

## 核外での遺伝情報操作法による人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作製

長谷川 護

(ダイナベック株式会社)

### 1. 序 論

2012年度のノーベル医学生理学賞は、動物の個体発生学に革命をもたらし、生命科学と医療の将来を大きく変えたとして、京都大学・山中伸弥教授と英国ケンブリッジ大学のジョン・ガードン博士の二人にその功績を称え、授与された。山中教授は、マウスの体細胞へ4種の核初期化遺伝子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*:いわゆる山中4因子)を導入し、初期胚細胞のように多分化能を持った人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) へと初期化する技術 (核初期化技術) の開発に成功し (2006年)<sup>1)</sup>, 引続いてヒト細胞からの作製にも成功することにより (2009年)<sup>2)</sup>, 生物学・医学の分野に大きな衝撃を与えた。これにより、細胞の分化・個体の発生プロセスを正逆両方向に自在に操作することが可能になり、難病の根本治療を含む生命操作が現実的なものとなってきた。多能性幹細胞としては以前より胚性幹細胞 (ES 細胞) が注目されていたが、初期胚の一部を利用するため、ヒト受精卵を滅失することに対する生命倫理的問題が大きく、また移植の際の宿主による免疫的な排除という大きな課題があった。これに対し、iPS 細胞は体細胞を素材として作り出すことが可能であり、ES 細胞技術が抱えていた問題を根本的に解決している。患者自身の体細胞から iPS 細胞を樹立し、自身の細胞を疾患の治療に応用できることも期待されている。これまですでに種々の体細胞から iPS 細胞が作製されており、神経細胞や心筋細胞などの細胞へと分化誘導する基礎的技術が確立されつつある。マウスの体内でヒト iPS 細胞由来の臓器を形成することに成功した報告もあり<sup>3)</sup>, ブタなどの大型動物を用いてヒト iPS 細胞由来の移植用臓器を作り出す計画も研究レベルで進展しているといわれている。

しかしながら、従来の iPS 細胞作製法は山中4因子の細胞への導入に際して主にレトロウイルス由来のベクターを用いており、染色体へウイルスゲノムが組み込まれることにより細胞に形質変化をもたらす恐れがあること、また iPS 細胞作製効率にも実用上の課題があった。これに対し、我々は、センダイウイルス (SeV) ベクター技術を用いてこの課題の回避に成功した。本稿ではこの SeV ベクターによる iPS 細胞作製技術とその応用例を紹介する。

### 2. さまざまな iPS 細胞誘導方法

これまでにさまざまな iPS 細胞作製法が報告されているが、それらは遺伝子導入による方法と遺伝子を用いずに作製する方法に大別される。後者の方法は、遺伝子やベクターが iPS 細胞に残存することを懸念して開発された方法である。遺伝子の代わりにその産物であるタンパク質を直接細胞に導入する方法<sup>4,5)</sup>や、合成 mRNA<sup>6)</sup>、化学物質によって内因性の細胞初期化因子の活性を高めることにより iPS 細胞を作製する方法があるが、いずれも作製効率や操作の煩雑さなどに大きな課題があり、これらの一部の方法では作製された iPS 細胞の性状についてもさらなる検討が必要と考えられているものがある。

一方、遺伝子導入による iPS 細胞誘導の場合は、遺伝子導入効率と遺伝子やベクターの細胞内残存、染色体への組み込みなどが課題となる。遺伝子導入効率や搭載遺伝子の発現効率は、ウイルスベクターを用いた方がプラスミド法などの非ウイルスベクターに比べて一般的に高い。しかしながら、ウイルスベクターを使用する場合、その種類によりその感染効率が標的細胞種により大きな違いがみられることがあることは留意すべきである。たとえばマウス白血病レトロウイルスベクターの場合、細胞分裂が静止している細胞に対しては遺伝子導入効率がきわめて低く、また、ヒト細胞感染のためには補助因子を別途細胞に導入しなくてはならない。アデノウイルスベクターの場合は血球系に対しては効率が低いため、大量のベクターが必要となる。使用される遺伝子やベクターの標的細胞内残存に関しては、レトロウイルスベクターでは標的細胞の染色体 DNA

Generation of induced pluripotent stem cells (iPS cells) using a novel extranuclear method for the manipulation of genetic information

Mamoru Hasegawa (DNAVEC Corporation, Techno Park Oho, 6 Ohkubo, Tsukuba, Ibaraki, 300-2611 Japan)

## テクニカルノート

に挿入されることが遺伝子発現に必須であるため、必然的に細胞に残存し続ける。これに対して、アデノウイルスベクターやプラスミドは、多くの場合染色体外に存在するため、一過性に発現した後消失する。ただし、低い確率ではあるが組換えにより染色体 DNA に挿入される事実があり、これにより染色体機能に障害を引き起こす可能性がある。

我々が世界で初めて実用化に成功した SeV ベクター<sup>7)</sup>は iPS 細胞作製についてのこれらの諸課題を一挙に解決できる優れた特徴を有している。

### 3. センダイウイルスベクターの特徴： 特に細胞工学用ツールとして

#### 1) センダイウイルス (SeV)

SeV (図 1A) はモノネガウイルス目パラミクソウイルス科に属する RNA をゲノムとするウイルスで、仙台市内で東北大学の研究チームにより分離された (1952 年)。直径 200 nm ほどの脂質二重膜からなるエンベロープと、その内部に核タンパク質複合体の形で 15,384 塩基の一本鎖

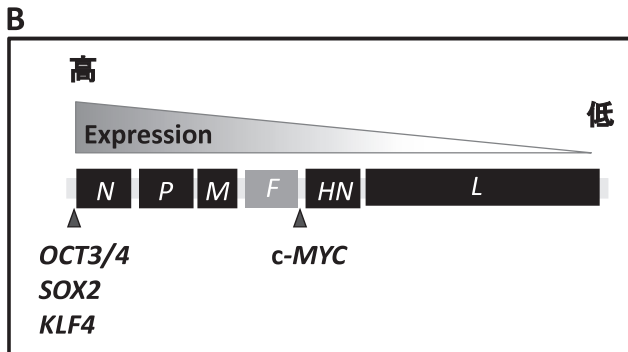
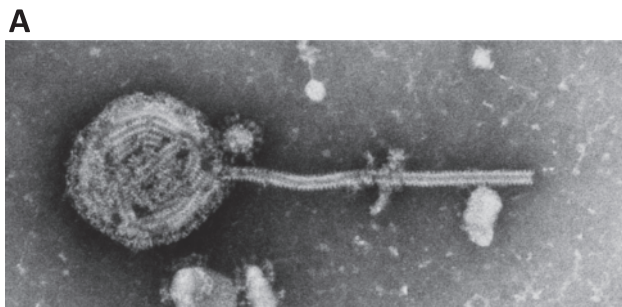


図 1 センダイウイルスとゲノムの模式図

(A) センダイウイルスの電子顕微鏡写真。核タンパク質複合体の一部がエンベロープを破ってむき出しになっている。(B) センダイウイルスの遺伝子のゲノム上の配列。発現量は左に配置されているものほど高い。

外来遺伝子は各遺伝子の間かゲノムの先頭、または末尾に搭載される。本開発では F 遺伝子 (灰色) を欠失したベクターが使われている。

非分節のマイナス鎖 RNA のゲノムを有し、それに 6 個の遺伝子 (複製と転写の上流から *N*, *P*, *M*, *F/HN*, *L* の順: 図 1B) と複数のアクセサリー遺伝子がコードされている。特徴的な遺伝子は *HN*, *F* および *L* 遺伝子であり、発現タンパク質 *HN* (hemagglutinine neuraminidase) は SeV が細胞に付着する際に細胞表面のシアル酸を認識してウイルス粒子を繫留させ、*F* (fusogenic protein) は細胞外のプロテアーゼにより切断活性化されて、繫留されている SeV のエンベロープと標的細胞の細胞膜の融合を触媒して感染を成立させる。また、*L* (RNA dependent RNA polymerase) はその修飾タンパク質 *P* とともに感染後に細胞質でウイルスゲノムの複製と複製された多コピーのゲノムからの転写を触媒する。そのため、SeV 感染細胞内には大量のウイルスタンパク質が蓄積する。なお、同じ RNA ウイルスでもマウス白血病ウイルスやヒト免疫不全ウイルスのようなレトロウイルスとは異なり、感染細胞内でゲノム RNA から DNA への変換は起こらず、SeV ゲノムは細胞質内で RNA としてとどまり、核内の染色体 DNA に組み込まれることはない。

さて、シアル酸を含む糖鎖を持つ膜タンパク質、膜脂質はほとんどの動物細胞種に存在するため、*F* タンパク質が活性化されている限り SeV の感染域は広い。そのため、以下に述べる SeV ベクターは哺乳類や鳥類などの広範な動物種の各種細胞への感染、遺伝子導入が可能である (自然界では SeV の *F* はマウスなどのげっ歯類の気道のプロテアーゼで活性化されるため、感染の種特異性、臓器特異性が認められている)<sup>8)</sup>。

#### 2) センダイウイルスベクター (SeV ベクター)

SeV の感染細胞域の広さ、ゲノムが染色体に組み込まれることが原理的にないこと、ウイルス遺伝子の高発現という特徴は、安全かつ高性能なベクター開発の材料としての SeV の魅力を示唆している。我々は、東京大学医科学研究所 (当時) の永井美之教授のグループが動物細胞に各 SeV 遺伝子 cDNA を導入することによって SeV の再構成 (SeV reverse genetics) に成功したこと<sup>9)</sup>を知り、1995 年から同グループと共同で新たなベクター、標的細胞での細胞質内複製、遺伝子高発現能を果たす新しい RNA レプリコンベクターの創出に挑戦した。SeV reverse genetics を活用することにより、発現させたい外来遺伝子を SeV ゲノムへ組み込んだり、安全性確保を目的として、伝播に必要ないいくつかのウイルス遺伝子を欠損させること、外来遺伝子発現レベルを調整することなどが可能になると思われたからである。その結果、*F*, *HN*, *M* などのエンベロープ遺伝子を単独ないし複数欠失した非伝播型ベクターの開発<sup>7,10)</sup>, *P*

遺伝子を欠損する短期遺伝子発現型ベクター、*M* 遺伝子のみを欠損する隣接細胞融合型ベクター、*F* のタンパク質分解酵素依存性活性化に着目したがん細胞特異的細胞融解ベクター<sup>11)</sup>など、広範な機能レパートリーを持つ SeV ベクターシステムを構築するに至った。この成果は麻疹（はしか）ウイルスのようなモノネガウイルスを基礎にした非伝播型ベクターの世界に先駆けた開発であり、細胞質型 RNA レプリコンベクターの概念を確立した。世界主要各国において一部パラミクソウイルスまでをカバーする広範なベクター基本特許群が成立しており、日本発のベクター技術としてもユニークな存在となっている。基礎研究はもとより医療技術として遺伝子治療製剤、遺伝子ワクチンの開発に貢献しつつあり、慢性動脈硬化症による虚血肢の遺伝子治療では第 I/IIa 相臨床研究が終了してベクターの安全性と治療効果に期待できる結果が出ている<sup>12)</sup>。また、遺伝子ワクチンのうち、より安全と思われる RNA ワクチンとして注目されており、予防用のエイズ遺伝子ワクチン<sup>13)</sup>の国際的な共同開発が進行、第 I 相臨床試験が英国とアメリカで今春から始まっている。

#### 4. センダイウイルスベクターを用いた iPS 細胞の誘導

山中伸弥教授のグループはマウス白血病レトロウイルスベクターを用いて iPS 細胞作製に成功した。このベクターをヒト細胞に応用するためには、あらかじめ同ウイルスの受容体を標的細胞に発現させる必要があったこと、非分裂細胞には遺伝子導入ができないこと、さらには標的細胞の染色体に積極的に組み込まれて機能するため、細胞のがん化を含む形質転換の可能性という安全性の問題があることが指摘されていた。そこで、元の細胞の遺伝的背景を維持させ、将来的な細胞・再生医療の安全性を確保するために、染色体と相互作用しない方法で山中因子を細胞に持ち込む方法や、山中因子を直接的には使わず、それらを細胞内で誘導する薬物等を検討する研究などが世界的に展開されることになった。我々は、前節で解説した SeV ベクターの細胞質型 RNA レプリコンベクターとしての性能がこれらの課題に重要な答えを与える可能性があると考え、*F* 欠失型の SeV ベクターに山中 4 因子を搭載してその核初期化能を検討した。

##### 1) 第一世代核初期化 SeV ベクターキットの開発

SeV ベクターの標的細胞への遺伝子導入効率をきわめて高く、低用量でも *in vitro* では多くの動物細胞種でほぼ 100 パーセントの導入を果たすことができる<sup>7)</sup>。核初期化の最適条件、たとえば核初期化因子の導入比率は標的細胞種によって異なることが考えられたので、四つの山中因子

*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* を別々の SeV ベクターに搭載して、研究者がその対象細胞によって用いるベクター量の比率を選択できるようにした。また、それにより、動物細胞を使うベクター製造の安定性と、iPS 細胞誘導実験中に研究者が誤ってベクターに直接接触する事故での安全性を高めることとした。

具体的には、今後 iPS 細胞作製に使う動物細胞の多様性を考え、細胞障害性を最小にするように多様な点変異を *P*, *M*, *HN*, および *L* に導入した SeV ベクターを用いた。この場合、ヒト細胞で長期感染する SeV 変異株の点変異も導入した<sup>10)</sup>。また、4 種の組換えベクター上の各核初期化因子挿入位置を工夫することによって遺伝子発現量を調節し（極性効果：図 1B）<sup>14)</sup>、これらの中から最も iPS 誘導効率が高い組み合わせを選択した。

その結果、市販のヒト線維芽細胞株を使う場合、各 4 種の組換え SeV ベクターを各 MOI (multiplicity of infection) = 3、つまり細胞あたりわずかに数個のベクターを使うだけで ES 細胞様の細胞を効率的に誘導できることがわかった（図 2A）。その効率はたとえばヒトの新生児包皮由来線維芽細胞では 1~3% 程度と他法に比べて非常に高いものであった。得られた細胞の多分化能については、*in vitro* では外胚葉系におけるドーパミン産生神経細胞への分化と神経ネットワーク様構造の形成、中胚葉系における拍動する心筋細胞群や各種血球系細胞、さらに内胚葉系における膵臓  $\beta$  細胞などへの分化が確認され（図 2B）、*in vivo* においても免疫不全マウスへ皮下等に移植することにより、数か月後に三胚葉系各種ヒト組織（神経線維様組織、心筋組織、骨髄を含む硬骨組織、軟骨組織、消化管様管構造、血球系細胞、メラニン色素を生産する上皮組織など）からなるヒトテラトーマの形成が確認された（図 2C）。成人皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の誘導も可能であった。このベクターキットの iPS 細胞誘導効率はこれまで報告されているほかの方法を数十倍から数千倍凌駕するものであった。また、ただ 1 回の細胞感染操作で十分であり、簡便性にも優れていた<sup>15)</sup>。このようにして得られる染色体が無傷でベクターや外来遺伝子が除去された iPS 細胞をここでは SeV-iPSC と呼ぶ。

##### 2) 第二世代核初期化 SeV ベクターキットの開発

第一世代のキットは、核初期化に用いた組換え SeV ベクターが iPS 細胞の増殖に伴い自然に希釈されて消失するものであった。得られた iPS 細胞コロニーを任意にピックアップすることにより、ベクターフリーの（核初期化因子フリーの）iPS 細胞（SeV-iPSC）を得ることができた。しかし、この方法では標的細胞の種類によってベクター消失

## テクニカルノート

の速度が異なるため、できあがった iPS 細胞を 3~4 か月にわたって培養しなくてはならない場合もしばしば見受けられた。標準化された iPS 細胞作製操作のためには、よりコントロールされたベクター除去が望ましい。我々は次に以下のような仕組みを利用した。すなわち、*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* にはそれぞれ、第一世代に用いた SeV ベクターと同じものを用い、その挿入位置を *N* 遺伝子の前 (3' 側, センダイウイルスはマイナス鎖 RNA がゲノムとなっており、読み取り開始側が 3' になる) とする。一方、*c-MYC* は新たに作出した温度感受性 SeV ベクター TS15 の *HN* と *L* 遺伝子の間に挿入する (図 1B)。TS15 ではその *L* 遺伝子に新たな温度感受性が導入されているため 37°C では複製が起こらない。SeV ベクターは搭載外来遺伝子が先頭寄り (3' 側) にあるほどその複製速度は小さい。よって、四つの組換え SeV ベクターを同時感染した細胞内では 37°C で培養すると *L* が *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* 搭載ベクターからトランスに供給されるため、TS15 ともども全ベクターの複製が続くが、複製競合により次第に *c-MYC* 搭載ベクターが優勢になり、*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* 搭載ベクターが消失することにより、*c-MYC* 搭載ベクターも *L* の欠乏とともに消失する。この新しいベクターキットによって得られるヒト iPS 細胞も ES 様発現マーカーを有し、*in vitro*, *in vivo* で多分化能を示した<sup>16)</sup>。現在、上記の特徴を持つベクターセットは高効率かつ標的細胞の遺伝的背景を攪乱しないこと、また再現性がよく操作が非常に簡便であること、容易にベクターと核初期化因子が除去された iPS 細胞が作製できることなどのメリットを有するキットとして CytoTune™-iPS の商品名で国内外で販売されており、高い評価の下、世界の多くの iPS 細胞研究に役立っている。その他、我々は 38°C で *L* の活性を失うベクターを用いて、任意の時間に組換えベクターを消去する技術も開発している<sup>16)</sup>。

### 3) 血液細胞からの iPS 細胞の誘導

これまで多くの場合、皮膚線維芽細胞が iPS 細胞作製用細胞として用いられてきたが、バイオプシーによる採取という身体的・心理的負担、また多くの場合、採取後の拡大培養という煩雑な作業が必要であり、その際、細胞の形質転換が起こる懸念があった。我々は慶應義塾大学医学部福田恵一教授のグループと共同で、1 ml 以下の末梢血中の T 細胞から 0.1% という高い効率で、しかも他法に比して 1 か月以上も短期間で iPS 細胞を作製する方法を開発した<sup>17)</sup>。こうして得られたヒト T 細胞由来 iPS 細胞 (TiPS) も *in vivo* および *in vitro* で十分な分化能力を示した。またその後、T 細胞以外の末梢血球細胞からの iPS 細胞の作製

にも成功している<sup>18)</sup>。今後、この採血という低侵襲性の方法によって患者など個人の iPS 細胞を簡便に誘導する方法が広まっていくと考えられる。また、我々は臍帯血の CD 34+ に対してわずか MOI=2 という少量のベクターでヒト iPS 細胞を誘導することにも成功した<sup>16)</sup>。臍帯血バンクから組織適合性の異なる iPS 細胞のセットを用意することにより、将来患者への迅速な再生医療の適用に貢献できるものと期待される。

## 5. SeV-iPS 細胞技術の応用

### 1) 優れた機能を有するヒト分化細胞の作製

SeV-iPSC は元の細胞の遺伝的背景を乱しておらず、分化細胞に移行する場合に最も無理のないプロセスを経ると考えられるため、得られる分化細胞は他法で得られる細胞と比較して本来の分化細胞の性質により近いものを持つと期待される。事実、我々が国立国際医療研究センターと共同で作製したヒト血管内皮細胞は、その重要な性質である血管平滑筋増殖抑制作用を長期的にわたって維持した (未発表)。また、SeV-iPSC から誘導したヒト肝細胞は強い薬物代謝酵素活性を持ち、肝障害物質に対しても特異的な障害を受けた<sup>19)</sup>。さらに我々は、ヒト ES 細胞と SeV-iPSC から世界で初めて褐色脂肪細胞を得ることに成功した<sup>20)</sup> (図 3A)。褐色脂肪細胞は動物の内燃機関といわれているもので、脂肪を燃焼して熱に変換して血中の中性脂肪や血糖値を下げる作用を有する (図 3B)。抗肥満薬、健康食品、美容技術の開発に役立つことが期待されるほか、将来的には病的肥満患者などの細胞治療にも役立つと期待される。

### 2) 難病疾患 iPS 細胞バンクの構築

難病の基礎研究や治療薬開発のために、iPS 細胞技術は必要な量の患者細胞を研究室にもたすものとして重要である。インフォームドコンセントにより得た患者細胞はその染色体を傷つけない方法で iPS 細胞に導かなくてはならない。さもないと染色体の機能変化を含む iPS 細胞が誘導され、それから得られる分化細胞が本来の病態とは異なった性質を付加されている可能性があるからである。SeV ベクターを用いた系は以下の理由からこのような iPS 細胞バンクの構築には最も適した系である； i) 染色体を傷つけない、 ii) 市販細胞とは違って、患者個人の細胞からの iPS 細胞の作製は困難な場合が多く、作製効率がきわめて優れた本法は威力を発揮する、また、 iii) 本法では少量の末梢血から患者の iPS 細胞を得ることができるため、患者への侵襲性が低く、精神的・肉体的負担を軽減する。我々は熊本大学医学部との共同で、神経系、皮膚、硬骨、筋肉、代謝疾患等の難病患者の iPS 細胞数百株の樹立にす



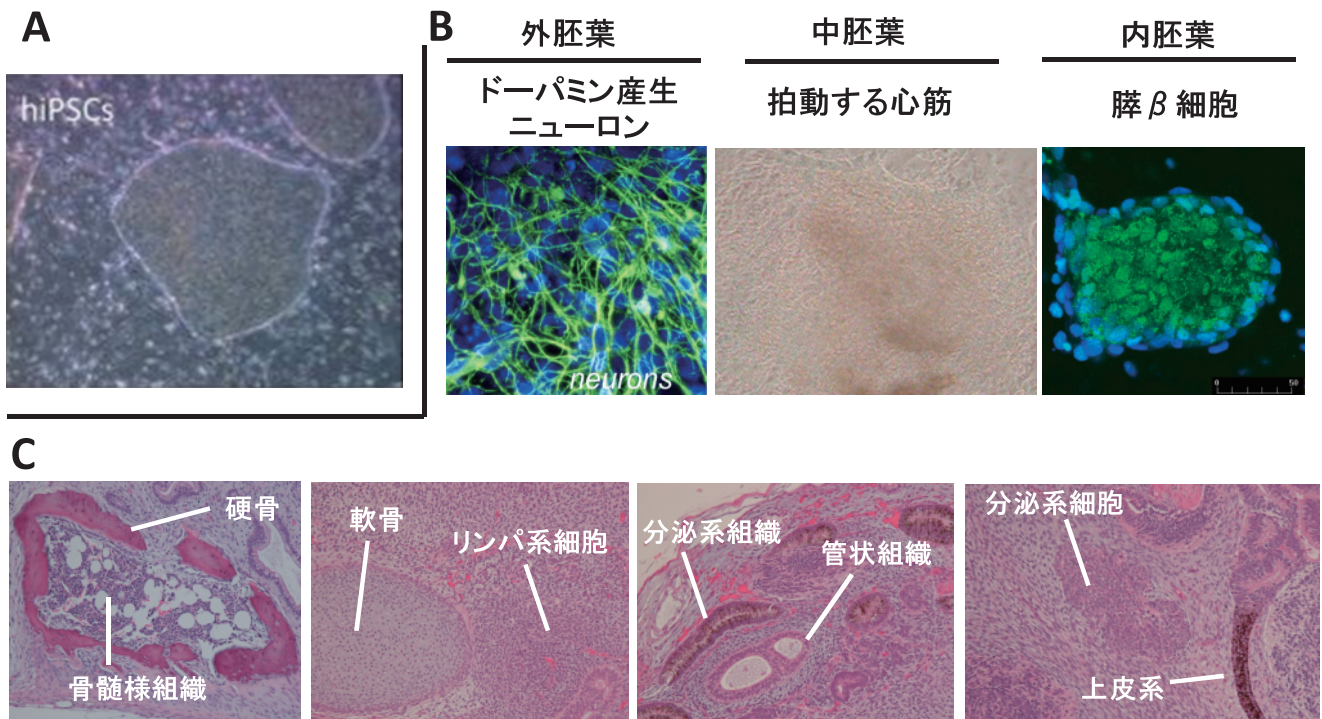


図 2

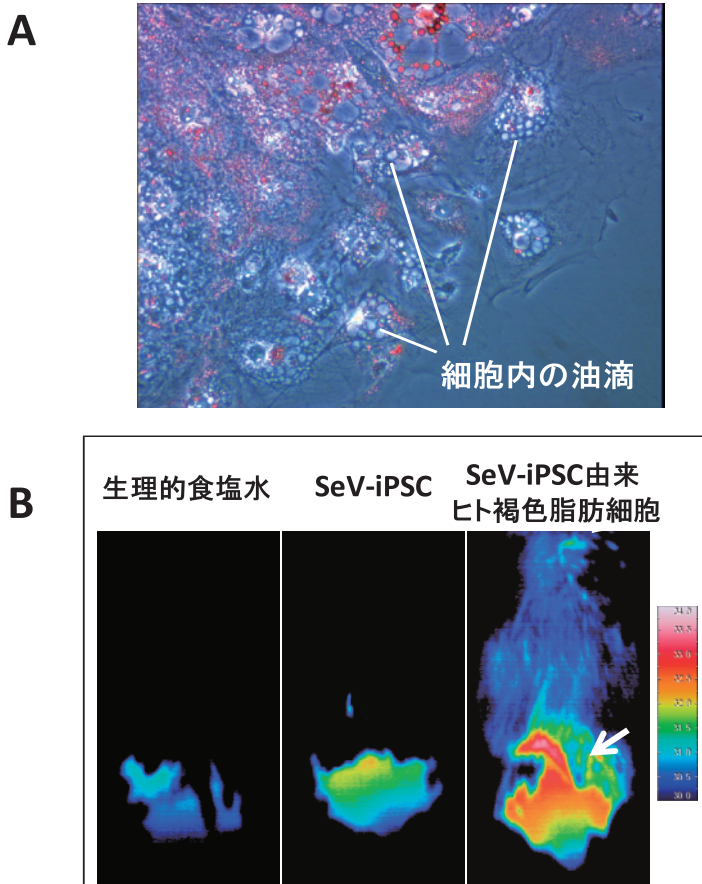


図 3

図 2 センダイウイルスベクターにより得たヒト iPS 細胞とその分化能

(A) ヒト線維芽細胞 BJ 株から得られた iPS 細胞 (SeV-iPSC). (B) SeV-iPSC の *in vitro* での三胚葉分化. (C) SeV-iPSC のマウス皮下移植により得たヒトテラトーマの組織切片解析 (HE 染色).

図 3 センダイウイルスベクターにより得たヒト iPS 細胞の褐色脂肪細胞への分化

(A) SeV-iPSC から誘導されたヒト褐色脂肪細胞. 培養液より脂肪を吸収して油滴を貯め込んでいる. (B) 得られたヒト褐色脂肪細胞を免疫不全マウス皮下に移植してβアドレナリン刺激を与えると, 褐色脂肪細胞特異的に脂肪が燃焼され発熱した.

## テクニカルノート

に成功している<sup>21)</sup>。

### 3) 遺伝子修復再生医療への基礎研究

再生医療による治療が期待されている疾患として遺伝的代謝疾患がある。特定の遺伝子機能の障害による疾患であり、酵素補充療法などが及ばない疾患に関しては健常人からの正常組織の移植が行われている。この場合、組織適合性の問題があるため移植のチャンスは極めて少なく、また、移植後も免疫抑制剤の使用が不可欠であるため、患者のQOLは必ずしも高くはない。

このような現状に対し、我々は患者のiPS細胞を得て、体外で異常遺伝子を修復したあと、必要な分化細胞に誘導して患者に戻して治療する可能性を世界で初めて実験的に示した<sup>22)</sup>。α1-アンチトリプシン欠損症(A1ATD)はA1AT遺伝子の一アミノ酸変異によって引き起こされるもので、重篤な肝硬変や呼吸障害を引き起こす。日本人にはほとんどないが白人に数百万人いるといわれる重要な遺伝子欠損症であり、肝移植による治療が行われている。我々と英国ケンブリッジ大学、サンガモ社は患者細胞から本法を用いてSeV-iPSCを誘導し、異常遺伝子を*in vitro*でZn-finger・PiggyBac法を用いて正常配列に修復後、肝細胞に分化させた。この遺伝子修復を受けたヒト患者肝細胞を免疫不全マウスの肝に移植したところ、正常なヒトA1ATの十分な発現が観察された。肝移植以外に有効な治療法がない代謝性遺伝疾患は多いため、この遺伝子修復再生医療の実現は非常に重要である。

## 6. おわりに

SeVベクター技術は日本発のユニークなベクター技術であり、基本となる知的財産権も日本(ディナベック社)が確保している。したがって、京都大学のiPS細胞作製技術と我々のSeVベクター技術というオリジナリティに富んだ二つの日本初技術の組み合わせから生まれたCytoTune™-iPSは、我が国のバイオ技術の成果として大きな意義があると考えられる。現在、国内外の多くの施設で、我々のキットを用いて元の細胞の遺伝情報を維持し、遺伝子およびベクターの残らない患者由来を含むiPS細胞が多数樹立されている。今後の医療分野において、医薬品候補の毒性・安全性の検討、創薬探索の効率化、患者iPS細胞の作出による病態の解析や病因の解明、さらに治療への応用という幅広い用途に対して、これらのiPS細胞が利用されることを大いに期待したい。また、我々のベクターは、目的遺伝子を必要な時間細胞に作用させ、その後培養温度のわずかなシフトで強制的にベクターを除去することが可能になっている。遺伝子をあたかも触媒の如く使っ

て、標的細胞の性質を修飾することが可能であることを示唆している。触媒ゆえにその姿、形はできあがった細胞には残らない。我々はFootprint freeの細胞工學用ベクターの完成と応用を目指して開発を続けている。

## 文 献

- 1) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, 126, 663-676.
- 2) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007) *Cell*, 131, 861-872.
- 3) Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Hamanaka, S., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Ibata, M., Sato, H., Lee, Y.S., Usui, J., Knisely, A.S., Hirabayashi, M., & Nakauchi, H. (2010) *Cell*, 142, 787-799.
- 4) Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H.R., Duan, L., & Ding, S. (2009) *Cell Stem Cell*, 4, 381-384.
- 5) Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., & Kim, K. S. (2009) *Cell Stem Cell*, 4, 472-476.
- 6) Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., & Rossi, D.J. (2010) *Cell Stem Cell*, 7, 618-630.
- 7) Li, H.O., Zhu, Y.F., Asakawa, M., Kuma, H., Hirata, T., Ueda, Y., Lee, Y.S., Fukumura, M., Iida, A., Kato, A., Nagai, Y., & Hasegawa, M. (2000) *J. Virol.*, 74, 6564-6569.
- 8) 永井美之 (2006) センダイウイルス物語：日本発の知と技。岩波書店。
- 9) Kato, A., Sakai, Y., Shioda, T., Kondo, T., Nakanishi, M., & Nagai, Y. (1996) *Genes Cells*, 1, 569-579.
- 10) Yoshizaki, M., Hironaka, T., Iwasaki, H., Ban, H., Tokusumi, Y., Iida, A., Nagai, Y., Hasegawa, M., & Inoue, M. (2006) *J. Gene Med.*, 8, 1151-1159.
- 11) Kinoh, H., Inoue, M., Washizawa, K., Yamamoto, T., Fujikawa, S., Tokusumi, Y., Iida, A., Nagai, Y., & Hasegawa, M. (2004) *Gene Ther.*, 11, 1137-1145.
- 12) Yonemitsu, Y., Matsumoto, T., Itoh, H., Okazaki, J., Uchiyama, M., Yoshida, K., Onimaru, M., Onohara, T., Inoguchi, H., Kyuragi, R., Shimokawa, M., Ban, H., Tanaka, M., Inoue, M., Shu, T., Hasegawa, M., Nakanishi, Y., & Maehara, Y. (2013) *Mol. Ther.*, 21, 707-714.
- 13) Moriya, C., Horiba, S., Kurihara, K., Kamada, T., Takahara, Y., Inoue, M., Iida, A., Hara, H., Shu, T., Hasegawa, M., & Matano, T. (2011) *Vaccine*, 29, 8557-8563.
- 14) Tokusumi, T., Iida, A., Hirata, T., Kato, A., Nagai, Y., & Hasegawa, M. (2002) *Virus Res.*, 86, 33-38.
- 15) Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 85, 348-362.
- 16) Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., & Nishikawa, S. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 14234-14239.
- 17) Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., Okada, Y., Seimiya, H., Fusaki, N., Hasegawa, M., & Fukuda,

- 
- 
- K. (2010) *Cell Stem Cell*, **7**, 11–14.
- 18) Nishishita, N., Fusaki, N., & Kawamata, S. (2011) Embryonic Stem Cells-Differentiation and Pluripotent Alternatives (Kallos, M.S. ed.), pp. 399–412, InTech.
- 19) Nakamura, N., Saeki, K., Mitsumoto, M., Matsuyama, S., Nishio, M., Saeki, K., Hasegawa, M., Miyagawa, Y., Ohkita, H., Kiyokawa, N., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., & You, A. (2012) *Cell Reprogram.*, **14**, 171–185.
- 20) Nishio, M., Yoneshiro, T., Nakahara, M., Suzuki, S., Saeki, K., Hasegawa, M., Kawai, Y., Akutsu, H., Umezawa, A., Yasuda, K., Tobe, K., You, A., Kubota, K., Saito, M., & Saeki, K. (2012) *Cell Metab.*, **16**, 394–406.
- 21) Fusaki, N., Ban, H., Tabata, T., Iida, A., Hasegawa, M., Ihn, H., & Era, T. (2011) 14th Ann. Meet. Am. Soc. Gene Cell Ther. (ASGCT), Abst. 577.
- 22) Yusa, K., Rashid, S.T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P. Q., Paschon, D.E., Miranda, E., Ordóñez, A., Hannan, N.R., Rouhani, F.J., Darce, S., Alexander, G., Marciniak, S.J., Fusaki, N., Hasegawa, M., Holmes, M.C., Di Santo, J.P., Lomas, D.A., Bradley, A., & Vallier, L. (2009) *Nature*, **478**, 391–394.
-