

---

## 西野瑞穂歯科臨床医学奨励賞 受賞総説

---

### 炎症環境による歯髄細胞の幹細胞化

#### —歯髄細胞分化に与える腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の影響—

上枝 麻友

キーワード：歯髄細胞, TNF- $\alpha$ , 幹細胞化

### Reprogramming of Human Dental Pulp Cells Mediated by Inflammatory Signals

#### —Effects of TNF- $\alpha$ on Human Dental Pulp Cell Differentiation—

Mayu UEDA

**Abstract :** During normal pulp tissue healing, inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) or interleukins, act in the initial 48 hours (inflammatory phase) and play important roles not only as chemo-attractants of inflammatory cells and stem/progenitor cells but also in inducing a cascade of reactions toward tissue regeneration or reparative dentin formation or both. Previous reports have shown that inflammatory cytokines regulate the differentiation capacity of dental pulp stem/progenitor cells (DPCs), but none has interrogated the impact of these cytokines on the stem cell phenotype of stem/progenitor cells.

In this review, I would like to summarize about the effects of a short-term treatment with TNF- $\alpha$  on the stem cell phenotype and differentiation ability of human DPCs.

#### はじめに

象牙質・歯髄複合体は自己修復能を持っており、齧蝕、咬耗、摩耗や窩洞形成などの歯の損傷時には歯髄保護のために象牙質の修復が起きることが知られている<sup>1-3)</sup>。すなわち、象牙質に及ぶような歯の損傷は象牙芽細胞の損傷と歯髄の炎症反応を惹起する。炎症が惹起されると、好中球や単球から炎症性サイトカインやケモカインが放出され、それに引き続き血管新生が誘導され、さらに既存の象牙芽細胞が再活性化されて象牙質の再生が生じる、あるいは、歯髄内に存在する前駆細胞や歯髄幹細胞が新たに象牙芽細胞に分化し象牙質の再生が生じると推測されている。

ところで、炎症性サイトカインのひとつである腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) は、マクロファージや好中球だけな

く骨髄細胞や線維芽細胞、滑膜細胞など様々な細胞から産生され、その生物活性に深く関与している。TNF- $\alpha$  の過剰な産生は、破骨細胞の活性化により骨吸収を促進したり<sup>4)</sup>、線維芽細胞や滑膜細胞へ作用し、コラゲナーゼやプロスタグランジン合成を促進し関節破壊や関節痛を引き起こす<sup>5)</sup>。さらには、血管内皮細胞へ作用し血管透過性の亢進やそれに伴う腫脹・浮腫の増悪などを惹起することがよく知られている。また、B細胞、T細胞、形質細胞に作用し、過剰な免疫応答を引き起こすこともある。

このようにTNF- $\alpha$ は、炎症性サイトカインとしてホストパラサイト相互作用や侵害受容入力、組織損傷における重要な因子として機能することが知られてきた。一方、最近になって、組織損傷の局所において初期の段階

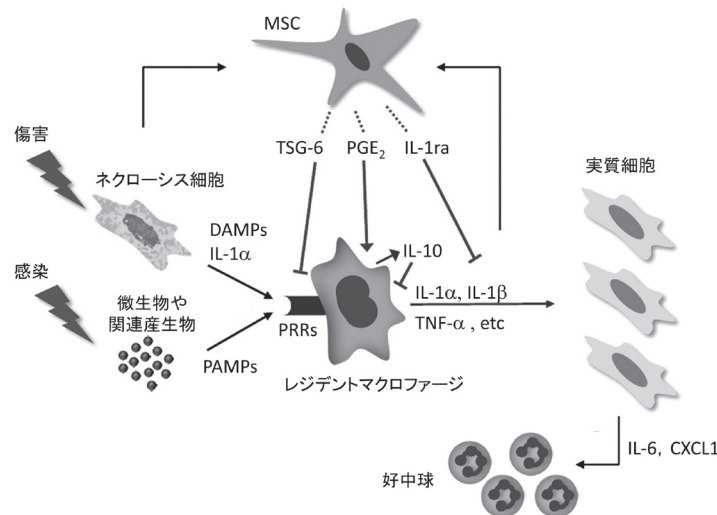


図1 間葉系幹細胞における抗炎症作用の模式図  
Prockop D J and Oh J Y: Mol Ther. (2012) より改変して転載

で  $\text{TNF-}\alpha$  が発現し、様々な成長因子やサイトカインの発現を誘導したり、細胞遊走を促進したりして組織再生に参与する可能性が示唆されるようになった。例えば、骨折部位に  $\text{TNF-}\alpha$  を作用させると、仮骨内の軟骨細胞の肥大化が促進され、骨のリモデリングが早期に生じて石灰化が亢進し、骨折治癒が促進されるという報告がある<sup>6)</sup>。さらに、 $\text{TNF}$  レセプター欠損マウスでは、仮骨内の軟骨細胞の肥大化が抑制され、骨のリモデリングが遅延し、骨折部位には疎性結合組織が満たされることにより骨折治癒が遅延するとも報告されている<sup>7)</sup>。すなわち、創傷治癒過程の初期段階においては  $\text{TNF-}\alpha$  のシグナルが組織修復の重要な役割を担っていることが示唆されている。

炎症再生連関を理解する上で忘れてはならないのが、間葉系幹細胞の働きである。Prockop によると、組織に加わる傷害や感染に伴ってマクロファージが  $\text{TNF-}\alpha$  や  $\text{IL-1}\beta$  のような炎症性サイトカインを産生し、これらが炎症カスケードの引き金を引くと同時に、間葉系幹細胞を活性化させ  $\text{TNF-stimulated gene 6 protein (TSG-6)}$  等の抗炎症効果を持つ因子を産生し、活性化されたマクロファージを調節、炎症性サイトカインの下流の反応を抑制するとともに再生のドライブを活性化すると推測されている<sup>8)</sup> (図1)。このような炎症の調節と再生促進機序の存在は、硬組織に取り囲まれ血行が悪い閉鎖空間に頻繁に傷害刺激が加わる歯髓組織にとっても重要な機能と考えられる。実際、私たちはマウス露髓モデルを作製し、前駆細胞や歯髓幹細胞が露髓刺激により誘導されることを間葉系幹細胞のマーカである  $\text{CD146}$  の免疫染色にて確認をしている (図2)。

事実、齶蝕に罹患した象牙芽細胞層では正常な象牙芽細胞に比べて  $\text{TNF-}\alpha$  が高発現しており<sup>9)</sup>、歯髓炎を起こした歯髓組織内には正常歯髓組織と比べると20～

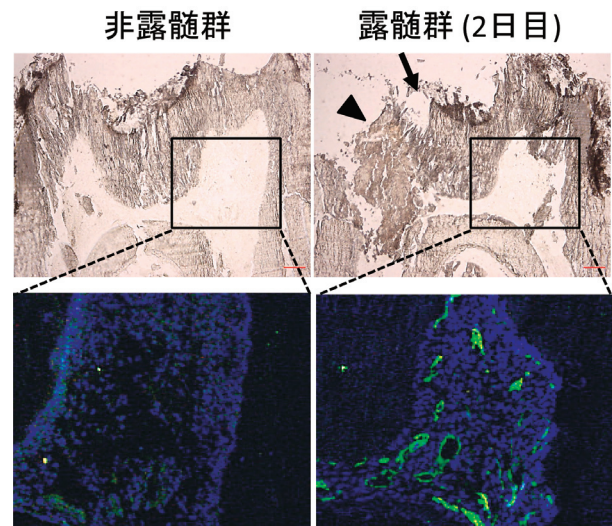


図2 露髓モデルにおける歯髓腔内の幹細胞マーカー  $\text{CD146}$  の発現パターン

30倍の高濃度で産生されているという<sup>10)</sup>。通常、このような閉鎖空間で高濃度の  $\text{TNF-}\alpha$  に暴露された場合には、細胞死が引き起こされても不思議はない。しかし、 $\text{TNF-}\alpha$  を培養ヒト歯髓幹細胞に対して投与すると、 $\text{dentin sialoprotein (DSP)}$ 、 $\text{dentinophosphophoryns (DPP)}$ 、 $\text{dentin matrix protein (DMP-1)}$  や  $\text{osteocalcin}$  の産生を誘導し、石灰化を促進するという報告<sup>11)</sup>がある。すなわち、組織損傷や感染により生じた炎症環境、なかでも炎症時に産生される  $\text{TNF-}\alpha$  が歯髓幹細胞ならびに周囲の細胞を刺激し再生機転を促すと考えられる。

しかし、歯髓の炎症現場で再生機転を有効に働かせるには、象牙芽細胞の分化誘導を引き起こすだけでは不十分で、その場の血液循環を回復し、多様な細胞社会からなる組織修復を達成するために、間葉系幹細胞の誘導・

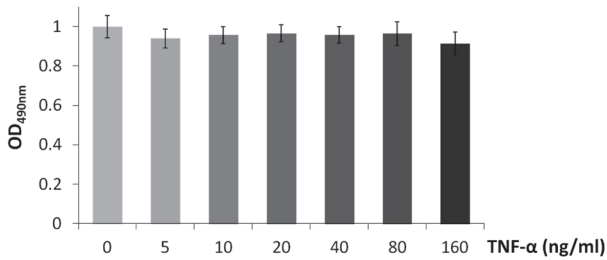


図3 TNF- $\alpha$  刺激がヒト歯髄細胞の生細胞数に及ぼす影響  
TNF- $\alpha$  (0~160 ng/ml) 添加における3日後の歯髄細胞の細胞増殖活性を示す。各濃度 n=4。

活性化, 増殖, 多分化能の獲得が不可欠と考えられる。

そこで, 初期の炎症環境で放出される TNF- $\alpha$  が歯髄細胞に及ぼす影響を明らかにするため, *in vitro* において, 歯髄細胞に TNF- $\alpha$  を作用させ分子生物学的検討を行った。その結果, 多分化能を有する細胞の比率が上昇するという大変興味深い結果を得たので, 報告する。

#### TNF- $\alpha$ が歯髄細胞の生存に与える影響

炎症性サイトカインのひとつである TNF- $\alpha$  は炎症, 免疫および細胞の生死に関与する因子として知られており, 敗血症ショック, 全身性エリテマトーデスや慢性関節リウマチといった自己免疫疾患, 動脈硬化, 糖尿病などの様々な疾病の病態に関与している。歯髄組織においても齶蝕や外傷により炎症が惹起された歯髄組織では TNF- $\alpha$  が上昇しており<sup>10,12)</sup>, 象牙質修復への関与が示唆されているがその詳細なメカニズムは不明である。

そこでまず, TNF- $\alpha$  が歯髄細胞の生存に与える影響について検討した。培養ヒト歯髄細胞に対して, 0~160 ng/ml の TNF- $\alpha$  を添加して2日間培養したところ, この範囲内では濃度が上昇しても生細胞数の減少は認められなかった(図3)。このことから, 短期間の TNF- $\alpha$  刺激は培養ヒト歯髄細胞の生死にはほとんど影響を及ぼさないことが明らかとなった。

ところで, 骨髄由来間葉系幹細胞に TNF- $\alpha$  を作用させるとアポトーシスが誘導されることや<sup>13)</sup>, 歯髄幹細胞においても TNF- $\alpha$  の強力な誘導因子であるリポポリサッカロイドを作用させると歯髄幹細胞のアポトーシスが生じることが知られている<sup>14)</sup>。本実験では, コントロール群と TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) を添加して2日間培養した TNF- $\alpha$  添加群において, 核をヘキスト 33342 で染色したところアポトーシス細胞に見られるような核の凝集や断片化は観察されなかった。さらに, 同時期の細胞のカスパーゼ活性は TNF- $\alpha$  添加によりわずかに活性が上昇するもののコントロール群と比較すると大きな差は認められなかった(未発表データ)。Block ら<sup>15)</sup> の報告によると間葉系幹細胞から産生されるスタニオカルシン-1 は細胞のアポトーシスを抑制するとされている。これら

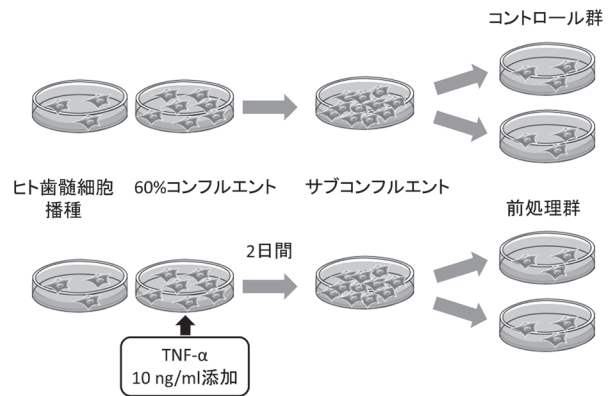


図4 TNF- $\alpha$  前処理実験  
コントロール群: 通法通り培養したヒト歯髄細胞。  
TNF- $\alpha$  前処理群: 60%コンフルエントとなったヒト歯髄細胞に TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) を添加, 2日間培養の後, TNF- $\alpha$  を完全に除去して継代培養を行ったもの。

から考えると, 本実験に用いた 10 ng/ml の濃度で TNF- $\alpha$  短期間刺激という実験条件は, 今回の条件で単離された歯髄細胞においてアポトーシスを誘導しないものと推測された。

#### TNF- $\alpha$ 前処理による歯髄細胞の幹細胞化

##### 1. TNF- $\alpha$ による歯髄細胞の前処理実験

Tani-Ishii らは, ラットの実験的露髄モデルでは露髄直後から4日目にかけて TNF- $\alpha$  陽性細胞が増加し, その後徐々に減少していくことを報告している<sup>16)</sup>。つまり, 歯髄炎において, 歯髄細胞は TNF- $\alpha$  に継続的に長期間曝露されるのではなく, 比較的短期間曝露されると考えられる。そこで, 歯髄の炎症環境を *in vitro* において模するために「TNF- $\alpha$  による歯髄細胞の前処理実験」を行った。すなわち, ヒト歯髄細胞の一方をコントロール群として通法通りに培養し, 他方はサブコンフルエントとなったヒト歯髄細胞に TNF- $\alpha$  を 10 ng/ml の濃度で添加し2日間培養した後, TNF- $\alpha$  を完全に除去するために継代培養を行い「TNF- $\alpha$  前処理群」とした。TNF- $\alpha$  で前処理することにより, 歯髄細胞の性質がどのように変化するかを検証した(図4)。

細胞免疫染色において, TNF- $\alpha$  を 10 ng/ml の濃度で添加し2日間培養した培養ヒト歯髄細胞は未処理の歯髄細胞と比較して間葉系幹細胞のマーカーである STRO-1, SSEA4 の陽性細胞数が増加した。TNF- $\alpha$  前処理群においても添加群と同様に陽性細胞数が増加した(図5)。FACS 解析においても, TNF- $\alpha$  添加群および TNF- $\alpha$  前処理群において間葉系幹細胞マーカーの SSEA4 および CD146 の陽性率が上昇した一方で, 骨分化誘導した培養ヒト歯髄細胞ではともに陽性率がコントロール群以下にまで低下した(図6)。



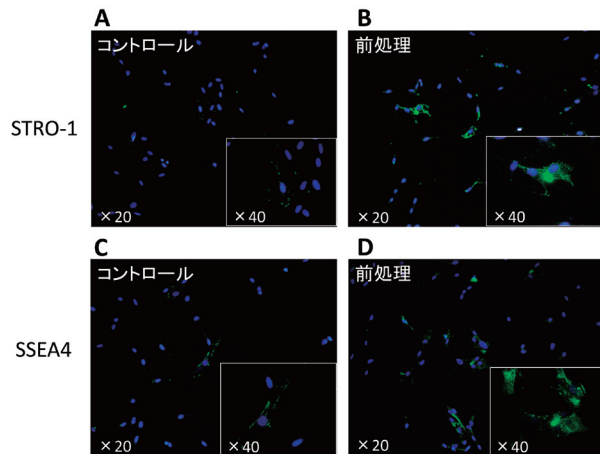


図5 細胞免疫染色による幹細胞の表面抗原マーカーの解析

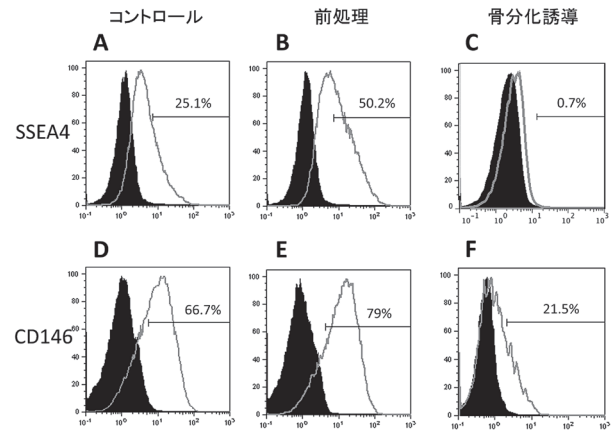


図6 FACSによる幹細胞の表面抗原マーカーの解析

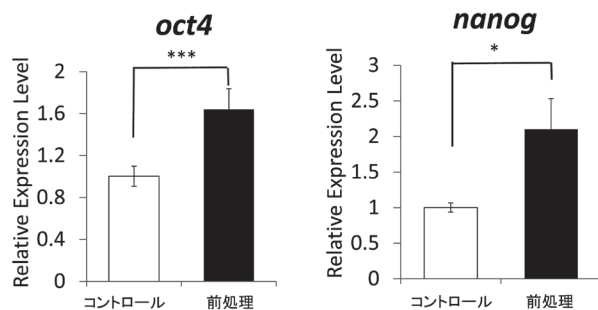


図7 リアルタイム RT-PCR を用いた幹細胞マーカーの mRNA 発現の解析

TNF- $\alpha$  前処理による *oct4* および *nanog* の発現量の変化を RT-PCR にて検討した。TNF- $\alpha$  で前処理することにより、*oct4* ( $n = 3$ ,  $P < 0.001$ ) および *nanog* ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ) の遺伝子発現量が有意に上昇した (t-test)。値は内部標準である s29 mRNA の増幅産物量に対する目的 mRNA の増幅産物量の相対比を示す。

Yang ら<sup>17)</sup> の報告によるとラット骨髄由来間葉系幹細胞から誘導した神経細胞あるいは上皮細胞は、培養条件を変えると一度幹細胞様細胞に脱分化した後に神経細胞は上皮細胞に、上皮細胞は神経細胞に分化できることが示されている。また、神経細胞に分化誘導した骨髄由来間葉系幹細胞を脱分化させると多分化能を再獲得することも示されている<sup>18)</sup>。さらに、分化したケラチノサイトは bFGF の刺激により前駆細胞に脱分化すること<sup>19)</sup> や成熟脂肪細胞を脱分化させることにより多分化能を獲得すること<sup>20)</sup> など一度分化した細胞がある刺激をうけることにより脱分化し幹細胞様の性質を獲得することが近年報告されている。これらの既存の報告と、今回の実験結果である SSEA4 および CD146 が細胞の分化が進むとその陽性率が低下し、TNF- $\alpha$  刺激により陽性率が上昇したことを併せて考えると、TNF- $\alpha$  添加群および

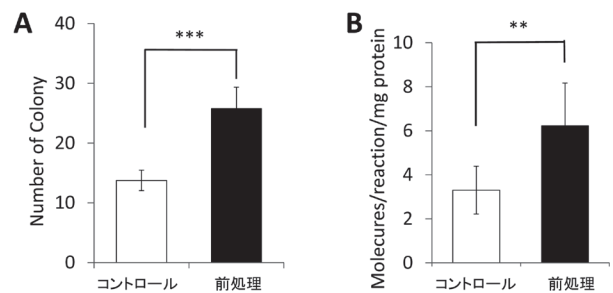


図8 幹細胞の保持する性質に与える影響

A. CFU-F assay による評価。各群共に 14 日間培養後の細胞をトルイジンブルーで染色し、50 個以上の細胞から形成されるコロニー数を計測した。TNF- $\alpha$  前処理群はコントロール群と比較して、コロニー形成能が有意に高いことが明らかとなった ( $n = 4$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )。B. テロメラーゼ活性。TNF- $\alpha$  前処理群において有意に上昇した ( $n = 9$ , \*\*  $P < 0.01$ )。

TNF- $\alpha$  前処理群における陽性率の上昇は TNF- $\alpha$  刺激により歯髄細胞がより未分化な状態に変化した、すなわち幹細胞様の性質を新たに獲得したと推測される。

そこで、次に TNF- $\alpha$  前処理により培養ヒト歯髄細胞が幹細胞様の性質を獲得したかどうかを検討した。まず、コントロール群と TNF- $\alpha$  前処理群において、*oct4* および *nanog*<sup>21-23)</sup> の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR にて比較した。TNF- $\alpha$  前処理により *oct4*、*nanog* とともにコントロール群よりも遺伝子発現が亢進した (図 7)。また、幹細胞の持つ特性であるコロニー形成能およびテロメラーゼ活性も、それぞれ TNF- $\alpha$  前処理により上昇した (図 8 A, B)。

本実験で用いた培養ヒト歯髄細胞は純粋な歯髄幹細胞の集団ではなく、前象牙芽細胞や歯髄線維芽細胞を含む分化度が異なる、あるいは分化の方向性が異なるヘテロ

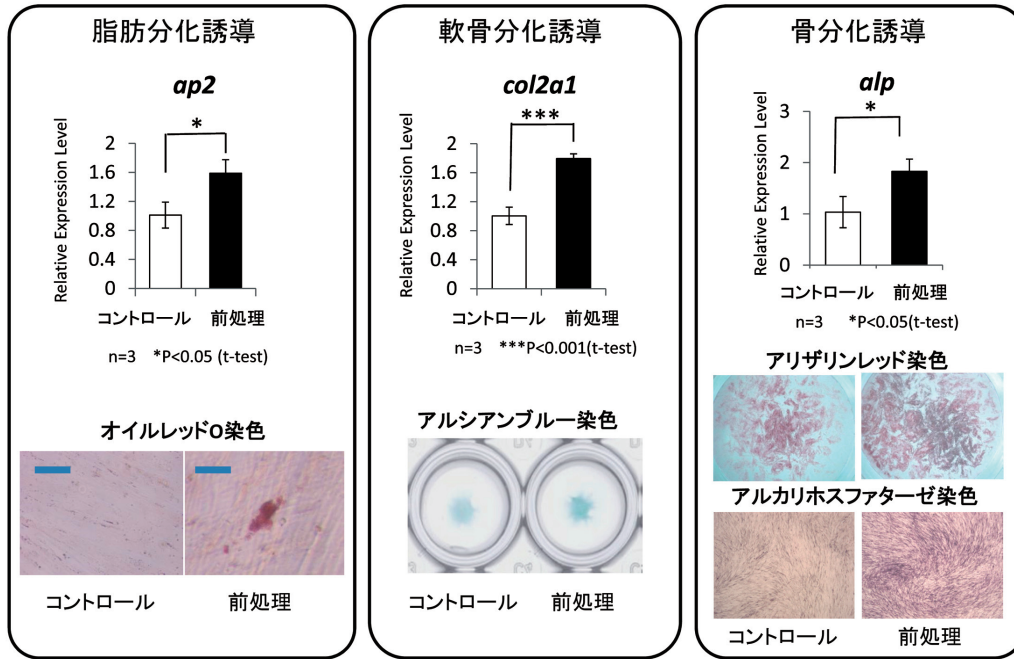


図9 リアルタイム RT-PCR を用いた TNF- $\alpha$  前処理による多分化能の検討  
 TNF- $\alpha$  前処理群の細胞において各種マーカー遺伝子である *ap2*, *col2a1*, *alp* の発現が有意に上昇した。また、オイルレッド O, アルシアンブルー, アリザリンレッド S, アルカリホスファターゼの染色性は全て前処理群で亢進した。バーの長さは 100  $\mu$ m を示す。

な細胞集団である。これら細胞集団に TNF- $\alpha$  を添加することで、生細胞数には変化がなく、幹細胞様の性質を持つ細胞の比率が増加したことを考えると、TNF- $\alpha$  刺激により分化した細胞が脱分化することにより、自己複製能を有する幹細胞様細胞が増加したと推測された。

## 2. TNF- $\alpha$ 前処理歯髄細胞の多分化能

そこで、TNF- $\alpha$  で前処理した歯髄細胞の多分化能を各種細胞のマーカー遺伝子の発現および染色にて検討した。コントロール群と比較すると TNF- $\alpha$  前処理群ではより短期間で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化誘導することが可能であった (図9)。つまり TNF- $\alpha$  で前処理することにより培養ヒト歯髄細胞は分化誘導を受けやすくなることが明らかとなった。このことから、前処理を施した培養ヒト歯髄細胞においては一度分化した細胞、分化の方向性の決定した細胞が再び多分化能を獲得したことを示唆しているものと考えられる。

## おわりに

歯髄細胞中には分化した象牙芽細胞や象牙芽細胞に分化しうる多能性歯髄幹細胞だけでなく歯髄線維芽細胞が存在している。そして歯髄線維芽細胞の多くも潜在的に硬組織形成能を有しており、象牙芽細胞が障害を受けた際には象牙芽細胞に新たに分化することが知られている。実際に Paula-Silva ら<sup>11)</sup> は、培養ヒト歯髄細胞を

TNF- $\alpha$  で刺激すると象牙芽細胞への分化が促進されることを示しているが、その詳細な分化誘導メカニズムは不明のままである。しかし、今回の研究で明らかとなった TNF- $\alpha$  の歯髄細胞に対する脱分化作用と併せ考えると、TNF- $\alpha$  は炎症環境において創傷部位近辺の分化の進んだ細胞 (歯髄線維芽細胞等) を一度未分化な状態、いわゆる多分化能を有する幹細胞様細胞に脱分化させ、再生に必要な細胞成分を供給する役割を担っていると同時に、新たに誘導された幹細胞様細胞の抗炎症作用により局所の炎症を制御して組織再生に関与している可能性が示唆された。もちろん、本研究で用いた歯髄細胞が単一の細胞からなる細胞集団ではないため、TNF- $\alpha$  前処理による幹細胞マーカーの上昇は歯髄細胞中に存在する歯髄幹細胞そのものが増殖した結果によるものか、分化の進んだ細胞が脱分化したことによって引き起こされているのかは十分明らかではない。しかし予備実験の段階ではあるが CD146 陰性歯髄細胞を TNF- $\alpha$  で刺激すると CD146 陽性細胞が出現することから、少なくとも分化の進んだ細胞の一部は TNF- $\alpha$  刺激により脱分化し幹細胞化が引き起こされると思われる。今後は、どのような細胞でこのような脱分化反応が生じるのか、またどのようなシグナル経路が関与して TNF- $\alpha$  による歯髄細胞の幹細胞化が起きているのか等について検討を行い、歯髄細胞の幹細胞化に関与する因子を同定したいと考えている。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野 窪木拓男教授に深甚なる感謝の意を表します。さらに現在本研究を進めるにあたり種々の御配慮、御援助、御助言をいただいております徳島大学大学院医歯薬学研究部顎機能咬合再建学分野 松香芳三教授はじめ諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究は JSPS 科研費 (24792084, 26861640) の助成を受けたものです。

## 文 献

- 1) Goldberg M and Smith A J: Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 13-27 (2004)
- 2) 大島勇人: 歯の損傷後の歯髄修復過程と象牙質・歯髄複合体の生物学的特性. *新潟歯学会雑誌* 34, 165-177 (2004)
- 3) Cooper P R, Takahashi Y, Graham L W, Simon S, Imazato S and Smith A J: Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 38, 687-697 (2010)
- 4) Graves D T, Li J and Cochran D L: Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 90, 143-153 (2011)
- 5) Parameswaran N and Patial S: Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20, 87-103 (2010)
- 6) Glass G E, Chan J K, Freidin A, Feldmann M, Horwood N J and Nanchahal J: TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1585-1590 (2011)
- 7) Gerstenfeld L C, Cho T J, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes G L, Graves D T and Einhorn T A: Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 18, 1584-1592 (2003)
- 8) Prockop D J and Oh Y J: Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther* 20, 14-20 (2012)
- 9) Horst O V, Horst J A, Samudrala R and Dale B A: Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMS Immunol* 12, 9 (2011)
- 10) Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M and Simunovic-Soskic M: Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res* 33, 482-448 (2002)
- 11) Paula-Silva F W, Ghosh A, Silva L A and Kapila Y L: TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res* 88, 339-344 (2009)
- 12) Bletsas A, Heyeraas K J, Haug S R and Berggreen E: IL-1 alpha and TNF-alpha expression in rat periapical lesions and dental pulp after unilateral sympathectomy. *Neuroimmunomodulation* 11, 376-384 (2004)
- 13) Ghali O, Chauveau C, Hardouin P, Broux O and Devedjian J C: TNF-alpha's effects on proliferation and apoptosis in human mesenchymal stem cells depend on RUNX2 expression. *J Bone Miner Res* 25, 1616-1626 (2010)
- 14) Yang H, Zhu Y T, Cheng R, Shao M Y, Fu Z S, Cheng L, Wang F M and Hu T: Lipopolysaccharide-induced dental pulp cell apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in vitro. *Braz J Med Biol Res* 43, 1027-1033 (2010)
- 15) Block G J, Ohkouchi S, Fung F, Frenkel J, Gregory C, Pochampally R, DiMattia G, Sullivan D E and Prockop D J: Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* 27, 670-681 (2009)
- 16) Tani-Ishii N, Wang C Y and Stashenko P: Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol* 10, 213-219 (1995)
- 17) Liu Y, Jiang X, Yu M K, Dong J, Zhang X, Tsang L L, Chung Y W, Li T and Chan H C: Switching from bone marrow-derived neurons to epithelial cells through dedifferentiation and translineage redifferentiation. *Cell Biol Int* 34, 1075-1083 (2010)
- 18) Liu Y, Jiang X, Zhang X, Chen R, Sun T, Fok K L, Dong J, Tsang L L, Yi S, Ruan Y, Guo J, Yu M K, Tian Y, Chung Y W, Yang M, Xu W, Chung C M, Li T and Chan H C: Dedifferentiation-reprogrammed mesenchymal stem cells with improved therapeutic potential. *Stem Cells* 29, 2077-2089 (2011)
- 19) Sun X, Fu X, Han W, Zhao Y, Liu H and Sheng Z: Dedifferentiation of human terminally differentiating keratinocytes into their precursor cells induced by basic fibroblast growth factor. *Biol Pharm Bull* 34, 1037-1045 (2011)
- 20) Shen J F, Sugawara A, Yamashita J, Ogura H and Sato S: Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose tissues. *Int J Oral Sci* 3, 117-124 (2011)
- 21) Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H and Smith A: Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391 (1998)
- 22) Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M and Yamanaka S:

The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642 (2003)

- 23) Boyer L A, Lee T I, Cole M F, Johnstone S E, Levine S S, Zucker J P, Guenther M G, Kumar R M, Murray H L, Jenner R G, Gifford D K, Melton D A, Jaenisch R and Young R A: Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956 (2005)