

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

- ・ ブタ、サル、ヒト iPS 細胞の高品質化(ナイーブ化)
- ・ iPS 細胞の高品質化の検証(増殖・分化能、保存性、遺伝子被操作性、遺伝子発現プロフィール)
- ・ iPS 細胞の造血幹細胞分化およびヒトの血液をもつ動物の作製

### (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 細胞の高品質化の検証(キメラ形成能評価、エピジェネティクス解析)
- ・ SCID ブタ産出のための遺伝子ノックアウトおよび体細胞核移植の実施

## § 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### 研究目的

現在、我が国で樹立されているヒト iPS 細胞はプライム型と呼ばれ、マウス iPS 細胞(ナイーブ型)と異なり初期状態を脱している。すなわち分化が相当進んでいる。安定なナイーブ型ヒト iPS 細胞はこれまで報告がなく、その樹立が望まれる。本研究では、ナイーブ型のヒト iPS 細胞を樹立し、この細胞が従来のプライム型に比べて増殖・分化能、保存性、遺伝子被操作性に優れることを示す。

また、ヒト iPS 細胞の臨床応用には、その有効性と安全性を検証できる大型動物実験系が必須

であり、その確立が望まれている。本研究では、とくに医学的・生物学的に意義のある大型動物モデルを作製する。具体的には、免疫不全ブタやヒト血液をもつ動物(ヒツジやブタ)の作製をめざす。

## 研究成果

(1) **ナイーブ型 iPS 細胞の作製**:まず、ブタの iPS 細胞でナイーブ型を樹立した(花園・長嶋グループ)<sup>4)</sup>。ナイーブ型ブタ iPS 細胞は、増殖能や遺伝子発現プロファイルがマウス ES 細胞に極めて類似する。また、ナイーブ型 iPS 細胞はキメラ形成能で特徴づけられるが、このブタ iPS 細胞は、蛍光標識した上でブタ初期胚に注入すると、蛍光を発するキメラ胎仔を形成した。iPS 細胞由来の肉眼的キメラは齧歯類以外では初めてである。しかし、成体キメラは得られていない。成体キメラを得るためには、iPS 細胞のさらなる改良が必要である。

ナイーブ型 iPS 細胞を選別するための、DNA メチル化に基づくプレスクリーニング系を構築した(長嶋グループ)。結果として、Oct3/4 標的遺伝子群のメチル化状況をスコア化したものが、キメラ形成能ともっともよく相関した。このスコアは、ナイーブ型のスクリーニング系として有望である。

以上の結果を踏まえ、今後、ナイーブ型のサル・ヒト iPS 細胞を樹立する(花園グループ)。なお、ラット胎仔後腎の器官培養系を用いて、幹細胞の奇形腫形成能に関する迅速診断法を確立した(花園グループ)<sup>2)</sup>。この系の特徴は、極めて短期間(約 10 日間)の *in vitro* 培養で奇形腫を検出できる点にある。免疫不全マウスを用いた既存の方法と比較して迅速性に優れると同時に、アクセス時の必要細胞数をはるかに少数で済む(約 1,000 個)。

(2) **初期胚の保存技術の開発**:ブタ初期胚の凍結技術に関して、極めて効率的な中空系ガラス化法を開発した(長嶋グループ)<sup>3)</sup>。ブタ胚は低温感受性が高く、他の動物に比して初期胚の凍結保存が困難であった。本研究では、中空系ガラス化法を開発して、これまで困難とされてきたブタ体外成熟・体外受精胚の簡便な凍結保存に成功した。その有効性は、高効率な産仔作出成績によって証明された。これによりブタ胚の保管が可能になり、本研究のキメラ胚作製実験が進めやすくなったばかりでなく、特殊ブタや希少ブタの保存を可能にした。また、本法は、凍結保存が同様に困難なヒト iPS 細胞にも適用できる可能性がある。

(3) **単為発生胚をホストとする凝集キメラ技術の確立**:ブタ iPS 細胞の多能性を検証するためのシステムとして、簡便かつ効率的なブタキメラ胎仔の作出システムを確立した(長嶋グループ)<sup>5)</sup>。体外成熟卵の単為発生で得た 4-8 細胞期胚あるいは桑実期胚の割球を、胚盤胞の内部細胞塊(ICM)と凝集させることにより、高効率(60~80%)にキメラ胚盤胞が得られることを確認した。さらに、凝集法で得られた胚盤胞の移植によって、体節期キメラ胎仔が得られる(13~36%)ことが確認された。以上から、単為発生ホスト胚を用いる凝集法は、iPS 細胞のキメラ形成能の検証に必要な十分な精度と簡便性を備えた方法である。

(4) **IL2R $\gamma$  遺伝子をノックアウトしたブタ細胞の樹立**:免疫不全(SCID)ブタ作出のために、Znフィンガー・ヌクレアーゼ法を用いて、インターロイキン 2 受容体  $\gamma$  鎖(IL2R $\gamma$ )遺伝子をノックアウトしたブタ胎仔繊維芽細胞を樹立した(長嶋グループ)。

(5) **ヒトの血液をもつヒツジの作製**:マウス iPS 細胞の造血幹細胞分化は、iPS 細胞の遺伝子操作(HoxB4 遺伝子導入等)によって実現しているが、ヒト iPS 細胞の造血幹細胞への分化誘導はまだ実現していない。ヒト iPS 細胞の造血幹細胞分化を検証するためには、大型動物個体への移植実験が必須である。ヒツジ胎仔を用いて、この評価系を確立した。この際、移植の前処置としてヒト臨床で行われているブスルファン投与法を、ヒツジ胎仔への移植系に初めて適用し、生後ヒツジ体内でより効率的なヒト造血再構築を可能にした(花園グループ)<sup>1)</sup>。今後、この系を用いて、ヒト iPS 細胞から造血幹細胞の分化誘導を実現する。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

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”, *Exp. Hematol.*, **40**(6), 436-444, 2012. (DOI:10.1016/j.exphem.2012.01.018)
2. Masuda, S., Yokoo, T., Sugimoto, N., Doi, M., Fujishiro, S., Takeuchi, K., Kobayashi, E., and Hanazono, Y., “A simplified in vitro teratoma assay for pluripotent stem cells injected into rodent fetal organs”, *Cell Med.*, **3**(1), 103-112, 2012. (DOI:10.3727/215517912X639432)
3. Maehara, M., Matsunari, H., Honda, K., Nakano, K., Takeuchi, Y., Kanai, T., Matsuda, T., Matsumura, Y., Hagiwara, Y., Sasayama, N., Shirasu, A., Takahashi, M., Watanabe, M., Umeyama, K., Hanazono, Y., and Nagashima, H., “Hollow fiber vitrification provides a novel method for cryopreserving in vitro maturation/fertilization-derived porcine embryos”, *Biol. Reprod.*, **87**(6), 133, 1-8 2012. (DOI:10.1095/biolreprod.112.100339)
4. Fujishiro, S.-H., Nakano, K., Mizukami, Y., Azami, T., Arai, Y., Matsunari, H., Ishino, R., Nishimura, T., Watanabe, M., Abe, T., Furukawa, Y., Umeyama, K., Yamanaka, S., Ema, M., Nagashima, H., and Hanazono, Y., “Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development”, *Stem Cells Dev.*, **22**(3), 473-482, 2013. (DOI:10.1089/scd.2012.0173)
5. Nakano, K., Watanabe, M., Matsunari, H., Matsuda, T., Honda, K., Maehara, M.,

Kanai, T., Hayashida, G., Kobayashi, M., Kuramoto, M., Arai, Y., Umeyama, K., Fujishiro, S., Mizukami, Y., Nagaya, M., Hanazono, Y., and Nagashima H., “Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos”, *PLoS One*, accepted, 2013.

(DOI:10.1371/journal.pone.0061900)