transcription factor network to determine cellular pluripotency, 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会 シンポジウム 多能性幹細胞を規定する因子群, 神戸ポートアイランド, 2008.12.9-12
5. Niwa H.: ES cell system as a tool to analyze mouse peri-implantation development, 日本発生生物学会第42回大会 シンポジウム Stem cell systems in mouse early development, 新潟, 2009.5.31
6. 丹羽仁史: 分化多能性を規定する転写因子ネットワークの構造、第33回阿蘇シンポジウム「生命科学のフロントランナー」、熊本、2009.7.31
7. Niwa H.: Transcription factor network governing pluripotency, 16th International

- Society of Developmental Biology Congress Symposium 16: Stem Cells and Pluripotency, Edinburgh, UK, 2009.9.9
8. Niwa H.: Transcription factor network governing pluripotency, A special meeting of the Cambridge Stem Cell Club, Cambridge, UK, 2009.9.11
 9. 丹羽仁史: 分化多能性を規定する転写因子ネットワーク、第71回日本血液学会 教育講演、京都、2009.10.25
 10. 丹羽仁史: 多能性を規定する転写因子ネットワーク、第7回 RCGM フロンティアシンポジウム「未来医療のためのゲノム医学研究」、埼玉医科大学、2009.11.3
 11. 丹羽仁史: 多能性を司る転写因子の進化論的考察、第32回日本分子生物学会 ワークショップ「進化研究への新しいアプローチ」、横浜、2009.12.9
 12. Niwa H.: Transcription factor network governing pluripotency, JSPS/JHU/NIA-sponsored symposium 'Aging vs Regenerative Medicine: How much stem cells can do?', Baltimore, USA, 2010.2.19
 13. 丹羽仁史: Basic structure of transcription factor network governing pluripotency、第74回日本循環器病学会総会 Focus Session iPS 細胞の臨床応用とその課題、2010.3.6
 14. 丹羽仁史: 多能性を規定する転写因子ネットワークの構造、第9回日本再生医療学会総会、プレナリーシンポジウム「幹細胞研究の最先端」、2010.3.18
 15. 丹羽仁史、多能性を規定する転写因子ネットワークの構造、2010 Millipore BioForum、東京国際フォーラム、6月10日
 16. 丹羽仁史、多能性を規定する転写因子ネットワークの動態、金沢大学十全医学会総会・学術集会、金沢大学十全講堂、7月9日
 17. 丹羽仁史、iPS 細胞を誘導する転写因子の生理的機能、第26回京都賞記念ワークショップ、京都国際会館、11月12日
 18. Niwa H., Dynamics of transcription factor network governing pluripotency, ISSCR 8th Annual Meeting, 6月22日
 19. Niwa H., Dynamics of transcription factor network governing pluripotency, 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 京都国際会館、6月22日
 20. Niwa H., Rewiring of transcription factor network, Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting, Albuquerque Convention Center, 8月6日
 21. Niwa H., Evolutionally-conserved amino acid of the HMG-box is responsible for the function of Sox2 in mouse ES cells, CSH Asia Conference: Molecular Switches and Genome Function in Stem Cells & Development, Suzhou Dushu Lake Conference Center, 9月24日
 22. Niwa H., Functional dissection of pluripotency-associated transcription factor network, 1st Annual Cambridge Stem Cell International Symposium, Cambridge, UK, 2011.7.6
 23. Niwa H., Functional dissection of pluripotency-associated transcription factor network,, 5th Mammalian Genes, Development and Disease Meeting, Bristol, UK, 2011.7.8
 24. Niwa H., Functional dissection of pluripotency-associated transcription factor network, ISSCR-CSH Asia Symposium; Cellular Programs and Reprogramming, Shuzou, China, 2011.10.25
 25. 丹羽仁史、多能性を規定する転写因子ネットワークの動態、第17回日本時間生物学会学術大会シンポジウム「哺乳類の時計と振動原理」、名古屋大学、2011年11月25日
 26. Niwa H., Pluripotency-associated transcription factor network, Eurosystem meeting; Advances in Stem Cell Research VI, Kranjska Gora, Slovenia, 2012.1.26
 27. 丹羽仁史、マウスES細胞の多能性を規定する転写因子ネットワーク、疾患生命工学センターシンポジウム「発生工学の最先端」、東京大学、2012年3月8日
 28. Niwa H, Molecular mechanism to maintain pluripotency of mouse ES cells, International Symposium on Recent Advances in Stem Cells and Cancer & the 8th

Annual Meeting of TSSCR, Kaohsiung Medical University, Taiwan. Oct 13-14, 2012
29. Niwa H, Restriction of pluripotency in development-modeling in vitro, The 61st
NIBB conference: Cellular Community in Mammalian Embryogenesis, Okazaki
Conference Center, 2013.7.10-12.

②ポスター発表（国内会議 3 件、国際会議 0 件）

1. 伊藤俊介、大塚哲、丹羽仁史: Distinction of differentiation capacity toward the trophoblast stem cell fate between naived and primed pluripotent states. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11～14日
2. 大塚哲、丹羽仁史: Exogenous E-cadherin enhances incorporation of EpiSCs to chimeric embryos. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11～14日
3. 茂田昌樹、大塚哲、丹羽仁史: Roles of p53 in mouse embryonic stem cell differentiation. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11～14日

(6) 成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・本クレスト課題遂行課程で確立した簡便な誘導型ノックアウト ES 細胞作製法は、HP で公開している。