

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21760643

研究課題名（和文） ニワトリ多能性幹細胞の誘導と生殖系列キメラニワトリ作製への応用

研究課題名（英文） Establishment of chicken pluripotent stem cells with germ line competency

研究代表者

河邊 佳典（KAWABE YOSHINORI）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：30448401

研究成果の概要（和文）：ニワトリ多能性幹細胞を誘導・樹立するために、以下の結果を得た。

1. はじめに多能性制御因子のニワトリホモログを取得することができた。2. 外因性因子を発現するレトロウイルスベクターを作製後、STO細胞へ遺伝子導入することで、遺伝子導入STO細胞を樹立させることができた。3. 樹立した遺伝子導入STO細胞でニワトリ胚盤葉細胞を行うことで、未分化を維持し培養できる条件を調査した。4. ニワトリ繊維芽細胞へのレトロウイルスベクター遺伝子導入により、ニワトリ多能性幹細胞の誘導を行ったところ、コロニーの形成が観察された。しかし、未分化マーカーの検出には至らなかった。これらの結果から、ニワトリ多能性幹細胞を誘導・樹立するためには、さらなる条件の検討が必要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：To establish chicken induced pluripotent stem cells, some chicken homologues to regulate pluripotency could be obtained. Retroviral vectors encoding their homologues were produced and infected into STO cells. Chicken blastodermal cells were cultured on genetically modified STO cells and the undifferentiated state was investigated. Chicken embryonic fibroblasts transduced by some retroviral vectors were evaluated by RT-PCR and AP staining. These results suggest that further improvement to induce chicken pluripotent stem cells is required.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能 バイオプロセス

キーワード：多能性幹細胞、トランスジェニック鳥類、キメラニワトリ、フィーダー細胞

1. 研究開始当初の背景

（1）トランスジェニックバイオリクターは、近年の医薬品タンパク質の急激な需要に対する新しい生産システムとして注目されており、中でもニワトリやウズラといった家禽鳥類を生体バイオリクターとし、その卵中に生産させるシステムが期待されている。哺乳類では、万能性を有する胚性幹（ES）細

胞に外来遺伝子を導入することで、遺伝子改変動物の作製を行う方法がある。これにないこれまで鳥類でもいくつかの研究グループがES細胞の樹立を試みている。しかし、キメラ個体の作製は可能なものの、改変遺伝子が伝播可能な生殖系列キメラニワトリの作製には至っていない。つまり、生殖系列の細胞に分化することができるES細胞の樹立

が達成されていない。

(2) 一方、近年既知の内因性転写因子 (Oct4、Sox2、Klf4、cMyc、Nanog、Lin28) をマウスやヒトの体細胞に導入し、フィーダー細胞上に移植後、外因性 (成長) 因子で刺激することで、分化多能性を有した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が誘導された。この人工多能性幹細胞は ES 細胞と同様、分化多能性をもつとともに生殖系列への分化能力を有していることが報告されている。

これらのことからマウス ES 細胞や iPS 細胞では Oct3/4、Sox2、Nanog などの内因性転写因子とフィーダー細胞や LIF などのサイトカインによって供給される外因性因子が多能性維持に重要な役割を果たしていると考えられるが、鳥類では多能性維持に必要な内因性・外因性因子の検討が行われていないため、生殖系列の細胞に分化可能なニワトリ ES 細胞の樹立が行われていないものと考えられる。

申請者らこれまでに赤血球分化ホルモンであるヒトエリスロポエチンを生産する遺伝子導入ニワトリの作製に成功している。これは、ほ乳類のサイトカインが鳥類の生理に影響しなかったことを意味しており、多能性維持のための内因性および外因性因子の発現環境の制御にほ乳類由来のものは適切ではなく、ニワトリの遺伝子あるいはタンパク質を用いることが重要であり、全てニワトリ由来のものに置き換えることによって生殖系列に分化可能なニワトリ多能性幹細胞が樹立できる可能性が高いと考えた。

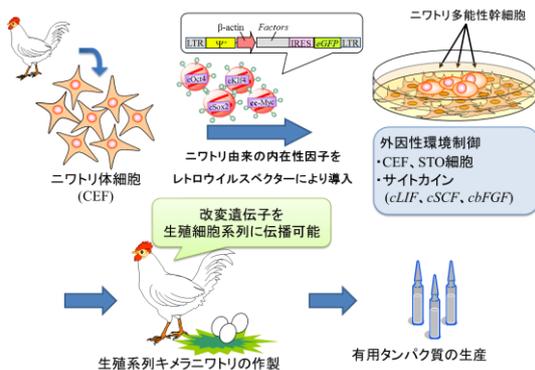


図 1.本研究の概要

2. 研究の目的

本申請では、ほ乳類 ES 細胞および iPS 細胞樹立時に使用されている遺伝子およびタンパク質をニワトリ由来のものにすべて置き換え、特定の遺伝子を体細胞へ導入し、フィーダー環境を整えることでニワトリ多能性幹細胞を誘導させ、生殖細胞系列へ伝播する生殖系列キメラニワトリの作製を目的として研究を行った。

その目的を達成するために、以下の項目に関して検討を行い、研究を進めた。

1. 多能性維持を制御する因子のクローニング、2. レトロウイルスベクターの生産、3. フィーダー環境の整備、4. ニワトリ多能性幹細胞の誘導・樹立

3. 研究の方法

(1) 多能性維持を制御する因子群のクローニング

これまでマウスやヒトの体細胞から iPS 細胞を誘導させたと報告されている内因性因子 (Oct4、Sox2、Klf4、c-myc、L-myc、Nanog、Nr5a2) および外因性因子 (LIF、SCF、bFGF、E-cadherin) のニワトリホモログのクローニングを RT-PCR 法もしくはゲノム PCR 法により行った。なお、得られた遺伝子は、遺伝子配列解析することで、目的の配列を有しているか確認した。

(2) 多能性制御因子発現用レトロウイルスベクターの生産

内因性因子に関しては、これら遺伝子をニワトリ β -アクチンプロモーター制御下で発現するユニットとして、外因性因子に関しては、CMV プロモーター制御下で発現するユニットとして、ウイルスベクター生産用プラスミドに組み込んだ (図 2)。このプラスミドをウイルス構成タンパク質発現ベクター (pGag-pol) および外皮タンパク質発現ベクター (pVSV-G) と共にウイルス生産細胞 (293FT 細胞) へ一過性で導入することで、ウイルスベクターを生産させた。

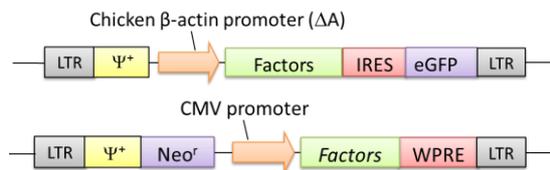


図 2. 多能性制御因子発現用レトロウイルスベクターの構造

(3) 外因性因子発現用フィーダー細胞の作製とニワトリ胚盤葉細胞の培養

各外因性因子発現用レトロウイルスベクターを生産後、超遠心機にて濃縮後、STO 細胞へ感染させ限界希釈法と薬剤スクリーニングを行うことで、遺伝子導入 STO 細胞のクローニングを行った。放卵直後のニワトリ受精卵から胚盤葉細胞の取得を行った。胚盤葉細胞を取得するために、細胞分離用リングを作製し、胚盤葉期の細胞領域にリングを当てて、リングに沿って有精卵の卵黄膜をハサミで切り取った。PBS で洗浄後、PBS 内にて胚盤葉細胞の明域のみを物理的に取得し、フィー

ダー細胞として用いた遺伝子導入 STO 細胞上に播種した。未分化能の評価は、POUV および Nanog 遺伝子の RT-PCR および AP 染色により行った。

(4) 多能性誘導因子発現用レトロウイルスベクターの生産と多能性幹細胞の誘導

取得した多能性幹細胞誘導用因子をコードしたレトロウイルスベクターをニワトリ胚性繊維芽細胞 (CEF) に感染させた。フィーダー細胞としては、外因性因子が導入された遺伝子導入 STO 細胞を用いた。感染から 2 日後、緑色蛍光によりレトロウイルスベクターによる遺伝子導入を確認し、多能性因子の発現を RT-PCR により評価した。また、各因子の 1 細胞あたりのウイルス感染数 (MOI) が均一になるように調製したのち、CEF へ感染させた。ウイルス感染初日を day0 とし、day8 に遺伝子導入 STO 細胞上に再播種した。引き続き培養を行い、AP 染色により未分化能を評価した。

4. 研究成果

(1) 多能性維持制御因子のクローニング

これまでに多能性維持を制御していると報告されている内因性および外因性因子のニワトリホモログの取得を試みた。脳 (Sox2 SCF, bFGF)、肝臓 (E-cad, Nr5a2)、中腎 (Nanog) の組織から抽出した mRNA を鋳型として逆転写を行い、PCR 法で増幅させた。Oct4, c-Myc, L-Myc, Klf4 に関しては、ニワトリゲノム DNA を鋳型とする PCR 法で増幅させた。サブクローニング用のプラスミドに組込んだ後、シーケンス解析を行ったところ、目的の配列であることが確認できたことから、多能性維持を制御する各因子を取得することができた。

(2) レトロウイルスベクターの生産

各因子を目的細胞へ効率的に遺伝子導入するための遺伝子導入方法として、高効率に宿主ゲノムへ組み込むことが可能なレトロウイルスベクターを用いることとした。各因子を発現するレトロウイルスベクター生産用プラスミドに組み込んだ後、レトロウイルスベクターを生産させた。マウス NIH3T3 細胞へ感染させたところ、遺伝子導入するために十分なウイルス力価が得ることを確認することができた。

(3) フィーダー細胞環境の整備とニワトリ胚盤葉細胞の培養

ニワトリ多能性幹細胞を樹立・誘導するために、培養環境を維持するためのフィーダー細胞の作製を行った。これまで哺乳類と比べて鳥類では、どの内因性および外因性因子が幹細胞の培養に必要な因子が同定されてい

ない。そこで簡便にスクリーニングするために、STO 細胞に外因性因子を発現するレトロウイルスベクターを作製後、さまざまな条件の組み合わせで遺伝子導入した細胞株を樹立した。ニワトリ胚盤葉細胞は、ニワトリ ES 細胞の候補細胞として知られているため、胚盤葉期とよばれる発生ステージの明域部分からこの細胞の採取を行った。採取した細胞を用いて、樹立した細胞株上で培養を試みた。培養後 AP 染色で未分化能を評価したところ、未分化状態を維持できる条件を決定することができた。また、RT-PCR 法で解析したところ、比較的安定して未分化マーカーの発現が維持できることがわかった。また、低分子化合物を培地中に添加することで、分化細胞の増殖を抑制できることがわかった。しかし、目的細胞の増殖も悪く、長期培養はできなかった。原因として低分子化合物の濃度や、初代細胞の播種密度条件が適切でなかったと考えられる。そのため今後それらを検討する必要がある。

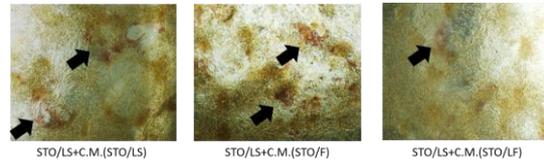


図 3. 遺伝子導入 STO 細胞を用いたニワトリ胚盤葉細胞の培養

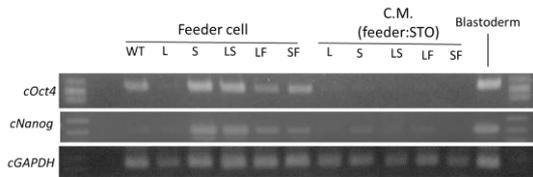


図 4. 胚盤葉細胞培養後の RT-PCR の結果

(4) ニワトリ多能性幹細胞の誘導

内因性因子発現用レトロウイルスベクターを初代体細胞へ遺伝子導入することにより、多能性幹細胞の誘導を試みた。初めに、内因性因子発現用レトロウイルスベクターを CEF に感染させたところ、GFP の蛍光が観察されたことから遺伝子導入できていることを確認した。また、感染した細胞から RNA を抽出後、RT-PCR 解析を行ったところ、ウイルスベクターで導入した各因子が発現されていることがわかった。原癌遺伝子の導入により細胞の増殖が上昇したことから、初代細胞増殖を上方調節できることが示唆された。

続いて、ウイルスカクテルを MOI をそろえて CEF へ感染させた。Day8 で遺伝子導入 STO

細胞上に再播種した。day10 程度から遺伝子導入のマーカーとして共発現する GFP 陽性コロニーおよび陰性コロニーの形成が観察された。しかし、これらの細胞はある程度の増殖後、増殖の停止が認められた。day28 で AP 染色を行ったところ、染色されなかった。マウス多能性幹細胞を誘導する際でも同様のものがみられることから、初期化されなかった細胞と考えられる。現在、他の内因性因子候補を取得中であり、またウイルス MOI の検討や誘導に適したフィーダー細胞環境を整備中である。これらを組み合わせることで、完全にリプログラミングされた多能性幹細胞が樹立できると考えている。

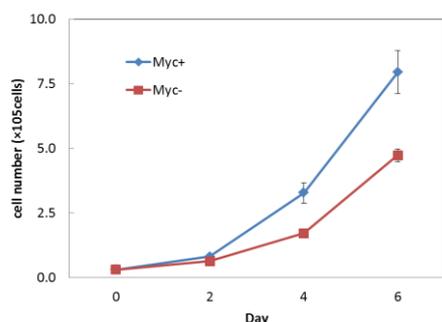


図 4.原癌遺伝子導入後の細胞増殖曲線

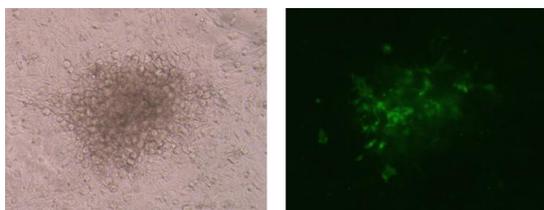


図 5. ニワトリ多能性幹細胞の誘導

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/prof_kawabe.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河邊 佳典 (KAWABE YOSHINORI)

研究者番号 : 30448401