

## 花園 豊

自治医科大学 分子病態治療研究センター 教授

### ヒト iPS 細胞の高品質化とその検証・応用

#### §1. 研究実施の概要

ヒトとマウスの iPS 細胞では、その状態が大きく異なることがわかってきた。マウス iPS 細胞の方がヒト iPS 細胞より初期(ナイーブな)状態に近い。マウス以外の動物の iPS 細胞もヒトのものに近い状態とされる。そこで、ヒトやサルやブタの iPS 細胞を初期状態にもちこみ、高品質化を図るのが本研究の目的である。高品質化すれば何が可能となるのか、応用例(単細胞分散培養や相同組換えや動物発生工学等)も示す。

本年度は、ブタ胎仔より線維芽細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いてブタ iPS 細胞を樹立した。このブタ iPS 細胞は、マウス iPS 細胞に非常によく似た形態を有し、増殖能・クローニング効率が高く、LIF に対する依存性があること、MHC クラス I の発現が低下していること、遺伝子導入が容易なことが分かった。また、X 染色体の再活性化が起こっている可能性が示唆された。これらの結果は、このブタ iPS 細胞が初期状態に近い細胞であることを示している。本当に初期状態にあるかどうかを確認するために、キメラ形成能について解析を行っている。

#### §2. 研究実施体制

##### (1)「花園」グループ(自治医科大学)

- ① 研究分担グループ長:花園 豊 (自治医科大学分子病態治療研究センター、教授)
- ② 研究項目
  - ・ ブタ iPS 細胞の作製
  - ・ 高品質化の検証(増殖能、クローニング効率、遺伝子操作のしやすさ)

##### (2)「長嶋」グループ(明治大学)

- ① 研究分担グループ長:長嶋 比呂志 (明治大学農学部、教授)
- ② 研究項目

- ・ ブタ iPS 細胞の発生実験(ブタ iPS 細胞のキメラ胚形成過程における挙動解析)

### §3. 研究実施内容

#### 研究目的:

ヒトとマウスの iPS 細胞では、その状態が大きく異なる。マウス iPS 細胞の方がヒト iPS 細胞より初期状態に近い。マウス以外の動物(サル・ブタ等)の iPS 細胞もヒトのものに近い状態とされる。そこで、ヒトやサルやブタの iPS 細胞を初期状態にもちこみ、高品質化を図るのが本研究の目的である。高品質化すれば何が可能となるのか、応用例(単細胞分散培養や相同組換えや動物発生工学等)も示す。

本年度は、ブタ iPS 細胞を作製し、三胚葉分化能、増殖能、クローニング効率等を評価した(花園)。また、ブタ iPS 細胞を、体外成熟卵由来のブタ単為発生胚に注入し、胚盤胞形成過程における注入細胞の挙動を観察した(長嶋)。

#### 研究方法:

(1) iPS 細胞の作製(花園): これまでに報告されたブタ ES/iPS 細胞は、ヒト ES/iPS 細胞と類似した性質を有する、いわゆるプライムされた(primed)細胞である。このプライムされた細胞は、Epi-stem cell (EpiSC)と類似した性質を有し、キメラ形成能やジャームライン・トランスミッション能がない。最近、ヒトにおいては初期(ナイーブな)状態に近いと思われる ES/iPS 細胞の樹立が報告された(Hanna et al., PNAS 2010)。そこで、この方法を準用してナイーブなブタ iPS 細胞の樹立を試みた。具体的には、クラウン系ミニブタ胎仔より線維芽細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いて山中 4 遺伝子を導入して、iPS 細胞用の培地(15%血清添加マウス ES 培地+LIF + forskolin)で培養した。

(2) iPS 細胞の発生実験(長嶋): ブタ卵の体外成熟、単為発生誘起および単為発生胚の体外培養条件は、既報の方法(Matsunari et al., 2008)に従った。単為発生後 3 日目(day-3)の 4-8 細胞期胚および 4 日目(day-4)の桑実期胚に、iPS 細胞を顕微注入した。GFP マーカーまたは Kusabira-Orange マーカー遺伝子を発現する iPS 細胞を、細胞集塊(Clump)として、あるいはトリプシン/EDTA 処理によって分散後に host 胚に注入した。iPS 細胞との対比のために、単為発生胚盤胞から免疫手術により単離した内部細胞塊(ICM)も注入に用いた。細胞注入後の体外培養培地として、ブタ胚培養用培地(PZM5, 機能性ペプチド研究所)の他、iPS 細胞用培地を用いた。注入する細胞の種類、細胞の処理法(clump または分散)、注入後の発生培地の種類などの諸条件が、胚発生ならびに注入細胞の挙動に及ぼす影響を検討した。注入細胞の挙動は、マーカーとして組み込まれている GFP、Kusabira-Orange の他、カルボシアニン色素(CM-DiI)の蛍光を指標として、ICM への寄与の有無ならびに栄養膜細胞層(Tr)への取り込みを基準に評価した。

## 結果と考察:

(1) iPS 細胞の作製(花園):クラウン系ミニブタ胎仔より線維芽細胞を採取し、レトロウイルスベクターを用いて山中 4 遺伝子を導入することにより、正常な核型を有し、各種未分化マーカーを発現し、三胚葉分化能を有するブタ iPS 細胞を樹立した。さらに、GFP または Kusabira-Orange マーカー遺伝子を発現するブタ iPS 細胞を作製した。これらのブタ iPS 細胞は、マウス iPS 細胞に非常によく似た形態(丸いドーム型)を有し、増殖能・クローニング効率も高く、LIF に対する依存性が有ること、遺伝子導入が容易なことが分かった。また、Xist の mRNA の解析から X 染色体の再活性化が起こっている(XaXa)可能性が示唆された。さらに、MHC クラス I の発現が低下していることも確認された。これらの結果は、このブタ iPS 細胞がナイーブであることを示唆している。

(2) iPS 細胞の発生実験(長嶋):ブタ iPS 細胞をブタ初期胚に注入した。桑実期に細胞注入を行った場合、50~90%の胚が胚盤胞期へ発達した。4-8 細胞期での細胞注入後も、胚盤胞への発達率は高く(73~89%)、iPS 細胞の注入がその後の胚発生を阻害することはないと考えられた。細胞注入後に得られた胚盤胞の観察において、蛍光を指標として注入細胞を追跡した結果、殆どの実験区において 60%以上の胚に注入細胞が存在していることが確認された。一方、注入細胞が ICM に寄与する率には実験区間の差(28~87%)が著しかった。注入後の胚発生率、キメラ胚形成率、そして ICM への寄与率のすべてが高いことが望ましいことを考えると、clump 状あるいは分散化 iPS 細胞を桑実期胚に注入する方法は、妥当であると考えられた。ICM の注入においては、胚盤胞への発達率(95%)、キメラ胚形成率(95%)、ICM への寄与率(90%)のいずれもが高かった。つまり、host 胚にとって ICM 細胞の注入は発生の阻害要因とはならず、また注入された ICM 細胞が胚盤胞の ICM に寄与する確立も高いことから、ICM 注入実験で得られた成績は、iPS 細胞の評価指標になり得ると思われる。

(3)まとめ:本年度は、ナイーブ状態に近いと思われるブタ iPS 細胞を作出した。そのブタ iPS 細胞がほんとうに初期状態にあるかどうかを検証するためのキメラ胚作製ならびに細胞追跡系(in vitro)を構築した。今後、iPS 細胞のキメラ胚への寄与を評価しつつ、キメラ形成能のより高い iPS 細胞の作製をめざす。併せて、樹立した iPS 細胞のキメラ形成能をある程度予測するための解析法(例えば Klf 遺伝子の挙動やエピジェネティクス解析)の開発も重要であろう。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Tomoyuki Abe, Shigeo Masuda, Hiroshi Ban, Satoshi Hayashi, Makoto Inoue,

Mamoru Hasegawa, Yoshikazu Nagao, and Yutaka Hanazono, “Ex vivo expansion of human HSCs with Sendai virus vector expressing HoxB4 assessed by sheep in utero transplantation”, *Experimental Hematology*, Vol. 39, No. 1, pp. 47-54, 2011. (doi:10.1016/j.exphem.2010.09.007)

**(4-2) 知財出願**

- ① 平成22年度特許出願件数(国内0件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内0件)