

肝がん幹細胞における核酸代謝経路の解析

研究分担者 金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系・恒常性制御学 教授

研究要旨：

肝細胞がんは全世界で年間約 62 万人が罹患し、早期発見を行いかつ根治的な治療が施されても、経過で再発を繰り返し死に至る世界第 3 のがん死亡原因である。近年正常組織と同様にがん組織においても幹細胞性を有する一部のがん細胞（がん幹細胞）が同定され、高い腫瘍形成能、転移能、抗がん剤抵抗性などががんの維持に必須な細胞集団であることが明らかにされつつある。我々は、肝幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いることで肝細胞がんを遺伝子発現パターンから幹細胞型と肝細胞型にし、幹細胞型肝細胞がんは若年発症で門脈浸潤傾向が強く Wnt シグナル活性が高いこと、EpCAM 陽性細胞ががん幹細胞の特徴を示し高い浸潤、腫瘍形成能を有すること、5-FU 抵抗性を示す事などを同定した。さらに我々は EpCAM 陽性肝がんにおける核酸代謝経路の遺伝子発現パターンを解析し、ヌクレオチドプールを調整している DUT 遺伝子がコードする dUTPase が EpCAM 陽性肝癌で高発現していることを同定した。本年度の研究において、我々は dUTPase の発現を 2009 年に肝切除が行われた肝細胞癌コホートで前向きに解析、dUTPase の発現は肝細胞癌術後早期再発のバイオマーカーとして有用であることを見出した。本研究の成果から、dUTPase は肝癌術後早期再発のバイオマーカーおよびがん幹細胞を標的とする治療法の開発において有力な標的分子であると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞がんは全世界で年間約 62 万人が罹患し、発症率としては第 5 位、がん死亡原因としては第 3 位に位置している。肝細胞がんの殆どは B 型もしくは C 型慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する。肝がんのメカニズムとしてはウイルス蛋白そのものに加えて、繰り返す壊死、炎症、再生過程を背景に遺伝子異常が蓄積され、前がん病変から高分化型肝がん、進行肝がんへと進行していくと考えられている。この過程において異常をきたす様々な遺伝子・蛋白異常が報告されているが、全体像については未だ不明な点が多い。

近年、一部の血液がんや固形がんにおいて幹細胞様の特徴を示す細胞群（がん幹細胞）の存在が明らかになり、がんの維持、転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっている可能性が示唆されている。肝細胞がんにおいてもいくつかの幹細胞マーカーを用いたがん幹細胞の分離同定が行われ、NOD/SCID マウスを用いた検討で強い腫瘍形成能力と自己複製能力、非対称性分裂能力を有していることが報告された。さらに、がん幹細胞は従来用いられている抗がん剤や放射線療法に対して高い抵抗性を有し、がん治療後の再発への関与が示唆されていることから、がん治療における重要な標的として認識されている。

最近我々は肝幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いることで肝細胞がんを遺伝子発現パターンから幹細胞型と肝細胞型に分類可能であ

ること、幹細胞型肝細胞がんは若年発症であること、門脈浸潤傾向が強いこと、Wnt シグナル活性が高いこと、EpCAM 陽性細胞ががん幹細胞の特徴を示し高い浸潤、腫瘍形成能を有すること、Wnt シグナルによって自己複製や非対称性分裂の制御を受けること、5-FU などの抗がん剤に対し抵抗性を示す事などを同定した。昨年度の研究で我々は、5-FU 代謝に関わる遺伝子の発現についてがん幹細胞とそれ以外の細胞に分類して解析を行い、dUTPase をコードしている DUT の遺伝子発現が EpCAM 陽性癌幹細胞で発現亢進が認められることを同定した。そこで、本年度の研究では dUTPase 発現亢進が癌の悪性度とどのように関わるのか、5-FU 抵抗性を含めて解析を行った。

B. 研究方法

サンプル 臨床サンプルとして、金沢大学附属病院で 2009 年に肝切除が行われた合計 39 例の肝細胞がんおよび背景肝組織を免疫組織化学解析に用いた。培養細胞は HuH7 細胞を用い、DMEM-10%FBS 培地で培養した。dUTPase の発現低下を誘導させる低分子化合物として知られる beta-HIVS はシグマから購入した。

免疫組織化学 ホルマリン固定肝細胞がん標本を用いて EpCAM, dUTPase の発現を免疫組織化学で評価した。クエン酸バッファーを用いて抗原賦活を行った後に、EnVision+キット（DAKO,

Carpinteria, CA)、抗 dUTPase 抗体 (Abcam)、抗 EpCAM 抗体 VU1D9 (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) で免疫染色を施行した。

(倫理面の配慮)

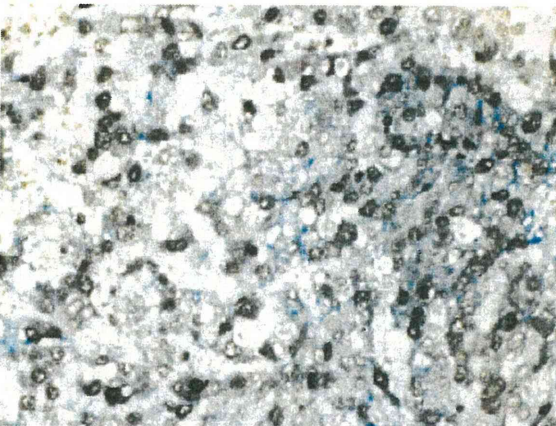
サンプルを提供する患者には、研究内容の説明及び研究協力への依頼につき説明文書を用いて説明し (遺伝子、転写産物、蛋白発現解析について、 研究の目的・方法、 研究用サンプルを提供することに伴う危険性及び利益、 同意撤回及びサンプルの廃棄、 プライバシーの保護及び機密保持、 経済的な利益等の項目)、研究協力への同意が得られた患者のサンプルを解析に用いた。

個人に関する情報の保護と管理は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。連結可能匿名化後、個人情報分担管理者の管理の下に保存、データは研究室に設置した専用コンピュータにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行った。

C. 研究結果

dUTPase の発現を 39 例の肝細胞癌コホートで評価したところ、24 例で核内に強い染色が認められた。さらに核内で強い発現が認められるサンプルを EpCAM と dUTPase で 2 重染色をおこなったところ、EpCAM 陽性細胞で dUTPase の核内への強い集積が認められ (図 1)、昨年度までに報告した EpCAM と dUTPase、Wnt シグナルとのデータと一致した。

図 1

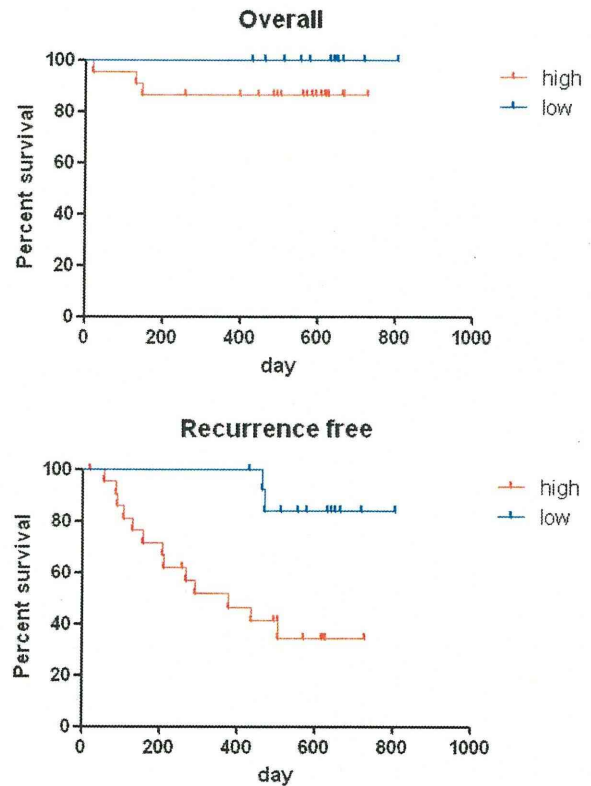


核内 dUTPase(DAB) 強発現肝細胞癌では EpCAM(Vector Blue)の発現が認められる。

このコホートの予後を 2011 年 9 月まで前向きに調査したところ、全生存率では有意差を認めないものの dUTPase の核内発現の高い肝細胞癌では予後不良傾向が認められ、無再発生存については統計的に有意に dUTPase の核内発現の高い肝細

胞癌では高い再発傾向が認められた (図 2)。次に、dUTPase の核内発現を低下させる作用が報告されている beta-HIVS による効果を HuH7 細胞で検討した。IC50 を HuH7 細胞で検討したところ、beta-HIVS の HuH7 に対する IC50 は約 3.6 mM であった。そこで、HuH7 を beta-HIVS で 5、2.5、0mM で 3 日間培養したところ、用量依存性に EpCAM 陽性細胞分画の減少が認められた (図 3)。

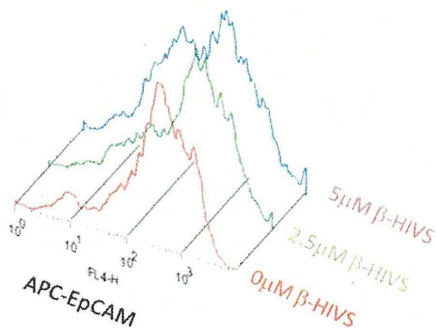
図 2 dUTPase の肝細胞がん発現パターンと予後



上段：全生存率、 $p = 0.16$

下段：無再発生存率、 $p = 0.003$

図 3 beta-HIVS が HuH7 細胞の EpCAM 発現に与える影響 (FACS 解析)



D. 考察

がん幹細胞仮説においては、正常幹細胞が正常臓器の維持に重要な役割を果たしているのと同様に、がん幹細胞ががん組織の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでに我々は EpCAM 陽性 AFP 陽性の幹細胞型の肝細胞がんでは Wnt シグナルの活性化と肝幹細胞マーカーの発現亢進、若年発症、強い門脈浸潤傾向、予後不良傾向が認められ、特に EpCAM 陽性細胞が強い腫瘍形成能、浸潤能、5-FU 抵抗性を有し、がん幹細胞の特徴を有していることを報告してきた。本研究において、我々は dUTPase の発現亢進は EpCAM 陽性癌幹細胞において認められ、dUTPase の発現亢進が肝細胞癌切除後の無再発生存に大きく寄与していることを見出した。

dUTPase はウイルス、結核菌、寄生虫から哺乳類まで幅広く保存されており、ヌクレオチドプールを調節することで DNA ダメージを回避する重要な遺伝子である。dUTPase の活性化は、dUTP pool を低く保つことで DNA ダメージを抑え、遺伝子情報を正確に娘細胞に伝えていくことが可能になることから、遺伝子変異を最小に抑えるという点で発生段階においては生物学的に有利であると考えられる。同様な機序ががん幹細胞でも働くことで抗がん剤抵抗性を獲得している可能性が高く、dUTPase の発現抑制を誘導する beta-HIVS の投与により HuH7 の EpCAM 陽性細胞分画の減少が認められた。EpCAM 陽性細胞は 5-FU 抵抗性を示すことが知られており、本研究の成果から、dUTPase を標的にすることで、術後再発率が高く 5-FU 抵抗性を示す EpCAM 陽性肝細胞癌の治療法開発につながることを期待された。

E. 結論

肝細胞がんは EpCAM と AFP により幹細胞型と肝細胞型に分類可能であり、特に幹細胞型は若年発症、予後不良、門脈浸潤傾向などがんとして

の生物学的悪性度が高いこと、EpCAM 陽性細胞はがん幹細胞としての特徴を有し 5-FU に対する抵抗性を示すこと、そのメカニズムとして dUTPase の発現亢進が関与し、dUTPase の発現が高い肝細胞癌では予後不良を示すことが前向き研究でも明らかになった。dUTPase の発現を抑制する beta-HIVS は癌幹細胞分画を減少させる可能性が示唆され、dUTPase はがん幹細胞を標的とする治療法の開発において重要な分子の一つであると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Differentiation of Cancer Stem Cells. In Stanley Shostak (eds): "Cancer Stem Cells - The Cutting Edge" InTech pp337-350, 2011.
2. Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol Hepatol. 26(6):960-4, 2011.
3. Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, and Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 129(7):1576-85, 2011.
4. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. Clin Exp Immunol. 163(2):165-77, 2011.

2. 学会発表

1. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Nio K, Hara Y, Wang XW, and Kaneko S. Distinct liver cancer stem cells defined by EpCAM and CD90 in human hepatocellular carcinoma. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2011, San Francisco, U.S.A., 2011.
2. Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Cancer Stem Cells in Hepatocarcinogenesis. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference 2011, Jeju, Korea, 2011.
3. 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞形質の多様性、日本臨床腫瘍学会総会、

横浜、2011

4. 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞の特徴に応じたテーラーメイド医療の検討、日本肝臓学会総会、東京、2011

G.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

特になし

皮膚の間葉系幹細胞の性状解析に関する研究

研究分担者 国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部 大河内仁志

研究要旨：

脂肪由来の間葉系幹細胞をマウスに静脈注射して腫瘍組織や炎症部への遊走能を検討した所、間葉系幹細胞の明らかな腫瘍組織や炎症部への集積は認められなかったが、免疫抑制作用が認められた。また脂肪由来の間葉系幹細胞と腫瘍細胞を同時に皮下移植した場合の相互作用を検討し、腫瘍増殖は促進されることを確認したが、両者を腹腔内に投与した場合には明らかな促進作用は認められなかった。

A.研究目的

骨髄をはじめとする様々な組織に間葉系幹細胞が存在しており、筋肉や骨、軟骨などへの多分化能をもつことや免疫調節作用が報告されている。骨髄由来の間葉系幹細胞研究がすすんでいるが、近年、脂肪組織にも骨髄と同様な多分化能をもった間葉系幹細胞の存在が報告され、採取の容易さと比較的大量に採取できることから注目されるようになってきた。これまで我々もヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導することに成功している。一般的に、間葉系幹細胞は創傷部や炎症部に集積しやすいとの報告があるが、腫瘍組織への遊走に関しては集積しやすいという報告や逆に集積しないという報告もみられて、定説がない。また間葉系幹細胞が産生する種々の因子により血管新生作用も指摘されている。間葉系幹細胞を治療手段として移植に用いる際に、血管新生作用による腫瘍の増殖促進効果が危惧される。特に癌切除後の場合は腫瘍細胞の残存の可能性を常に考慮する必要がある。したがって本研究では脂肪由来の間葉系幹細胞と腫瘍組織や炎症部への遊走能や相互作用を検討することを目的とする。

B.研究方法

1 腫瘍細胞との相互作用の検討

前年度ヒト膵臓癌由来の細胞株 MiaPaCa-2 細胞 100 万個と CM-Dil で標識したヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞 100 万個を混合したものをヌードマウスの皮下に接種し、経時的に腫瘍の大きさを計測したところ、MiaPaCa-2

細胞単独の場合に比べて、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を同時に移植した群の方が腫瘍の増大が認められた。そこで今年度は別の膵臓がん細胞株 AsPC-1, PANC-1, BxPC-3 についても同様の検討を行った。さらに細胞を腹腔内に投与して同様の検討を行った。皮下投与の場合は腫瘍の大きさを経時的に測定したが、腹腔内投与の場合は1週毎に3匹ずつ犠牲死させて、肉眼的に観察できる腹腔内の結節の数を測定した。また組織標本を作製して移植細胞の分布を検討した。

2 皮膚炎症に対する免疫調整作用の検討

前年度に DNFB を感作物質として用い、Balb/C マウスの接触皮膚炎モデルを用いて脂肪組織由来の間葉系幹細胞の炎症部への遊走を検討したところ、特に炎症部への集積は認められなかったが、炎症反応自体は抑制され、何らかの免疫調整作用が認められた。今年度は免疫的に系統の異なる C57BL/6 マウスを用いて、感作物質として TNCB を使用し、惹起後に脂肪組織由来の間葉系幹細胞 50 万個ないし 100 万個を静脈注射して、同様な検討を行った。接触皮膚炎の反応の強さは、惹起後の耳の厚さの測定ならびに病理組織像で評価した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来の細胞は市販されているものあるいは手術時に同意の得られた組織から細胞を分離して用いた。マウスをもちいる動物実験は施設の動物実験委員会において動物実験計

画の審査と承認を受け、動物の愛護上の配慮をもって、実験を行った。

C. 研究結果

1 腫瘍細胞との相互作用の検討

ヒト膵臓癌由来の細胞株 AsPC-1, PANC-1, BxPC-3 についてヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞を同時にヌードマウスへ移植し、経時的に腫瘍の大きさを計測したところ、癌細胞単独の場合に比べて、間葉系幹細胞の同時投与群の方が腫瘍の増大が促進される傾向が認められた。しかし MiaPaCa-2 の場合ほど両者の差は顕著ではなかった。4週間後に組織切片を作製して、腫瘍部においてヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞の生着を検討した。細胞は腫瘍組織の中に散在して存在していたが、明らかに血管になっている所見は認められなかった。

腹腔内投与した場合に MiaPaCa-2 細胞においても単独群と間葉系幹細胞の同時投与群で明らかな結節の数や大きさに有意な差は認められなかった。肺、肝臓、脾臓、腎臓の組織標本を作製し、組織学的な検討も行ったが、明らかな転移巣は認められなかった。

2 皮膚炎症に対する免疫調整作用の検討

C57BL/6 マウスを用いて、TNCB を腹部に塗布し、6 日後に片方の耳に再塗布して炎症を惹起した。再塗布の6時間後に脂肪組織由来の間葉系幹細胞を尾静脈より、投与して経過を観察した。対照群は PBS の投与とした。

細胞投与群と対照群ともに再塗布2日目に耳の厚さは最大となったが、脂肪組織由来の間葉系幹細胞投与群では 50, 100 万個いずれの投与においても耳の腫脹は抑制された。特に細胞数による抑制の程度に有意差は認められなかった。

間葉系幹細胞の培養上清を細胞の代わりに投与する実験も行ったが、明らかに耳の腫脹を抑制する所見は得られなかった。

D. 考察

ヒト膵臓癌由来の細胞株を用いた研究では脂肪組織由来の間葉系幹細胞を同時に皮下投与すると明らかな腫瘍の増大がみられたが、細胞株によってその増殖促進作用の程度は異なることが認められた。間葉系細胞から細胞外マトリックスの産生がおこり、足場が確保された可能性と間葉系細胞からの何らかのサ

イトカインによる増殖刺激が考えられるが、前者では細胞株間の違いをうまく説明できない。移植後4週間で腫瘍組織の間葉系細胞は diffuse に分布していたが、明らかな血管内皮細胞様構造は認められなかった。我々は *in vitro* で脂肪由来の間葉系細胞を高率に血管内皮細胞に分化させることに成功しているが、今回の *in vivo* での条件では血管内皮細胞に分化するのに適した条件ではなかったと思われる。

腹腔内への投与実験では皮下投与にみられた間葉系幹細胞による増殖促進作用がはっきりと認められなかった。この理由として腹腔内は癌細胞の増殖条件がすでに整っているために、間葉系幹細胞の影響を受けにくかったのではいかと考えられた。

炎症部への間葉系幹細胞のホーミングを検討するために耳の接触性皮膚炎モデルを用いたが、脂肪組織由来の細胞を移植した場合に著明に耳の腫脹が抑制され、移植細胞による免疫反応抑制作用が示唆された。しかし予想に反して、炎症を起こしている皮膚の局所には移植細胞がほとんど検出されなかった。そこで免疫的に系統の異なる C57BL/6 マウスを用いて、同様な実験を行ったところ、やはり耳の腫脹が抑制されたものの、皮膚の局所には移植細胞がほとんど検出されなかった。これらの結果から、脂肪組織由来の間葉系幹細胞に免疫反応を抑制する能力があることが示唆されたが、局所における直接作用というよりは液性因子を介した間接的な作用である可能性が示唆された。

E. 結論

脂肪組織由来の間葉系細胞は膵臓がん由来の細胞に対して皮下に同時投与した場合には腫瘍増殖を促進する作用が認められた。脂肪組織由来の間葉系細胞に抗炎症作用を認めたが、局所における直接作用は証明できなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Konno M, Masui S, Hamazaki TS, Okochi H. Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain. J Biotechnol. 154(4):298-303, 2011

2.学会発表

Makoto Tokuhara, Yukio Saito, Toshio Shimizu, Satsuki Fukuda, Chikako Ishiguro, Masamitsu Konno, Tatsuo S. Hamazaki, Hitoshi Okochi

Do adipose tissue-derived stem cells (ASCs) promote tumor growth?

IFAT Miami 11月2011

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1.特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

厚生労働科学研究費補助金（平成 23 年度 第 3 次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

がん幹細胞のエピゲノムプロファイリング

研究分担者 畑田 出穂 群馬大学 教授

研究要旨：

miR-200 ファミリーなどのエピゲノムの変化は癌幹細胞の形成に重要な役割をなす。我々はこのエピゲノムの形成に重要な働きをしていると考えられる microRNA をみいだした。この microRNA は DNA メチル化の制御をおこなう。

A. 研究目的

iPS 細胞の研究からもわかるようにがん幹細胞の特徴はエピゲノムにより裏打ちされている。この研究では独自のエピゲノムプロファイリング法を用いてがん幹細胞のエピゲノムの特徴を探る。

B. 研究方法

自ら開発した網羅的メチル化解析法 (MIAMI 法) と MBD1DIP 法を用いて乳癌幹細胞のエピゲノムを調べる。

(倫理面への配慮)

必要な場合は群馬大学ゲノム倫理委員会の規定に従っておこなう。

本研究における倫理面への配慮については、本研究においてはヒトサンプルを用いず、動物実験は国立がんセンター研究所の倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

乳癌幹細胞では miR-200a, miR-200b, miR-200c など miR-200 ファミリー遺伝子がいずれもメチル化され発現が減少している。このようなエピゲノムの変化は DNA メチル化を制御する遺伝子群によって制御されていると考えられる。我々は乳癌幹細胞で発現変化している microRNA の 1 つが、これらの遺伝子をターゲットとして抑制していることをみいだした。

D. 考察

これまで癌においてメチル化の変化においてメチル化を制御する遺伝子が関与しているらしいことはわかっていた。しかしながら、これらの遺伝子がなぜ発現変化するかはわかっていなかった。今回、我々がこれらの遺伝子を抑制する microRNA をみつけたことで、癌のエピゲノムについての理解が深まると考えられる。

E. 結論

癌幹細胞のエピゲノムを形作る、メチル化制御遺伝子を抑制する microRNA を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

Horii T et al. J Reprod Dev.57: 579-585, 2011.

2. 学会発表

堀居他 第 34 回日本分子生物学会
年会 2012 年 12 月 13~16 日 横浜

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

がん幹細胞モデルの構築とそれを用いての薬剤スクリーニング

研究分担者 大岡 静衣 国立がん研究センター研究所 研究員

研究要旨：

発がん過程で重要な役割を担うことおよび幹細胞の機能維持にも関わることが知られているテロメラーゼの作用機序を解明することで、がん幹細胞を標的とした診断治療法の開発が期待されている。がん幹細胞機能維持に必須の複合体を同定し、がん幹細胞モデルを確立した（人工がん幹細胞モデル）。作成した人工がん幹細胞モデルは、顕著な造腫瘍能の亢進とがん幹細胞マーカーである、CD133、CD44、の発現量が増加し、有意な転移能および ES 細胞用の遺伝子発現プロファイルを有すること、および放射線感受性の低下を認めたことより、人工がん幹細胞モデルはがん幹細胞としての特徴を有することが確認された。今年度は、薬剤スクリーニングのための実験系を確立した。また、がん幹細胞維持に重要な分子群が、有糸分裂期に複合体を形成し、正常な細胞分裂進行に寄与することを明らかにし、有糸分裂期をターゲットとする薬剤ががん幹細胞を機能的に阻害する可能性を示した。

A. 研究目的

人工がん幹細胞モデルは、がん幹細胞を標的とした治療薬のスクリーニングには必須の tool である。昨年度までに、テロメラーゼ触媒活性領域である TERT が幹細胞因子である Nucleostemin (NS) およびクロマチンリモデリング因子である BRG1 と複合体を形成しがん幹細胞の機能維持に関わることを見出していた。また、これらの因子を過剰発現して作製した人工細胞は、造腫瘍能の亢進を示すこと、転移能の亢進および ES 細胞様の遺伝子発現様式、および抗がん剤や放射線への抵抗性を確認し、人工がん幹細胞モデルはがん幹細胞としての特徴を有することが確認されていた。今年度は、

がん幹細胞を標的とした薬剤スクリーニングを行うための人工がん幹細胞を用いたスクリーニング系を確立すること、および、がん幹細胞機能維持機構を解明し、がん幹細胞を機能的にターゲットとする薬剤の選抜に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

すでに確立されたがん細胞株（HeLa 細胞や MCF 細胞）、あるいは正常細胞から人為的遺伝子導入により作製したがん細胞に対して、レトロウイルスを用いて TERT-NS-BRG1 複合体を導入することで作製した人工がん幹細胞モデルを、3D 培養し、薬剤抵抗性を検討した。免疫細胞染色では、HeLa 細胞または MCF7 細胞

を固定後、抗 NS、hTERT、BRG1 抗体、蛍光標識二次抗体で染色し、共焦点レーザースキャン顕微鏡で観察した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組換え実験は、国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の機関承認を得て行った。

C. 研究結果

人工がん幹細胞モデルの 3D 培養を行うことにより、がん幹細胞モデルの方ががん細胞よりも、既存抗がん剤に対する薬剤抵抗性が高い傾向が見られた。がん幹細胞維持に重要な分子群が、有糸分裂期に複合体を形成し、正常な細胞分裂進行に寄与することを明らかにした。

D. 考察

がん幹細胞は薬剤抵抗性が高いことが知られているが、3D 培養を行うことで人工がん幹細胞モデルも薬剤抵抗性が高まり、人工がん幹細胞モデル 3D 培養系はがん幹細胞としての特徴を有することが確認された。人工がん幹細胞モデル 3D 培養系は薬剤抵抗性のアッセイに用いることができ、がん幹細胞選択的抗がん剤スクリーニング系を確立することができた。がん幹細胞維持に重要な分子群が有糸分裂期に重要な働きをすることから、有糸分裂期をターゲットとする薬剤ががん幹細胞を機能的に阻害する可能性を示した。人工がん幹細胞モデ

ルを用いたスクリーニング系で、有糸分裂期に作用する薬剤を中心に検索することで、よりがん幹細胞選択的かつ効果の高い薬剤を迅速に発見できることが期待される。

E. 結論

人工がん幹細胞モデル3D培養系を用いた薬剤抵抗性のアッセイ系を確立した。このアッセイ系は、がん幹細胞選択的な抗がん剤のスクリーニングに用いることができる。がん幹細胞維持に重要な分子群が有糸分裂期に重要な働きをすることから、有糸分裂期をターゲットとする薬剤ががん幹細胞を機能的に阻害する可能性が高い。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大岡静衣、岡本奈緒子、木下圭太、安川麻実、増富健吉 Tumor initiating cell maintenance and heterochromatin establishment during mitotic phase. 第34回分子生物学会年会 2011年12月13日～16日 神奈川

大岡静衣 がん幹細胞機能維持に関わる分子群のイメージング解析 第4回 NanoBio 若手ソーシャルネットワークワーキングシンポジウム 2011年6月3日～4日 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yamashita T. et al	Differentiation of Cancer Stem Cells	Stanley Shostak	Cancer Stem Cells - The Cutting Edge	InTech	Croatia	2011	337-350

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawamata M, Ochiya T.	Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis.	<i>Cell Mol Life Sci</i>	68	1911-1915	2011
Kawamata M, Ochiya T.	Establishment of embryonic stem cells and generation of genetically modified rats. In: Craig A (ed), Methodological Advances in the Culture.	<i>Croatia, InTech</i>		383-396	2011
Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K.	The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families.	<i>PLoS One</i>	6	e16081	2011
Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T.	MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression.	<i>Mol Ther</i>	19	1123-1130	2011
Takahashi RU, Takeshita F, Fujiwara T, Ono M, Ochiya T.	Cancer stem cells in breast cancer.	<i>Cancers</i>	3	1311-1328	2011
Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Matsunaga J, Takahashi RU, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H.	miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence.	<i>J Cell Biol</i>	193	409-424	2011

Yamamoto Y, Yoshioka Y, Minoura K, Takahashi RU, Takeshita F, Taya T, Horii R, Fukuoka Y, Kato T, Kosaka N, Ochiya T.	An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells.	<i>Mol Cancer</i>	10	135	2011
Nishimura J et.al	Potential use of Fibrin-based Collagen for local delivery of antibiotics.	<i>Surg Today.</i>	in press	in press	in press
Kobayashi S et.al	Fibrin sealant with PGA felt for prevention of bile leakage after liver resection.	<i>Hepato gastroenterology</i>	in press	in press	in press
Nagano H et.al	Combined IFN- α and 5-FU treatment as a postoperative-adjuvant following surgery for hepatocellular carcinoma with portal venous tumor thrombus.	<i>Experimental and Therapeutic Medicine.</i>	in press	in press	in press
Eguchi H et.al	A Thick Pancreas Is a Risk Factor for Pancreatic Fistula after a Distal Pancreatectomy: Selection of the Closure Technique according to the Thickness.	<i>Dig Surg.</i>	28(1)	50-56	2011
Tomimaru Y et.al	Advantage of autologous blood transfusion in surgery for hepatocellular carcinoma.	<i>World Gastroenterol. J</i>	17(32)	3663-3760	2011
Akita H et.al	Mural Nodule in Branch Duct Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas is a Marker of Malignant Transformation and Indication for Surgery.	<i>Am J Surgery.</i>	202(2)	214-219	2011
Miyata H et.al	Multimodal treatment for resectable esophageal cancer.	<i>Gen Thorac Cardiovasc Surg.</i>	59(7)	461-466	2011

榎本 豊	Em/miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies.	<i>Leukemia</i>	25	1849-1856.	2011
加藤 菜穂子	Two types of C/EBPα mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models.	<i>Blood</i>	117	221-233.	2011
K. Okamoto, T. Ishiguro, Y. Midorikawa, H. Ohata, M. Izumiya, N. Tsuchiya, A. Sato, H. Sakai, H. Nakagama	miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver.	<i>EMBO J.</i>	28;31(7)	1752-63	2012
T. Ishiguro, A. Sato, H. Ohata, H. Sakai, H. Nakagama, K. Okamoto	Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	418	199-204	2012
M. Izumiya, N. Tsuchiya, K. Okamoto, H. Nakagama	Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays.	<i>Cancer Sci.</i>	102	1615-1621	2011
N. Tsuchiya, M. Izumiya, H. Ogata-Kawata, K. Okamoto, Y. Fujiwara, M. Nakai, A. Okabe, A.J. Schetter, E.D. Bowman, Y. Midorikawa, Y. Sugiyama, H. Aburatani, C.C. Harris, H. Nakagama	Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21.	<i>Cancer Res.</i>	71	4628-4639	2011
*Yokoyama A, Ficara F, Murphy M, Meisel C, Naresh A, Kitabayashi I, *Cleary ML	Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways.	<i>Journal of Cell Science</i>	124 (13)	2208-2219	2011

*Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, *Cleary ML	A higher-order complex containing AF4- and ENL-family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription.	<i>Cancer Cell</i>	17	198-212	2010
Yamashita T. et al	Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection.	<i>J Gastroenterol Hepatol.</i>	26	960-4	2011
Sunagozaka H. et al	Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma.	<i>Int J Cancer.</i>	129	1576-85	2011
Nakamoto Y. et al	Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization.	<i>Clin Exp Immunol.</i>	163	165-77	2011
Konno M, Masui S, Hamazaki T S, Okochi H.	Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain	<i>J Biotechnol</i>	154	298-303	2011
•Horii T, Suetake I, Yanagisawa E, Morita S, Kimura M, Nagao Y, Imai H, Tajima S, Hatada I.	The Dnmt3b Splice Variant is Specifically Expressed in In Vitro-manipulated Blastocysts and Their Derivative ES Cells.	<i>J Reprod Dev.</i>	57	579-585	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis

Masaki Kawamata · Takahiro Ochiya

Received: 1 January 2011/Revised: 3 March 2011/Accepted: 10 March 2011/Published online: 25 March 2011
© Springer Basel AG 2011

Abstract Embryonic stem cells (ESCs) are derived from blastocysts and are capable of differentiating into whole tissues and organs. Transplantation of ESCs into recipient blastocysts leads to the generation of germline-competent chimeras in mice. Transgenic, knockin, and knockout gene manipulations are available in mouse ESCs, enabling the production of genetically modified animals. Rats have important advantages over mice as an experimental system for physiological and pharmacological investigations. However, in contrast to mouse ESCs, rat ESCs were not established until 2008 because of the difficulty of maintaining pluripotency. Although the use of signaling inhibitors has allowed the generation of rat ESCs, the production of genetically modified rats has been difficult due to problems in rat ESCs after gene introduction. In this review, we will focus on some well-documented examples of gene manipulation in rat ESCs.

Keywords ES cell · Rat · Transgenic · Pluripotency · Chimera

Introduction

Embryonic stem cells (ESCs) established from the inner cell mass (ICM) of preimplantation blastocysts [1] have been routinely derived from mice since 1981 [2, 3]. These cells have a stable developmental potential to form derivatives of all three embryonic germ layers, the endoderm,

mesoderm, and ectoderm, even after prolonged culture [4] and have been used to study the mechanism of cell differentiation. Moreover, they are capable of generating germline chimeras following injection into the blastocyst [5]. Gene manipulation is available, and germline transmission of transgenic ESCs was achieved in 1986 [6]. Soon after this achievement was reported, gene-targeting mice were generated via homologous recombination in ESCs [7]. So far, a huge number of genetically modified mice have been produced via the manipulation of ESCs and used in a range of biomedical researches. However, this technique is unavailable in species other than mice because of a lack of stable ESCs.

The laboratory rat, the first mammalian species domesticated for scientific research, has been used as an animal model for research in physiology, toxicology, nutrition, behavior, immunology, and neoplasia for over 150 years [8–12]. Despite the utility to use rats in experiments, rat ESCs were not established until 2008. The reasons for the failure to develop ESCs in rats are related to the difficulty in maintaining pluripotency in culture despite trials using numerous strategies [13–17]. Our group generated rat ESCs harboring a potential to contribute to chimera but not to develop germ cells [18]. On the other hand, despite the lack of authentic ESCs, several technologies have been developed to alter rats genetically [19–26].

Rat transgenesis from ESCs with 2i+LIF medium

In 2008, germline-competent rat ESCs were first established from blastocysts by using a 2i+LIF medium composed of two signaling inhibitors (MEK inhibitor PD0325901; GSK3 inhibitor CHIR99021), a leukemia inhibitory factor (LIF), and a defined basal culture medium

M. Kawamata · T. Ochiya (✉)
Division of Molecular and Cellular Medicine,
National Cancer Center Research Institute, 1-1,
Tsukiji, 5-chome, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan
e-mail: tochiya@ncc.go.jp

containing no fetal bovine serum (FBS) (Fig. 1) [27, 28]. The results of the two studies showed that FBS was a key factor in the induction of differentiation in rat ESCs [29]. This culture medium was also used for the generation of mouse ESCs [30]. Generally, mouse ESCs are cultured on feeder layers of mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Further, it was found that the use of DIA-M cells [27] or a mixture of MEFs and L-cells as feeder layers [28] was optimal for isolating rat ESCs. In these conditions, although ESCs maintained pluripotency and contributed to chimeras, only two of nine cell lines achieved germline transmission. Rat-induced pluripotent stem cells (iPSCs) with the potential to contribute to chimeras were also generated by the addition of A-83-01 (Type 1 Tgf β receptor inhibitor) to 2i+LIF in a mouse ESC basal culture medium containing 20% knockout serum replacement (KSR). However, these iPSCs did not achieve germline transmission [31].

Gene introduction was available in the rat ESCs cultured in 2i+LIF medium. However, they were sensitive to electro-physical stimulation induced by the conventional electroporation method, which led to cell death. A nucleofection method was found to be more efficient and convenient for gene introduction in rat ESCs [28]. Furthermore, FBS was temporally added into an electroporation medium as well as a 2i+LIF cell-culture medium to aid viability [27]. Each group obtained stable transfectant clones in which the CAG-eGFP-IRES-pac plasmid was randomly integrated in their genome after selection with puromycin [27, 28]. Although five overt coat color chimeras were born after injection of the clone, they either died perinatally or were euthanized due to jaw abnormalities. The reasons for their abnormalities might have been chromosomal instability in the transfectant ESC line [27]. On the other hand, Hirabayashi et al. [32] succeeded in the germline transmission of a transfectant rat ESC line

harboring a humanized Kusabira-Orange (huKO) gene using the 2i+LIF culture medium. A CAG/huKO-neo plasmid was introduced into ESCs by electroporation, and then stable clones were obtained by neomycin selection. In the 2i+LIF medium, 1,000 U/ml of rat LIF [33] was substituted for the human LIF used in the previous works (100 U/ml [27]; 10 U/ml [28]). It is possible that the rat LIF is better for the maintenance of rat ESCs [34]. Kobayashi et al. [35] overcame the difficulty to generate interspecific chimeras between rats and mice using rat ES or iPSCs cultured in a 2i+rat LIF medium. Thus, using rat LIF might be an option to keep rat ESCs stable.

Rat transgenesis from ESCs with YPAC medium

Our group developed a new culture medium (YPAC medium) including the additional signaling inhibitors of Rho-associated kinase (Y-27632) and A-83-01 to the 2i [36]. The four inhibitors, Y-27632, PD0325901, A-83-01, and CHIR99021, are collectively referred to as YPAC. A mouse ESC basal culture medium containing FBS (20% vol/vol) and MEFs was used, but LIF was not necessary in our study (Fig. 1). In the culture condition, the majority of cell lines (six out of six) demonstrated chimerism and germline transmission and could be stably transfected with a reporter transgene to produce genetically modified rats. These three cell lines were derived from each of the following strains: Wistar, LEA (Long Evans Agouti), and hybrid Wistar/LEA [36].

Since the medium contained 20% serum, the ESCs were tolerant to the damage induced by electric stimuli during gene introduction. In our procedure, a transgene in which the Venus gene was transcribed by the *Oct4*-promoter (*Oct4*-Venus) was introduced in the ESCs by the nucleofection method. When the manipulated cells were plated,

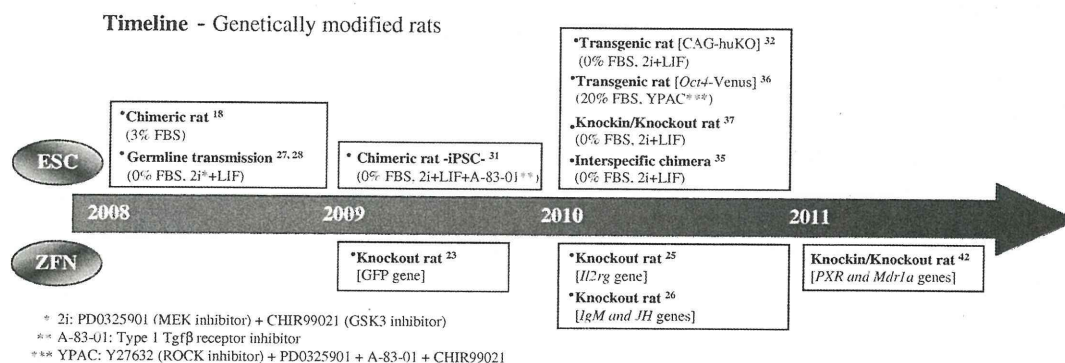


Fig. 1 Timeline of rat transgenesis using ESC or ZFN technology since 2008. The *parentheses* indicate the culture conditions. The *brackets* indicate transgenes or targeted genes

the use of matrigel (2% at final concentration) was effective for selecting stable clones because they are retained to adhere on MEFs [36]. It is generally known that rat ESC colonies tend to detach from MEFs [27, 28, 36]. This phenomenon enhances the ESCs' attachment to each other, leading to clone contamination. As the transgene did not include a selection cassette, Venus-positive clones were picked and expanded without drugs. In this cloning process, we found an advantage of using ESCs for the generation of transgenic rats because we were able to choose high-quality clones mimicking an endogenous *Oct4* expression pattern. While the majority of the clones exhibited a heterogeneous expression pattern in undifferentiated cells, only a few clones maintained homogenous expression after long-term culture (Fig. 2a). This homogeneity corresponds to the expression pattern of endogenous OCT4 protein. *Oct4*-Venus transgenic rats were generated through germline transmission of the selected clones without any adverse effects of gene introduction on chimera contribution (Fig. 2b). The Venus fluorescence was also detected in germ cells of the transgenic fetal gonads (Fig. 2c). Moreover, we could trace the fluorescence only in undifferentiated ESCs from their blastocysts during the establishment process and long-term culture (Fig. 2d) [36].

Gene targeting rats from ESCs

Tong et al. [37] achieved for the first time the production of knockout rats via homologous recombination in rat ESCs. A targeting vector was constructed to disrupt the tumor suppressor gene *p53* (also known as *Tp53*). Targeting efficiencies in two ESC lines derived from the DA (Dark Agouti) strain were 1.12–3.70%. Many properly targeted cell lines cultured in the 2i+LIF medium developed chromosome abnormalities. Over 65% of the cells were polyploid. This phenomenon is similar to that reported in previous works [27, 28]. However, after subcloning round and compact colonies, two out of 20 clones had euploid chromosome numbers leading to the production of a viable knockout [34]. This achievement is historic because the *p53* knockout rat validates the culminated effort of many to enable targeted genetic engineering in rat ESCs. Another group also succeeded in gene targeting in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*hprt*) locus by homologous recombination in rat ESCs [38]. Although these *hprt* heterozygous clones cultured in the 2i+LIF medium maintained pluripotency, aneuploid cells did emerge in the cultures. However, approximately 2% of geneticine-resistant colonies achieved recombination correctly. The efficiency was similar to that originally reported for mouse

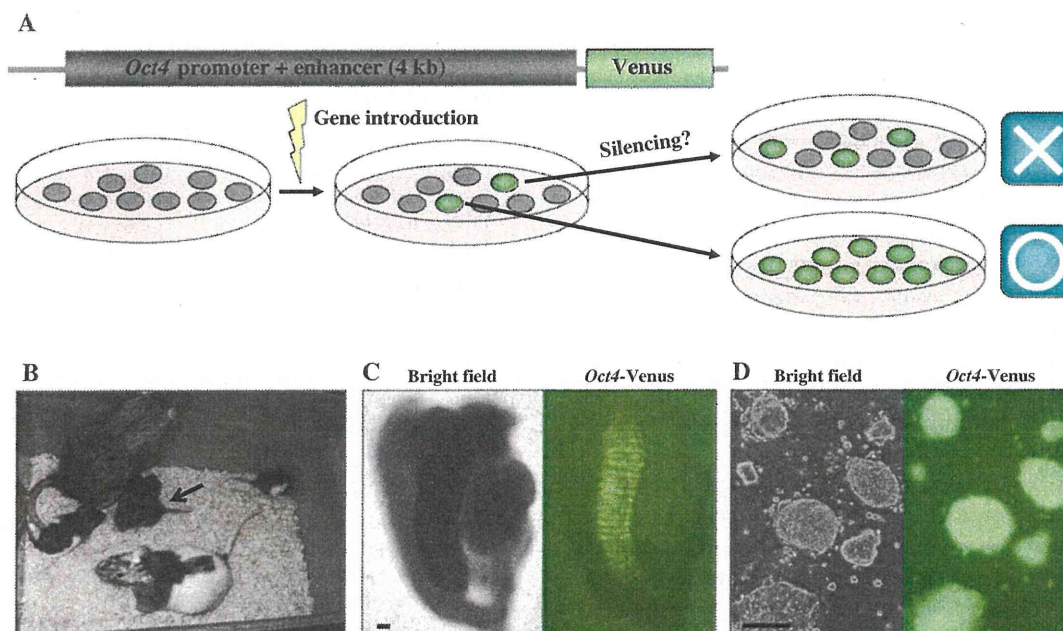


Fig. 2 Transgenesis in rat ESCs. **a** *Oct4*-Venus transgene is introduced in rat ESCs by a nucleofection method. Some clones receive random integration of the transgene, with subsequent green fluorescence. After subcloning and passaging, Venus fluorescence was decreased in a majority of the clones (*upper*), while a minority of the clones expressed the fluorescence homogeneously. **b** The *Oct4*-Venus

transgenic rat (*arrow*) was produced through germline transmission of the recombinant ESCs from a chimeric rat. **c** *Oct4*-Venus positive-germ cells in E16.0 gonad of the transgenic rats. **d** An ESC line derived from the *Oct4*-Venus transgenic rat. Venus fluorescence was kept in undifferentiated cells after 18 passages. All scale bars, 100 μ m

and human ESCs [39–41]. Thus, these reports suggest that rat ESCs are readily amenable to gene targeting by homologous recombination using the basic methodology that has proved so effective in mouse ESCs.

Discussion

Rat transgenesis via gene manipulation in ESCs was demonstrated in 2010, marking the beginning of a new era in rat genetics. Although some problems remain in the rat ESC handling, a combination of the methods described in this manuscript as well as newly devised techniques will lead to the discovery of a gold standard method to routinely generate genetically modified rats from ESCs. Recently, not only knockout but also knockin rats have been generated using ZFN-mediated homologous recombination [42]. This knockin strategy will make it possible to introduce temporal control and tissue-specific changes in genes in rat models by combining *Cre/loxP* and an inducible gene expression system. ZFN technology also possesses several advantages, such that the time frame to obtain mutant animals is short, ZFN-mediated homologous recombination in embryos does not require a selection marker, and time-consuming backcrossing is avoided [42]. However, this technology remains expensive to purchase, which is an obstacle for most researchers. In contrast, researchers can apply gene targeting by using ESCs, as is routinely done in mouse research. Therefore, ESC is also required to expand knockout rat lines. There is another advantage of using ESCs when generating transgenic rats. Useless transgenic animals are frequently generated with the conventional method. However, as described in this manuscript, we can choose ESC clones in which a transgene is correctly expressed, leading to the generation of high-quality transgenic rats [36]. Moreover, we can analyze gene function in chimeric animals by using ESCs. Recent reports have shown that this chimeric strategy is effective in identifying gene functions in vivo in terms of developing a more clinically relevant stochastic model [43]. Thus, we speculate that using both the ESC and ZFN strategies will be necessary for routine rat transgenesis.

We now have an opportunity to find new gene functions that have been concealed or questioned in mutant mice. We have accumulated genetic information and a vast amount of research data on physiology and pharmacology in rats. Thus, a combination of these studies will lead to the discovery of new and profound mechanisms of human diseases and the manufacture of medicines to cure patients. Furthermore, rats with their larger sizes make it possible to extract sufficient quantities of samples, such as blood, without killing the animals and to perform difficult surgeries, such as those in brain tissue; all of this emphasizes

the advantages of gene-modified rats. We hope that researchers will create many genetically modified rats and open up a powerful new platform for the study of human diseases.

Acknowledgments This work is supported by a Grant-in-Aid from the Third-Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control.

References

1. Brook FA, Gardner RL (1997) The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5709–5712
2. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156
3. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7634–7638
4. Thomson JA, Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 38:133–165
5. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255–256
6. Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 323:445–448
7. Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, Hageman JR, Huang S, Williams PJ, First NL, Maeda N, Smithies O (1989) Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8927–8931
8. Gill TJ 3rd, Smith GJ, Wissler RW, Kunz HW (1989) The rat as an experimental animal. *Science* 245:269–276
9. Jacob HJ (1999) Functional genomics and rat models. *Genome Res* 9:1013–1016
10. Jacob HJ, Kwitek AE (2002) Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 3:33–42
11. Aitman TJ, Critser JK, Cuppen E, Dominiczak A, Fernandez-Suarez XM, Flint J, Gauguier D, Geurts AM, Gould M, Harris PC, Holmdahl R, Hubner N, Izsvák Z, Jacob HJ, Kuramoto T, Kwitek AE, Marrone A, Mashimo T, Moreno C, Mullins J, Mullins L, Olsson T, Pravenec M, Riley L, Saar K, Serikawa T, Shull JD, Szpirer C, Twigger SN, Voigt B, Worley K (2008) Progress and prospects in rat genetics: a community view. *Nat Genet* 40:516–522
12. Jacob HJ, Lazar J, Dwinell MR, Moreno C, Geurts AM (2010) Gene targeting in the rat: advances and opportunities. *Trends Genet* 26:510–518
13. Brenin D, Look J, Bader M, Hübner N, Levan G, Iannaccone P (1997) Rat embryonic stem cells: a progress report. *Transplant Proc* 29:1761–1765
14. Buehr M, Nichols J, Stenhouse F, Mountford P, Greenhalgh CJ, Kantachavesiri S, Brooker G, Mullins J, Smith AG (2003) Rapid loss of Oct-4 and pluripotency in cultured rodent blastocysts and derivative cell lines. *Biol Reprod* 68:222–229
15. Demers SP, Yoo JG, Lian L, Therrien J, Smith LC (2007) Rat embryonic stem-like (ES-like) cells can contribute to extraembryonic tissues in vivo. *Cloning Stem Cells* 9:512–522
16. Fändrich F, Dresske B, Bader M, Schulze M (2002) Embryonic stem cells share immune-privileged features relevant for tolerance induction. *J Mol Med* 80:343–350
17. Vassilieva S, Guan K, Pich U, Wobus AM (2000) Establishment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell