

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380157

研究課題名(和文) iPS細胞と次世代ゲノム変異導入技術を利用した新たな動物育種システムの構築

研究課題名(英文) Swine derived induced pluripotent stem cell and its application to livestock science

研究代表者

福田 智一 (Fukuda, Tomokazu)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40321640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：産業用動物であるブタに近年発達する人工多能性幹細胞(iPS細胞)技術を適用し、動物生命科学への新たな発展する技術として確立することを目的とした。産業用動物であるブタに注目し、ブタ由来iPS細胞を作成した。Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Mycに2つの因子を加えることによって安定的に継代可能なブタiPS細胞を得た。ブタiPS細胞はヒトのものと異なり、継代操作上で単一細胞にしても細胞死を誘導せず、増殖因子にLIF(白血球遊走阻害因子)、低分子量阻害剤を必要とした。さらにメス由来のiPS細胞でX染色体の活性化が観察された。我々は発生初期段階の状態に近いブタ由来iPS細胞の樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we applied the induced pluripotent stem (iPS) cell technology to the livestock science. We focused on the porcine, one of the major livestock, and established the porcine derived iPS cell. We obtained porcine derived iPS cells with the expression of six reprogramming factors, including Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc. The porcine derived iPS cell had different nature from that of human, and it showed the growth dependency to the LIF (leucocyte migration inhibition factor), and low molecular inhibitors. Interestingly, porcine derived iPS did not cause the massive apoptosis even after the enzymatic digestion into the single cell, which nature is different from human. Furthermore, the re-activation of X chromosome was observed in female derived porcine iPS cells. We succeeded the high quality porcine derived iPS cell, which is close to the nature of early embryonic stage.

研究分野：畜産学、分子遺伝学、細胞生物学

キーワード：畜産学 分子遺伝学 人工多能性幹細胞 家畜

1. 研究開始当初の背景

京都大学の山中伸弥教授の研究により、一度終末分化した細胞に全能性を付加する iPS 細胞(Induced Pluripotent Stem Cell)技術が開発された。この技術は人工的に 4 種類の転写因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc)を導入し生殖細胞を含む全身の細胞へ分化する幹細胞へ感化させる技術である。本方法はヒトにおける再生医療の切り札となる技術として注目されている。本技術を動物生命科学に応用すれば様々な利用が可能になると考えられる。

iPS 細胞技術は京都大学の山中伸弥教授によって開発された。Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)と呼ばれる 4 つの遺伝子を人工的に発現させることによって、一度終末分化した細胞を受精卵に含まれる時点と同じ状況に導く。この過程はリプログラミングと呼ばれ、ゲノム中に存在する遺伝子群の発現が劇的に変化することがわかっている。本技術は多くの研究者が長い間夢見ていたが、なし得なかった大きなブレークスルーであり、我が国の生命科学が達成した大きな宝の技術である。

我が国の畜産産業は現在、外国からの圧力に苦しんでいる。我が国の畜産産業は高い市場価値を高めて、さらに国際的な競争力を高める必要がある。現在、家畜において人工授精が多く動物で行われているが、生殖細胞は終末分化した細胞であるために再度細胞分裂を開始することはない。そのために優秀な家畜の生殖細胞は有限な遺伝資源となっている。もし優秀な家畜由来の iPS 細胞を作出でき、生殖細胞へ人工的に分化誘導が可能になれば、優秀な家畜の生殖細胞を無限に利用できる可能性が広がる。

さらに近年、ゲノム編集技術と呼ばれる技術が発展している。ゲノム編集技術とは数億 bp の塩基から構成されるゲノムの 1 点を特異的に切断、改変する技術である。このような技術は次世代の品種改良のための大きなブレークスルーになると考えられている。従来の家畜育種であれば、交配に依存するために導入したい形質以外のゲノム領域が交雑されてしまうため、長期に渡る戻し交雑が必要となる。もし導入したい形質の原因遺伝子が明らかになっていれば、旧来の交雑を経ずに、ゲノム編集技術を用いて直接形質を導入することが可能になるかもしれない。

このような背景から、我々は産業用家畜であるブタを対象に iPS 細胞の樹立とその樹立した細胞の生物学的性質を解析した。

2. 研究の目的

ブタ胎児筋肉由来線維芽細胞へ山中 4 因子と呼ばれる Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc を発現するベクターを導入を行った。当初、山中 4 因子を導入したブタ iPS 細胞を作成したが、東日本大震災による被災によって完全に死滅してしまった。我々は死滅したブタ iPS 細胞

よりもさらに優れた、より発生段階の初期の細胞に近いものを作成することを試みた。より高品質なブタ iPS 細胞を作成するために山中 4 因子に加えて Nanog および Lin28 と呼ばれる遺伝子群を利用することにした。これらの 2 つの遺伝子は iPS 細胞の作成の初期の研究において Wisconsin 大学の研究グループが重要な働きをしていることを報告している。ヒトにおいてはこれらの 6 因子の発現によって iPS 細胞を報告した例はあるが、ブタにおいてはほとんどない。そこで我々は Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28, Nanog の 6 因子を発現するブタ iPS 細胞を樹立することを試みた。

3. 研究の方法

ブタ胎児由来筋肉からの線維芽細胞を用いた。使用したブタは妊娠後約 45 日のブタを用いた。初代線維芽細胞へ Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc を発現するレンチウイルスである STEMCCA を感染させた。STEMCCA は EF1 プロモーターによってドライブされる発現ユニットを持つ組み換えレンチウイルスである。我々は STEMCCA と同様に EF1 プロモーターでドライブされるレンチウイルスにマウス由来の Lin28 および Nanog を導入した。加えて Lin28 および Nanog の発現カセットに融合させる形でハイグロマイシン耐性遺伝子を導入した。Lin28, Nanog, ハイグロマイシン耐性遺伝子のタンパク質は自己消化性ペプチドである 2A ペプチドによって連結した(図 1A)。組み換えレンチウイルスのパッケージングには 293T 細胞における一過性発現系を使用した。293T 細胞へはパッケージングプラスミドと共にリポフェクションによって導入した。STEMCCA ウィルスおよび Lin28-Nanog を発現する組み換えウィルスを混合し、ブタ初代線維芽細胞に感染させた(図 1B)。ウィルス感染後、72 時間後にマウス胎児性線維芽細胞(MEF)由来のフィーダー細胞上にリシードを行った。リシード後 2 週間目に出現したコロニーを観察し、EGFP の蛍光が見られるコロニーを選抜した。顕微鏡下で pick up したコロニーをさらに MEF フィーダー上で増殖させ、安定的に維持できるブタ iPS 細胞ラインを樹立した。

樹立したブタ iPS 細胞の細胞増殖に必要な培地構成成分の同定、ゲノム DNA からの PCR による発現カセットの検出、RT-PCR による内在性ブタ多能性関連遺伝子の発現の検出、蛍光抗体法による多能性関連タンパク質の発現の検出、核型解析、テロメラーゼ活性の検出、SCID マウスの精巣組織におけるテラトーマ(奇形腫)の形成、細胞周期の検出、COBRA 法による X 染色体不活性化の検出、ブタ胚盤胞期胚への iPS 細胞の注入を行った。

4. 研究成果

我々は山中 4 因子を発現する STEMCCA ベクターと Lin28 および Nanog を発現する

LVSIN-LN-IRES ZsGreen との重感染によって2個の独立したブタ由来 iPS 細胞クローンを得た。図 1C に示すように樹立したブタ iPS 細胞は Lin28 および Nanog の発現カセットに下流に設置された ZsGreen のよって強い緑色蛍光を示した。またゲノム DNA からの PCR によって、樹立したブタ iPS 細胞が山中4因子を発現する STEMCCA および追加の2因子を発現する LVSIN-Lin28Nanog を両方持つことを検出した(図 2A)。さらに RT-PCR により、ブタ内在性 Oct3/4, Sox2, Klf4, が発現していることを検出した。また iPS 細胞誘導のために導入した STEMCCA カセットが恒常的に発現していることを検出した(図 2c)。これは導入した遺伝子カセットが EF1 プロモーターによってドライブされていることに起因すると考えられる。従来の報告では幹細胞に変化した後も EF1 プロモーターの場合はサイレンシング耐性になることが知られており過去の報告と一致するものであった。

さらに樹立したブタ iPS 細胞の幹細胞としても生物学的性質を明らかにした。まず幹細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を Fast Red を基質に染色によって検出した(図 2B)。樹立したブタ iPS 細胞は高いアルカリフォスファターゼ活性を示した。くわえて多能性幹細胞に特徴的に発現する遺伝子産物の発現を蛍光抗体法にて検出を行った。樹立した細胞は Oct3/4 および Nanog に対して陽性を示した(図 3)。また表面抗原である SSEA4 に対して陽性したが、SSEA1 および SSEA3 に対しては陰性であった(図 3)。

さらに核型解析を行ったところ、2つのクローンはそれぞれ 50 個の分裂体を解析したが、全て 38+ XX の結果となり、全く異常は認められなかった(図 4A,B,C)。またストレッチ PCR 法にてテロメラーゼ活性を検出したところ、樹立される元のブタ胎児由来線維芽細胞と比較して、高い活性が検出された。

免疫不全動物(SCID マウス)の精巣組織に樹立したブタ iPS 細胞を移植した。移植後12週後に数センチの腫瘍が発生した(図 5A)。腫瘍の発生は複数のクローンで認められた。得られた腫瘍組織を病理組織学的に解析すると、消化管上皮様組織、線維組織様、神経管様組織、脂肪組織様など三胚葉由来の組織分化が検出された(図 5B,C,D)。

細胞周期を検出したところ、iPS 細胞を作成した元となる線維芽細胞より、G2/M 期の細胞が多く含まれていることが明らかになり、iPS 細胞への変化を生じたことで細胞周期の回転が加速されたことが検出された。また X 染色体の不活性化パターンを COBRA(Combined Bisulfite Restriction Analysis)法にて検出すると、ポジティブコントロールである雌由来線維芽細胞では Xa(活性化状態の X 染色体)+Xi(不活性化状態の X 染色体)のパターンであったが、樹立したブタ iPS 細胞では全てが Xa(活性化状態の X 染色体)由来のパターンを示した(図 6A)。

このことは我々の樹立したブタ由来 iPS 細胞が着床前の受精卵内部の細胞の状態に近いことを示している。この X 染色体の解析結果を裏付けるために、ヒストン H3 の K27 トリメチル抗体による不活性化 X 染色体の in situ における検出を行った。雌由来線維芽細胞では核内に1つのドット状のシグナルが検出され、不活性化 X 染色体が存在することが検出され(図 6B)た。一方、樹立されたブタ iPS 細胞においては細胞核は染色性を示したが、線維芽細胞に認められた様なドット状の染色パターンは認められなかった。このことから我々の樹立したブタ iPS 細胞は両方の X 染色体が活性化していると結論した。

また我々はブタの後期桑実胚および早期胚盤胞に iPS 細胞を注入し、発生における変化を観察した。その結果、48 時間後の胚盤胞の内部細胞塊に該当する部分に iPS 細胞由来の蛍光シグナルが検出された。このことから我々の樹立したブタ iPS 細胞はブタ胎児に寄与する可能性が示された。

我々が樹立したブタ iPS 細胞は従来の報告よりも品質が高い細胞と考えられる。理由は奇形腫の形成と X 染色体の活性化状態である。従来のブタ iPS 細胞の報告では X 染色体の状態は不活性化+ 活性化の組み合わせで、体細胞での状態がリセットされていないものであった。我々が報告したブタ iPS 細胞の X 染色体の活性化状態は品質の高いブタ iPS 細胞であることを示している。加えて我々のブタ iPS 細胞は SCID マウスにおいて大きな奇形腫を形成した。幹細胞としての重要な性質として奇形腫の形成能力が必須である。加えて我々が樹立したブタ iPS 細胞は三胚葉性の分化を示した。この性質はブタ iPS 細胞として重要である。

我々の樹立したブタ iPS 細胞は従来の報告よりも品質が高いものであると考えられる。しかし現在の状態では、外来遺伝子が挿入されしかも発現が継続的に行われている。この状態では iPS 細胞由来のブタは全て遺伝子組み換え体になってしまう。産業用動物の次世代技術として実用化を目指すためには、少なくとも外来遺伝子フリーにする必要がある。我々は一過性の遺伝子発現システムを用いて同様のブタ iPS 細胞を得るために現在、実験を進めている。

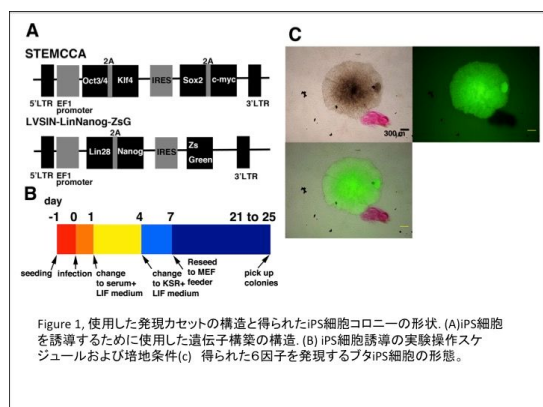


Figure 1. 使用した発現カセットの構造と得られたiPS細胞コロニーの形状。(A)iPS細胞を誘導するために使用した遺伝子構築の構造。(B) iPS細胞誘導の実験操作スケジュールおよび培地条件(c) 得られた6因子を発現するブタiPS細胞の形態。

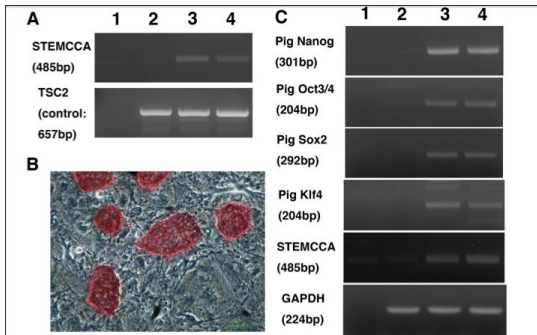


Figure 2. 得られたブタiPS細胞における挿入遺伝子および遺伝子発現の解析. (A) ゲノムDNAからのPCR法による検出. 1: テンプレートなし対照, 2: ブタ線維芽細胞, 3および4: ブタiPS細胞. (B) 得られたブタiPS細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性の検出. (C) RT-PCR法による遺伝子発現の検出. レーンの並びはAと同じ.

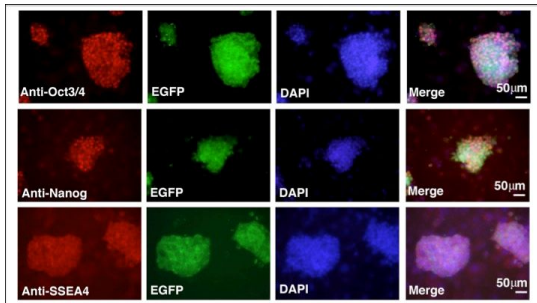


Figure 3. 得られたブタiPS細胞の多能性関連遺伝子産物の蛍光抗体法による検出. Oct3/4, Nanog, SSEA4遺伝子産物の発現を検出した.

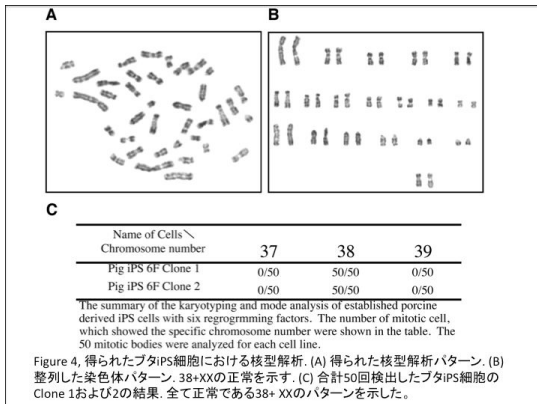


Figure 4. 得られたブタiPS細胞における核型解析. (A) 得られた核型解析パターン. (B) 整列した染色体パターン. 38+XXの正常を示す. (C) 合計50回検出したブタiPS細胞のClone 1および2の結果. 全て正常である38+XXのパターンを示した.

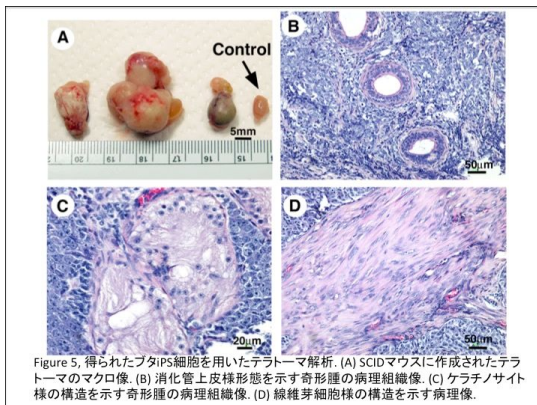


Figure 5. 得られたブタiPS細胞を用いたテラトーマ解析. (A) SCIDマウスに作成されたテラトーマのマクロ像. (B) 消化管上皮様形態を示す奇形腫の病理組織像. (C) ケラチノサイト様の構造を示す奇形腫の病理組織像. (D) 線維芽細胞様の構造を示す病理像.

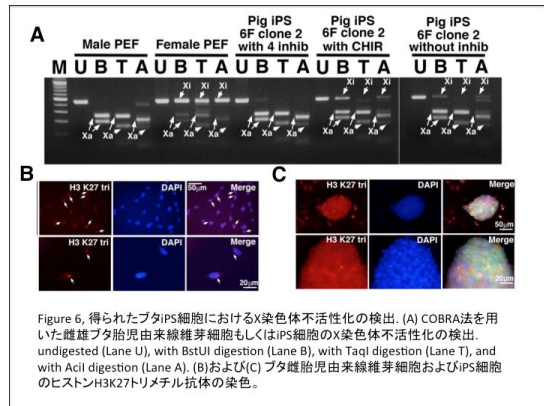


Figure 6. 得られたブタiPS細胞におけるX染色体不活性化の検出. (A) COBRA法を用いた雌雄ブタ胎児由来線維芽細胞もしくはiPS細胞のX染色体不活性化の検出. undigested (Lane U), with BstUI digestion (Lane B), with TaqI digestion (Lane T), and with AclI digestion (Lane A). (B)および(C) ブタ胎児由来線維芽細胞およびiPS細胞のヒストンH3K27トリメチル抗体の染色.

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) Guo Y, Fukuda T, Donai K, Kuroda K, Masuda M, Nakamura S, Yoneyama H, Isogai E (2015) Leptospiral lipopolysaccharide stimulates the expression of toll-like receptor 2 and cytokines in pig fibroblasts. *Anim Sci J* 86. doi: 10.1111/asj.12254 (査読あり)

2) Donai K, Kiyono T, Eitsuka T, Guo Y, Kuroda K, Sone H, Isogai E, Fukuda T (2014) Bovine and porcine fibroblasts can be immortalized with intact karyotype by the expression of mutant cyclin dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase. *J Biotechnol* 176: 50-57. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.02.017. (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

1) Fukuda T (2015) Porcine derived induced pluripotent stem cell with six reprogramming factors. 8th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research Taiwan. (2015年4月12日)

2) 福田智一, 谷哲弥, 原口清輝, 土内憲一郎, 星野由美, 西森克彦 (2014年8月) ブタ由来人工多能性幹細胞の生物学的特性の解析. 第107回日本繁殖生物学会 帯広. (2014年8月21日)

3) 福田智一, 土内憲一郎, 星野由美, 西森克彦 (2013年9月) ブタ由来人工多能性幹細胞とその細胞生物学的特徴. 第106回日本繁殖生物学会 東京農工大学. (2013年9月13日)

4) Fukuda T (2012) Application of induced pluripotent stem cells for the screening of low-molecular demethylating compounds. The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology Nagoya. (2012年11月27日)

5) 福田智一, 星野由美, 西森克彦, 佐藤英明
(2012年9月) プタ由来人工多能性幹細胞の
樹立. 第105回日本繁殖生物学会 つくば市.
(2012年9月6日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 智一(FUKUDA TOMOKAZU)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 40321640

(2) 研究分担者

上西 博英(HIROHIDE UENISHI)
独立行政法人 農業生物資源研究所・主任研
究員

研究者番号: 80391556

(3) 連携研究者

星野 由美(YUMI HOSHINO)
東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 10451551