

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658224

研究課題名（和文）人工多能性幹細胞を用いた絶滅危惧種・希少種の保全に関する研究

研究課題名（英文）Preservation of endangered and rare animal species using induced pluripotent stem cells.

研究代表者

今井 裕（IMAI HIROSHI）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10303869

研究成果の概要（和文）：

絶滅危惧種や希少種の個体保全のモデルとして、ハタネズミを用いた人工多能性幹細胞（iPS細胞）株の樹立と樹立された細胞株の性質について検討した。レトロウイルスベクターを用いて、4種の多能性関連遺伝子を導入した。多能性細胞様の多くのコロニーが得られ、細胞分化能も有していたが、樹立された細胞株の多能性は限定的なものであり、体細胞のリプログラミング誘導に関するより詳細な研究が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The establishment of induced pluripotent stem (iPS) cells in vole and the characterizations of the established cell lines has been performed as a model experiment for the preservation of endangered and rare animal species. Pluripotent-related four transcription genes were introduced into somatic cells using retroviral vectors. Colonies like as mouse embryonic stem (ES) cells were obtained. These colonies have a part of stem cell potential, but have limited pluripotent characteristics. Further experiments are necessary to establish a system inducing nuclear reprogramming of somatic cells in vole.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：野生動物保護・増殖、多能性幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

国際自然保護連合の報告によると、2010年までに、世界の174万種の既存種のうち、17,315種が絶滅危機種としてレッドデータブックに登録されており、このうち哺乳類は16%を占めるとされている。絶滅に至る要因は、外来移入生物の増加、生息地の破壊や捕獲が主たる原因となっているが、社会的・経済的要因を含み、これらをにわかに取り除く

ことは極めて困難である。

一方、近年のバイオテクノロジー技術の進展にともなって、体細胞クローン技術やiPS細胞技術開発の成果によって、体細胞から個体を生産することが可能になってきた。このことは、本来個体数が少ない希少種・絶滅種や有用資源動物を細胞レベルで保存できれば、現時点では多くの技術的困難はあるものの、将来的には上記の先端バイオテクノロジー

の進展によって、個体の再生産が可能になると考えられる。申請者は、これまで一貫して上記バイオテクノロジーの開発に従事してきた経験をもち、今回ホンドハタネズミの繁殖技術に精通した共同研究者（日本獣医生命科学大学、岡田）の協力を得て、この種における iPS 細胞の樹立と個体生産に向けた技術開発を計画した。

## 2. 研究の目的

希少な哺乳動物を保全するため、それらの体細胞から人工的に多能性幹細胞を誘導するとともに、この細胞由来の個体生産を可能にする技術の開発を目指す。このために、マウスで開発された、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）樹立技術を応用し、希少動物の体細胞から iPS 細胞を樹立し、キメラ形成、生殖細胞への分化誘導、顕微授精（ICSI）などの技術を応用し、個体生産の可能性を検討し、将来的には、この技術の希少種・絶滅危惧種・有用資源動物の保全への足掛かりを得る。本課題では、まず、わが国で準絶滅危惧種に指定されているホンドハタネズミを用いて、その体細胞から iPS 細胞株を樹立し、その細胞生物学的性質をマウス由来の iPS 細胞と比較しながら、異種であるマウス胚への細胞移植によるホンドハタネズミを再生する。さらに、ここで樹立される iPS 細胞や精巣由来の生殖幹細胞を用いて、これらを生殖細胞へ分化誘導後、免疫不全マウス精巣内での精子形成、ICSI 技術を用いた個体生産の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

ホンドハタネズミ、ユーラシアハタネズミおよびロシアハタネズミの体細胞（尾部表皮）に4つの（Oct3/4, c-Myc, Klf4, Sox2）多能性誘導転写遺伝子を piggyBac transposon ベクターあるいはレトロウイルス

スベクター（pLV-CAG1.1-EGFP）を用いて導入し、iPS 細胞株の樹立を試みた。体細胞への遺伝子導入後 14 日後に出現したコロニー数を多能性細胞の特異的マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼ（APase）の活性によって算出した。

マウス ES 細胞様のドーム状の形態をもち、持続的な増殖を続ける細胞を iPS 細胞株として以下の評価を行った。多能性幹細胞としての性質を特徴づける、内因性の Oct3/4、Nanog、Sox2 について、遺伝子レベルおよびタンパク質レベルでの発現をそれぞれ RT-PCR、免疫組織染色、ウエスタンブロッティングなどによって検討した。また、細胞表面抗原である SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4 の検出も行うとともに、。染色体の核型解析、胚様体の形成能、免疫不全マウスへの細胞移植によるテラトーマ形成能など、常法に従って樹立細胞の多能性を検証した。

## 4. 研究成果

3 種のハタネズミの亜種から採取した体細胞によって iPS 細胞の誘導を試みた結果、コロニー形成能に大きな差が認められた。すなわち、ホンドハタネズミでは、全くコロニーが得られず、ユーラシアハタネズミも 2-5 個のコロニーを認めたにすぎなかったが、ロシアハタネズミでは 47-74 個のコロニーを得ることができた。つまり、ハタネズミでも種によってコロニー形成効率（リプログラミング効率）は非常に異なることが明らかとなった。また、ここで得られたコロニーは、Oct3/4 の発現が認められなかったため、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行ったところ効率よくコロニーを得ることができた（図 1）。そこで、これ以降は、ロシアハタネズミの体細胞を用いて、レトロウイルスベクターによりリプログラミング誘導を行うこ

とにした。

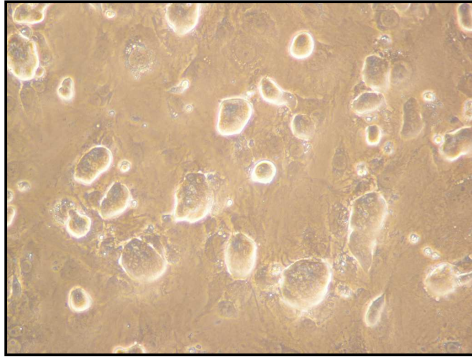


図1 ロシアハタネズミのコロニー

1×10<sup>4</sup> 個の細胞から平均 961 個 (コロニーの出現効率は 9.6%) のコロニーが出現した。さらに出現したコロニーのアルカリフォスファターゼ活性 (AP 活性) を検討したところ、1×10<sup>4</sup> 個の細胞から平均 184 個の AP 活性を持つコロニーが得られた (APase 活性をもつコロニーの出現率は 1.8%)。

出現したコロニーが実際に iPS 細胞の性質を備えているのかどうかを検定するためにランダムに、10 個のコロニーを選抜し、酵素により細胞を分散した後細胞培養を行って、コロニーの再形成を確認した。コロニーを再形成した 5 株について、APase や多能性関連タンパク質の発現を検討した。その結果、これらのコロニーは、APase 活性は持たないが、OCT3/4 や NANOG タンパク質、SSEA-4 細胞表面抗原を発現していた。

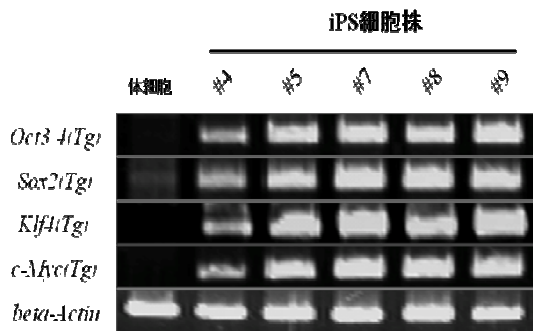


図2 iPS 細胞株 (5 株) における導入多能性遺伝子の発現

ついで、上記のコロニーで多能性遺伝子の発現を検討した結果、導入した多能性遺伝子の発現は、iPS 細胞で高く維持されているが (図2)、内因性の Oct3/4 や Nanog の発現は極めて限定的であった。

さらに、iPS 細胞の機能的な性質を評価するために、胚様体の形成を介した iPS 細胞の分化誘導を試みたところ、浮遊培養を始めた翌日には、図3に示すような胚様体を形成

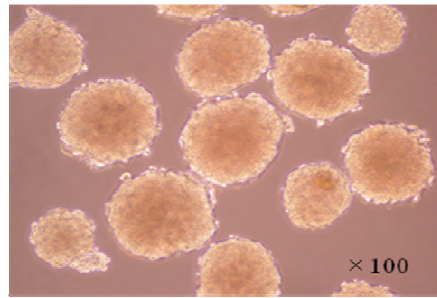


図3 iPS 細胞株由来の胚様体

した。しかし、その後の接着培養による分化誘導実験では、ASM (中胚葉の分化細胞マーカー) と AFP (内胚葉の分化細胞マーカー) のを発現する細胞への分化は確認できたものの (図4と図5)、外胚葉への細胞分化は認められなかった。また、胚様体の培養過程においても明らかに未分化な細胞集団が確認された。

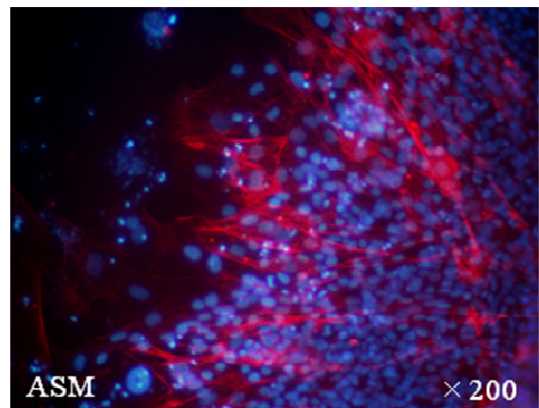


図4 平滑筋細胞 (中胚葉系列) への分化

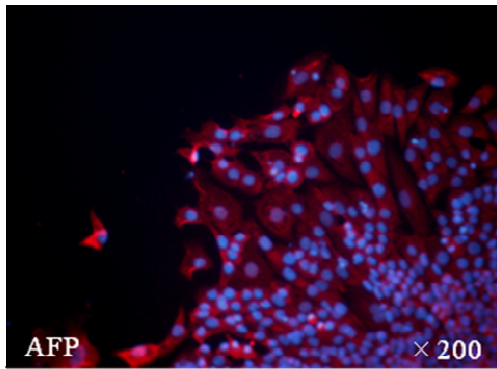


図5  $\alpha$  フェトプロテイン抗体を用いた内胚葉系列細胞の検出

以上のことから、本研究で得られたハタネズミ iPS 細胞株は部分的にリプログラミングを受けた細胞株であるが、性質や多能性が不完全な細胞株であることが示唆された。今後、十分な内因性の多能性遺伝子の発現を誘導するリプログラミング誘導条件の検討とともにハタネズミの多能性遺伝子の配列情報やその遺伝子発現を検出する実験系が必要であると考えられた。

#### 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 2 件)

(1) Tsukiyama T, Asano R, Kawaguchi T, Kim N, Yamada M, Minami N, Ohinata H and Imai H, Simple and efficient method for generation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycyclin-inducible factors and an EOS reporter system, Genes Cells. 査読有、16、2011、815-825  
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01528

(2) 浅野 良太、川口 高正、今井 裕、哺乳動物における iPS 細胞、日本胚移植学雑誌、査読有、34 巻、1 号、9-18  
<http://jets.kenkyukai.jp/about/index.a>

[SP?](#)

[学会発表] (計 6 件)

(1) Establishment of induced pluripotent stem cells in cattle using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factors, The World Congress on Reproductive Biology (WCRB), Cairns, Australia, 9 Oct- 12 Oct. 2011

(2) Derivation of murine-ES-cell like iPS cells in canine under the EOS reporter system, International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Yokohama, Japan, 13 June- 16 June. 2012

(3) Transdifferentiation of bovine amnion cells into trophoblast-like cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible reprogramming factors, Satellite symposium to the International Congress on Animal Reproduction (ICAR), Banff, Canada, 24 July- 26 July. 2012

(4) Derivation of Trophoblast-Like Cells from Bovine Amnion Cells by Piggybac Transposon Vectors Carrying Doxycycline-Inducible Reprogramming Factors, The 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of Korean Society of Reproductive Medicine, Seoul Women's University, Seoul, Korea, 1 December. 2012 (招待講演)

(5) Generation of murine-ES-cell-like iPS cells in cattle using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factor, CiRA International Symposium 2013 ~Rising the next generation

of stem cell research~, Kyoto, Japan, 11  
March- 12 March. 2013

(6) ウシにおけるマウス ES 細胞様 iPS 細胞  
の樹立の試み、第 1 回 関西生殖医学集談会、  
ハービスプラザ、大阪、平成 25 年 3 月 2 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：多能性幹細胞を効率的に作製する方法  
発明者：今井 裕・金 ナレ  
権利者：京都大学  
種類：特許  
番号：特願 2013-014443 号  
出願年月日：平成 25 年 1 月 29 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.reprod.kais.kyoto-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井 裕 (IMAI HIROSHI)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：10303869

### (2) 研究分担者

岡田 幸之助 (OKADA KOUNOSUKE)  
日本獣医生命科学大学・応用生命科学  
部・講師  
研究者番号：60445830

### (3) 連携研究者

該当なし