

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871115

研究課題名(和文) iPS細胞誘導技術を駆使した哺乳類新型多能性幹細胞株の樹立

研究課題名(英文) Establishment of novel pluripotent stem cells in mammals by iPS technology.

## 研究代表者

築山 智之 (TSUKIYAMA, Tomoyuki)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・助教

研究者番号：60612132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞誘導技術を用いた動物種を問わないユニバーサルな培養条件評価系を開発し、マウス-ラット異種間キメラ内でラットiPS細胞由来の機能的なラット生殖細胞を世界で初めて作出した。さらに、GSK3阻害剤を含むエピプラスト幹細胞培養条件でES細胞を培養することで、ES細胞とエピプラスト幹細胞の中間の性質を示す一方、キメラ貢献能、生殖細胞寄与能を有する新規の多能性幹細胞を樹立し、INTPS細胞と名付けた。この培養条件はLIFシグナリングに依存せずに多能性を維持することができ、非齧歯類における新規多能性幹細胞株を樹立する上で有用である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We developed a comprehensive system for generation and evaluation of iPS cells and generated functional rat germ cells from rat iPS cells in mouse-rat interspecific chimeras. Additionally, we generated a novel pluripotent stem cells named INTPS cells by culturing ES cells in EpiSC medium containing a GSK3 inhibitor. The INTPS cells have intermediate feature between ES cells and EpiSCs and have an ability to contribute to chimeras and their germline. We proposed that this culture condition is useful for generating novel pluripotent stem cells in non-rodent species, because this culture condition enables us to establish pluripotent stem cells independently from LIF signaling.

研究分野：幹細胞

キーワード：iPS細胞 異種間キメラ 新型多能性幹細胞 INTPS細胞 ラットiPS細胞 TS細胞 トランスポゾン pi ggyBac

## 1. 研究開始当初の背景

近年、マウスとヒトの多能性幹細胞の差異に関する研究が進み、多能性幹細胞という大きなグループの中でも性質が異なる複数のカテゴリーが存在し、マウス型の多能性幹細胞はヒト型の多能性幹細胞と比べ、より未分化で、より広範囲に分化可能な多能性の“naïve”な状態にあることが示唆されており、ヒト型の多能性幹細胞はむしろ、エピプラスト由来の幹細胞であるエピプラストstemセル (EpiSC) に対応する細胞種である (naïve と対比して “primed” な状態であると名付けられている) と考えられている。さらに、マウス ES 細胞様の “naïve” な状態の細胞集団中にも複数のカテゴリーが存在し、生殖細胞を含む全ての細胞種に分化可能な最も未分化な集団と、“primed” な状態にコミットメントする前の “transition state” にある集団との間で行き来していると考えられており、前者の最も未分化な集団は多能性の “ground state (基底状態)” にあると定義付けられている。

マウスにおいては従来、LIF および血清 (または BMP4) の存在下で培養することにより “naïve” な状態にある多能性幹細胞株が樹立できることが知られていたが、近年になり、Mek/Erk・GSK3 阻害によって多能性 “基底状態” にある「真の」多能性幹細胞を濃縮できることが示され、この培養条件を使用することによってラットにおいても ES・iPS 細胞株が樹立できることが明らかとなった。

一方、“primed” な状態にあるヒト型の多能性幹細胞はラット、ブタを始め、様々な動物種において樹立できることが知られているが、キメラに寄与できないという大きな弱点を抱えている。また、そもそも “naïve” な状態に比べ分化が進んだ段階にあるためか、“primed” な状態にあるヒト iPS・ES 細胞は、樹立する機関、人物によって性質に偏りが生じ、細胞株間における分化能の偏りが顕著であることが近年問題化してきており、“primed” な状態にあるヒト多能性幹細胞を “naïve” もしくは “基底状態” に変化させる試みが世界中で進んでいる。

しかし、これらの研究の進展にも関わらず、依然としてマウス・ラットといった齧歯類以外の動物種においては、ヒトを含め、キメラ貢献能・生殖細胞寄与能の指標を満たすような「真の」多能性を有する “naïve” もしくは “基底状態” にある多能性幹細胞株を再現性よく樹立できる報告はなく、樹立する試みがいくつか論文として報告されているものの、得られた細胞株はいずれも導入した外来遺伝子の発現に依存的であり、外来遺伝子非依存的に安定して増殖できる細胞株は得られていない。なお、ヒト iPS・ES 細胞の不均一性に加え、培養の煩雑さ、不安定さ、増殖の遅さ、遺伝子導入の難しさもこの問題に起因していると考えられ、ブタ、サル等の大

型哺乳動物を用いた医用モデル動物の作出、前臨床試験の実施も同一の理由により儘ならないのが実情である。

## 2. 研究の目的

今日の状況を招いた大きな要因として、大型哺乳動物やヒトの初期胚を用いた細胞株の樹立実験は材料的・倫理的律速から困難であり、十分に理想的な培養条件を検討することが難しく、最初のヒト ES 細胞樹立報告の条件が標準的手法として定着したことが挙げられると考えた。しかし今日においては、iPS 細胞技術の確立により初期胚を破壊すること無く直接体細胞から多能性状態を誘導することが可能である。

そこで我々は**独自に確立した高効率かつ精密な iPS 細胞樹立系を駆使することによって、従来報告された培養条件にとらわれることなく、新規の培養条件を探索することで、現存の非齧歯類多能性幹細胞の欠点を克服した新型多能性幹細胞株を樹立できる**と考えた。

本研究では、iPS 細胞樹立技術を応用したスクリーニング手法を用いて新規の培養条件を同定、評価し、既存のヒト iPS・ES 細胞の欠点を克服した、マウス iPS・ES 細胞の能力に匹敵する、生殖細胞寄与能を持つような「真の」多能性を有する新型幹細胞株を、ヒトを含む様々な動物種で樹立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

piggyBac 遺伝子導入系を用い、外来性リプログラミング因子の発現をドキシサイクリンの添加の有無によって任意に制御可能としたポリシストロニックカセット (TET-ON リプログラミング因子) と、樹立した細胞の多能性・キメラ貢献能・生殖細胞寄与能を評価するための蛍光レポーター (EOS レポーター、RFP レポーター、Acrosin レポーター) を体細胞に導入して iPS 細胞を誘導する動物種を問わないユニバーサルな培養条件評価系を開発し、まずは 129B6F1 系統および従来 ES 細胞株を得ることが困難であった NOD 系統由来マウス胎仔線維芽細胞を用い、新規培養条件の組織的探索が可能であるかどうか、同定した新規条件を用いて樹立した細胞株が多能性を有するかどうかについて検証した。

この際、フィーダー細胞の有無、細胞外マトリックス、基礎培地、血清、血清代替物、ペプチド、増殖因子、化合物等の組み合わせについて培養条件の探索を行った。また、新規培養条件を用いてマウス胚盤胞から直接多能性幹細胞株を樹立することや、従来のマウス ES 細胞を数継代の内に適応させることも可能であるか確認した。

また、樹立した細胞株について、コロニー形態・増殖の確認、表面抗原・多能性遺伝子

の発現解析、X染色体活性化状態の確認、胚様体およびテラトマ形成を介した invitro での分化能の確認を行った。なお、この際、キメラ寄与率が低い場合に備え、CAG プロモーター制御下で恒常的に赤色蛍光蛋白質 (RFP) を発現するレポーター、および精子特異的遺伝子である Acrosin の発現制御下において GFP を発現するレポーターを同時に導入した。これにより、**キメラの全身への寄与を視覚的に判定でき、交配すること無く生殖細胞寄与能を迅速に評価可能となる**と同時に、**ドナー由来精子細胞を選別して卵細胞質内精子注入法 (ICSI) に用いることも可能**とした。

#### 4. 研究成果

piggyBac 遺伝子導入系を用い、外来性リプログラミング因子の発現をドキシサイクリンの添加の有無によって任意に制御可能としたポリシストロニックカセット (TET-ON リプログラミング因子) と、樹立した細胞の多能性・キメラ貢献能・生殖細胞寄与能を評価するための蛍光レポーター、RFP レポーター、Acrosin レポーター) を体細胞に導入して iPS 細胞を誘導する動物種を問わないユニバーサルな培養条件評価系を開発し、129B6F1 系統および従来 ES 細胞株を得ることが困難であった NOD 系統由来マウス胎仔線維芽細胞、およびラット胎仔線維芽細胞から、従来の培養条件を用いて生殖細胞寄与能を持つマウスおよびラット iPS 細胞を樹立できることを示した上、マウス-ラット異種間キメラ内でラット iPS 細胞由来の機能的なラット生殖細胞を世界で初めて作出し、蛍光レポーターの発現によって非侵襲的にキメラ貢献能、生殖細胞寄与能を評価できる実験系の有用性を示した。(Tsukiyama T. et al., 2014, PLoS ONE, 9(3): e92973)

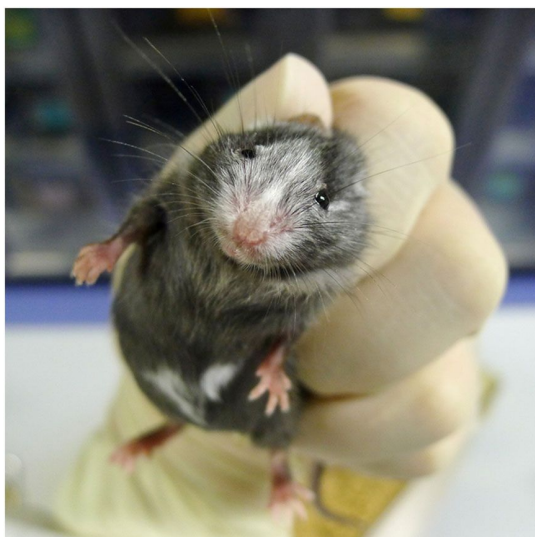


図 1. 本研究で作出されたマウス-ラット異種間キメラ

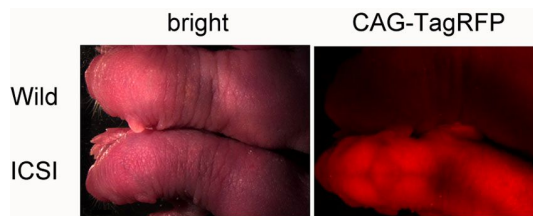


図 2. マウス-ラット異種間キメラ内で発生したラット iPS 細胞由来精子から作出したラット産仔

さらに、GSK3 阻害剤を含むエピプラスト幹細胞培養条件を用いて ES 細胞を培養すると、ES 細胞とエピプラスト幹細胞の中間の性質を示す新規の多能性状態に安定化することを見出し、Intermediate Pluripotent Stem Cell (INTPS 細胞) と名付けた。

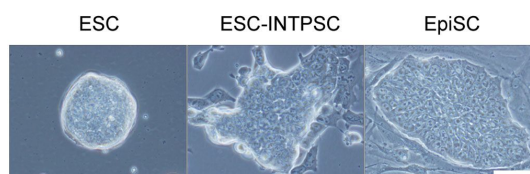


図 3. 本研究で樹立された INTPS 細胞のコロニー形態

また、前述の実験系により、これらの細胞がキメラ貢献能、生殖細胞寄与能を有することを示した。この培養条件は LIF シグナリングに依存せずに多能性を維持することができ、非齧歯類における新規多能性幹細胞株を樹立する上で有用である可能性があり、論文として報告した。(Tsukiyama T. et al., 2014, PLoS ONE, 9(3): e95329)

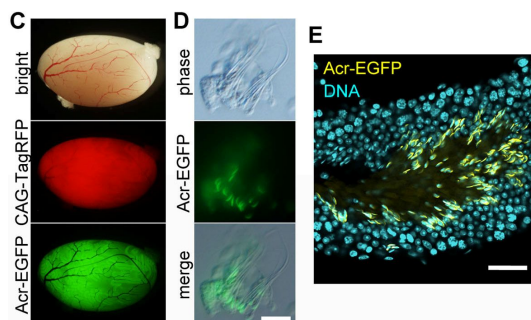


図 4. INTPS 細胞を用いて作製したキメラの精巢内において発生した INTPS 細胞由来精子

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

- 1) Suzuki S., Tsukiyama T., Kaneko T., Imai H. and Minami N., A hyperactive piggyBac

transposon system is an easy-to-implement method for introducing foreign genes into mouse preimplantation embryos., The Journal of Reproduction and Development、査読有、in press、2015、DOI:

10.1262/jrd.2014-157

2) Ohinata Y. and Tsukiyama T.、

Establishment of trophoblast stem cells under defined culture conditions in mice.,

PLoS ONE、査読有、第9巻第9号、e107308、2014、DOI: 10.1371/journal.pone.0107308

3) Tsukiyama T. and Ohinata Y.、A Modified EpiSC Culture Condition Containing a GSK3

Inhibitor Can Support Germline-Competent Pluripotency in Mice、PLoS ONE、査読有、

第9巻第4号、e95329、2014、DOI:

10.1371/journal.pone.0095329

4) Tsukiyama T.、Kato-Itoh M.、Nakauchi H. and Ohinata Y.、A Comprehensive System for

Generation and Evaluation of Induced

Pluripotent Stem Cells Using piggyBac

Transposition、PLoS ONE、査読有、第9巻第3号、e92973、2014、DOI:

10.1371/journal.pone.0092973

〔学会発表〕(計 6件)

1) 築山 智之、岩谷 千鶴、土屋 英明、清田 弥寿成、松下 淳、依馬 正次、ヒトおよびカニクイザル多能性幹細胞の培養における Wnt 阻害剤の影響、日本繁殖生物学会、2014 年 8 月 23 日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

2) Ohinata Y. and Tsukiyama T.、Germline contribution of rat iPS cells in mouse-rat interspecific chimeric animals.、日本繁殖生物学会、2014 年 8 月 21 日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

3) 川口 高正、築山 智之、松山 秀一、木村 康二、南 直治郎、山田 雅保、今井 裕、piggyBac トランスポゾンを用いたリプログラミング因子導入によるウシ羊膜細胞からの栄養膜細胞株樹立の試み、日本繁殖生物学会、2014 年 8 月 21 日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

4) 大日向 康秀、築山 智之、蛍光レポーターによる PGC 形成過程、精子形成過程、卵形成過程の可視化、日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 13 日、東京農工大学(東京都・府中市)

5) 川口 高正、築山 智之、南 直治郎、山田 雅保、松山 秀一、木村 康二、今井 裕、piggyBac トランスポゾンを用いたナীব型ウシ iPS 細胞の樹立の試み、日本繁殖生物学会、2013 年 9 月 13 日、東京農工大学(東京都・府中市)

6) Kawaguchi T.、Tsukiyama T.、Minami N.、Yamada M.、Kimura K. and Imai H.、Generation of murine-ES-cell-like iPS cells in cattle using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factor、CiRA International Symposium 2013 ~Raising the next generation of stem cell research~、2013 年 3 月 11 日、京都大学(京都府・京都市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築山 智之 (TSUKIYAMA, Tomoyuki)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・助教

研究者番号: 60612132

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: