

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」

平成 14 年度採択研究代表者

松岡 英明

(東京農工大学大学院共生科学技術研究部 教授)

「疾患モデル細胞の高効率創製と機能解析」

1. 研究実施の概要

本研究プロジェクトは、複数個の遺伝子を改変した細胞を創製し、網羅的なデータ解析に基づいて、疾患モデル細胞という新しい概念を提示することを目的としている。そのために、最も技術的に困難である、マイクロインジェクションによる遺伝子改変技術を簡便迅速、さらには自動化を目指すことを第一の目標に掲げている。平成 18 年度までの成果として、開発した単一細胞操作支援ロボットおよび画像リンクソフトを用いて実機による機能試験を実施し、細胞操作を正確に支援し、制御のみならず性能測定のためのソフトウェアの機能を充実させた。その結果、ステージの性能とともに、細胞呼び出し精度を測定することが可能となり、ES 細胞の連続インジェクションの処理スピード・成功率が向上した。また、ES 細胞等の非常に小さい細胞への遺伝子導入には、遺伝子導入量の精密な制御が必要になるため、キャピラリーの先端径、遺伝子導入時の加圧量、加圧時間を制御することで、ES 細胞への定量的遺伝子導入の高精度化を目指した。その結果、最適なキャピラリーの先端径は $0.5\sim 0.7\ \mu\text{m}$ であり、加圧条件は、 $0.7\ \text{kgf/cm}^2$ 、 $30\ \text{msec}$ であることがわかった。この場合、ES 細胞への外来遺伝子のインジェクション成功率が 10%以上と、飛躍的に向上させることができた。疾患関連遺伝子として、8種類の糖尿病関連遺伝子について siRNA を恒常的に発現するベクターを開発し、8種類の遺伝子が安定に発現阻害された、新規な ES 細胞を樹立することに成功した。さらに、そのうちの4種類については、ダブルノックダウン ES 細胞の樹立にも成功している。また、8種類のノックダウン ES 細胞および2種類のダブルノックダウン ES 細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導にも成功しており、様々なノックダウン効果がインスリン分泌細胞へ及ぼす影響について解析をすることができた。また、脂質代謝に関与する ABC 輸送タンパク質 ABCA3 遺伝子ノックアウトマウス代謝解析により、パルミチン酸残基を持つホスファチジルコリンとホスファチジルグリセロールが ABCA3 タンパク質の輸送基質であることを明らかにした。さらに、shRNA を組み込んだ ES 細胞からキメラ個体を作成し、生殖系列への寄与も確認できた。目的のトランスジェニックマウスを9匹作成することに成功したが、樹立したマウス系統においては、組み込まれた shRNA が発現抑制を受けていた。第二の疾患モデル動物作出法として、ES 細胞で効果が確認された2種類の糖尿病関連遺伝子に対する shRNA に CMV-EGFP をカセットとして組み込んだコンストラクトをレンチウイルスベクターにより受精卵へのトランスジェニック作出を行

ったところ、56%と63%という極めて高率にトランスジェニックマウスの作出に成功した。一方、puromycin 耐性遺伝子を導入したジーントラップクローンを、高濃度の puromycin で選別してホモクローンを高効率に濃縮することを試みてきたが、それを可能にするような puromycin の濃度を設定することが出来なかった。そこで、現在一般に用いられている薬剤耐性選択システムの特性を網羅的に解析し、puromycin 系以上に本目的にかなう選択システムが存在しないかどうか、検討したところ、puromycin 選択系で、最も良好な容量依存的な高発現細胞の選択が確認され、neomycin 系はもともと発現の微弱な耐性細胞集団を形成し得た。これは、この選択系が、もともと微弱な耐性遺伝子発現を選択出来ることを証明するものであった。

今後は、単一細胞操作支援ロボットのノウハウを普及させるため、かつ、細胞連続培養操作ニーズに対応するため、サーモプレート・インキュベータ対応とする。さらに、座標位置操作の簡便からより正確性を追求するために回転ステージを備え、制御ソフトウェアをユニット個別制御可能とするようにする。さらに、顕微鏡下で測定可能、かつ、極微量インスリン測定デバイスを開発すると同時に、単一細胞操作支援ロボットを様々な研究分野応用展開することで、細胞工学的応用技術の開発を目指す。また、ES 細胞等の非常に小さい細胞への遺伝子導入には、遺伝子導入量の精密な制御が必要になるため、キャピラリー先端径の計測技術を開発するとともに、遺伝子導入時の加圧量、加圧時間を制御することで、ES 細胞への定量的遺伝子導入の高精度化を目指す。さらに、ES 細胞がコロニーを形成している場合の単一の ES 細胞においても、同様の実験を行う。一方、装置開発と平行して、残りの4種類の糖尿病関連遺伝子について、ダブルノックダウン ES 細胞を樹立し、それらからインスリン分泌細胞への分化誘導を行うことで、様々なノックダウン効果がインスリン分泌細胞へ及ぼす影響について解析を行う。さらに、これらの細胞からキメラマウスの作出も試みて、発生の各段階における糖尿病関連遺伝子の発現を経時的に観察する。さらに、疾患モデル細胞のモデルとして有用性を確かめるには、そのゲノムを有する疾患モデル動物を作出し、解析することが重要である。この目的のための体細胞核移植クローン技術および ES 細胞を経た顕微授精技術を用いて、疾患モデル個体への作出を進めることで、疾患モデル細胞への応用を進める。一連の解析結果により、疾患モデル細胞を作製し、細胞から個体までの各段階における解析が可能になると考えられる。

2. 研究実施内容

(1) ロボットを用いた細胞機能評価

開発した単一細胞操作支援ロボット(2号機)を用いて、細胞操作条件や遺伝子導入条件および遺伝子導入簿の細胞操作条件等について様々な角度から検討し、ロボットを構成する各種要素技術の向上を目指した。具体的には、開発した単一細胞操作支援ロボットおよび画像リンクソフトを用いて実機による機能試験を実施し、細胞操作を正確に支援し、制御のみならず性能測定のためのソフトウェアの機能を充実させた。その結果、ステージの性能とともに、細胞呼び出し精度を測定することが可能となり、ES 細胞の連続インジェクションの処理スピード・成功率が向上した。

(2) 単一 ES 細胞の遺伝子改変のための要素技術の開発

ES 細胞等の非常に小さい細胞への遺伝子導入には、遺伝子導入量の精密な制御が必要になるため、キャピラリーの先端径、遺伝子導入時の加圧量、加圧時間を制御することで、ES 細胞への定量的遺伝子導入の高精度化を目指した。その結果、最適なキャピラリーの先端径は 0.5~0.7 μm であり、加圧条件は、0.7 kgf/cm^2 、30 msec であることがわかった。この場合、ES 細胞への外来遺伝子のインジェクション成功率が 10%以上と、飛躍的に向上させることができた。さらに、複数の遺伝子の同時導入も可能となり、その成功率も 10%以上であった。

(3) 糖尿病関連遺伝子のノックダウン ES 細胞の樹立

これまでに、8種類の糖尿病関連遺伝子について、それらを恒常的に発現させ、かつ発現量を可視化した ES 細胞を用いて、8種類の糖尿病関連遺伝子の siRNA による発現阻害条件を検討し、最適条件を決定している。そこで、今年度は、得られた阻害条件に基づき、siRNA を恒常的に発現するベクターを開発して ES 細胞へ導入し、安定に発現阻害する細胞を開発した。また、2種類の遺伝子についてはダブル恒常発現株を作製した上で、ダブルノックダウン ES 細胞を樹立することができた。さらに、得られた条件を元に、遺伝子改変していない ES 細胞へ siRNA 発現ベクターを導入した細胞4種類と、2種類の siRNA 発現ベクターを同時に導入した ES 細胞2種類を樹立することにも成功した。

(4) ノックダウン ES 細胞からインスリン分泌細胞への分化

マウス ES 細胞からインスリン分泌細胞への分化については、既にその方法が報告されており、我々も追実験に成功している。昨年度には、糖尿病関連遺伝子を恒常的に発現した ES 細胞に siRNA 発現ベクターを導入した ES 細胞を用いて、インスリン分泌細胞へ分化誘導を行ったところ、分化後においてもノックダウン効果を維持することができたことを明らかにしている。そこで、今年度は、上記(3)で開発した新たなノックダウン ES 細胞を用いてインスリン分泌細胞へ分化誘導を行った。その結果、IRS-1、IRS-2、をノックダウンさせた細胞を分化させたところ、標的とした遺伝子のノックダウン効果は維持していたが、インスリン分泌量は、コントロールと同程度の量であった。一方、Pdx-1、HNF-1 α 、HNF-1 β をノックダウンさせた細胞では、分化はしたもののインスリンの分泌量は少なかった。また、Pdx-1 と IRS-1 のダブルノックダウン ES 細胞を分化誘導したところ、Pdx-1 のノックダウン効果が大きい細胞ほど、インスリンの分泌量も減少した。

(5) 糖尿病原因遺伝子を標的として改変した細胞の機能解析法の確立

糖尿病原因遺伝子を標的として改変した細胞の機能解析法を確立するために、培養皿と一体化できるプラスチックポンプとシステムの開発を目的とした。前年度において、プラスチック製バルブレスディフューザーマイクロポンプを製作し送液することを確認し、塑性変形と接着部の強度が弱いことが課題であることが分かった。そこで、接着強度と関わる表面改質の研究を行い、マイクロチップに多用される代表的なポリマーについて、プラズマで数秒の短時間にて改質しパターニングが可能な技術の開発に成功した。本技術を用いて処理面に細胞接着性材料(フィブロネクチン)を選択的に吸着することにも成功した。

(6) 疾患原因遺伝子を標的として改変した細胞の作製と細胞機能解析

糖尿病や肺サーファクタント欠損症をはじめとするさまざまな糖・脂質代謝疾患の原因遺伝子を単離・同定すると同時に、単一あるいは複数の疾患原因遺伝子を破壊あるいは改変することにより、疾患モデル細胞を作成した細胞の機能解析を行ってきた。これまでに、肺における脂質代謝に関与する ABC トランスポーター ABCA3 遺伝子の単離・同定、さらに日本人の患者において初めて遺伝子異常を発見した。またターゲティングベクターとの相同性組み換えにより ES 細胞の ABCA3 遺伝子を欠損させ、ノックアウトマウスの樹立に成功した。今年度には肺サーファクタント欠損患者において認められた ABCA3 変異タンパクを発現する疾患モデル細胞を作製し、局在・糖鎖修飾・ATP 水解活性を調べる事によって、重篤度をはじめとする臨床的なクラス分けを可能にした。さらに ABCA3 ノックアウトマウスから精製した脂質の網羅的なメタボローム解析によって、パルミチン酸残基を持つホスファチジルコリンとホスファチジルグリセロールが ABCA3 タンパクの輸送基質であることを明らかにした。一方、膝発生に関与する転写因子 PDX-1 の遺伝子を欠損させ GFP 遺伝子をノックインした ES 細胞の作製には成功したが、マウスの樹立には至っていない。最終年度の本事業を推進するにあたって、糖尿病の疾患モデル細胞の作製を継続しつつも、すでにノックアウトマウスの作製に成功している疾患モデル細胞に重点をおいて研究を進めることにより、細胞の機能を明らかにしていく。ABCA3 遺伝子以外にも、特に脳に強く発現し、脂質輸送に関与すると考えられる ABC トランスポーター ABCA2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスの樹立にも成功していることから、ABCA2 及び ABCA3 の機能を解析すると同時に疾患との関わりについて検討する。

(7) 疾患モデル細胞からの体細胞核移植クローン技術および ES 細胞を用いた疾患モデル個体の作出およびその基礎技術開発

疾患モデル細胞から疾患モデル動物を作出する技術開発を行った。すなわち、第一の方法として shRNA を組み込んだ ES 細胞 → キメラ作成 → 顕微授精からなる実験系を開発した。その結果、キメラ個体を作出し、生殖系列への寄与も確認できた。目的のトランスジェニックマウスを9匹作出することに成功した。しかしながら、樹立したマウス系統においては、組み込まれた shRNA が発現抑制を受けていた。そこで、さらに子孫の解析を行ったが、同様に発現抑制が生じていた。現在、これらのサイレンシングの解除を試みている。第二の疾患モデル動物作出法として、ES 細胞で効果が確認された Pdx-1 あるいは IRS-1 に対する shRNA に CMV-EGFP をカセットとして組み込んだコンストラクトをレンチウイルスベクターにより受精卵へのトランスジェニック作出を行った。生まれたマウスのうち、Pdx-1 に対するトランスジェニックは 9/16(56%)、IRS-1 に対しては 10/16(63%) という極めて高率にトランスジェニックマウスの作出に成功した。現在、これらのマウスにおける shRNA の発現を調べている。第三の疾患モデル作出法として、線維芽細胞への shRNA の導入を行い、選抜後、上記の核移植クローンを行う。この条件設定のための核移植実験を行い、ドナー細胞用のマウスとして (B6x129) 系統の雄を用いることが、最適であることが明らかになった。ただちに、その線維芽

細胞への遺伝子導入を開始し、ドナー用疾患モデル細胞を準備する予定である。

新規幹細胞として、ウサギの ES 細胞の樹立を試みた。ウサギは脂質代謝系など研究においてマウスよりも優れた人のモデルとなることが知られている。ウサギの ES 細胞は、フィーダー細胞の濃度を適切に調整することにより、極めて安定的に未分化性と増殖能を維持したコロニーを 20 代以上継代することに成功した。最も継代が進んだ株でも、テラトーマの形成を確認することができ、ES 細胞としての性質が維持されていることが示された。今後、マウスに次ぐ第二の真の ES 細胞(無限増殖能、多分化能、生殖キメラ形成能)を樹立できるよう、キメラ実験を実施する。

(8) 新規ジーントラップ法による遺伝子マーキングおよび変異 ES 細胞の系統的作出とその解析法の確立

これまで puromycin 耐性遺伝子を導入したジーントラップクローンを、高濃度の puromycin で選別してホモクローンを高効率に濃縮することを試みてきた。しかし、ゲノム上のランダムな位置に挿入された puromycin 耐性遺伝子発現カセットの発現は予想以上に変動し、ランダムに選択されたクローンに於いてホモクローンを高効率に濃縮することを可能にするような puromycin の濃度を設定することが出来なかった。この状況は、インスレーター配列を用いて puromycin 耐性遺伝子発現カセットを挿入部位近傍のクロマチン構造の影響を遮断しても解決されないことから、本方法の原理の再検討を余儀なくされた。そこで、現在一般に用いられている薬剤耐性選択システムの特性を網羅的に解析し、puromycin 系以上に本目的にかなう選択システムが存在しないかどうか、検討した。発現ベクター pCAG-EGFP-IRES-DR(drug resistant)-pA の DR として、neomycin 耐性遺伝子、hygromycin 耐性遺伝子、puromycin 耐性遺伝子、blasticidinS 耐性遺伝子、zeocin 耐性遺伝子、histidiolD 耐性遺伝子を挿入し、これらのベクターを ES 細胞に電気穿孔法で導入して、低濃度(=野生型ES細胞を死滅させる最低濃度の2倍)、中濃度(同4倍)、高濃度(同8倍)で選択し、生存したコロニーをプールして、それぞれにおける EGFP の発現量を FACS で解析した。その結果、puromycin 選択系で、最も良好な容量依存的高発現細胞の選択が確認された。一方で、neomycin 系はもっとも発現の微弱な耐性細胞集団を形成し得た。これは、この選択系が、もっとも微弱な耐性遺伝子発現を選択出来ることを証明するものである。

3. 研究実施体制

(1)「松岡」グループ

①研究者名

松岡 英明(東京農工大学大学院共生科学技術研究部 教授)

②研究項目

- ・ ロボットを用いた細胞機能評価
- ・ 単一 ES 細胞の遺伝子改変のための要素技術の開発
- ・ 糖尿病関連遺伝子のノックダウン ES 細胞の樹立

- ・ノックダウン ES 細胞からインスリン分泌細胞への分化
- ・糖尿病原因遺伝子を標的として改変した細胞の機能解析法の確立

(2)「稲垣」グループ

①研究者名

稲垣 暢也(京都大学大学院医学研究科 教授)

②研究項目

- ・疾患原因遺伝子を標的として改変した細胞の作製と細胞機能解析

(3)「小倉」グループ

①研究者名

小倉 淳郎((独)理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室 室長)

②研究項目

- ・疾患モデル細胞からの体細胞核移植クローン技術および ES 細胞を用いた疾患モデル個体の作出およびその基礎技術開発

(4)「丹羽」グループ

①研究者名

丹羽仁史((独)理化学研究所発生・再生科学総合研究センター多能性幹細胞研究チーム
チームリーダー)

②研究項目

- ・新規ジーントラップ法による遺伝子マーキングおよび変異 ES 細胞の系統的作出とその解析法の確立

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Tomonori Shimakita, Yoshikazu Tashiro, Akira Katsuya, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, "Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit", *J. Food Prot.*, **69**(1), 170-176 (2006).
- Hideaki Matsuoka, Soichiro Shimoda, Yoshiyuki Miwa and Mikako Saito, "Automatic positioning of a microinjector in mouse ES cells and rice protoplasts", *Bioelectrochemistry*, **69**(2), 187-192 (2006).
- Tomonori Shinya, Rozenn Ménard, Ikuko Kozone, Hideaki Matsuoka, Naoto Shibuya, Serge Kauffmann, Ken Matsuoka and Mikako Saito, "Novel β -1,3-, 1,6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in

- tobacco", *FEBS J.*, **273**(11), 2421-2431 (2006).
- Kohtaro Fujioka, Ikuko Kozone, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, "Rapid evaluation of the efficacy of microbial cell removal from fabrics", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**(12), 995-1002 (2006).
 - Hideaki Matsuoka, Soichiro Shimoda, Masakazau Ozaki, Hajime Mizukami, Meiri Shibusawa, Yohei Yamada and Mikako Saito, "Semi-quantitative expression and knockdown of a target gene in single-cell mouse embryonic stem cells by high performance microinjection", *Biotechnol. Lett.*, **29**(3), 341-350 (2007).
 - Tomonori Shinya, Kazunari Hanai, Ivan Gális, Kaoru Suzuki, Ken Matsuoka, Hideaki Matsuoka and Mikako Saito, "Characterization of *NtChitIV*, a class IV chitinase induced by β -1,3-, 1,6-glucan elicitor from *Alternaria alternata* 102: Antagonistic effect of salicylic acid and methyl jasmonate on the induction of *NtChitIV*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**(2), 311-317 (2007).
 - Kohtaro Fujioka, Ikuko Kozone, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, "Automatic mapping of viable microbial cells distributed in the surface layer of cotton fabrics", *Biocont. Sci.*, **12**(1), 31-34 (2007).
 - Katsuya Yamada, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka and Nobuya Inagaki, "A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells", *Nat. Prot.*, **2**(3), 753-762 (2007).
 - Tomonori Shimakita, Hidenori Yamamoto, Tomotaka Naramura, Akira Fujimori, Takao Ide, Yoshikazu Tashiro, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, "Rapid count of microbial cells in dialysate", *Ther. Apher. Dial.*, in press.
 - Takashi Abe and Masahiro Matsumoto, Improved wettability of a fluoropolymer from a simple combination of surface modifications using a plasma and surfactant, *Japanese Journal of Applied Physics*, **46**, 367-369 (2007).
 - Sato, S., Yamada, K., and Inagaki, N.: System for simultaneously monitoring heart and breathing rate in mice using a piezoelectric transducer. *Med. Biol. Eng. Comput.* **44**: 353-362, 2006.
 - Matsumura, Y., Ban, N., Ueda, K., and Inagaki, N.: Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency. *J. Biol. Chem.* **281**: 34503-34514, 2006.
 - Yamada, C., Nagashima, K., Takahashi, A., Ueno, H., Kawasaki, Y., Yamada, Y., Seino, Y., and Inagaki, N.: Gatifloxacin acutely stimulates insulin secretion and chronically suppresses insulin biosynthesis. *Eur. J. Pharmacol.* **553**: 67-72, 2006.
 - Yamada, K., Hosokawa, M., Fujimoto, S., Nagashima, K., Fukuda, K., Fujiwara, H., Ogawa, E., Fujita, Y., Ueda, N., Matsuyama, F., Yamada, Y., Seino, Y., and Inagaki,

- N.: The spontaneously diabetic Torii rat with gastroenteropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **75**: 127-134, 2007.
- Hamasaki, A., Yamada, Y., Kurose, T., Ban, N., Nagashima, K., Takahashi, A., Fujimoto, S., Shimono, D., Fujiwara, M., Toyokuni, S., Seino, Y., and Inagaki, N.: Adult pancreatic islets require differential pax6 gene dosage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**: 40-46, 2007.
 - Saito, T., Yamada, K., Wang, Y., Tanaka, Y., Ohtomo, K., Ishikawa, K., and Inagaki, N.: Expression of ABCA2 protein in both non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells in the rodent peripheral nerve. *Neurosci. Lett.* **414**: 35-40, 2007.
 - Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H., and Inagaki, N.: ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**: 9628-9634, 2007.
 - Yamada, K., Saito, M., Matsuoka, H., and Inagaki, N.: A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nature Protocols* **2**: 753-762, 2007.
 - Takahashi, A., Nagashima, K., Hamasaki, A., Kuwamura, N., Kawasaki, Y., Ikeda, H., Yamada, Y., Inagaki, N., and Seino, Y.: Sulfonylurea and glinide reduce insulin content, functional expression of K(ATP) channels, and accelerate apoptotic beta-cell death in the chronic phase. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, in press.
 - Miyake, A., Yamada, K., Kosaka, T., Miki, T., Seino, S., and Inagaki, N.: Disruption of Kir6.2-containing ATP-sensitive potassium channels impairs maintenance of hypoxic gasping in mice. *Eur. J. Neurosci.*, in press.
 - Ogonuki N, Mochida K, Miki H, Inoue K, Fray M, Iwaki T, Moriwaki K, Obata Y, Morozumi K, Yanagimachi R, Ogura A. Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 13098-13103, 2006.
 - Kanatsu-Shinohara M, Ikawa M, Takehashi M, Ogonuki N, Miki H, Inoue K, Kazuki Y, Lee J, Toyokuni S, Oshimura M, Ogura A, Shinohara T. Production of knockout mice by random or targeted mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:8018-8023, 2006.
 - Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Miki H, Ogonuki N, Takehashi M, Morimoto T, Ogura A, Shinohara T. Clonal Origin of Germ Cell Colonies after Spermatogonial Transplantation in Mice. *Biol Reprod*, 75:68-74, 2006.
 - Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Adenovirus-mediated gene delivery into mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 2596-2601, 2007.

- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Yoshida S, Toyokuni S, Lee J, Ogura A, Shinohara T. Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. *Biol Reprod* 76: 55-62, 2007.
- Shinmen A, Honda A, Ohkawa M, Hirose M, Ogonuki N, Yuzuriha M, Miki H, Mochida K, Inoue K, Abe K, Ito M, Ogura A. Efficient production of intersubspecific hybrid mice and embryonic stem cells by intracytoplasmic sperm injection. *Mol Reprod Dev* (in press).
- Inoue K, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H, Ogura A. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. *Stem Cells*, (in press).
- Lee J, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Toyokuni S, Kimura T, Nakano T, Ogura A, Shinohara T. Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells *Development*, (in press).
- Aoto, T., Saitoh, N., Ichimura, T., Niwa, H. and Nakao, M.: Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-Oct3/4 locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation. *Dev. Biol.*, 298, 354-367, 2006.
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J.-I., Matoba, R., Ko, M.S.H. and Niwa, H.*: Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 7772-7782, 2006.
- Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawatsuji, M., Baba, H. and Nakao, M.: Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 920-926, 2006.
- Matoba, R., Niwa, H., Masui, S., Ohtsuka, S., Garter, M.G., Sharov, A.A. and Ko, M.S.H.: Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PLoS One*, 1, e26, 2006.
- Ogawa, K., Saito, A., Matui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S, Shimosato, D., Morishita, Y., Watabe, T., Niwa, H.* and Miyazono, K.*: Activin/Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J. Cell Sci.*, 120, 55-65, 2007.
- Niwa, H.*: How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134, 635-646, 2007.

(2) 特許出願

平成 18 年度特許出願:0 件(CREST 研究期間累積件数:8 件)