

応用利用に向けた 低分子化合物によるヒトiPS細胞の培養

iPS cells cultivation with small molecules for application.

京都大学 物質—細胞統合システム拠点 研究員 **池田 達彦**
Tatsuhiko Ikeda, Ph.D. (Researcher)
Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University

京都大学 物質—細胞統合システム拠点 特定拠点講師 **長谷川 光一**
Kouichi Hasegawa, Ph.D. (Junior Associate Professor)
Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University



キーワード

iPS, small molecules, cultivation

01 | はじめに

1981年にEvansらによって、はじめて多能性幹細胞である胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)がマウスから樹立されて以来¹⁾、研究環境は大きく変化した。多能性幹細胞そのものに関する様々な研究が行われたのはもちろんのことであるが、ES細胞を用いることでキメラ胚の作製が可能となり、これによって様々な種類のノックアウトマウスが作製されることとなった。ES細胞から作られた様々な培養細胞や病態モデルマウス等は今日でも多くの研究に用いられ、疾患の原因解明や治療薬の開発に貢献している。さらに、1998年にはThomsonらによって、ヒトにおいてもES細胞が樹立され²⁾、研究がますます加速することとなった一方で、ES細胞の作製には生命の萌芽たる初期胚が必要となるとの考えから、倫理上の問題に対する議論が持ち上がり、いくつかの国においては、ES細胞の作製が禁止されることとなった。そのような状況の中、2006年に山中らがOct4, Sox2, Klf4, c-Mycの4つの遺伝子を導入することで体細胞を初期化し、誘導型多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)を作製することに成功した³⁾。これによって、倫理上の問題に縛られることなく多様なヒト多能性幹細胞すなわちiPS細胞を作製・研究することが可能となり、疾患の原因解明や治療薬の開発に加えて再生医療の分野においても研究が加速することとなった。

こうしてヒトiPS細胞を用いた研究が基礎研究から応用利用へと発展する中で、その培養方法の研究・開発がますます重要になってきている。すなわち、iPS細胞を作製・維持できることはもちろんであるが、より安全なiPS細胞を大量かつ安定的に供給できる培養方法の開発が求められているのである。本稿では、応用利用の観点からヒトiPS細胞の培養方法について概説する。

02 | ヒトES細胞/iPS細胞の培養方法

当初ヒトES細胞の培養は牛胎仔血清を添加した培地で、マウス胎仔由来の線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts: MEF)をフィーダー細胞として、ES細胞とフィーダー細胞との共培養系で培養されていた。しかしながら、牛胎仔血清や線維芽細胞のロットが変わるとうまく培養できない場合がある等、培養方法としては非常に不安定なものであった。そこで、フィーダー細胞や血清から供給される成分の中からヒトES細胞の多能性の維持に寄与する成分を突き止め、安定的な培養方法を開発することが求められた。

先行するマウスES細胞の研究においては、マウスES細胞の多能性の維持にサイトカインの一種である白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor: LIF)が重要な役割を果たしていることが解明され、LIFの添加によって培養が安定することが明らかとなっていた。さらに近年、MAPKシグナルパスウェイが分化を誘導すること、wntシグナルパスウェイが多能性の維持に関与していることが明らかとなり、MAPK阻害剤およびwntシグナルにおいて抑制的に働いているGSK3の阻害剤を添加することで無血清培地での培養が確立されている⁴⁾。

一方、ヒトES細胞においては、LIFの添加は多能性の維持に寄与しておらず、線維芽細胞増殖因子-2(fibroblast growth factor-2: FGF2)やトランスフォーミング増殖因子ベータ(TGFβ)スーパーファミリーのアクチビンなどからのシグナルによって多能性が維持され、マウスと同様には培養できないことが分かっていた。

このことから、現在もなお、ヒトES細胞/iPS細胞の培養は一般的にはフィーダー細胞としてMEFを用い、血清代替(KnockOut™ Serum Replacement: KSR)およびFGF2を添加した培地で行われることが多い。一方で、フィーダー細胞を用いずマトリゲル等を基底膜マトリックスとして用いるフィー

ダーフリー培地も多数開発されている^{5)~7)}。その一部を例として挙げると、mTeSR1やEssential8等がよく使われているほか、国内においてはStemFit AK03Nもよく使用されているようである。しかしながら、いずれも高価であるうえ、これらにおいてもFGF2等の増殖因子が添加されており、こうしたタンパク質の安定性が培養の安定性にも影響を与える場合があるため、応用利用のためにはより安価で安定性の高い完全合成培地の開発が望まれている。また、基底膜マトリックスはフィーダーフリー培地で接着培養する際の細胞の足場となる重要な成分で、マトリゲル、ビトロネクチン、ラミニン等がよく用いられているが、継代の際には細胞と基底膜マトリックスとを解離させる必要がある。その方法としてはタンパク質分解酵素を用いる方法が一般的であるが、EDTAを加えたPBSを用いる方法⁶⁾やカルシウムイオンを添加したPBSを用いる方法⁹⁾等もあり、培地の種類や細胞の種類に合わせて適切な方法を選択する必要がある。

03 | naïve状態とprimed状態

さて、前項においてマウスES/iPS細胞とヒトES/iPS細胞では多能性の維持機構が異なっていることを記したが、マウスやラット等のげっ歯類由来のES/iPS細胞とその他の哺乳類由来のES/iPS細胞では様々な特性が異なっている。当初これらの違いは種特異的な差であると思われていたが、マウスの着床直後の胚からもヒトES/iPS細胞様の細胞が樹立できることが報告され^{9)・10)}、現在では多能性幹細胞の未分化の度合いの違いによるものと考えられており、マウスやラットES細胞様のより未分化な状態はnaïve状態、ヒトES細胞やヒトiPS細胞等のやや分化の進んだ状態はprimed状態と名付けられた¹¹⁾。

naïveとprimedの差を表す特徴としては、まずコロニーの外観が挙げられる。naïveの幹細胞はやや厚みのある重層的なドーム状のコロニーを形成するのに対して、primedの幹細胞は薄く平らなコロニーを形成する。また、継代の際にトリプシン処理によって細胞塊を単一細胞にまでばらしてしまうと、primedでは生存率が大きく低下するのに対して、naïveでは高い確率で生存できることが知られている。次にエピジェネティックな特徴としてX染色体の不活性化が挙げられる。ヒトを含む哺乳類のX染色体はメスの場合は分化が始まるとすぐに1本が不活性化されることが知られているが、わずかに分化が進んだ状態であるprimedの幹細胞でも同様に不活性化が起こる。これに対して、naïveの幹細胞ではX染色体の不活性化は起きていない。同様に、分化とともに進むことが知られているヒストンやDNAのメチル化修飾においても両者には違いがある。発生に関わる遺伝子のプロモーター領域に結合しているヒストンH3の27番目のリジン残基におけるトリメチル化(H3K27me3)はnaïveではほとんど蓄積されていないのに対して、primedではH3K27me3の蓄積がみられ、全体的なDNAのメチル化についてもprimedでは促進されている¹²⁾。これらのことから、naïveがより未分化な状態であることが改めて伺える。また、naïveとprimedではエネルギー代謝も異なっている。naïveの幹細胞ではミトコンドリアの活性が高く、TCAサイクルや酸化的リン酸化によるエネルギー代謝が活性化しており、酸素の消費量も多くなっているが、primedの幹細胞で

は解糖系がエネルギー代謝の中心となっており、酸素呼吸によるエネルギー代謝は活性化していない。これは非常に興味深い現象で、発生の最初期であるnaïveでは酸素呼吸によってエネルギーを作り出しているにも関わらず、ほんのわずかに分化の進んだprimedでは発酵によってエネルギーを作り出しており、やがて分化が進むと再び酸素呼吸によるエネルギー代謝へと戻っていくのである。当然のことながら、エネルギー効率の良い酸素呼吸を行っているnaïveの幹細胞はprimedよりも増殖速度は速い。さらに、両者にはキメラ胚の形成能にも差がある。naïveの幹細胞はキメラ胚を形成することが可能であるが、primedの幹細胞ではキメラ胚の形成は非常に困難である。

通常のヒトiPS細胞はprimed状態であり、細胞の継代時には、単細胞に解離せずに細胞塊での継代が必要であり、継代効率は作業者に依存する所も多い。ヒトiPS細胞の応用利用を考えた場合、継代効率は非常に重要な要素であることから、ヒトにおけるnaïve幹細胞の作出は近年の大きなテーマの一つであった。naïveから少し分化の進んだ状態がprimedであることから、マウス等ではnaïveの幹細胞はprimedの培養条件で培養することで容易にprimedへと変化するが、ヒトiPS細胞をprimedからnaïveへと変化する事は容易ではなかった。最初に作製されたヒトnaïve ESC/iPSCはOct4とKlf4、又はKlf4とKlf2を一時的に強発現させ、MAPKの一種であるERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、LIFとフォルスコリンを加えた培地で培養することで、作製・維持が可能であった¹³⁾。つまり、遺伝子導入に依存していた。しかしその後、様々な方法・培養条件でヒトnaïve ESC/iPSCが作製されるようになり、現在では上記の2つの阻害剤に加えて、さらにいくつかの阻害剤や成長促進因子を添加することで、Oct4やKlf4等の一過的な強発現を伴うことなくprimedからnaïveへの移行が可能となっている。これによって、ヒトES/iPS細胞を高増殖で、解離継代が容易な培養が可能となった。

	naïve	primed
多能性の維持	LIFシグナルに依存	FGF、アクチビンシグナルに依存
コロニー形状	ドーム状で重層的	平面的
単一細胞での生存性(継代時)	高	低
X染色体の不活性化	なし	あり
発生関連遺伝子のプロモーター領域におけるH3K27me3の蓄積	低	高
DNAのメチル化	低	高
呼吸	酸素呼吸	発酵
増殖速度	速い	遅い
キメラ胚の形成	容易	困難

表1 naïveとprimedの特徴^{11)・12)}

04 | 培養条件による細胞の状態の変化

ヒトnaïve iPS細胞が作製されたことを先に述べたが、厳密にはそれらの細胞がnaïveの状態にあるかどうかは断定でき

ない。なぜなら、naïveであることを示す重要な要素の一つがキメラ胚の形成能だからである。ヒトiPS細胞においてはキメラ胚を作って確かめるといわけにはいかない。前述のヒトnaïve iPS細胞はキメラ胚形成能以外のnaïveの特徴を持つ幹細胞ということになる。ヒトnaïve iPS細胞は未だに確立された技術ではなく、キメラ胚形成能といった評価法が適用できないため、作製方法によってヒトnaïve iPS細胞には多くのバリエーションが存在する。作製方法としては、当初作製されたように2種類の阻害剤とLIFを培地に加えるとともに、Oct4やKlf4等の一過的な強発現によってnaïveへと移行させる方法や、ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤にさらに骨形成タンパク質(BMP)シグナル阻害剤を加えLIFを添加した培地でOct4やKlf4等の一過的な強発現を伴わずにnaïveへと移行させる方法、さらにこれらを発展させて、複数のMAPK阻害剤を加える方法等がある。もちろん、いずれのnaïve iPS細胞においてもドーム状のコロニー形成やLIFシグナル依存的な多能性維持等のnaïveであることを示す特徴は持っているが、遺伝子の発現量を網羅的に解析するトランスクリプトーム解析等の高分解能を有する解析方法を用いると非常に多くのバリエーションが存在することがわかる。

実際にいくつかのRNA-seqデータ¹⁴⁾⁻¹⁹⁾を用いてトランスクリプトーム解析を行うと、naïve ES/iPS細胞の中にもややprimedに近い遺伝子発現パターンを持つものと大きく異なる遺伝子発現パターンを持つものが存在している。筆者も公開されているRNA-seqデータを用いて解析を行ったところ、Theunissenらの作製したnaïve ES細胞とTakahimaらの作製したnaïve ES細胞が特にprimedと異なる遺伝子発現パターンを有していることが確認できた(図1)。

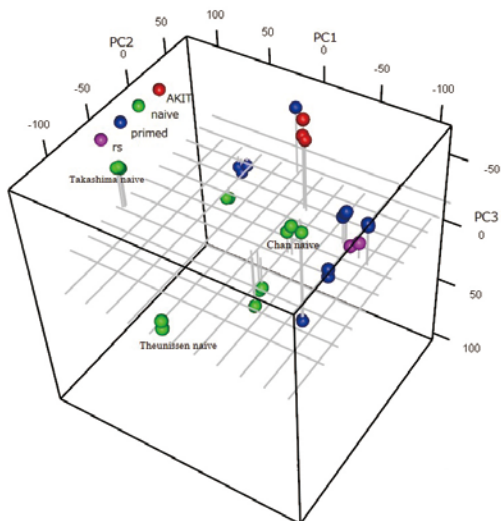


図1 様々なnaïve、primed、rs幹細胞の主成分分析 AKITは筆者らのグループが作製した新しい培地で培養したES細胞。左側にnaïveのクラスターが、右側にprimedのクラスターが形成されている。rsはprimedの一部であることが確認できる。

同様の結果は他の論文でも報告されており²⁰⁾、現時点では彼ら2グループのnaïve ESCがよりnaïveらしい状態にあるのだろうと思われる。

逆に、primedに属する細胞でありながら、naïveに近い遺伝子発現パターンを持つものも見出された。筆者らのグループが作製したFGF2等の増殖因子を含まない新しい培地で培養したES/iPS細胞である。この培地で培養されたES/iPS細胞は平

面的なコロニーを形成し、継代時にトリプシンを用いて単一細胞にすると生存率が著しく低下する等のprimedの特徴を有していたが、naïveにおいて多能性維持に関わる遺伝子のうちのひとつであるTbx3の発現量が上昇していた他、他の培養条件で培養した場合と詳細に比較したところ、発現量に変動の見られた遺伝子のパターンがある種のnaïve ES/iPS細胞のものによく似ているという結果が得られた(図2)。

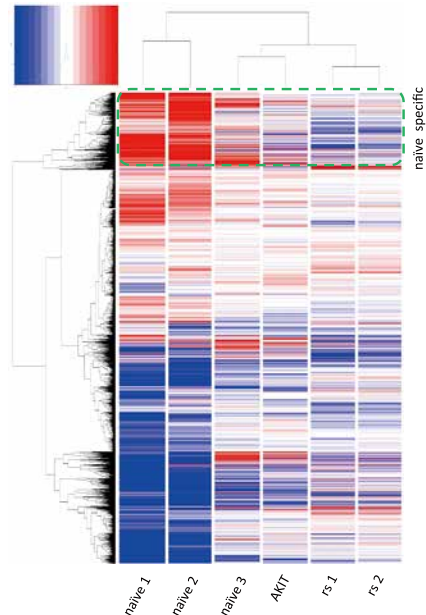


図2 様々なnaïve、rs幹細胞およびAKIT培養ES細胞の発現変動遺伝子のヒートマップ primedの細胞と比較して発現変動のあった遺伝子について、その変動パターンをヒートマップを用いて比較した。緑の点線で囲んだ遺伝子群がnaïveに特異的な遺伝子群であると思われる。また、AKIT培養ES細胞の発現変動パターンはnaïve3と似ていることが確認できる。

このことと、培養条件を変えることで遺伝子の一過的な強発現を伴わずにprimedからnaïveへと移行させることができることを併せて考えると、naïveとprimedの間にはある程度の可逆的な連続性があるのかもしれない。

さらに、従来のprimedやnaïveとは異なる特徴を有する新しい状態が見つかってきている。その一つが領域選択型多能性幹細胞(region-selective pluripotent stem cell: rsPSC)である¹⁹⁾。この多能性幹細胞はマウスのエピブラストをFGF2とwnt阻害剤であるIWR1を添加した培地で培養することで得られた。このrsPSCは基本的にはprimedの特徴を有していたが、単一細胞での継代に対する耐性や、やや早い増殖速度を示した他、特殊なキメラ胚形成能を有していた。すなわち、マウスエピブラストの後極側に移植した場合にのみ生着し、キメラ胚を形成したのである。同様に、FGF2とIWR1を添加した培地でヒトES細胞を培養したところヒトrsPSCが得られ、これをマウスエピブラストの後極側に移植したところ生着し、三胚葉のいずれにも寄与していたことから、rsPSCには異種間キメラ形成能があることが示された。

このように、ヒト多能性幹細胞の未分化状態には様々な状態が存在し、細胞の遺伝的背景や組織的背景、樹立時の遺伝子改変だけでなく、培養方法によって大きく特徴が変化することが示されてきた。このことは目的にあわせて最適な培養方法を選択、あるいは開発する必要があることを示している。例えば、遺伝子改変を行うのであれば、単一細胞から効率よく増殖するnaïveやrsが適しているし、短期間で多量の細胞を必要とする

のであれば、naiveやrsの増殖速度の速さも魅力的だろう。その一方で、naiveやrsを作製・維持するための培地は高価であり、長期培養下でのゲノムの安定性が低いことも報告されている²¹⁾。また、前述のStemFitやE8では、細胞はnaiveと同等の増殖も可能である。このため、現在まで、特別な理由がなければ従来のprimedの培養方法を選択することが無難である。

05 | 応用利用に向けた培養方法の開発

では、応用利用に適した培養方法とはどのようなものだろうか。それはまず高品質で安価に安定供給が可能な培養方法でなければならない。高品質であるということは、分化した細胞や死細胞がほとんど含まれていないことはもちろんだが、ロット間の差がなく、同一の処理に対して同一の応答性が維持されている必要がある。安定供給を行うためには発酵工学という回分培養や流加培養あるいは連続培養のような大容量での培養が必要となる。これらを満たし、市場に広く供給するためには培地成分に高価なものを使用しない等のコストカットも必要となる。

まず高品質を実現するためには、現在の培養方法に存在する不安定性の原因を取り除く必要がある。ヒトiPS細胞の培養における不安定性の最大の要因は生物由来の成分である。フィーダー細胞を用いる培養方法ではフィーダー細胞の状態がヒトiPS細胞の状態に影響を与えるし、フィーダーフリー培地においても添加されているシグナルタンパク質の安定性の影響を受けることになる。さらに、再生医療への活用においては、安全性の観点から動物由来成分を含まない(Xenoフリー)培地であることも要求される。そこで重要な役割を果たすのが生理活性をもつ低分子化合物である。naiveやrsPSCの作製・維持にもERK1/2阻害剤やGSK3阻害剤、wnt阻害剤といった低分子化合物が用いられているが(表2)、このような低分子化合物は細胞内のシグナル分子や細胞表面のレセプターに結合することで、シグナルを遮断したり強化したりする作用がある。これら低分子化合物を組み合わせることで、培地中から不安定なタンパク質を取り除き、安定的な培地を作製することができると期待される。実際に、筆者らのグループにおいて低分子化合物を組み合わせることでFGF2等の増殖因子を含まない、全く新しいフィーダーフリー・Xenoフリー培地の作製に成功しており、今

後さらなる改良を進めることで、タンパク質を全く添加しない完全合成培地の開発を目指したい。

完全合成培地の開発は、均質で安定供給可能な大容量の培養を行うためにも重要である。現在一般的に行われているプレート上での平面的な培養では空間当たりの培養効率が悪い上に、培地交換にも多くのコストがかかる。そこで大容量のタンク質で3次元的に培養することが求められるが、当然のことながらヒトiPS細胞の培養には細胞間接着によるシグナル伝達も重要であるため、単一細胞ではなく一定の大きさの細胞塊を維持しながら培養液中を浮遊させる(浮遊培養)必要がある。こうした条件を満たすためには、浮遊培養に適した完全合成培地を調製しなければならない。この点についても、筆者らのグループは、2種類のポリマーを利用することで、ヒトiPS細胞にストレスを与えることのない全く新しい浮遊培養系を開発している。現在はこの浮遊培養系と、完全合成培地の開発を通して、新たな安価な培養系の開発に着手している。

また、再生医療への応用を考える場合には、これらの安価で安定した培養法に加えて、培養方法によるエピジェネティックな変化やゲノム不安定性にも注意が必要となる。iPS細胞においてはその初期化の過程においてエピジェネティックな状態は完全には初期化されていないことが知られているが、このことが分化後の組織を生体へ移植した際にどのような影響を及ぼすのかは不明である。さらに、他の培養細胞同様、iPS細胞を長く継代していると遺伝子が損傷を受け突然変異が生じたり、エピジェネティックな変化が生じることがある。こうした変化が生じた細胞を再生医療に用いることは出来ないので、こうした変化が起こりにくい培養条件についての検討が今後の大きな課題の一つである。

ここまでヒトiPS細胞を高品質で安価に安定供給する場合に必要な培養条件を示した。しかし、培養されたiPS細胞をどのように利用するかによって、その後の要求される培養条件は異なってくる(図3)。例えば、角膜等に分化させ患者に移植を行うことを目的とする場合であれば、大量培養の必要性は低くなり高い安全性が求められることから、均質性の高い浮遊培養よりも小スケールで個別に管理できる従来のプレート上での接着培養や特殊なメンブレン上での培養の方が適していると思われる。この場合においては、ヒトiPS細胞を播種する基底膜マトリックスに何を用いるかも重要な選択となる。前述のように

培養方法・培地		基質	動物由来成分	増殖因子	低分子化合物
primed	KSR + MEF	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	FGF2およびMEF細胞発現物質	
	TeSR1 ⁵⁾	ラミニン	Xenoフリー	FGF2, TGFβ 他	
	Essential8 ⁶⁾	ビトロネクチン	Xenoフリー	FGF2, TGFβ	
	StemFit AK03N ⁷⁾	ラミニン	Xenoフリー	FGF2 他	
naive	2iL ¹³⁾	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	LIFおよびMEF細胞発現物質	ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、フォルスコリン
	t2iL+G0 ¹⁷⁾	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	LIF、FGF2およびMEF細胞発現物質	ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、PKC阻害剤
	5i/L/A ¹⁸⁾	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質	含む	LIF、FGF2、アクチビン	ERK1/2阻害剤、GSK3阻害剤、ROCK阻害剤、BRAF阻害剤、SRC阻害剤
rs ¹⁹⁾	ゼラチンおよびMEF細胞発現基質 又はマトリゲル	含む	FGF2	IWR1	

表2 主な培養方法・培地とその特徴

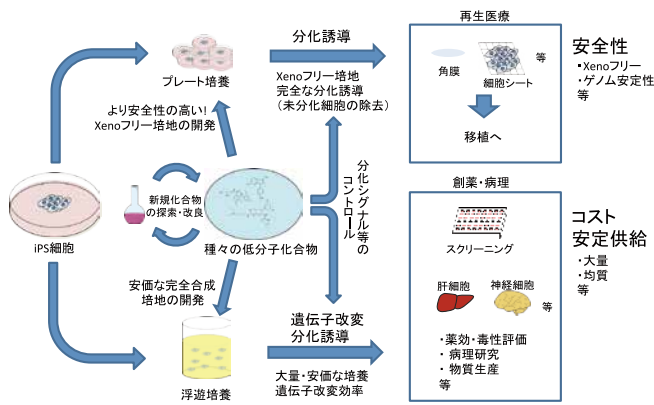


図3 応用利用と培養条件 iPSC細胞を応用利用する場合には、その目的にあわせて培養方法を開発・選択する必要がある。再生医療への応用を目的とする場合には(上段)、高い安全性が要求される。創薬研究や病理研究などへの応用を目的とする場合には(下段)、コストの低さや、安定供給体制がより重要となる。いずれの場合においても生理活性を持つ低分子化合物を用いることで培地から高価で不安定なタンパク質を取り除き、安全で安価な培養方法が開発できる他、シグナルのコントロールによるnaiveやrsPSCの作製・維持および分化誘導などにおいても重要であり、今後様々な生理活性を持つ低分子化合物が開発されることで、多くの問題が解決できるものと期待される。

基底膜マトリックスの種類によっては増殖速度や継代の効率、分化効率が変化するほか、生体に移植した際に残留していると激しい免疫応答(拒絶反応)を起こす場合もあることにも注意が必要である。一方で、創薬における候補化合物のスクリーニングや薬効・毒性評価への応用を目的とする場合には、Xenoフリー培地であることは必須ではなくなり、コストの低さや安定供給体制といった要素がより重要となる。また、病態モデルの作製や病理研究に利用する場合には遺伝子改変が必要になる場合もあり、このような場合には遺伝子改変効率が高いと思われるnaiveやrsPSCを作製・維持する培地を選択することも考慮しなければならない。

06 | おわりに

ヒトES/iPSC細胞の様々な特徴とその特徴を引き出す、あるいは変化させる培養条件について概説した。しかしながら、ヒトES/iPSC細胞においてその状態を維持するためのシグナル経路については完全には明らかになっておらず、また、既知である領域においてもそのシグナルを遮断又は増幅することができる生理活性を持つ低分子化合物が網羅されているわけではない。今後、ヒトiPSC細胞の基礎的研究の進展と並行して、新たに生理活性を持つ低分子化合物が発見・合成されることでより応用利用に適した培養方法が開発されていくものと期待したい。

参考文献

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**(5819), 154-6 (1981).
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**(5391), 1145-7 (1998).
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4), 663-76 (2006).
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**(7194), 519-23 (2008).
- Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA,

Thomson JA. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**(2), 185-7 (2006).

- Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga-Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourget J, Teng JM, Thomson JA. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods* **8**(5), 424-9 (2011).
- Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* **4**, 3594 (2014).
- Ohnuma K, Fujiki A, Yanagihara K, Tachikawa S, Hayashi Y, Ito Y, Onuma Y, Chan T, Michiue T, Furue KM, Asashima M. Enzyme-free Passage of Human Pluripotent Stem Cells by Controlling Divalent Cations. *Sci. Rep.* **4**, 4646 (2014).
- Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**(7150), 191-5 (2007).
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**(7150), 196-9 (2007).
- Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**(6), 487-92 (2009).
- Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **504**(7479), 282-6 (2013).
- Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassidy JP, Muffat J, Carey BW, Jaenisch R. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**(20), 9222-7 (2010).
- Sperber H, Mathieu J, Wang Y, Ferreccio A, Hesson J, Xu Z, Fischer KA, Devi A, Detraux D, Gu H, Battle SL, Showalter M, Valensisi C, Bielas JH, Ericson NG, Margaretha L, Robitaille AM, Margineantu D, Fiehn O, Hockenbery D, Blau CA, Raftery D, Margolin AA, Hawkins RD, Moon RT, Ware CB, Ruohola-Baker H. The metabolome regulates the epigenetic landscape during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat. Cell Biol.* **17**(12), 1523-35 (2015).
- Ji X, Dadon DB, Powell BE, Fan ZP, Borges-Rivera D, Shachar S, Weintraub AS, Hniz D, Pegoraro G5, Lee TI, Misteli T, Jaenisch R, Young RA. 3D Chromosome Regulatory Landscape of Human Pluripotent Cells. *Cell Stem Cell* **18**(2), 262-75 (2016).
- Chan YS, Göke J, Ng JH, Lu X, Gonzales KA, Tan CP, Tng WQ, Hong ZZ, Lim YS, Ng HH. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* **13**(6), 663-75 (2013).
- Takahashi Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficiz G, Krueger F, Oxley D, Santos F, Clarke J, Mansfield W, Reik W, Bertone P, Smith A. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* **158**(6), 1254-69 (2014).
- Thunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M1, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornruksa S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* **15**(4), 471-87 (2014).
- Wu J, Okamura D, Li M, Suzuki K, Luo C, Ma L, He Y, Li Z, Benner C, Tamura I, Krause MN, Nery JR, Du T, Zhang Z, Hishida T, Takahashi Y, Aizawa E, Kim NY, Lajara J, Guillen P, Campistol JM, Esteban CR, Ross PJ, Saghatelian A, Ren B, Ecker JR, Izpisua Belmonte JC. An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* **521**(7552), 316-21 (2015).
- Huang K, Maruyama T, Fan G. The Naive State of Human Pluripotent Stem Cells: A Synthesis of Stem Cell and Preimplantation Embryo Transcriptome Analyses. *Cell Stem Cell* **15**(4), 410-5 (2014).
- Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* **135**(7), 1299-310 (2008).