

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. 研究実施体制

(1)「花園」グループ

① 研究代表者: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

- ・ヒト・サル・ブタ iPS 細胞の高品質化(ナイーブ化)と、その細胞生物学・分子生物学的検証
- ・iPS 細胞からの造血分化法の開発と、大型動物(サル・ヒツジ)を用いたその検証

(2)「長嶋」グループ

① 主たる共同研究者:長嶋 比呂志(明治大学 農学部、教授)

② 研究項目

- ・ブタ iPS 細胞の高品質化の発生的検証
- ・エピジェネティクスからの iPS 細胞高品質化指標抽出
- ・遺伝子組換えブタ(SCID ブタなど)産出のための体細胞核移植及び相同組換えの実施

§2. 研究実施内容

(文献番号は(3-1)に対応する)

研究目的:

多能性幹細胞には二種類ある。ES 細胞とエピ幹細胞である。胚盤胞の内部細胞塊(ICM)由来の細胞がES細胞で、着床後のエピプラスト由来の細胞がエピ幹細胞である。ES細胞もエピ幹細胞も三胚葉分化能をもち、免疫不全マウスに移植すれば奇形腫をつくる点は同じである。しかし、ES細胞は、初期状態により近く、培養や遺伝子操作が容易で、キメラ動物を作製できる。一方、エピ幹細胞は、ES細胞より少し分化が進んでいて、培養や遺伝子操作が容易ではなく、キメラを形成しない。ES細胞の性質をナイーブ型、エピ幹細胞の性質をプライム型と呼ぶ。ヒトES細胞の場合、着床前のICM由来でありながらナイーブ型の性質をもたず、どういふわけか、エピ幹細胞のようなプラ

イム型になってしまう。iPS 細胞の場合はどうか？マウス iPS 細胞は明らかにナイーブ型である。ヒト iPS 細胞は、キメラ形成能は検証できないが、他の性質で見る限りプライム型である。マウス以外の動物(サル、ブタ、ウサギなど)の iPS 細胞は、ヒトと同じようにプライム型である。本研究では、初期状態により近く、扱いやすい、ナイーブ型の高品質 iPS 細胞を作る。ナイーブ型にすれば何が可能になるか、応用例も示す。平成 23 年度は、下記に示すように、当初の計画通り研究を進めることが出来た。

研究成果:

(1) **ナイーブ型 iPS 細胞の作製(花園)**:ナイーブ型のブタ iPS 細胞、およびナイーブ型のヒト iPS 細胞を作製した。ブタでは山中 4 因子をレトロウイルスベクターで導入した。一方、ヒトでは安全性を考慮して、ゲノムに組み込まれないセンダイウイルスベクターを用いた。さらに、サル ES 細胞のナイーブ化も実施した。ナイーブ型かどうかは、leukemia inhibitory factor (LIF)への反応性、MHC class I 抗原の発現、X 染色体の活性状態、増殖能、サブクローニング効率などによって評価した。ナイーブ型ブタ iPS 細胞については、下記(3)の通りキメラ形成能を評価した。

(2) **iPS 細胞の移植実験(花園)**:iPS 細胞を大型動物(ブタやヒツジ)に移植する実験を行った。近交系のクラウン系ミニブタを利用すれば、ブタ iPS 細胞の同種同系移植が可能になる。これは、マウス同系移植の大型動物版と言える。実際に行ったところ、iPS 細胞から奇形腫は全く出来なかった。ブタでは同種同系移植といえども、移植した iPS 細胞に対する免疫拒絶反応が生じた。したがって、同種移植を想定するヒト臨床では、奇形腫形成はめったにみられない事象と推定される。

ヒツジを用いた異種移植実験(ヒト→ヒツジ)では、レシピエントとして胎仔を用いた。これは、ヒト iPS 細胞を免疫不全マウスに移植する実験系の大型動物版と言える。ヒツジ胎仔にヒト造血細胞を移植した場合、生後 3 年間にわたってヒツジ体内でヒト造血細胞を検出できることが分かった¹⁾。このヒツジの系で、今後、ヒト iPS 細胞を用いた造血再構築実験を行う。

(3) **iPS 細胞の発生実験(長嶋)**:ブタ iPS 細胞を同種桑実期胚に注入し、in vitro で胚盤胞まで発生させた後、仮親子宮に移植した。妊娠 23 日目(単為発生胚由来)と 65 日目(体外授精胚由来)に胎仔を取り出し、iPS 細胞由来のキメラ個体が出来ているどうかを評価した。その結果、23 日目で 11 頭(15.5%, 11/71)、65 日目で 1 頭(7.7%, 1/13)の蛍光陽性胎仔、すなわちキメラと判定される胎仔が観察された。以上より、ナイーブ型ブタ iPS 細胞のキメラ形成能は証明された。iPS 細胞由来の肉眼的キメラブタは、今まで報告にないことである。今後は、新生仔さらに成体のキメラブタ作出が目標になる。

なお、iPS 細胞由来キメラブタを作出するには、iPS 細胞の受け皿(レシピエント)になる初期胚の安定供給が欠かせない。そのために、中空系ガラス化法によるブタ胚の凍結保存法の確立を試みた。ブタ体外成熟/体外受精胚を中空系法によりガラス化保存し、その融解後に 3 頭の仮親子宮に移植した結果、全頭が妊娠し高効率(19.3%, 17/88)に産仔が得られた。この産仔作出効率は、非ガラス化保存新鮮胚の移植試験で得られた成績(30.7%, 27/88)に比べ

でも同等で有意差は認められなかった。本成果は、従来は不可能と考えられていたブタ体外成熟／体外受精桑実胚の凍結保存に初めて成功したものである。

- (4) **iPS 細胞のエピジェネティック解析**(長嶋)：大部分のブタ iPS 細胞では、内在性 *Oct3/4* が高メチル化のままであった。これが 65 日目キメラブタ出現頻度低下の原因の一つと考えている。ブタ iPS 細胞のいっそうの高品質化(リプログラミング完全化・キメラ形成効率向上)のためには、内在性 *Oct3/4* の脱メチル化が今後の課題である。次に *Oct3/4* の標的遺伝子である *Sall4* のメチル化状況を見ると、それは iPS 細胞株間で異なり、iPS 細胞のキメラ形成能(胚盤胞への取込み)と相関があった。以上から、内在性 *Oct3/4*、および山中 4 因子の標的遺伝子などを対象として、DNAメチル化を指標とした高品質ブタ iPS 細胞の選別・評価が可能であると考えられる。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Abe T, Masuda S, Tanaka Y, Nitta S, Kitano Y, Hayashi S, Hanazono Y and Nagao Y, “Maternal administration of busulfan before in utero transplantation of human hematopoietic stem cells enhances engraftments in sheep”, *Experimental Hematology*, (in press)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 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)