

iPS 細胞への遺伝子導入を用いた分化誘導の最適化

川端 健二,^{*,a,b} 田代 克久,^a 水口 裕之^{a,c}

Differentiation of Functional Cells from iPS Cells by Efficient Gene Transfer

Kenji KAWABATA,^{*,a,b} Katsuhisa TASHIRO,^a and Hiroyuki MIZUGUCHI^{a,c}

^aLaboratory of Stem Cell Regulation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan, ^bDepartment of Biomedical Innovation and ^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received July 20, 2010)

Induced pluripotent stem (iPS) cells, which are generated from somatic cells by transducing four genes, are expected to have broad application to regenerative medicine. Although establishment of an efficient gene transfer system for iPS cells is considered to be essential for differentiating them into functional cells, the detailed transduction characteristics of iPS cells have not been examined. By using an adenovirus (Ad) vector containing the cytomegalovirus enhancer/beta-actin (CA) promoters, we have developed an efficient transduction system for mouse mesenchymal stem cells and embryonic stem (ES) cells. Also, we applied our transduction system to mouse iPS cells and investigated whether efficient differentiation could be achieved by Ad vector-mediated transduction of a functional gene. As in the case of ES cells, the Ad vector could efficiently transduce transgenes into mouse iPS cells. We found that the CA promoter had potent transduction ability in iPS cells. Moreover, exogenous expression of a PPAR γ gene or a Runx2 gene into mouse iPS cells by an optimized Ad vector enhanced adipocyte or osteoblast differentiation, respectively. These results suggest that Ad vector-mediated transient transduction is sufficient to promote cellular differentiation and that our transduction methods would be useful for therapeutic applications based on iPS cells.

Key words—regenerative medicine; induced pluripotent stem (iPS) cell; adenovirus vector; mesenchymal stem cell; embryonic stem (ES) cell

1. はじめに

幹細胞 (stem cells) は自己複製能と分化多能性という大きく2つの特徴を有する細胞であり、目的の細胞へ分化させることにより創薬や再生医療への応用が期待されている。再生医療への応用が期待されている幹細胞には、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、ES (embryonic stem) 細胞、iPS (induced pluripotent stem) 細胞などがある。このうち、ES 細胞は受精卵 (胚) から樹立され、iPS 細胞は体細胞に4種の遺伝子 (Oct-3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入することにより作製される。しかし

ながら、ES 細胞や iPS 細胞を直接生体に移植するには困難な場合も多く、マウス生体に投与するとランダムに分化しテラトーマ (奇形腫) を形成する。したがって、治療目的には幹細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させた後生体に移植することが望ましいと考えられる。幹細胞を骨、心筋、脂肪、血液などの目的の細胞に分化させるには、培養液に特定のサイトカインや増殖因子等の液性因子を加える方法がとられているが分化効率は十分ではない。そこで、われわれは各種幹細胞に機能遺伝子を導入することにより効率よく分化させることができないかと考え研究を進めている。一般に、幹細胞は遺伝子導入が困難であり、リポフェクション法やレトロウイルスベクター系など通常用いられる方法では十分な導入効率が得られない。われわれは高効率かつ一過性に目的遺伝子を発現させることができるアデノウイルス (Ad) ベクターを用いて機能遺伝子を導入

^a独立行政法人医薬基盤研究所幹細胞制御プロジェクト (〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8), ^b大阪大学大学院薬学研究科医薬基盤科学分野, ^c同分子生物学分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6)

*e-mail: kawabata@nibio.go.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S19 で発表したものを中心に記述したものである。

することにより、幹細胞の分化誘導効率を向上させることを目指した。

2. 間葉系幹細胞への遺伝子導入

間葉系幹細胞は骨髄由来のストローマ細胞であり、骨、軟骨、脂肪、心筋系などの中胚葉系細胞に分化することができ、未分化状態で細胞を容易に増殖させることができる。¹⁾ また、最近では、間葉系幹細胞は神経細胞、肝細胞、インスリン産生細胞などの外胚葉や内胚葉系の細胞へも分化するという報告もあり、再生医療や組織工学への応用が強く期待されている。間葉系幹細胞の分化を制御する手段の1つとして、細胞分化に関与する遺伝子を導入することが挙げられる。Adベクターを用いた間葉系幹細胞への遺伝子導入も試みられてきたが、間葉系幹細胞はAd受容体CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) を発現していないためにその導入効率は極めて低く、遺伝子導入には高タイトルのベクターを必要としていた。^{2,3)} われわれは、独自に開

発した種々のファイバー改変型Adベクターを用いて間葉系幹細胞にレポーター遺伝子を導入し、その発現効率を比較検討した。^{4,5)} 間葉系幹細胞を多く含む画分であるマウス骨髄ストローマ細胞を用いて遺伝子導入効率を測定した結果、間葉系幹細胞にはファイバーにポリリジン残基を挿入したK7型ベクターが最も適しており、従来型ベクターの100倍以上の遺伝子導入効率を示すことが明らかとなった [Figs. 1(A) and (B)]. RGD型ベクターは従来型ベクターに比較し10倍程度の導入効率を示した。また、種々のプロモーターを用いて比較検討したところ、CAプロモーターが最適であった [Fig. 1(C)]. したがって、間葉系幹細胞にはCAプロモーターを有するK7型Adベクターを用いることにより最も高効率に遺伝子導入できることが明らかとなった。間葉系幹細胞は様々な系列の細胞に分化するというだけでなく、担がんマウスに投与された場合には腫瘍に集積する性質を有している。⁶⁾ し

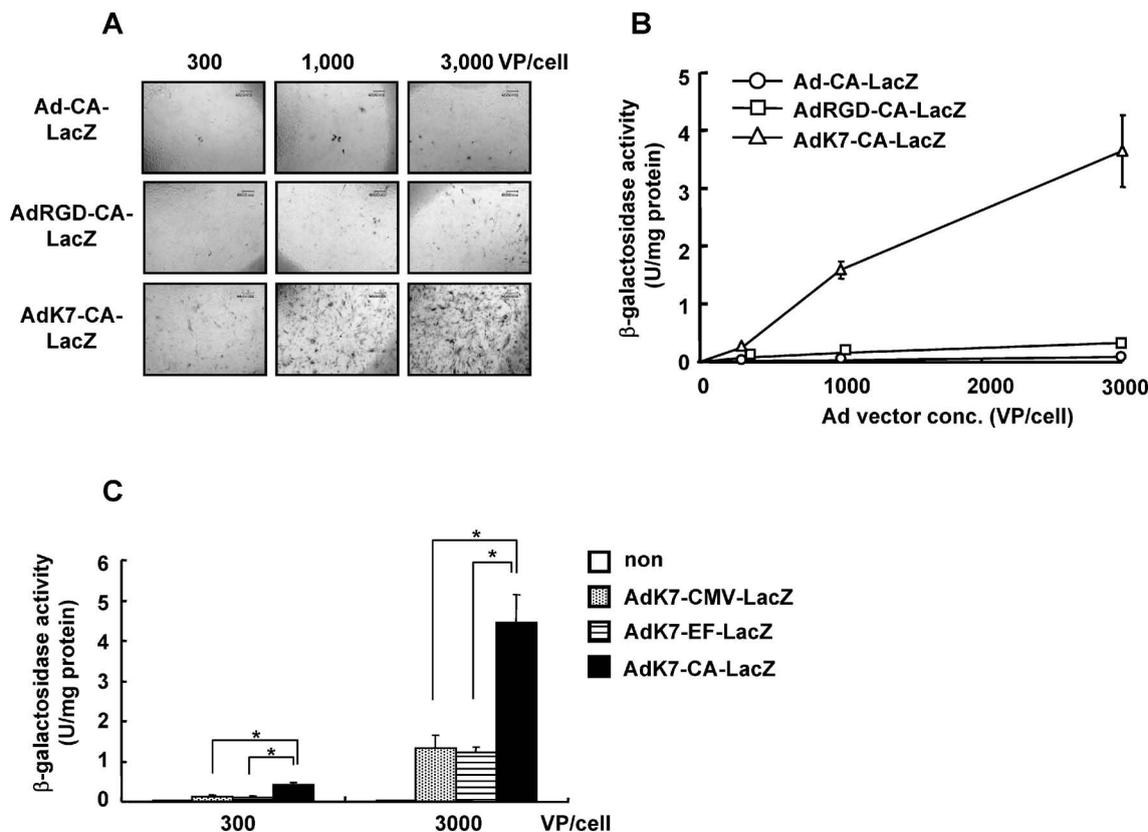


Fig. 1. Gene Transduction Efficiency in Mouse Primary BMSCs by Various Types of Ad Vectors

Mouse primary BMSCs were transduced with the indicated doses of LacZ-expressing Ad vectors for 1.5 h. Two days later, (A) X-gal staining and (B) luminescence assay were carried out. Similar results of X-gal staining were obtained in three independent experiments. Scale bar indicates 200 μ m. (C) Optimization of promoter activity in BMSCs using LacZ-expressing AdK7. BMSCs were transduced with each Ad vector at 300 or 3000 VP/cell, and LacZ expression in the cells was measured. The data (B and C) are expressed as mean \pm S.D. ($n=3$). * $p<0.01$.

たがって、間葉系幹細胞は分化させた細胞自身を治療に利用するだけでなく、抗腫瘍性サイトカイン等を発現する間葉系幹細胞をがんに対する細胞治療薬として利用できる可能性があり、現在検討している。

3. 間葉系幹細胞の分化誘導

間葉系幹細胞への遺伝子導入には CA プロモーターを有した K7 型 Ad ベクターが最適であることが明らかとなったので、次に本ベクターを用いて機能遺伝子を導入し分化誘導効率を向上させることを試みた。Runx2 は Runt ファミリーに属する転写因子であり、Runx2 遺伝子欠損マウスは骨芽細胞分化が初期で停止し骨形成が欠損することが知られている。⁷⁾そこで、Runx2 遺伝子をマウス骨髄ストローマ細胞に導入した結果、従来の分化誘導法と比較しアルカリホスファターゼ活性の上昇及びカルシウムの沈着がみとめられ、著明に骨芽細胞への分化誘導効率が促進されることが明らかとなった [Figs. 2(A) and (B)]. また、それに伴い、タイプ I コラーゲン、オステリクス、オステオカルシン等の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現も上昇した [Fig. 2(C)]. さらに、このようにして分化誘導した骨芽細胞をマウスに移植したところ、Fig. 3 に示すように異所性の骨形成がみとめられ、*in vivo* においても機能を有していることが示された。以上より、本ベクターは *in vitro* 及び *in vivo* において間葉系細胞を効率よく骨芽細胞へ分化誘導するのに適したベクターであることが示された。

4. マウス ES 細胞及びマウス iPS 細胞への遺伝子導入

ES 細胞は胚盤胞内部細胞塊由来の細胞であり、無限に増殖するとともにすべての機能細胞に分化する性質を有する。一方、iPS 細胞は体細胞に 4 種の遺伝子 (Oct-3/4, c-myc, Sox2, Klf4) を同時に導入することにより得られる人工多能性幹細胞であり、倫理的な問題を回避できることから再生医療への応用が大きく期待されている。⁸⁾しかしながら、これら幹細胞の分化を自由に制御する技術はいまだ確立されておらず、その原因の 1 つとして効率よい遺伝子導入法が確立されていないことが挙げられる。これまで、ES 細胞に対しては、プラスミド DNA を用いたエレクトロポレーション法 (プラスミド DNA を電氣的刺激により細胞内に導入し、染色体にわずかに目的遺伝子と薬剤耐性遺伝子が組み込まれた細

胞を薬剤で選択する方法)、⁹⁾ レトロウイルスベクター、¹⁰⁾ レンチウイルスベクター、¹¹⁾ ポリオーマウウイルスの複製機構を利用したスーパーランスフェクション法 (ポリオーマウウイルスの複製起点を含んだプラスミド DNA がマウス ES 細胞ではエピゾーマルに増幅できる性質を利用した方法)¹²⁾などが外来遺伝子導入法として用いられてきた。しかしながら、これらは半永久的に導入遺伝子を発現し続ける方法であり、ES 細胞や iPS 細胞の分化制御、特に医療目的などの細胞分化後には発現を停止させたい場合には好ましくない。Ad ベクターは導入遺伝子が宿主染色体へ組込まれることなく、染色体外にエピゾームとして存在することから (増幅しない)、遺伝子発現が一過性であり、ES 細胞や iPS 細胞を目的の機能細胞に分化させた後は導入遺伝子の発現が消失するものと期待される。そこで、筆者らは、マウス ES 細胞及び iPS 細胞に最も適した Ad ベクターによる遺伝子導入法の確立を試みた。その結果、マウス ES 細胞や iPS 細胞は Ad 受容体 CAR を高発現しており、従来型アデノウイルスベクターが最適であることが明らかとなった。^{13,14)} また、RSV, CMV, CA (β -actin promoter/CMV enhancer), EF-1 α の 4 種のプロモーターを用いて検討した結果、ES 細胞及び iPS 細胞では CA 及び EF-1 α プロモーターを用いた場合にのみ遺伝子発現がみられ、RSV や CMV プロモーターはほとんど機能しなかった [Fig. 4(A)]. これまで Ad ベクターは ES 細胞への遺伝子導入には不適と考えられてきたが、これは多くの場合、最も一般的に用いられている CMV プロモーターを用いて検討されてきたためであり、ウイルスの細胞へのエンタリー自体には問題がないことが示された。ただし、CA プロモーターを用いた場合には ES 細胞のみならずその支持細胞 (フィーダー細胞) である胚繊維芽細胞にも遺伝子発現がみられたのに対し、EF-1 α プロモーターを用いた場合にはほぼ ES 細胞特異的に遺伝子発現可能であった。これは、EF-1 α プロモーターの活性が胚繊維芽細胞に比べ ES 細胞において相対的に高いことが原因と考えられる。したがって、目的により両プロモーターを使い分けることによって、再生医療への幅広い応用が期待できる。

Ad ベクターを導入することにより ES 細胞や iPS 細胞が有する本来の性質が失われると再生医療

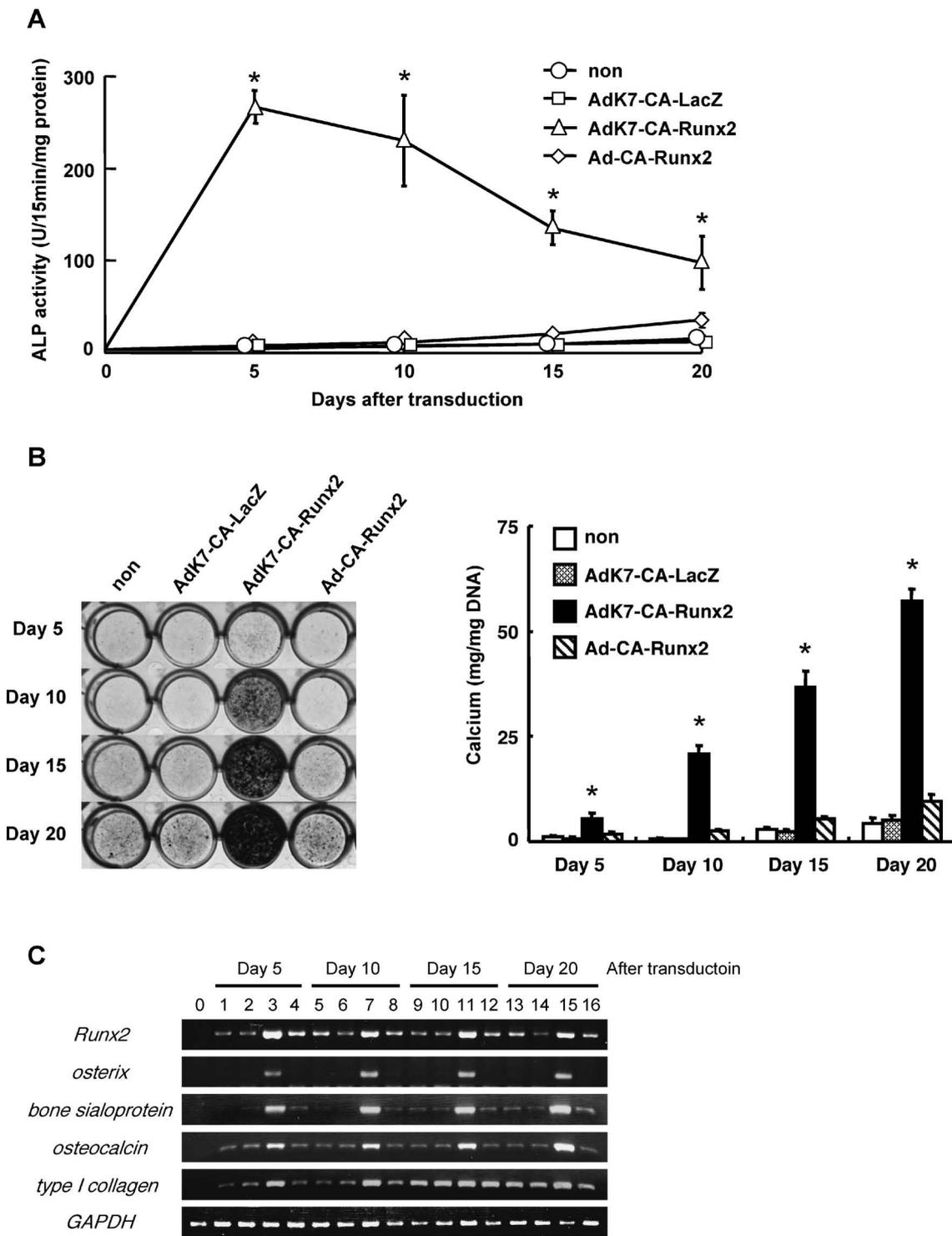


Fig. 2. Promotion of *in Vitro* Osteoblastic Differentiation in BMSC Transduced with AdK7-CA-Runx2

BMSCs were transduced with each Ad vector at 3000 VP/cell for 1.5 h, and were cultured for the indicated number of days. (A) Alkaline phosphatase activity, (B, left) matrix mineralization, and (B, right) calcium deposition in the cells was determined as described in Materials and Methods. The data are expressed as mean ± S.D. (*n*=3). **p*<0.01 as compared with non-, AdK7-CA-LacZ-, or Ad-CA-Runx2-transduced cells. (C) RT-PCR was carried out using primers for Runx2, osterix, bone sialoprotein, osteocalcin, collagen type I, and GAPDH. Lane 0: non-treated BMSCs; lanes 1, 5, 9, and 13: BMSCs with osteogenic supplements (OS); lanes 2, 6, 10, and 14: BMSCs with OS plus AdK7-CA-LacZ; lanes 3, 7, 11, and 15: BMSCs with OS plus AdK7-CA-Runx2; lanes 4, 8, 12, and 16: BMSCs with OS plus Ad-CA-Runx2.

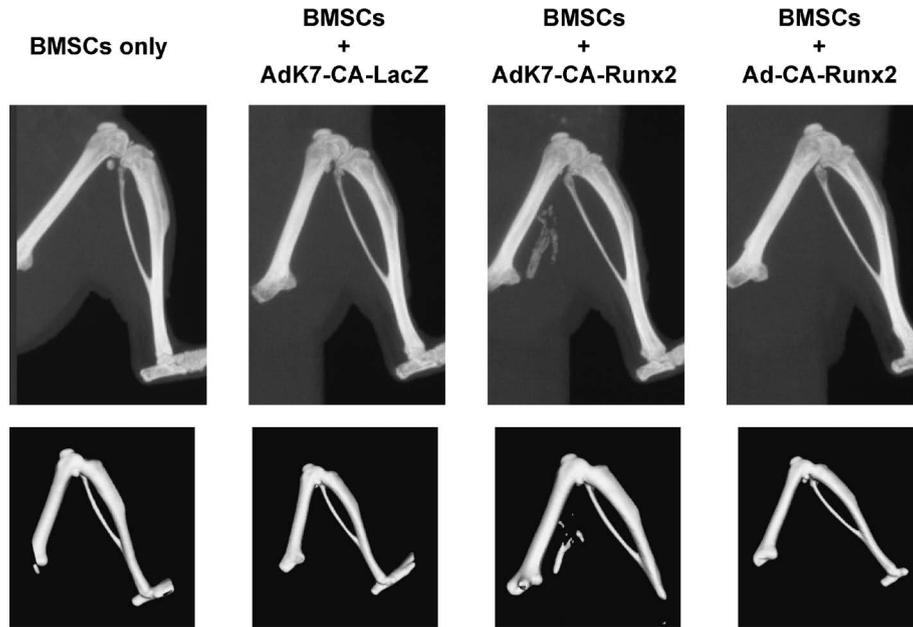


Fig. 3. *In vivo* Ectopic Bone Formation of Mouse BMSCs by AdK7-mediated Runx2 Gene Transduction

BMSCs were transduced with indicated Ad vectors at 3000 VP/cell for 1.5 h. On the following day, cells (2×10^6 cells) were suspended in PBS and injected into the hind limb biceps muscle of nude mice. Four weeks later, bone formation was analyzed by the microCT system. Similar results were obtained in two independent experiments. Upper, X-ray images; lower, 3D reconstitution images.

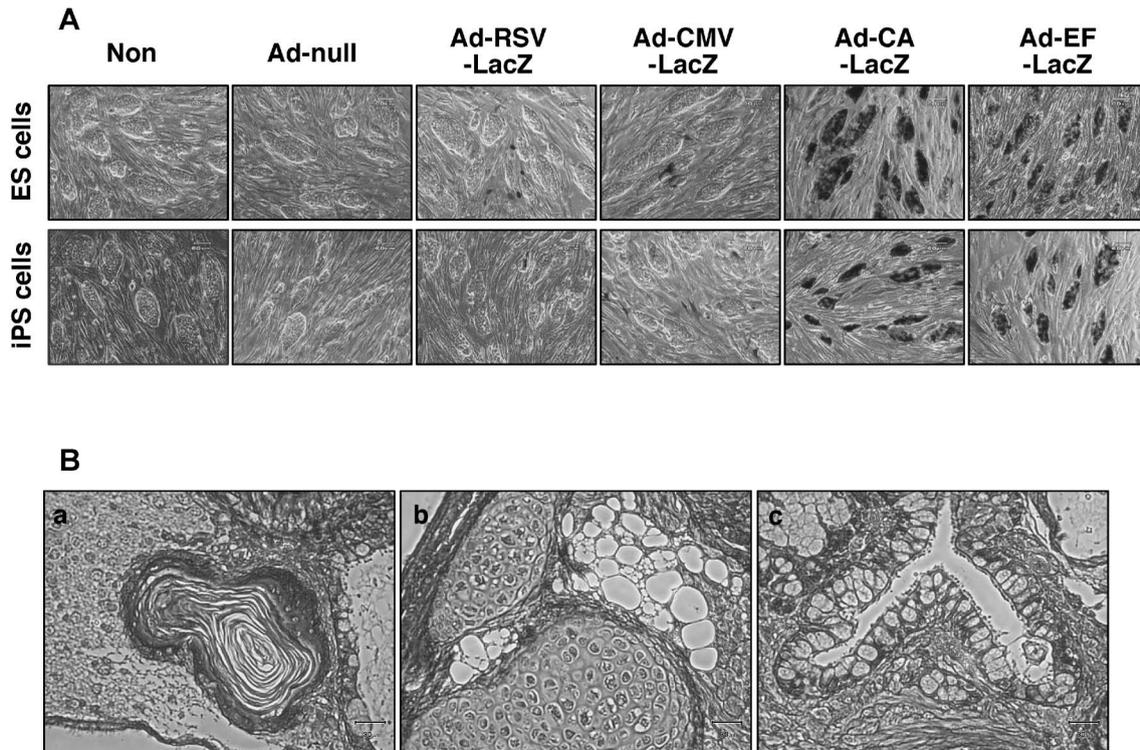


Fig. 4. Efficient Transgene Expression in Mouse iPS Cells by Using an Ad Vector Containing the CA and the EF-1 α Promoter

(A) Mouse ES cells or iPS cells were transduced with LacZ-expressing Ad vector at 3000 VP/cell. On the following day, X-gal staining was carried out. Similar results of X-gal staining were obtained in three independent experiments. (B) Paraffin sections of the teratomas derived from Ad-CA-mCherry-transduced iPS cells were prepared, and sections were stained with hematoxylin and eosin. a, ectoderm (epidermis); b, mesoderm (cartilage and adipocyte); c, endoderm (gut epithelium).

への応用は困難となる。そこで、三胚葉への分化能が保持されているかどうかを検討するために、Ad ベクター導入後の iPS 細胞を用いてテラトーマ形成実験を行った [Fig. 4(B)]. その結果、遺伝子導入された iPS 細胞はもとの iPS 細胞と同様に外胚葉・中胚葉・内胚葉いずれにも分化可能であることが明らかとなり、Ad ベクターは ES 細胞や iPS 細胞の分化能を妨げることなく、効率よく遺伝子導入ができるベクターであることが明らかとなった。

5. 遺伝子導入による ES 細胞の分化制御

最適化された Ad ベクターを用いて ES 細胞に機能遺伝子を導入し、実際に ES 細胞の分化を制御できるかどうかについて検討した。マウス ES 細胞はフィーダー細胞由来のサイトカイン LIF (leukemia inhibitory factor) がその未分化維持に必須であることが知られている。LIF は受容体に結合後、下流の STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) を介してシグナルを伝達する。そこで、EF-1 α プロモーターを有した従来型 Ad ベクターを用いて STAT3 の dominant-negative 変異体 (STAT3F) の cDNA をマウス ES 細胞に導入することにより、LIF の下流シグナルを阻害させたところ、LIF 存在下でも ES 細胞は三胚葉すべての細胞に分化することが明らかとなった [Fig. 5(A)]. ES 細胞の未分化維持には LIF 以外にも Nanog などの転写因子が必須であることが明らかとなっている。そこで、先述のベクターを用いて STAT3F と Nanog を同時に発現させたところ、STAT3F による細胞分化シグナルが Nanog 発現により阻害され、ES 細胞は未分化状態を維持し続けた [Fig. 5(B)]. したがって、Ad ベクターを用いることで ES 細胞の分化を自由に制御できる可能性が示された。

6. ES 細胞及び iPS 細胞の高効率分化誘導

Ad ベクターを用いた遺伝子導入技術が分化誘導系に応用できるかどうかを検討するために、マウス ES 細胞及び iPS 細胞へ機能遺伝子を導入することを試みた。ES 細胞及び iPS 細胞からの分化モデルとして脂肪細胞への分化誘導を行うとともに、脂肪細胞分化に必須の遺伝子である PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 遺伝子¹⁵⁾ を ES 細胞及び iPS 細胞へ導入することにより、脂肪細胞への分化効率が上昇するかどうかを検討した。両細胞へ LacZ 遺伝子 (コントロール) 又

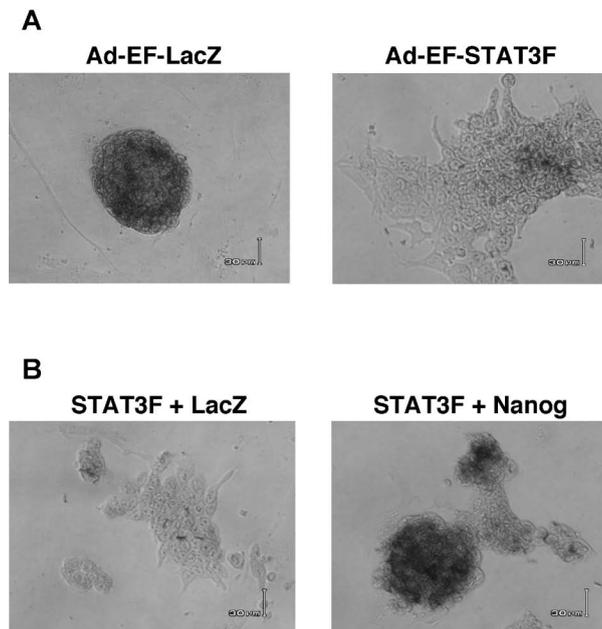


Fig. 5. Introduction of Functional Genes into Mouse ES Cells by Ad Vectors Containing EF-1 α Promoter

Mouse ES cells (1×10^4 cells) were seeded, and on the following day, the cells were transduced with 3000 VP/cell of Ad-EF-LacZ or Ad-EF-STAT3F for 1.5 h (A). Mouse ES cells were also co-infected with 3000 VP/cell of Ad-EF-STAT3F and 3000 VP/cell of Ad-EF-lacZ or Ad-EF-Nanog for 1.5 h (B). On day 3, each cell was infected again by the same vectors. On day 5, alkaline phosphatase staining was performed. Alkaline phosphatase-positive cells indicate undifferentiated ES cells. Similar results were obtained in three independent experiments.

は PPAR γ 遺伝子を導入し、脂肪細胞分化用の液性因子 (インスリン, デキサメタゾンなど) を含む培地中で 15 日間接着培養した。オイルレッド O 染色により脂肪細胞への分化効率を評価した結果、iPS 細胞の脂肪細胞への分化効率は ES 細胞の分化効率よりも低いものの、液性因子を作用させて培養することにより両細胞とも脂肪滴が観察された [Fig. 6 (A)]. さらに、液性因子のみを用いた分化誘導法と比較し、液性因子を加えさらに Ad ベクターによる PPAR γ 遺伝子を導入した ES 細胞及び iPS 細胞は、極めて効率よく脂肪細胞へ分化していることも示された。すなわち、従来の方法では ES 細胞において約 50% の細胞が、iPS 細胞において 20–30% の細胞がそれぞれオイルレッド O で染色されたのに対し、PPAR γ 遺伝子を導入した ES 細胞及び iPS 細胞においては 80–90% の細胞がオイルレッド O に染色された。また、Ad ベクターを用いた PPAR γ 遺伝子導入による脂肪細胞への分化効率の上昇は、脂肪細胞特異的なマーカー遺伝子の発現上昇によっても確認された。なお、LacZ 遺伝子を導

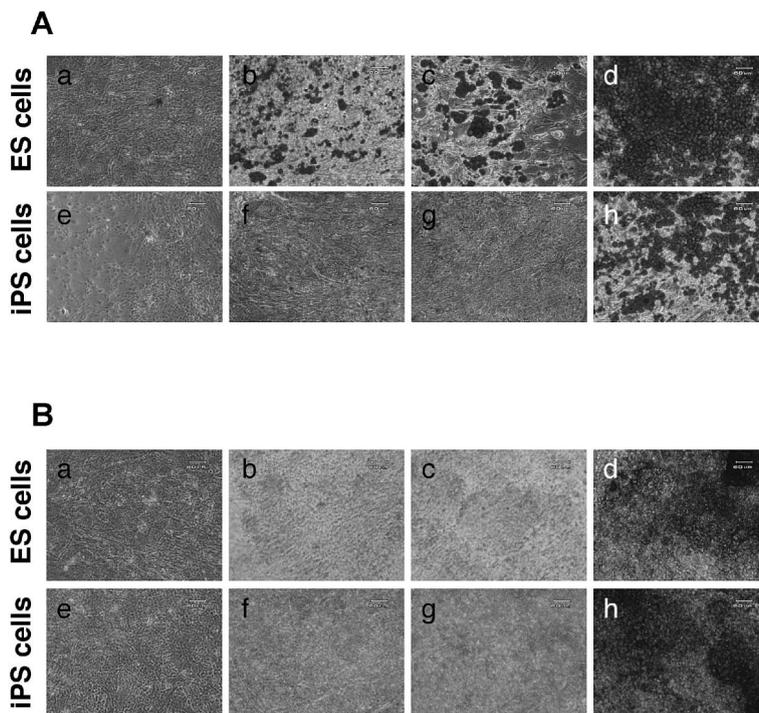


Fig. 6. Efficient Adipocytic or Osteoblastic Differentiation from Mouse ES Cells and iPS Cells by the Transduction of the PPAR γ or Runx2 Gene

(A) ES-EBs or iPS-EBs were transduced in triplicate with 10000 VP/cell of Ad-CA-LacZ or Ad-CA-PPAR γ . After plating onto a gelatin-coated dish on day 7, ES-EBs and iPS-EBs were cultured for 15 days in the presence or absence of adipogenic supplements (AS). After cultivation, lipid accumulation was detected by oil red O staining. a, non-treated ES-EBs; b, ES-EBs with AS; c, ES-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; d, ES-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ ; e, non-treated iPS-EBs; f, iPS-EBs with AS; g, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-LacZ; h, iPS-EBs with AS plus Ad-CA-PPAR γ . The scale bar indicates 60 μ m. (B) ES-EBs or iPS-EBs were transduced in triplicate with 10000 VP/cell of Ad-CA-LacZ or Ad-CA-Runx2. After culturing for 15 days with or without osteogenic supplements (OS), matrix mineralization in the cells was detected by von Kossa staining. a, non-treated ES-EBs; b, ES-EBs with OS; c, ES-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; d, ES-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2; e, non-treated iPS-EBs; f, iPS-EBs with OS; g, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-LacZ; h, iPS-EBs with OS plus Ad-CA-Runx2. The scale bar indicates 60 μ m.

入した細胞ではこのような分化効率の上昇はみとめられなかった。これらの結果から、マウス ES 細胞及び iPS 細胞の脂肪細胞への分化効率は Ad ベクターを用いた PPAR γ 遺伝子の導入により改善できることが示された。

次に、Ad ベクターによる遺伝子導入がその他の細胞種への分化誘導系にも有用であるかどうかを検討するため、マウス ES 細胞及び iPS 細胞から骨芽細胞への分化誘導を試みた。今回の分化誘導系においては前述した Runx2 遺伝子を Ad ベクターにより発現させた。Ad-CA-Runx2 を EB (embryoid body) へ 3 回作用させ、骨芽細胞分化用の液性因子 (β グリセロリン酸, アスכולビン酸など) 中で接着培養し、マウス ES 細胞及び iPS 細胞由来の細胞が石灰化を生ずる骨芽細胞へ分化しているかどうかを von Kossa 染色により解析した。その結果、液性因子を作用させることにより石灰化が検出されたものの、その分化効率は低く、20%以下の細胞し

か石灰化を起こしていなかった [Fig. 6(B)]。一方、Runx2 遺伝子を導入した ES 細胞及び iPS 細胞は、液性因子のみで培養した細胞及び LacZ 遺伝子を導入した細胞と比較し、石灰化した細胞が著明に増加していること明らかとなった [Fig. 6(B)]。また、沈着した石灰化を定量化したところ、LacZ 遺伝子導入群においては液性因子のみの誘導法と著差はみとめられなかったものの、Runx2 遺伝子導入細胞においては約 8 倍、石灰化が上昇していた。これらの結果から、Ad ベクターによる Runx2 遺伝子の導入によりマウス ES 細胞及び iPS 細胞から骨芽細胞へ効率よく分化誘導可能であることが示された。このように最適化した Ad ベクターを用いたマウス ES 細胞及び iPS 細胞への分化関連遺伝子の導入により、脂肪細胞及び骨芽細胞への分化効率を飛躍的に改善できることが示され、本遺伝子導入技術はマウス ES 細胞及び iPS 細胞を用いた細胞分化研究に有用であると考えられた。

7. おわりに

これまでもレトロウイルスベクターなどの恒常的遺伝子発現系を用いて ES 細胞から標的の細胞への分化誘導は行われてきた。しかしながら、これらの手法では機能遺伝子が染色体に挿入されるため治療用に適しておらず、一過性の遺伝子導入系の分化誘導が望まれていた。今回、われわれは Ad ベクターを用いたマウス ES 細胞及び iPS 細胞への高効率遺伝子導入法を確立し、さらにその遺伝子導入技術を利用して分化関連遺伝子をマウス ES 細胞及び iPS 細胞へ導入することにより特定の細胞へ効率よく分化誘導することに成功した。なお、異なる iPS 細胞株についても今回と同様の結果が得られており、¹⁴⁾ 幅広い ES 細胞及び iPS 細胞株に適用可能であることが示唆されている。また、今回は示していないが、分化が完了した細胞では Ad ベクター由来の遺伝子発現はほとんどみとめられないことも確認している。¹⁶⁾ したがって、Ad ベクターは幹細胞を用いた分化誘導研究において、効率面だけでなく安全面においても非常に有用であると考えられる。現在、筆者らのグループでは Ad ベクターを用いた遺伝子導入技術がその他の細胞種への分化誘導系へ応用可能かどうかに関して、マウス及びヒトの ES 細胞及び iPS 細胞を用いて検討中である。一過性発現を示す Ad ベクターを用いた遺伝子導入技術は、幹細胞研究・再生医療研究において重要なツールになるものと考えられ、今後のますますの応用が期待される。

REFERENCES

- 1) Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R., *Science*, **284**, 143–147 (1999).
- 2) Conget P. A., Minguell J. J., *Exp. Hematol.*, **28**, 382–390 (2000).
- 3) Hung S. C., Lu C. Y., Shyue S. K., Liu H. C., Ho L. L., *Stem Cells*, **22**, 1321–1329 (2004).
- 4) Mizuguchi H., Sasaki T., Kawabata K., Sakurai F., Hayakawa T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 1101–1106 (2005).
- 5) Tashiro K., Kondo A., Kawabata K., Sakurai H., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 127–132 (2009).
- 6) Studeny M., Marini F. C., Dembinski J. L., Zompetta C., Cabreira-Hansen M., Bekele B. N., Champlin R. E., Andreeff M., *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 1593–1603 (2004).
- 7) Komori T., *J. Cell. Biochem.*, **95**, 445–453 (2005).
- 8) Takahashi K., Yamanaka S., *Cell*, **126**, 663–676 (2006).
- 9) Tompers D. M., Labosky P. A., *Stem Cells*, **22**, 243–249 (2004).
- 10) Cherry S. R., Biniszkiwicz D., van Parijs L., Baltimore D., Jaenisch R., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7419–7426 (2000).
- 11) Gropp M., Itsykson P., Singer O., Ben-Hur T., Reinhartz E., Galun E., Reubinoff B. E., *Mol. Ther.*, **7**, 281–287 (2003).
- 12) Niwa H., Masui S., Chambers I., Smith A. G., Miyazaki J., *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1526–1536 (2002).
- 13) Kawabata K., Sakurai F., Yamaguchi T., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Mol. Ther.*, **12**, 547–554 (2005).
- 14) Tashiro K., Inamura M., Kawabata K., Sakurai F., Yamanishi K., Hayakawa T., Mizuguchi H., *Stem Cells*, **27**, 1802–1811 (2009).
- 15) Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B. M., *Cell*, **79**, 1147–1156 (1994).
- 16) Tashiro K., Kawabata K., Sakurai H., Kurachi S., Sakurai F., Yamanishi K., Mizuguchi H., *J. Gene Med.*, **10**, 498–507 (2008).