

Annual Review 循環器 2012

2012年1月25日発行

中外医学社

3. 患者特異的 iPS 細胞による疾患メカニズムの解明

慶應義塾大学医学部循環器内科・総合医科学研究センター講師 湯浅慎介

key words iPS cell, cardiomyocyte, long QT syndrome, hypertrophic cardiomyopathy, personalized medicine, human peripheral blood derived iPS cells

動 向

2006年に人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS cell) の樹立が初めて報告された¹⁾。最初の報告はマウスを用いたものであり、ヒトiPS細胞ができるようになるまではもう少し時間がかかるのではないかと考えられていた。しかしながら翌2007年にはヒトiPS細胞の樹立が報告され²⁾、間もなく世界中で爆発的にiPS細胞研究が進み始めた。当初の世界的な研究の流れは、基礎的なiPS細胞の解析や新規樹立方法の開発に重点が置かれていた³⁾。iPS細胞の臨床応用として最も期待されているものは、再生医療への応用である。様々な疾患によって臓器障害に陥った際には、各臓器で機能細胞が減ってくる事が知られている。そのような傷害された臓器に対してiPS細胞由来の元気な分化細胞を移植することにより再生医療を開発しようと試みられている。現在のヒトiPS細胞を用いた再生医療開発の取り組みとしては、長期的な安全性の検証と効果的な細胞移植医療の開発が活発に試みられている。

一方で、遺伝性疾患の病態解明と新規治療方法の開発に向けた疾患モデル作製としてのiPS細胞研究が行われ始めている。すなわち遺伝性疾患の

患者さんより皮膚生検を行うことにより得られた皮膚組織より線維芽細胞の樹立を行い、遺伝子導入を行うことでiPS細胞樹立を行う。このようにして樹立されたiPS細胞は患者さんのゲノムにコードされた全ての遺伝情報を受け継いでいるために、遺伝性疾患の原因遺伝子も受け継いでいる。例えば心筋症などの患者さんからiPS細胞を樹立し心筋細胞を分化誘導することにより、病気のヒト心筋細胞がin vitroで容易に作れるようになる。この病気のヒト心筋細胞を解析することにより、未解決だった病気の原因解明や、同細胞を用いたドラッグスクリーニングなどで新規治療方法の開発ができるのではないかと考えられる。

A. ヒト末梢血よりiPS細胞樹立方法の確立

このように様々な可能性を有するiPS細胞であるが、実際に臨床応用を念頭に研究を始めると、問題点が幾つか残されていることに気づく。その一つはiPS細胞を樹立する上で皮膚生検から線維芽細胞を樹立する必要があることである。皮膚生検は、消毒、麻酔、生検、縫糸、感染予防、抜糸が順次行われていく。皮膚生検といえども手術に

準じたものであり、患者さんの痛み、僅かながらのリスクそして傷跡の問題がある。特に子供や女性では痛みや傷跡の問題は避けなければならないものである。iPS細胞を臨床応用するためには侵襲性の低い患者献体からiPS細胞を樹立する方法を開発する必要があると考えた。末梢血は日常的に血液検査で得ることが可能であり、最も侵襲性が少なく患者献体を得る方法の一つである。様々な検討の結果、ヒト末梢血中に存在する最終分化Tリンパ球からiPS細胞が効率的に樹立しうることを見出した。特に我々は、センダイウイルスという遺伝子の運び屋と末梢血から得られる活性化T細胞を組み合わせる用いることにより、ごく少量の血液サンプルからも、ゲノムに外来遺伝子が挿入されずにヒトiPS細胞が効率的に樹立可能であることを見出した⁴⁾。非侵襲的な簡便・迅速・高効率なiPS細胞樹立方法を開発することにより、臨床応用を強く推進できると考えている。

B. 循環器疾患特異的iPS細胞の開発

前述したように患者由来iPS細胞は患者のゲノムにコードされた全遺伝情報を有しているために、現在治療法がない遺伝性疾患などの病態解明と新規治療方法の開発という観点から、循環器領域においても疾患iPS細胞研究が進んでいる。さらに、現在は同モデルを用いた薬剤スクリーニング系の開発と新規薬剤候補が提示されてきており、実臨床に役立つ研究に近づいてきていることが実感される。本稿では、最近一流紙に相次いで報告された遺伝性QT延長症候群にまつわる3報と肥大型心筋症の表現形を伴うLEOPARD症候群に関する解析について概説する。

C. 遺伝性QT延長症候群特異的iPS細胞

遺伝性QT延長症候群に関しては、昨年10

月から本年の3月にかけて一流紙に相次いで報告された。それらはQT延長症候群のtype1, 2, 8に関して、それぞれiPS細胞の作製とiPS細胞由来心筋細胞の機能解析を行っている。遺伝性QT延長症候群の多くは、単一遺伝子変異による疾患であり細胞膜にあるイオンチャネルの異常により生じる。QT延長症候群は心臓突然死の多くの原因、特に若年突然死の多くの原因になっているといわれているが、根本的な治療方法はないのが現状である。現実には、ある程度の効果が期待される薬物療法と植込み型除細動器を組み合わせるようになる。QT延長症候群の詳細な分子生物学的・電気生理学的な解析と根治薬の開発を目指して、QT延長症候群モデルの作製と薬剤スクリーニングが活発に成されている。

最初の報告はドイツのグループからのものである⁵⁾。カリウムチャネル遺伝子変異(KCNQ1 R190Q)を認める8歳の少年からLQT type1特異的iPS細胞を樹立している。同iPS細胞から心筋細胞を分化誘導し、電気的な活動を記録するとカリウム電流の著明な低下が観察され、イソプロテレノールを用いると活動電位持続時間が延長した。また、臨床的にLQT type1の治療目的で用いられる薬剤であるβブロッカーの投与で不整脈の出現が抑制されている。本報告における遺伝子変異の機能解析などは過去に報告されているものであり、臨床象を含めて患者由来iPS細胞で再現されたという報告である。新規性は低いようにも思えるかもしれないが、世界で初めてのQT延長症候群由来iPS細胞の機能解析である。

続いては、イスラエルのグループからのものである⁶⁾。前述とは別のカリウムチャネルの遺伝子変異(KCNH2 A614V)を認める28歳の女性からLQT type2特異的iPS細胞を樹立している。本変異に関しても、過去の報告でカリウムチャネルの異常によりカリウム電流の低下をきたすことがわかっている。iPS細胞由来心筋細胞から電氣的

な活動を記録するとカリウム電流の著明な低下が観察され、心電図上のQT延長に相当する電気的な変化も認められた。続いて活動電位持続時間の短縮や不整脈の出現を抑制できる薬剤スクリーニングを行った。カルシウムの細胞内流入が活動電位持続時間や不整脈の出現に関与していることからカルシウムチャネル阻害薬であるニフェジピンを投与したところ、iPS細胞由来心筋細胞において治療効果が確認された。またカリウムチャネル開口薬であるピナシジルを投与したところ、同様にiPS細胞由来心筋細胞において治療効果が確認された。本報告はLQT type2患者からiPS細胞を樹立し、疾患モデルを作製し薬剤スクリーニングが可能であることを示唆した報告である。

次の報告は、アメリカのグループからのものである⁷⁾。本研究においては、カルシウムチャネル遺伝子変異(CACNA1C G406R)を認める2症例からTimothy症候群(LQT type8)特異的iPS細胞を樹立している。本変異は電位依存性のカルシウムチャネルの不活性化障害をきたすことが知られているが、どのようにQT延長症候群や不整脈をきたすかなどは不明であった。iPS細胞由来心筋細胞から電気的な活動記録をすると、不規則な心筋細胞収縮、過剰なカルシウムの細胞内流入、活動電位持続時間の延長などが確認された。またロスコピチンという薬剤がカルシウムチャネルの電位依存性不活性化を増強させることが知られており、ロスコピチンをiPS細胞由来心筋細胞に添加したところ不規則な心筋細胞収縮、過剰なカルシウムの細胞内流入、活動電位持続時間の延長などが改善されることが確認された。同薬剤を、そのまま患者に用いることは難しいと考えられるが、似た作用を有する薬剤の開発などが有益であることが示唆された。

D. 心筋症特異的iPS細胞の作製と解析

LEOPARD症候群は常染色体優性遺伝とされているが、孤発例が多い稀な疾患である。LEOPARD症候群という名前の由来は、その疾患の特徴である全身の黒子(ほくろ)が豹(レパード)に似ていることより命名された症候群である。黒子は生下時から多発し思春期までに次第に増加し、全身皮膚に生じる。本症候群は多発性黒子、心伝導障害、眼間開離、肺動脈狭窄、外陰部異常、精神遅滞、感音性難聴などを特徴とし、このうち心病変が最も生命予後に影響を与えるといわれている。また、LEOPARD症候群の90%程度に原因遺伝子とされるPTPN11遺伝子異常が認められる。PTPN11遺伝子はSHP2という脱リン酸化酵素をコードしている。増殖因子やサイトカインは、細胞膜上の受容体に結合することにより、細胞に情報を伝達して恒常性を維持している。SHP2は様々な増殖因子やサイトカインの細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っており、Ras-MAPキナーゼ経路を正に制御している。すなわちPTPN11遺伝子の異常というのはSHP2という脱リン酸化酵素の機能異常を引き起こし、その結果として増殖因子やサイトカインなどの間違った情報が細胞内に伝わり、細胞の増殖、生存や分化などの様々な生命現象に異常をきたし、その結果として病気を発症する。

本研究における患者においてもPTPN11遺伝子異常を認めている典型的LEOPARD症候群である⁸⁾。LEOPARD症候群の80%は肥大型心筋症を呈することが知られており、最も生命を脅かす病態である。このことよりLEOPARD症候群で、なぜ肥大型心筋症を呈するかを解明すること、そして肥大型心筋症の発症を止める治療方法を研究・開発することが最も必要なことであることがわかる。そのためには、まずLEOPARD症候群iPS細胞由来心筋細胞が、試験管内で肥大するかどうか

を検証する必要がある。LEOPARD症候群iPS細胞由来心筋細胞を健常人と比較した結果、LEOPARD症候群において肥大していくことが判明した。LEOPARD症候群においては脱リン酸化酵素であるSH2P2に異常をきたしている。どのタンパクにおいてリン酸化の程度が変化しているかを、リン酸化プロテオミックマイクロアレイにより網羅的検索を行った。同解析は600種類の抗リン酸化タンパク抗体などを用いてリン酸化の影響を検討することができる手法である。LEOPARD症候群と健常人を比較検討することにより、様々なタンパク量（リン酸化タンパクではなく、一つのタンパク全体の量）そのものが、LEOPARD症候群において増えているものと、減っているものがあることが判明した。またリン酸化タンパクに関しても、増えているものと減っているものが多数存在することが判明した。またLEOPARD症候群においてはRas-MAPキナーゼ経路という細胞内タンパクのリン酸化を調節して細胞の増殖、生存や分化などに強く影響を及ぼしているシグナル経路が特に異常をきたしていることが知られている。すなわちLEOPARD症候群においては、増殖因子が細胞に作用した時にこれらの細胞内シグナルの活性化が低下しているといわれている。このことを検証するために、iPS細胞に線維芽細胞増殖因子を作用させRas-MAPキナーゼ系の活性化が健常人とLEOPARD症候群に差があるかを検討した。健常人由来iPS細胞においては線維芽細胞増殖因子を作用後には予想通り速やかにRas-MAPキナーゼ系の活性化が認められている。一方でLEOPARD症候群患者由来iPS細胞に線維芽細胞増殖因子を作用させるとRas-MAPキナーゼ系の活性化反応性が著明に低下していることが判明した。LEOPARD症候群の病気の原因というのはRas-MAPキナーゼ系の活性化の低下であるといわれているが、このことがiPS細胞を用いた研究により試験管の中で再現可能であることが確認

された。

著者らは、これらの実験によりLEOPARD症候群iPS細胞の樹立を確認し、さらにLEOPARD症候群PS細胞由来心筋細胞が肥大をきたすことを示し、LEOPARD症候群iPS細胞においてRas-MAPキナーゼ系の活性化に関するリン酸化の程度に大きな差があることを確認した。以上のことは、これまでに長年蓄積されたLEOPARD症候群の疾患解析の結果と非常によく一致しており、試験管内で再現可能なLEOPARD症候群のモデルを構築したといえよう。今後は、さらに具体的な分子標的を明らかにすることにより、疾患治療方法の開発が進んでいくことと思われる。

E. 今後の循環器疾患特異的iPS細胞の疾患解析における展望

これらの研究は一見すると似た研究のようにみえるが、これまでの研究とは根本的に違う側面がある。これまでの研究は、患者の遺伝子変異を探索し、発見したとしてもヒトの生きた心筋細胞を用いた解析というのは不可能であった。そのために、これらの変異遺伝子を人工的に培養細胞（ヒト心筋細胞は用いることができないので、他の細胞種）に導入して変異遺伝子の電気生理学的解析や、実験動物（マウスなど）に遺伝子導入をすることによる遺伝子改変動物などを用いて解析することしかなかった。これらの実験系は極めて人工的なものであり、本当にヒトの病気の再現ができているかどうかはわからなかった。そのために疾患解析や治療方法の開発は思うように進んでこなかった。今後は、様々な難治性疾患を対照に患者特異的iPS細胞が作製され、疾患モデル作製の確認と薬剤スクリーニングが行われていくと思われる。一日も早く臨床応用され、患者にフィードバックされていくことが期待される。

文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131: 861-72.
- 3) Yuasa S, Fukuda K. Recent advances in cardiovascular regenerative medicine: the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008; 6: 803-10.
- 4) Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7: 11-4.
- 5) Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med*. 2010; 363: 1397-409.
- 6) Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 471: 225-9.
- 7) Yazawa M, Hsueh B, Jia X, et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*. 2011; 471: 230-4.
- 8) Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*. 2010; 465: 808-12.

3. 炎症細胞が作り出すニッチと筋肉再生

湯浅慎介, 福田恵一

胎仔骨格筋発生時においてG-CSF受容体が筋芽細胞に一過性に発現し、同様に成体骨格筋再生における筋芽細胞においてもG-CSF受容体が発現することを見出した。G-CSFの筋肉発生・再生に対する役割は、*in vitro*および*in vivo*における筋芽細胞の増殖促進作用であった。筋損傷後には炎症細胞の浸潤が顕著に認められ、炎症細胞あるいは炎症そのものが筋再生に関与しているかは不明であった。G-CSFは炎症部位において血液細胞から多く分泌されるサイトカインであり、損傷部位に浸潤した炎症細胞から分泌される。炎症細胞が作り出すニッチにおけるG-CSFにより、筋傷害後の局所の骨格筋再生が促され、創傷治癒に至ると考えられる。

はじめに

骨格筋細胞は全身の骨格に存在する筋肉を構成している細胞である。強い外傷や廃用症候群などの後天性筋傷害疾患や筋ジストロフィーをはじめとした先天性筋疾患は数多くあるが、骨格筋に再生能力があることから骨格筋再生療法開発の試みはあまりなされてこなかった。しかしながら骨格筋再生も完全ではなく、これらの疾患は生活の質を著しく落とし、さらには呼吸筋傷害などから死に至ることもあり骨格筋再生療法の開発が望まれている。

成体においては筋線維の周囲に衛星細胞と呼ばれる

【キーワード&略語】

骨格筋, ニッチ, 炎症細胞, 再生

bHLH: basic-helix-loop-helix
(塩基性ヘリックスループヘリックス)

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)

骨格筋幹細胞があり、筋肉修復・再生を担っている。成体における骨格筋幹細胞から成熟骨格筋細胞への分化を制御する分子機序は胎仔正常発生時の骨格筋細胞分化・成熟に類似していることが広く知られている。すなわち成体における骨格筋細胞の再生現象を解明し新規再生療法を開発するためには、胎仔期の骨格筋細胞発生を紐解いていくことが重要である。骨格筋発生はさまざまな転写因子群により、筋細胞の分化・成熟が時間空間的に精密に制御されている。胎生中期の体節において骨格筋幹細胞が同定されるようになり、それらはPax3やPax7を発現し、続いてbHLH型転写因子群MyoD, Myf5, MRF4, Myogeninが順次発現し筋肉細胞として分化・増殖・成熟し成体に存在する大きな筋肉を形成していく。このようなさまざまな転写因子群が順次発現し下流の骨格筋特異的遺伝子群の発現を調節し、骨格筋の幹細胞から増殖が活発な筋芽細胞そして成熟筋細胞へと分化していく。成体の骨格筋再生においては、さまざまな炎症細胞の浸潤があり、ま

Muscle regeneration at the inflammatory cell niche

Shinsuke Yuasa¹⁾²⁾/Keiichi Fukuda¹⁾: Department of Cardiology, Keio University School of Medicine¹⁾/Center for Integrated Medical Research, Keio University School of Medicine²⁾ (慶應義塾大学医学部循環器内科¹⁾/慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター²⁾)

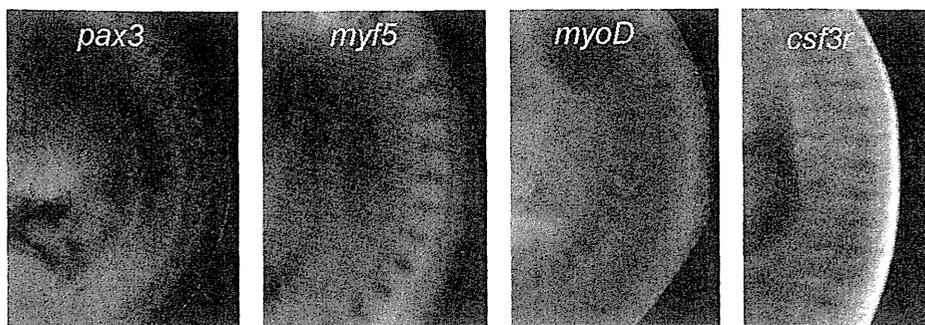


図1 マウス胎仔 (E9.5) を用いた whole mount *in situ* hybridization 法による骨格筋特異的遺伝子の発現パターン (巻頭カラー図7参照)

た再生骨格筋と非傷害正常骨格筋細胞が混在しており、詳細な解析が困難である。そこで骨格筋再生療法の開発のためには、胎生期の各分化段階にある骨格筋細胞に対して、どのような作用を有する物質が存在するかを発生学的見地から詳細に解析し、筋肉の増殖・分化促進因子の探索を行い、成体骨格筋再生へと応用していく必要があると考えた。

1 G-CSF 受容体のマウス胎仔における発現

骨格筋細胞と心筋細胞発生分化において特異的に発現するさまざまな遺伝子、中でも分泌因子と受容体に着目しスクリーニングを行った結果、マウス初期胚において G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor: 顆粒球コロニー刺激因子) の受容体が体節で強く発現していることが判明した^{1)~3)}。マウス胎仔胚における G-CSF 受容体の発現を whole mount *in situ* hybridization 法により各種骨格筋マーカーの発現を比較したところ、骨格筋幹細胞のマーカーである pax3 とは発現部位が一致しないが、骨格筋幹細胞から分化直後の筋芽細胞などで発現する myf5 や myoD の発現部位と類似していることが判明した (図1: E9.5 マウス胎仔の whole mount *in situ* hybridization)。さらに詳細な発現部位を免疫染色により検討したところ、体節の中でも Pax3, Pax7 を発現する骨格筋として最も未分化な集団ではなく、それらのすぐ内側の細胞集団である MyoD を発現し始める筋芽細胞に特異的に G-CSF 受容体が強く発現していることがわかった (図2: E10.5 マウス胎仔の切片を用いた免疫染色)。G-CSF 受容体の発現時期と部位から、G-CSF は骨格

筋の幹細胞から分化直後の筋芽細胞において分化や増殖などの機能に強く関与している可能性が強く示唆された。

2 G-CSF は筋芽細胞の増殖因子である

G-CSF は白血球の増加作用や造血幹細胞の末梢への動員作用などの血球系への強い作用が知られているサイトカインであるが、骨格筋に対する作用は不明である。そこで *in vitro* において、骨格筋細胞に対して G-CSF がどのような作用があるかを検討することとした。マウス筋芽細胞の細胞株として知られている C2C12 細胞は通常血清濃度の状況であれば増殖を続け未分化状態を維持するが、低血清濃度の状況では成熟骨格筋細胞へと分化することが知られている。C2C12 細胞を低血清状態で培養すると、培養初期の未分化筋芽細胞において G-CSF 受容体が発現しており、培養後期に成熟骨格筋細胞へと分化した際には G-CSF 受容体の発現が消失することが確認された。さらに G-CSF を培養液中に添加することにより、G-CSF 濃度依存性に未分化筋芽細胞の増殖が強く促されることが判明した。一方で培養液中に G-CSF 受容体の中和抗体を添加し G-CSF シグナルをブロックすると C2C12 細胞の増殖は抑制され、筋芽細胞の増殖に G-CSF は必須な因子であることが判明した。G-CSF は血球系細胞において G-CSF 受容体に結合し、さまざまな細胞内シグナルに刺激を伝えることが判明している。C2C12 細胞の培養液中に G-CSF を添加すると、STAT3, AKT, ERK, JNK, p38 などのサイトカイン受容体の下流にあると知られている細胞内シグナルが顕著に活性化されること

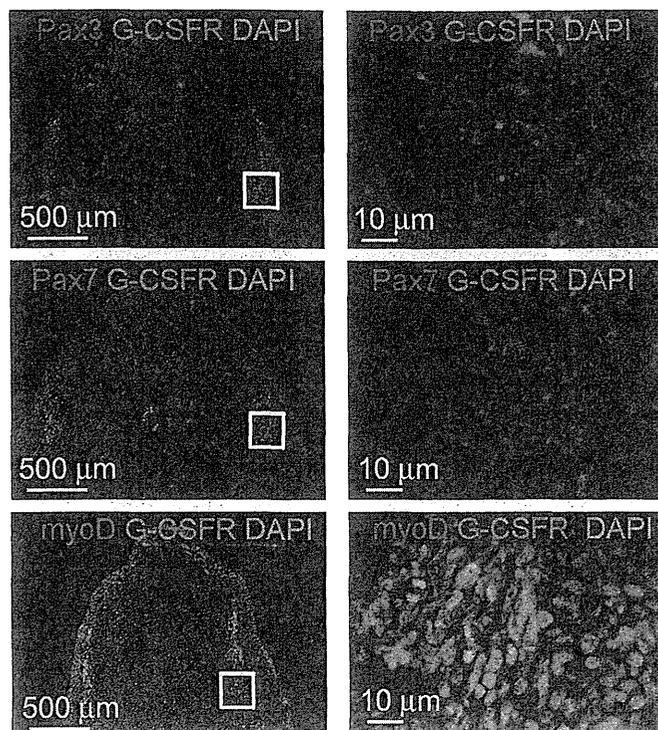


図2 マウス胎仔 (E10.5) 切片を用いた免疫染色法による骨格筋特異的遺伝子の発現パターン (巻頭カラー図8参照)

が判明した。すなわち G-CSF は筋芽細胞特異的に細胞内シグナルを活性化することができることを意味している。これらのことから G-CSF は筋芽細胞の直接的な強い増殖因子であることが判明した。

③ G-CSF 受容体は成体骨格筋再生時の筋芽細胞に発現している

さらに胎生期と同様に G-CSF 受容体の成体における発現の有無を検証することとした。胎生期での観察から G-CSF 受容体は成熟骨格筋細胞や最上流の骨格筋幹細胞では発現していない、骨格筋幹細胞が分化し始めて増殖能を保持している筋芽細胞でのみ発現が認められることが予想された。成体における筋肉細胞の再生能力は保たれているが、安静状態では筋肉の再生は起こっていない、静止期の骨格筋幹細胞が少数いるのみで筋芽細胞もほとんど認められない。しかしながらさまざまな原因で筋肉が傷害された後には、速やかに筋肉細胞の幹細胞である筋衛星細胞が分化・増殖し始め筋芽細胞を経て成熟骨格筋細胞へと変化する。成体での骨格筋再生現象を検討するために骨格筋傷害モデルを作製することとした。コブラ蛇毒に由来するカルジオトキ

シンは骨格筋細胞を選択的に傷害する物質であり、筋肉傷害・再生に関する基礎研究でよく用いられている。カルジオトキシンを筋肉内注射することによりマウス成体骨格筋傷害モデルを作製し (図3)、G-CSF 受容体の発現を観察した結果、再生途中の骨格筋細胞 (筋芽細胞) に特異的に G-CSF 受容体が強く発現していることが判明した (図4)。胎仔期での観察と同様に成熟骨格筋細胞では G-CSF 受容体は観察されなかった。また G-CSF 受容体の発現日は傷害後 3 日から 7 日の間に限局しており、筋傷害後の再生が活発な期間に限られていた。これより G-CSF 受容体は成体筋再生時の筋芽細胞に特異的に発現し、G-CSF が骨格筋再生に強く関与している可能性が示唆された。

④ G-CSF は骨格筋傷害後の再生を強く促す

G-CSF 受容体が筋芽細胞で発現しており、*in vitro* で筋芽細胞の増殖を強く促すことより、成体骨格筋再生時においても筋芽細胞を増殖させ再生を促進することが予想された。古くから知られていることだが、成体における骨格筋の再生は個々の筋肉細胞を観察することにより可能である。すなわち傷害を受けていない

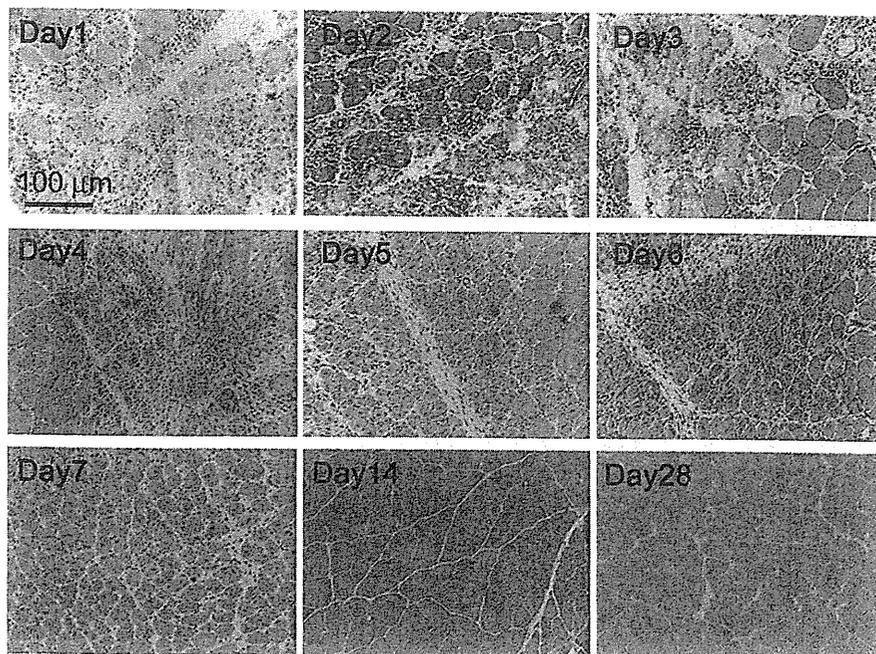


図3 カルジオトキシン投与後の下肢筋肉の変性と再生現象の経時的変化 (H & E 染色)
(巻頭カラー図9 参照)

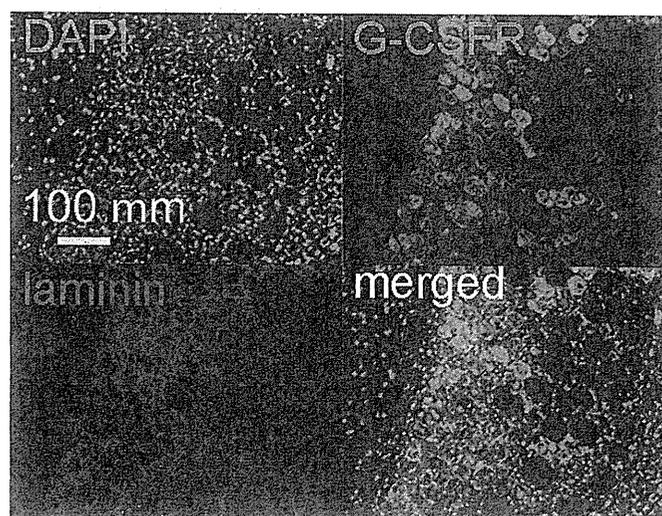


図4 カルジオトキシン投与5日後の下肢筋肉の再生骨格筋におけるG-CSFRの発現を免疫染色により確認 (巻頭カラー図10 参照)

正常成熟骨格筋細胞は大型の細胞で辺縁に存在する核を有する。また再生骨格筋は、再生途中では小型で円形の細胞であり、その核は中心に存在する。また再生骨格筋が成熟し大型の細胞になった後も核は中心に存在し、はじめから傷害を受けていない骨格筋細胞との区別が可能である(図3)。カルジオトキシンを筋肉内に投与し骨格筋傷害モデルを作製し、G-CSFを投与することで筋再生におけるG-CSFの効果を検討すること

とした。その結果、G-CSF投与により、傷害部位において中心核を有する再生骨格筋細胞が顕著に増え(図5)、筋肉径が大きくなり、そして筋力が回復することが判明した。またG-CSFが骨格筋再生において必須な因子であるかを検討するために、G-CSFのシグナルが完全に欠損するG-CSF受容体欠損マウスを用いて同様の解析を行った。G-CSF受容体欠損マウスにおいては筋傷害後の骨格筋再生が大きく障害されることも判明

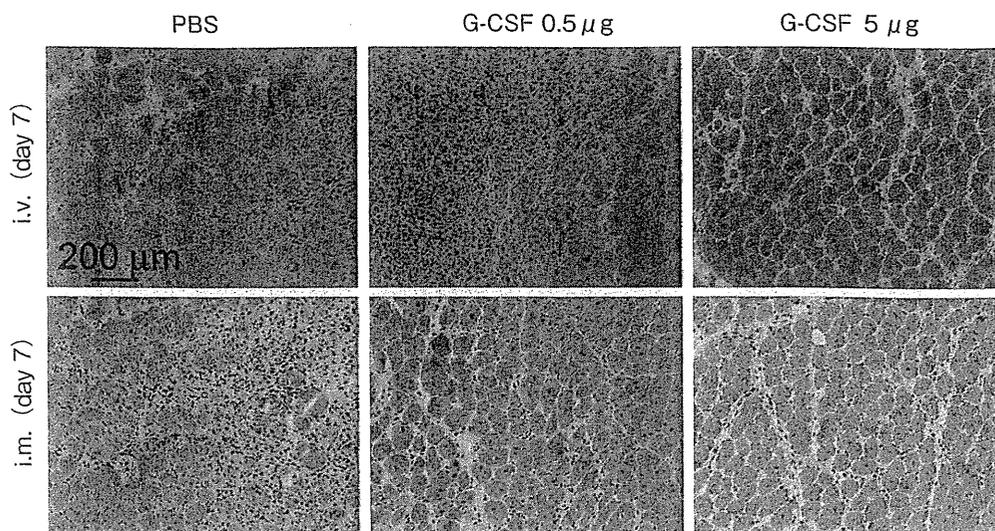


図5 カルジオトキシンによる骨格筋傷害後に、G-CSFを静脈投与 (i. v.) と筋肉内投与 (i. m.) することによる筋再生現象の組織学的観察 (H & E染色) (巻頭カラー図11参照)

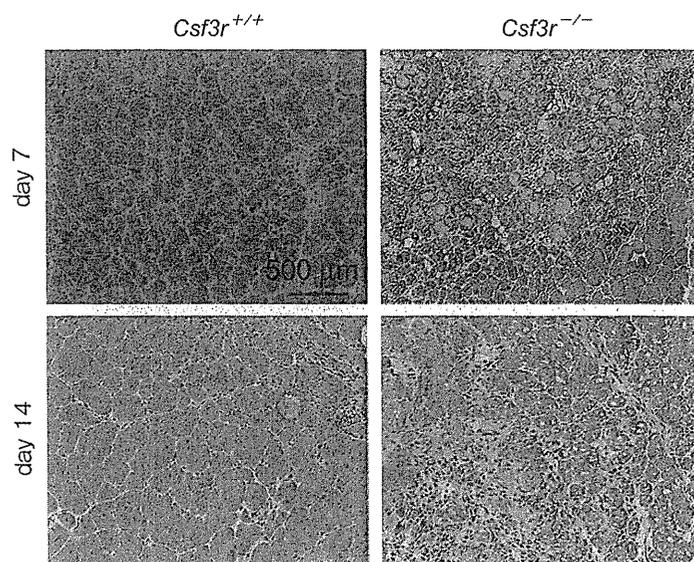


図6 G-CSFRノックアウトマウス (*csf3r*^{-/-}) とコントロールにおけるカルジオトキシンによる骨格筋傷害後の再生現象の差異 (巻頭カラー図12参照)

した (図6). すなわち骨格筋傷害後の再生においてG-CSFが再生を強く促すと同時に、筋再生において必須な因子であることが判明した。

5 炎症細胞が作り出すニッチと筋肉再生

では骨格筋傷害後の再生筋芽細胞に発現しているG-CSF受容体に対するリガンドとしてのG-CSFはどこに由来するのであろうか？筋傷害後には筋線維膜の崩壊、筋細胞の壊死・変性が順次起こる。壊死筋肉細

胞から放出されるさまざまな物質により、炎症細胞を動員・活性化し、また活性化された炎症細胞からサイトカインが分泌されて相互反応が起こる。好中球が最初に傷害部位に到達し、続いてマクロファージが集積し変性筋線維を貪食する。また筋衛星細胞とマクロファージが相互作用し白血球遊走や炎症を増強させ、単球やマクロファージが筋衛星細胞の増殖や分化を促すことが知られている。さまざまな白血球はG-CSFを産生することが知られており、漠然と白血球を増やし

炎症を助長しているのではないかと考えられてきた。しかしながら筋傷害後の壊死筋線維の周辺に集族する炎症性白血球は炎症の惹起という機能の他に、直接的に筋芽細胞の増殖を経て筋再生を促している可能性が強く示唆される。すなわち筋傷害後に炎症性白血球が作り出す微小環境（ニッチ）において分泌されているG-CSFを筋芽細胞がG-CSF受容体を経て受け止めることにより、筋再生が促されていると考えられる。さらにこの作用を増強させるためにG-CSFを投与することにより、強い骨格筋再生の増強作用があることが判明した。

おわりに

本研究から、成体骨格筋における局所の炎症細胞が作り出すニッチによる組織の再生調節がなされていることが示唆された。同様にしてさまざまな臓器においても、局所の炎症細胞が作り出すニッチと組織再生が強く関与していることが想定される。骨格筋において

は局所でG-CSFが再生促進作用を有することを見出したが、各々の臓器における個々の炎症・再生に関する現象を明らかにし、それらをコントロールすることにより、炎症と再生という問題点を包括的に解決する方法が全身のあらゆる臓器で開発されていくと思われる。

文献

- 1) Yuasa, S. et al. : Nat. Biotech., 23 : 607-611, 2005
- 2) Yuasa, S. et al. : Circ. Res., 106 : 1083-1091, 2010
- 3) Shimoji, K. et al. : Cell Stem Cell, 6 : 227-237, 2010
- 4) Hara, M. et al. : J. Exp. Med., 208 : 715-727, 2011

<筆頭著者プロフィール>

湯浅慎介：1999年、慶應義塾大学医学部卒業。2005年、慶應義塾大学大学院医学研究科博士課程修了。慶應義塾大学医学部循環器内科助教を経て、'08年より慶應義塾大学医学部循環器内科／総合医科学研究センター特別研究講師となる。幹細胞医学の理解を深め、臨床応用のための基盤的な研究を進めていきたいと考えている。

Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus

Tomohisa Seki¹, Shinsuke Yuasa^{1,2} & Keiichi Fukuda¹

¹Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan. ²Department of Cardiology, Center for Integrated Medical Research, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan. Correspondence should be addressed to K.F. (kfukuda@sc.itc.keio.ac.jp) or S.Y. (yuasa@a8.keio.jp).

Published online 15 March 2012; doi:10.1038/nprot.2012.015

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have become important cell sources for genetic disease models, and they have the potential to be cell sources for future clinical therapies. However, invasive tissue sampling reduces the number of candidates who consent to donate cells for iPSC generation. In addition, integrated transgenes can potentially insert at inappropriate points in the genome, and in turn have a direct oncogenic effect. Technical modifications using a combination of activated T cells and a temperature-sensitive mutant of Sendai virus (SeV) can avoid invasive tissue sampling and residual transgene issues in generating iPSCs. Such advances may increase the number of consenting patients for cell donations. Here we present a detailed protocol for the generation of iPSCs from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and mutant SeV encoding human OCT3/4, SOX2, KLF4 and c-MYC; T cell-derived iPSCs can be generated within 1 month of blood sampling.

INTRODUCTION

Generating iPSCs is a prominent recent advance in stem cell biology¹. iPSCs have become cell sources for genetic disease models and are expected to provide important new cell sources for clinical therapies. Initial studies generated human iPSCs from human fibroblasts obtained from dermal biopsy samples^{2,3}. However, although further studies successfully reprogrammed several types of human somatic cells into iPSCs^{4–6}, the methods and cell sources most suitable for iPSC applications in humans remain undetermined. In particular, the generation of iPSCs for disease research should ideally avoid invasive tissue sampling, which markedly reduces the number of patients who consent to cell donations. In this regard, peripheral blood is an appealing cell source because of the noninvasive collection and easy accessibility of blood cells compared with skin fibroblasts and other types of cells from adult tissues.

We recently demonstrated that transgene-free iPSCs can be efficiently generated from a small amount of human peripheral blood within 1 month of the blood sampling using a combination of activated T cells and temperature-sensitive (TS) mutants of SeV encoding human OCT3/4, SOX2, KLF4 and c-MYC (Fig. 1)⁷. We named these T cell-derived iPSCs TiPS cells (TiPSCs). Recombinant SeVs that replicate in the cytoplasm of infected cells in the form of negative-sense single-stranded RNA were originally used to generate iPSCs from human fibroblasts⁸. These recombinant SeVs do not integrate into the host genome⁹, and have already been used in human iPSC generation using CD34⁺ cells from human cord blood¹⁰. Introducing TS mutations also successfully erased residual genomic RNA of the SeV vectors from the target cells¹⁰, thus generating transgene-free iPSCs with high efficiency. T cells are also an appealing cell source because they are easily proliferated *in vitro* using a plate-bound anti-CD3 monoclonal antibody and interleukin (IL)-2 (ref. 11). Although it was reported that T cells are not efficiently reprogrammed using only four factors in the mouse^{12,13}, SeV vectors were efficiently transduced into human activated T cells

to express exogenous genes¹⁴. Thus, the combination of activated T cells and TS SeV mutants made it possible to generate TiPSCs from patients effectively, easily and less invasively.

Advantages of the method

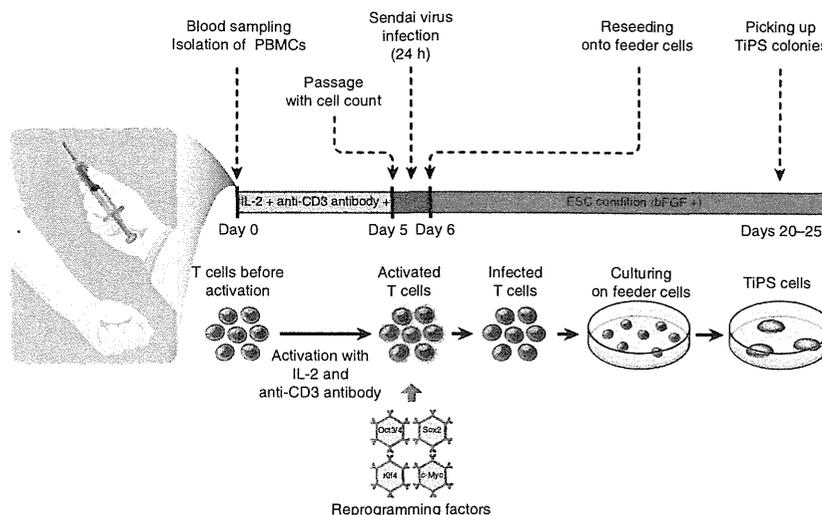
The initial methods for generating human iPSCs used a skin biopsy^{2,3}, requiring local anesthesia and suturation. In our protocol, iPSCs can be generated from patients without such invasive tissue sampling. Sufficient patient-specific iPSCs can be generated from 1 ml or less of peripheral blood, which contains sufficient terminally differentiated T cells⁷. Our method might therefore decrease the likelihood of patients refusing cell sampling and therefore potentially increase the number of patients who consent to generating iPSCs. In addition, TiPSCs can still be generated from whole blood samples stored at room temperature (20–25 °C) for 24 h and from mononuclear cells stored at –150 °C. Therefore, transported samples can be easily used for generating iPSCs in any clinical situation. SeV also has the possibility to be used for generating iPSCs from other human blood cells such as monocytes, which, on the basis of existing reports of iPSCs that were generated successfully using SeV from T cells and CD34⁺ cells^{7,10}, do not harbor T cell receptor (TCR) or immunoglobulin gene rearrangements.

Comparison with other methods

In the first report of iPSC generation from human peripheral blood cells⁶, mobilized CD34⁺ human peripheral blood cells were successfully reprogrammed into iPSCs. However, this method required extremely large amounts (~300 ml) of blood, an apheresis machine and drug administration before blood sampling to mobilize the CD34⁺ blood cells, all of which should ideally be avoided because of the possible associated side effects (e.g., bone pain), despite these effects being infrequent. Less invasive methods using peripheral blood have also been reported for



Figure 1 | Overview of the TiPSC generation protocol. PBMCs are activated for 5 d with IL-2 and anti-CD3 antibody, and then transduced with SeV expressing human *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC*. TiPSC colonies emerge at 20–25 d after blood sampling.



the successful reprogramming of mononuclear blood cells^{15–17}. In these methods, mononuclear blood cells from donors or frozen samples were infected using retrovirus¹⁵ or lentivirus^{16,17} to express four factors, human OCT3/4, SOX2, KLF4 and c-MYC. In these studies, human T cell reprogramming into iPSCs was achieved, but the efficiency of reprogramming was extremely low (approximately 0.0008–0.01%). Although these methods used less peripheral blood and did not require the pharmacological pretreatment of patients, the problems of transgene genomic insertion and low reprogramming efficiency remained, precluding their wide use in the clinical application of iPSCs. Generating iPSCs with TS-mutated SeV easily erases residual genomic viral RNA from the target cells¹⁰, and the method is significantly more efficient (~0.1%) compared with those protocols in which iPSCs were generated from T cells with retrovirus or lentivirus.

Human keratinocytes derived from plucked human hair have also been used as another less invasive method of obtaining iPSCs from patient cells^{4,18}. However, in some cases, these reported methods require several hairs to obtain successful cell outgrowth of keratinocytes. Dental tissue has also been explored as a potential source of iPSCs¹⁹. However, although teeth are routinely removed in many clinics and no further procedures are required with respect to the donor, it is generally difficult to routinely obtain patients' dental tissues—with specific genetic or nongenetic diseases—for the purpose of iPSC studies. In comparison with these outlined methods, our protocol involves harvesting only a small sample of peripheral blood; in addition, T cell proliferation does not need stochastic cell outgrowth. These are clear advantages for clinical application in comparison with the methods reported in the past.

Experimental design

Blood sampling. Our protocol is focused on the simple procedure of peripheral venous blood sampling to obtain the donor cells, using a standard process. Patient somatic cells can then be easily and aseptically obtained from the blood sample. In our protocol, 1 ml of whole blood is sufficient to generate TiPSCs (Fig. 2a).

Derivation of activated T cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) can be separated by a Ficoll gradient method from heparinized whole blood samples (Fig. 2b). Although PBMCs contain lymphocytes and monocytes, activation with plate-bound anti-CD3 monoclonal antibody and IL-2 selectively proliferates T cells, and clearly increases the proportion of T cells in the cultured PBMCs¹¹. CD3 protein exists in the complex of TCR proteins on the surface of T cells, and can therefore be used as a T cell-specific marker. Anti-CD3 antibody modulates the TCR-CD3 complex to induce T cell proliferation and activation²⁰, whereas IL-2 also activates general T cell signaling pathways and eventually promotes cytokine transcription, cell survival, cell-cycle entry and growth²¹. At day 5 of culture with anti-CD3 monoclonal antibody and IL-2, CD3⁺ cells increased up to ~95% of cultured PBMCs (Fig. 2c–e). With this culture method, users can avoid using a fluorescence-activated cell sorter in which

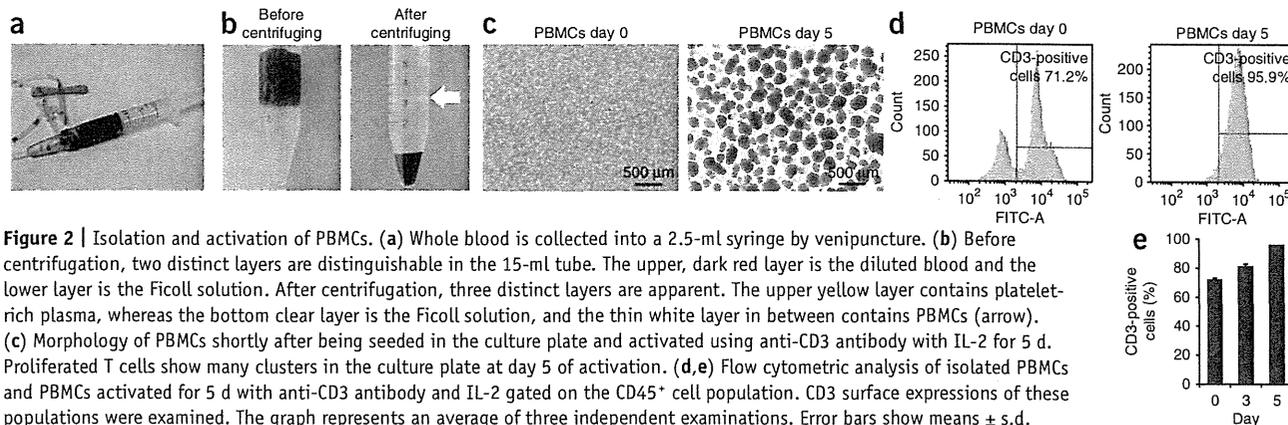
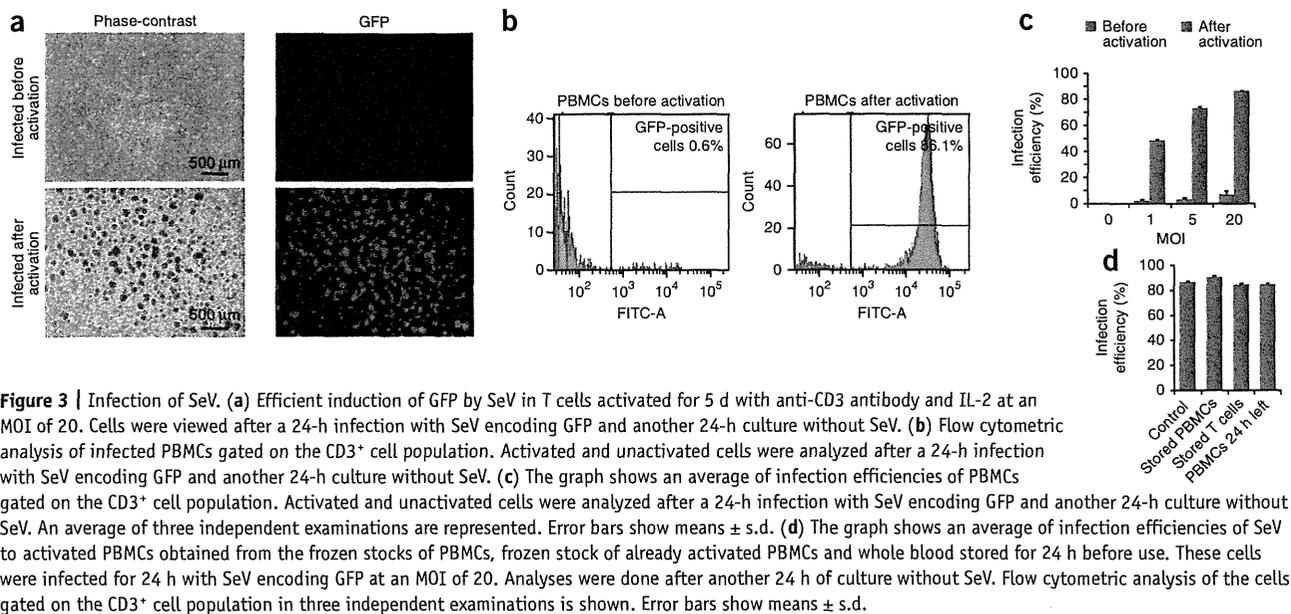


Figure 2 | Isolation and activation of PBMCs. (a) Whole blood is collected into a 2.5-ml syringe by venipuncture. (b) Before centrifugation, two distinct layers are distinguishable in the 15-ml tube. The upper, dark red layer is the diluted blood and the lower layer is the Ficoll solution. After centrifugation, three distinct layers are apparent. The upper yellow layer contains platelet-rich plasma, whereas the bottom clear layer is the Ficoll solution, and the thin white layer in between contains PBMCs (arrow). (c) Morphology of PBMCs shortly after being seeded in the culture plate and activated using anti-CD3 antibody with IL-2 for 5 d. Proliferated T cells show many clusters in the culture plate at day 5 of activation. (d,e) Flow cytometric analysis of isolated PBMCs and PBMCs activated for 5 d with anti-CD3 antibody and IL-2 gated on the CD45⁺ cell population. CD3 surface expressions of these populations were examined. The graph represents an average of three independent examinations. Error bars show means ± s.d.



PROTOCOL



the sorted cells are frequently damaged by laser emission and the process of single-cell sorting.

Introduction of SeV vectors. SeV is an enveloped virus with a single-stranded, negative-sense, nonsegmented RNA genome belonging to the paramyxoviridae family. Recombinant SeV vectors replicate only in the cytoplasm of infected cells⁹. SeV vectors containing reprogramming factors were generated by introducing open reading frames for the human *OCT3/4* (official symbol: *POU5F1*) *SOX2* and *KLF4* genes into a fusion protein (F)-deficient, TS SeV vector. SeV vector containing the *c-MYC* gene was also generated with a more TS mutant, the TS15-SeV vector (P2, L1361C, L1558I), so that it could be eliminated rapidly at 37 °C¹⁰.

The seed SeV/ Δ F vectors are generated by the transfecting template pSeV/ Δ F carrying each transgene and pCAGGS plasmids—varying the genes encoding T7 RNA polymerase, nucleoprotein (NP), phosphoprotein (P), F5R and large protein (L)—into 293T cells. Thereafter, the vector is propagated using LLC-MK2/F7/A cells, which are SeV F-expressing LLC-MK2 cells¹⁰. SeV solutions can be stored at -80 °C and thawed before use. Activated PBMCs are infected at day 5 of activation culture. For effective reprogramming of T cells, this activation of PBMCs is important because it not only increases the number of T cells, but also significantly promotes the introduction efficiency of SeV. At a multiplicity of infection (MOI) of 20, SeV could infect CD3⁺ T cells at >80% efficiency, which was lower than 10% before activation (Fig. 3).

TiPSCs

At around day 15 after transduction of SeV, human embryonic stem cell (ESC)-like colonies emerge on the feeder cells (Fig. 4). These T cell-derived TiPSC colonies show monoclonal TCR rearrangement in their genome, which is a hallmark of mature terminally differentiated T cells and indicates that each TiPSC colony is derived from a single mature T cell.

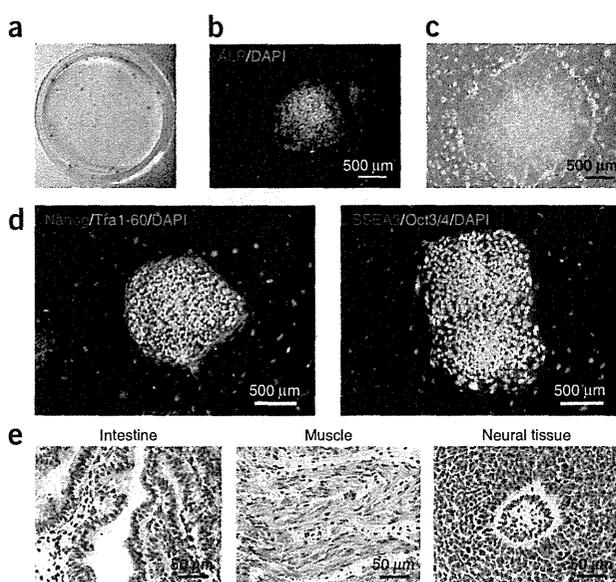


Figure 4 | Characterization of TiPSCs. (a) Example of a 10-cm dish stained for ALP on day 20 after SeV infection at an MOI of 20 and seeded at a density of 5×10^4 cells per 10-cm dish. Many ALP-positive T cell colonies that were infected with SeV are visible. (b) ALP staining of TiPSC colonies. (c) Typical ESC-like TiPSC colony on day 20 after SeV infection. (d) Immunofluorescence staining for pluripotency and surface markers (Nanog, Tra1-60, Oct 3/4, SSEA3) in TiPSCs. Immunofluorescence staining was performed using the following primary antibodies: anti-NANOG (RCAB0003P, ReproCELL), anti-OCT3/4 (sc-5279, Santa Cruz), anti-SSEA3 (MAB4303, Millipore) and anti-Tra1-60 (MAB4360, Millipore). DAPI (Molecular Probes) was used for nuclear staining. The following secondary antibodies were used: anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG and IgM conjugated with Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568 (Molecular Probes). (e) Hematoxylin and eosin-stained representative teratomas derived from the TiPSC line.

MATERIALS

REAGENTS

- Donors for blood sampling **! CAUTION** Subjects must have given informed consent. **! CAUTION** All experiments involving humans must conform to relevant governmental and institutional ethics regulations.
- Novo-heparin (5,000 units per 5 ml; Mochida Pharmaceutical)
- Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare, cat. no. 17-5442-02)
- Purified NA/LE mouse anti-human CD3 (BD Pharmingen, cat. no.555336)
- GT-T502 medium (Kohjin Bio, cat. no. 16025020)
- Fetal bovine serum (FBS; Cell Culture Bioscience, cat. no. 171012)
- Bovine albumin fraction V solution (BSA; Gibco, cat. no. 15260-037)
- DMEM (Sigma, cat. no. D5546)
- DMEM/F12 (Sigma, cat. no. D6421)
- KnockOut serum replacement for ESCs/iPSCs (KSR; Gibco, cat. no. 10828-028)
- GlutaMAX-I (Gibco, cat. no. 35050-061)
- Non-essential amino acid solution (NEAA; Sigma, cat. no. M7145)
- Penicillin-streptomycin (Gibco, cat. no. 15140-122)
- 2-Mercaptoethanol (2-ME; Invitrogen, cat. no. 21985-023)

! CAUTION This solution is flammable, harmful if swallowed and toxic when in contact with skin and eyes. Use protective gloves and safety glasses when handling it.

- Recombinant basic fibroblast growth factor, human (bFGF; Wako, cat. no. 064-04541)
- Collagenase type IV (Gibco, cat. no. 17104-019)
- Gelatin powder (Sigma, cat. no. G-1890)
- D-PBS(-) (Wako, cat. no. 045-29795)
- Acetamide (Wako, cat. no. 015-00115)
- Propylene glycol (Wako, cat. no. 16-0499)
- Cell Banker-2 (BIO LABO, cat. no. BLC-2)
- TRIzol reagent (Invitrogen, cat. no. 15596-026)
- Chloroform (Wako, cat. no. 038-02606)
- Ethanol (Wako, cat. no. 057-00456)
- Ethanol (70% (vol/vol); Wako, cat. no. 059-07895)
- Isopropyl alcohol (Wako, cat. no. 166-04836)
- SuperScript double-stranded cDNA synthesis kit (Invitrogen, cat. no. 11917-010)
- Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen, cat. no. 18418-012)
- SYBR Premix Ex Taq II (Takara, cat. no. RR081A)
- Sodium acetate (3 M; Wako, cat. no. 316-90081)
- Liquid nitrogen
- CytoTune-iPS reprogramming kit (OCT3/4-SeV/TSΔF, SOX2-SeV/TSΔF, KLF4-SeV/TSΔF, c-MYC (HNL)-SeV/TS15ΔF; Invitrogen, cat. no. A13780-01)
- Mitomycin C-treated mouse embryonic fibroblasts (MEFs; Reprocell, cat. no. RCHEFC003)
- MEF medium (see REAGENT SETUP)
- Human iPSC medium (see REAGENT SETUP)
- Isopropanol (Wako, cat. no. 16604836)
- RNase-free water (Takara, cat. no. 9012)
- DNase I (Invitrogen, cat. no. 18068-015)

EQUIPMENT

- Syringe (2.5 ml; Terumo, cat. no. SS-02LZ)
- Butterfly needle (23 G; Terumo, cat. no. SV-23CLK)
- Needle (23 G; Terumo, cat. no. NN-2325R)
- Alcohol prep pads (Hakujuji)
- Tourniquet (Asone, cat. no. MH-01)
- Millex GV filter unit (0.22 μm; Millipore, cat. no. SLGV033RS)

- C-chip disposable hemocytometer (Digital Bio, cat. no. DHC-N01)
- Trypan blue stain (0.4%; Gibco, cat. no. 15250)
- Microtubes (1.5 ml; Thermo Fisher Scientific, cat. no. 131-615C)
- Tube (50 ml; Corning, cat. no. 430829)
- Tube (15 ml; Corning, cat. no. 430053)
- Tissue culture dish (10 cm; Falcon, cat. no. 353003)
- Tissue culture plate (96 well; Falcon, cat. no. 353078)
- Tissue culture plate (24 well; Falcon, cat. no. 353047)
- Tissue culture plate (12 well; Falcon, cat. no. 353043)
- Tissue culture plate (6 well; Falcon, cat. no. 353046)
- Cryovials (1.5 ml; Sumilom, cat. no. MS-4702X)
- Freezing container (Sanyo, cat. no. MDM-U73V)
- Cell culture incubator set at 37 °C, 5% CO₂ (Sanyo, cat. no. MCO-18AIC)
- Versatile refrigerated centrifuge (Sanyo, cat. no. AX-320)
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, cat. no. ND-2000)
- ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, cat. no. 7500-01)
- Inverted microscope
- Phase-contrast microscope

REAGENT SETUP

bFGF Prepare 0.1% (wt/vol) BSA/PBS in a sterile tube and use it to dissolve bFGF for a final concentration of 4 ng ml⁻¹. Prepare 100-μl aliquots in screw-cap microcentrifuge tubes and store them at -20 °C.

Gelatin-coated culture dishes Dissolve 1 g of gelatin powder in 1,000 ml of distilled water, autoclave, filter the solution with a 0.22-μm Millex GV filter unit and store it at 4 °C. Add an appropriate volume of 0.1% (wt/vol) gelatin solution to cover the entire area of the culture dishes to coat. Incubate the dishes for at least 30 min at 37 °C in a sterile environment. Remove the gelatin solution before use.

Collagenase type IV solution Dissolve 1 g of collagenase type IV powder in 1,000 ml of DMEM/F12 medium and filter the solution with a 0.22-μm Millex GV filter unit. Make 50-ml aliquots in 50-ml tubes and store them at -20 °C. Thawed solution can be stored at 4 °C for up to 1 week before use.

Anti-CD3 monoclonal antibody-coated plates Dissolve anti-human CD3 antibody in D-PBS(-) to a concentration of 10 μg ml⁻¹. Add the anti-human CD3 antibody solution to 24-well tissue culture plates to soak the surface of each plate, and then incubate them at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for at least 30 min. Remove the anti-human CD3 antibody solution and wash the plates once with D-PBS(-) before seeding the cells.

Human iPSC medium To prepare 500 ml of human iPSC medium, mix 387.5 ml of DMEM/F12 medium with 100 ml of KSR, 5 ml of GlutaMAX-I (1 mM), 5 ml of penicillin-streptomycin, 5 ml of NEAA (10 μM), 500 μl of 2-ME (100 μM) and 50 μl of bFGF (4 ng ml⁻¹). Filter the medium with a 0.22-μm filter unit and store it for up to 1 week at 4 °C.

MEF medium To prepare 500 ml of MEF medium, mix 450 ml of DMEM medium with 50 ml of FBS and 2.5 ml of penicillin-streptomycin. Filter the medium with a 0.22-μm filter unit and store it for up to 2 weeks at 4 °C.

DAP213 solution To prepare 10 ml of DAP213 solution, mix 5.37 ml of human iPSC medium, 1.43 ml DMSO, 1 ml of 10 M acetamide and 2.2 ml of propylene glycol. Store the solution for up to 1 month at -80 °C.

SeV solutions To prepare working stocks of SeV solutions (from the CytoTune kit), thaw the solutions on ice and prepare 50-μl stocks in 1.5-ml tubes. Working stocks can be stored at -80 °C.

PROCEDURE

Blood sampling ● TIMING ~10 min

1| Sterilize the cap from the bottle of heparin with an alcohol prep pad.

! CAUTION Wash your hands before starting venipuncture. Wear gloves when handling blood. Change gloves after venipuncture in each donor or if the gloves become contaminated.



PROTOCOL

- 2| Combine a 23-G needle and 2.5-ml syringe and draw up 100–300 μ l of heparin.
- 3| Release the 23-G needle from heparinized 2.5-ml syringe and combine a new 23-G butterfly needle with the heparinized 2.5-ml syringe.
- 4| Identify the median cubital or cephalic veins of donors' arms; then palpate and trace the vein paths with the index finger.
- 5| Sterilize the venipuncture site with an alcohol prep pad.
! CAUTION Do not palpate the venipuncture site after sterilization.
- 6| Apply the tourniquet above the selected puncture site.
! CAUTION Do not place the tourniquet too tightly or leave it on for more than 3 min.
- 7| Remove the needle shield and perform venipuncture. Insert the needle into the blood vessel and hold still once a backflow of blood is seen in the tube of the butterfly needle setup.
! CAUTION Venipuncture must be done by a person who is well trained and legally certified to carry out the procedure.
! CAUTION Patients' informed consent must be obtained before blood sampling.
- 8| Draw 1–2 ml of blood into the syringe.
- 9| Remove the tourniquet.
! CAUTION Do not withdraw the needle before removing the tourniquet.
- 10| Withdraw the needle fully, apply pressure to the alcohol prep pad over the puncture site and maintain the pressure for 3–5 min until the bleeding stops.
- 11| Discard the needle of the Vacutainer into a biohazard container without recapping the needle.
! CAUTION Dispose of items that are used for venipuncture immediately and in appropriate containers.
▲ CRITICAL STEP This step and all subsequent steps should be carried out using sterile reagents and equipment.
■ PAUSE POINT Heparinized whole blood can be stored for up to 24 h before use (Fig. 2a).

Isolating PBMCs using Ficoll gradient ● TIMING ~1 h

12| Add 1–2 ml of heparinized whole blood to a 15-ml tube.

? TROUBLESHOOTING

13| Add 1–2 ml of D-PBS(–) and dilute the blood with D-PBS(–) 1:1.

14| Prepare 3 ml of Ficoll-Paque PREMIUM in a separate 15-ml tube.

15| Pour the diluted blood onto the Ficoll solution carefully so as to form two layers.

! CAUTION Do not mix the blood and the Ficoll solution. The blood must remain on top.

16| Centrifuge for 30 min at 400g at room temperature.

17| Collect the layer of PBMCs without touching the Ficoll layer, using sterile pipette tips, into a new 15-ml tube (Fig. 2b).

▲ CRITICAL STEP When collecting PBMCs, carefully avoid obtaining any of the Ficoll solution layer. Contamination of the Ficoll solution reduces the collection rate of the mononuclear cells.

18| Dilute the PBMCs by adding 5 ml of D-PBS(–).

19| Centrifuge for 5 min at 200g at room temperature.

20| Discard the supernatant, add 5 ml of D-PBS(–) and dilute the PBMCs with D-PBS(–).

21| Centrifuge for 5 min at 200g at room temperature.



22| Discard the supernatant and resuspend the PBMCs with GT-T502 medium to a concentration of 1.25×10^6 cells per ml.
■ PAUSE POINT If needed, isolated PBMCs can be frozen and stored at -150°C by using Cell Banker-2 according to the manufacturer's instructions.

Activating T cells ● TIMING 5 d

23| Add 400 μl of PBMC solution with GT-T502 medium into the wells of a human CD3-specific antibody-coated 24-well plate at a density of 5×10^5 cells per well.

▲ CRITICAL STEP Approximately 1 to 2×10^6 PBMCs can be obtained from 1 ml of human peripheral blood with a Ficoll gradient method. This number of PBMCs fills 2–4 wells of a standard 24-well plate. For TiPSC generation, one well of PBMCs is sufficient. Excess cells can be stored using Cell Banker-2, as described at the **PAUSE POINT** in Step 22.

24| Incubate the cells for 5 d at 37°C in a 5% CO_2 incubator without medium change.

■ PAUSE POINT If needed, activated PBMCs can be frozen and stored at -150°C by using Cell Banker-2 according to the manufacturer's instructions.

SeV infection ● TIMING ~1 d

25| Dilute the SeV solutions containing *OCT3/4*-SeV/TS Δ F, *SOX2*-SeV/TS Δ F, *KLF4*-SeV/TS Δ F and *c-MYC (HNL)*-SeV/TS15 Δ F individually on ice as detailed in REAGENT SETUP. This will take ~30 min.

! CAUTION Perform all procedures involving SeV vectors in a safety cabinet while wearing gloves. All waste should be treated first with ethanol, then with bleach, and finally it should be autoclaved.

26| Collect the activated PBMCs by pipetting and transfer them into a 15-ml tube.

27| Centrifuge for 5 min at 200g at room temperature.

28| Discard the supernatant and resuspend the cells with GT-T502 medium to a concentration of 7.5×10^5 cells per ml.

29| Add 1 ml of PBMC solution with GT-T502 medium into the wells of a human CD3-specific antibody-coated 12-well plate at a density of 7.5×10^5 cells per well.

▲ CRITICAL STEP After 5 d of activation with CD3-specific antibody and IL-2, approximately twofold amounts of activated PBMCs should be obtained. This amount of activated PBMCs fills 2–5 wells of a standard 12-well plate. For TiPSC generation, one well of activated PBMCs is sufficient. Excess cells can be stored using Cell Banker-2.

■ PAUSE POINT If needed, activated PBMCs can be frozen and stored at -150°C by using Cell Banker-2 according to the manufacturer's instructions.

30| Add the virus solutions containing *OCT3/4*-SeV/TS Δ F, *SOX2*-SeV/TS Δ F, *KLF4*-SeV/TS Δ F and *c-MYC (HNL)*-SeV/TS15 Δ F individually to the wells, each at an MOI of 20. One well containing all virus solutions is sufficient to generate TiPS colonies.

31| Place the plate in an incubator at 37°C and 5% CO_2 . This plate should be left undisturbed for 24 h for cells to grow; meanwhile, however, immediately proceed with Step 32 (MEF plating).

Plating MEFs ● TIMING ~30 min

32| Place 10 ml of MEF medium in a 50-ml tube. Although MEFs should be ready for use on the following day, plating of MEFs should be done 1 d before plating infected PBMCs for optimal cell viability.

33| Remove a vial of frozen MEFs from freezing container and place the vial into a 37°C water bath until thawed.

34| Wipe the vial with ethanol, open the cap and transfer the cell suspension to the tube prepared in Step 32.

35| Centrifuge the tube for 5 min at 200g at room temperature.

? TROUBLESHOOTING

36| Discard the supernatant and resuspend the cells with 50 ml of MEF medium.

37| Add 10 ml of MEF suspension onto a 10-cm gelatin-coated dish, or add 2 ml into each well of a gelatin-coated six-well plate (6×10^6 cells per 10-cm dish or 1.2×10^5 cells per well of a six-well plate).



PROTOCOL

38| Incubate overnight at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

■ **PAUSE POINT** The MEF dishes can be stored for up to 3–4 d before use.

Replating infected PBMCs ● TIMING ~30 min

39| Collect the infected cells (from Step 31) by pipetting and transfer them into a 15-ml tube.

40| Centrifuge for 5 min at 200g at room temperature.

41| Discard the supernatant and resuspend the cells with 1 ml of human iPSC medium.

42| Aspirate the medium from the 10-cm dishes with MEF feeder cells (prepared in Steps 32–38) and add 10 ml of human iPSC medium into the dishes.

43| Use a hemocytometer to count the number of cells in solution prepared in Step 41 and replate 5×10^4 and 5×10^5 cells on a 10-cm dish with the MEF feeder cells prepared in Step 42.

▲ **CRITICAL STEP** After 24 h of infection, approximately 1×10^6 PBMCs can be obtained from one well of a 12-well plate. This number of infected PBMCs is sufficient to replate 5×10^4 and 5×10^5 cells on a 10-cm dish with MEF feeder cells.

▲ **CRITICAL STEP** Excess infected PBMCs can be used as a positive control for assessing the removal of SeV by real-time PCR. Dilute 5×10^4 cells of infected PBMCs with 500 µl of TRIzol and store it at –80 °C if needed.

44| Incubate the dish at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

Culturing infected PBMCs ● TIMING ~3 weeks

45| After replating the infected mononuclear cells, change the human iPSC medium every 2 d and maintain cells in culture until the TiPSC colonies emerge.

▲ **CRITICAL STEP** The infected mononuclear cells should be attached to the MEFs within the first 2 d after replating. It is not a problem for TiPSCs generation if unattached cells are lost when changing the human iPSC medium.

46| About 10 d after replating, small colonies should start to appear. At about 15–20 d after replating, colonies showing typical human ESC colony-like morphology should emerge (Fig. 4c).

Picking up and expanding the TiPSC colonies ● TIMING ~3 weeks

47| Mark the colonies that show ESC-like morphology on the bottom of the dish under an inverted microscope.

48| Prepare the required number of six-well plates with MEF feeder cells.

49| Replace the medium in the six-well plates with MEF feeder cells by human iPSC medium at the amount of 2 ml per well.

50| Add 20 µl of human iPSC medium into the required number of wells of 96-well plates. Colony pick-up needs one well per colony.

? TROUBLESHOOTING

51| Wipe a phase-contrast microscope carefully with ethanol and place it onto a tissue culture clean bench.

52| By using the phase-contrast microscope and a 20-µl pipette, pick up the colonies marked in Step 36 and place each colony into one well of the 96-well plates containing human iPS cell medium (added in Step 50).

53| Use a phase-contrast microscope and a 200-µl pipette to add 200 µl of human iPSC medium into the wells of 96-well plates and break the colonies into small pieces by pipetting.

! **CAUTION** Do not disperse the colonies into single cells.

54| Transfer the broken colonies into wells of six-well plates containing MEF feeder cells as prepared in Step 48.

55| Incubate at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Change human iPSC medium every 2 d.

56| Every 5–7 d, passage the cells by using collagenase IV solution as follows: when the colonies become confluent, aspirate the medium and add collagenase IV solution (use half the amount you use for maintenance medium; for example, 1 ml for a well of a six-well plate and 5 ml for a 10-cm dish).

57| Incubate for 30–60 min at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

58| Collect the colonies into a 15-ml tube by pipetting when floating colonies appear.

59| Centrifuge for 2 min at 200g at room temperature.

60| Discard the supernatant. Add 1 ml of fresh human iPSC medium and break the colonies into small pieces with a 1,000- μ l pipette and by pipetting 1 ml of cell solution four or five times.

! **CAUTION** Do not disperse the colonies into single cells.

61| Place the broken colonies into a new dish or plate that has been pre-plated with MEFs and filled with fresh human iPSC culture medium. The split ratio used for the cells depends on the cell lines and usually ranges from 1:4 to 1:10.

62| If you wish to freeze the iPSCs, follow option A. If you wish to check for the removal of SeV by real-time RT-PCR, follow option B.

(A) Freezing of iPSCs ● TIMING ~1 h

(i) Aspirate the medium and add collagenase IV solution as detailed in Step 56.

(ii) Incubate for 30–60 min at 37 °C in a 5% CO₂ incubator.

(iii) Collect the colonies into a 15-ml tube by pipetting when floating colonies appear.

(iv) Centrifuge for 2 min at 200g at room temperature.

(v) Discard the supernatant, add 200 μ l of DAP213 solution and break the colonies into small pieces with a 200- μ l pipette.

! **CAUTION** For good cell viability, perform this step and Steps 62A(vi) and Steps 62A(vii) within 15 s.

(vi) Transfer 200 μ l of the cell suspension to 1.5-ml cryovials.

(vii) Plunge the vials quickly into liquid nitrogen.

(viii) Store the cryovials in the freezing container at –150 °C.

(B) Checking for removal of SeV by real-time RT-PCR ● TIMING ~8 h

(i) Prepare primers as shown in Table 1.

(ii) Transfer the excess broken colonies from Step 50 into 1.5-ml tubes. Half of the cells from a 10-cm dish of confluent TiPSCs will supply sufficient mRNA.

(iii) Centrifuge for 2 min at 200g at room temperature.

(iv) Discard the supernatant. Dilute the broken colonies by adding 1 ml of D-PBS(–).

(v) Centrifuge for 2 min at 200g at room temperature.

(vi) Discard the supernatant. Dilute the broken colonies by adding 500 μ l of TRIzol.

■ **PAUSE POINT** Cell lysates prepared with TRIzol should be stored at –80 °C.

(vii) Add 100 μ l of chloroform to 500 μ l of cell lysate (which should be thawed on ice if stored at –80 °C) and mix vigorously by shaking. To make a positive control, thaw the infected PBMC lysate prepared in Step 43 on ice and use protocol (viii–xxxv) with infected PBMC lysate, as was used for the TiPSC samples.

TABLE 1 | Primer sequences for detecting SeV.

Primers	Sense	Antisense
SeV-hOct3/4	5'-TCTGGGCTCTCCCATGCATTCAAAC-3'	5'-AATGTATCGAAGGTGCTCAA-3'
SeV-hSox2	5'-ACGGCCATTAACGGCACACTG-3'	5'-AATGTATCGAAGGTGCTCAA-3'
SeV-hKlf4	5'-CACCTCGCCTTACACATGAAGAG-3'	5'-AATGTATCGAAGGTGCTCAA-3'
SeV-c-Myc	5'-TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG-3'	5'-AAATACGGCTGCACCGAGTCGT-3'
GAPDH	5'-GTGGACCTGACCTGCCGTCT-3'	5'-GGAGGAGTGGGTGCTGCTGT-3'

