

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 22 年度採択研究代表者

H25 年度
実績報告

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

- ・サル・ブタ・ヒト iPS 細胞の高品質化、およびその検証
- ・高品質化の応用その 1: ヒツジにおける造血再構築系の確立
- ・高品質化の応用その 2: SCID ブタ作製

(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
- ・高品質化の応用その 2: SCID ブタ作製

§ 2. 研究実施の概要

研究のねらい

(1) iPS 細胞は、どこまで初期化されるか、その深さによって二層構造をもつ。すなわち、着床前の段階まで初期化されるもの(ナイーブ型)と着床後の段階まで初期化されるもの(プライム型)である。従来のヒト iPS 細胞はプライム型のみが知られていた。ヒト iPS 細胞のナイーブ型の検証は倫理的に容易でないため、サル・ブタ・マウス iPS 細胞で代替実験を実施した上で、ヒトのナイーブ型 iPS 細胞を作製する。また、(2) iPS 細胞の発生工学的応用や臨床応用に向けては、齧歯類に加え大型動物評価系が必要である。

平成 25 年度の研究進捗状況

(1)に対して本チームは、昨年度(平成24年度)、ブタ iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞由来のブタ胎仔キメラを作製した。本年度は、ブタ単為発生胚を利用して、ブタ iPS 細胞のキメラ形成能を評価する系を開発して論文発表した。

いわゆるナイーブ型の iPS 細胞は、胚盤胞内部細胞塊の特徴を備えるためキメラ形成能で特徴づけられる。しかし、ナイーブ型であることを証明するのに、いちいちキメラ形成能を評価してはわずらわしい。そもそも、ヒトではキメラ形成能を見ることはできない。ナイーブ型をある程度予知できないかという目的で、DNA メチル化解析を行った。ES 細胞で特異的に発現の認められる 36 個の遺伝子を対象にしてそのプロモーター領域のメチル化を調べた(pluripotency score)。この pluripotency score は、キメラ形成能とよく相関し、これらの遺伝子の発現がナイーブ型 iPS 細胞の作製には重要と推察された。さらに、ナイーブ型のスクリーニング系として有望と考えられた。

今後、初期化のより深いナイーブ型のヒト iPS 細胞の作製をめざす。また、ヒト iPS 細胞をナイーブ化することによってどんなメリットがあるかも示したい。(たとえば、造血幹細胞に分化誘導しやすくなるなど。)ところで、初期化は方法によってどこまで遡るかが異なる。すなわち、核移植では受精卵、(もし実在すれば)STAP では桑実胚、ナイーブ型では胚盤胞、プライム型ではエピブラストまで初期化される。本研究が初期化の深さが各々異なる仕組みの解明の一助になることを期待したい。

(2)に対して本チームは、免疫のないブタ(免疫不全ブタ、SCID ブタ)の作製に成功した。具体的には、Zn フィンゲースクレアーゼ法によって、ブタ体細胞の IL2 受容体 γ 鎖遺伝子をノックアウトした。この細胞核を未受精卵に移植した(体細胞核移植)。核移植した細胞をブタ仮親子宮内に移植した。満期でブタ胎仔を取り出し解析したところ、IL2 受容体 γ 鎖遺伝子発現なく、胸腺がなく、T/NK 細胞なく、免疫不全ブタと結論された。

一方、ヒツジを用いる実験に関しては、その胎仔にヒト造血幹細胞を移植して、ヒト造血をヒツジ体内で長期間(約 3 年間)維持することに成功した。

今後、免疫不全ブタやヒツジ胎仔は、ヒト造血再構築実験など、ヒト iPS 細胞のアッセイ系や受け皿としての活用が期待される。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

1. 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 SH, Mizukami Y, Nagaya M, Hanazono Y and Nagashima H., “Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos.”, *PLOS ONE*. **8**:e61900, 2013 (doi: 10.1371/journal.pone.0061900)
2. Arai Y, Ohgane J, Fujishiro SH, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y and Nagashima H., “DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells.”, *Genesis*. **51**:763-76, 2013 (doi:10.1002/dvg.22423)
3. Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y and Nagashima H., “Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA.”, *PLOS ONE*. **8**:e76478, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0076478)