

令和元年6月24日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04581

研究課題名(和文) 遺伝子挿入を伴わないブタ人工多能性幹細胞の作出と安全性評価

研究課題名(英文) Establishment of integration free swine iPS cell

研究代表者

福田 智一 (Tomokazu, Fukuda)

岩手大学・理工学部・教授

研究者番号：40321640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：山中4因子とよばれる遺伝子群に2遺伝子を加え、合計6遺伝子の導入によって安定的なブタ由来iPS細胞を樹立した。我々が樹立したiPS細胞は山中4因子のみで樹立した場合よりも安定的に正常な染色体パターンを維持できる。X染色体の不活性化状態から着床前の状態の幹細胞に近いこと、初期胚の内部細胞塊に寄与することを明らかにした。これらのデータは我々の樹立したブタiPS細胞の全能性と品質の高さを示した。さらに次世代シーケンサーを使用し全遺伝子の配列を元の線維芽細胞と比較して生物学的特性を評価した。優良な形質を持つブタ個体の細胞を遺伝資源として無限に利用出来る可能性を開き、我が国の畜産業の発展に寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の研究によって、山中4因子によって効率的に幹細胞へリプログラミングできる動物種とそうでない動物種の存在が指摘されている。具体的にはOct3/4遺伝子のアミノ酸配列自体は高度に保存されているが、幹細胞へ変化させる過程で作用する遺伝子群が動物種によって異なる仮説である。この仮説の元は、同じ山中4因子を導入してもマウスとその他の動物種において大きく幹細胞の樹立効率が異なることが報告されてきた。この種差はリプログラミングバリアと呼ばれている。本研究では網羅的に遺伝子発現を解析したことから、このリプログラミングバリアの分子生物学的な解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cell was developed by Dr. Yamanaka in Kyoto University in 2006. We established pig derived iPS cell with the expression of reprogramming six factors including Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Nanog, Lin28. Our established pig derived iPS cell can maintain the normal chromosome pattern when it compared with iPS cell with four reprogramming factors. Furthermore, our established iPS cell showed activated status of X chromosome for both of maternal and paternal allele, indicating that our status of our established iPS cell is close to the embryo before implantation. Additionally, we carried out the whole genome transcriptome analysis with next generation sequencer among parent fibroblast and iPS clone 1 and 2. Our established method would contribute to the progress of the livestock sciences.

研究分野：畜産学

キーワード：ブタ 産業動物 幹細胞 次世代シーケンス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞(iPS)とは京都大学の山中伸弥教授が開発した方法で、少数の遺伝子を導入し全身に分化する全能性を人工的に付加した細胞である。この細胞は生殖細胞を含む全身へ分化出来る能力を持ち、再生医療や様々な産業で注目されている。異分野で生まれた本技術を畜産学に適用し、新たな技術革新を目指すため、本研究が実行された。

本研究チームは、ブタの胎児由来線維芽細胞に山中4因子とよばれる遺伝子群に2遺伝子を加え、合計6遺伝子の導入によって安定的なブタ由来 iPS 細胞を樹立した。我々が樹立した iPS 細胞は山中4因子のみで樹立した場合よりも安定的に正常な染色体パターンを維持できる。加えて X 染色体の不活性化状態から着床前の状態の幹細胞の状態であること、初期胚の内部細胞塊に寄与することを明らかにした。これらのデータは我々の樹立したブタ iPS 細胞の全能性と品質の高さを示している。しかしながら、我々の樹立したブタ iPS 細胞はゲノムへ外来遺伝子が挿入されており、このまま個体に戻しても遺伝子組み換え体となってしまう。本研究チームの研究実績を進展させ、一過性の遺伝子発現もしくは外来遺伝子の切り出しを通じてブタ iPS 細胞を樹立する。樹立した iPS 細胞から作出される個体は遺伝子挿入を持たず、組み換え体とはならない。さらに次世代シーケンサーを使用し全遺伝子の配列を元の線維芽細胞と比較して安全性を評価する。この技術は優良な形質を持つブタ個体の細胞を遺伝資源として無限に利用出来る可能性を開き、我が国の畜産業の発展に寄与する。

### 2. 研究の目的

人工多能性幹細胞とは、京都大学の山中伸弥教授が開発した新規幹細胞の作製方法である。2006年に Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc の4遺伝子の発現によって終末分化した細胞を生殖細胞まで含む全身の細胞へ分化する幹細胞へ細胞状態を変化させる技術である。人類が歴史上作った幹細胞には2種存在し、胚から作製した ES 細胞とリプログラミング技術を用いて作製した iPS 細胞が存在する。ES 細胞および iPS 細胞は極めて類似した生物学的特性を示し、再生医療の切り札とも言われている。本技術は再生医療のために開発された技術であるが、産業動物に応用することにより高い経済価値を持つ動物の生殖細胞を作り出すことを可能にし、飛躍的発展が期待される。このような背景から、我々はブタ iPS 細胞の作製に着手した。

近年の研究によって、山中4因子によって効率的に幹細胞へリプログラミングできる動物種とそうでない動物種の存在が指摘されている。具体的には Oct3/4 遺伝子のアミノ酸配列自体は高度に保存されているが、幹細胞へ変化させる過程で作用する遺伝子群が動物種によって異なる仮説である。この仮説の元は、同じ山中4因子を導入してもマウスとその他の動物種において大きく幹細胞の樹立効率が異なることが報告されてきた。この種差はリプログラミングバリアと呼ばれている。本研究では網羅的に遺伝子発現を解析したことから、このリプログラミングバリアの分子生物学的な解明に繋がると期待される。

### 3. 研究の方法

研究を開始した当初は、山中4因子、Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc を発現するレンチウイルスを使用していたが、山中4因子だけでは長期間コロニーを維持することが困難であった。このことから、山中4因子に2因子を加え、合計6因子となる発現ベクターを構築した。追加した2因子は Nanog および Lin28 遺伝子である。この2因子の下流に IRES (Internal Ribosomal Entry Site) および ZsGreen 蛍光タンパク質を配置した。6因子の iPS 細胞は緑色蛍光を示すと予想された。iPS 細胞の培養条件は以下のとおりである。マウス胎児由来線維芽細胞(MEF)を元に作製したフィーダー細胞上に、35mm 培養ディッシュあたり、 $1 \times 10^5$  細胞の幹細胞を播種した。細胞には Gibco 社の Accutase を使用した。培養培地には DMEM/F12 培地を基礎培地として、15% Knockout Serum Replacement を添加した。さらに MEK 阻害剤である PD0325901 および GSK-3 $\beta$  の阻害剤である CHIR99021、TGF- $\beta$  シグナルの阻害剤であるチアゾピビンを使用した。さらにヒト由来 LIF (白血病阻止因子)、線維芽細胞増殖因子(b-FGF)を添加した。

iPS 細胞を誘導する親となった胎児性線維芽細胞および iPS 細胞から全 RNA を抽出した。全 RNA を対象に逆転写反応を行なった。逆転写反応においてゲノム DNA の混入を最小にするために DNase I 処理を同時に行なった。得られた cDNA ライブラリーを元に全遺伝子を HiSeq2000 を用いて次世代シーケンサーによる解析を行なった。得られたリードを配列を元に現在、ブタゲノムの最新版を参照配列としてマッピングを行なった。反応はペアエンドの 100bp で実施した。これらの配列情報の処理には Linux ベースのコンピュータを使用した。得られた次世代シーケンスのデータを FASTQC によって正確度の高い配列のみを抽出した。抽出されたリードを参照ゲノム配列へまず、マッピングした。マッピングには STAR プログラムを使用した。マッピングデータから、Cufflinks-R package による発現の異なる遺伝子の抽出を行なった。一方、Cufflinks-Cuffdiff ではなく、遺伝子あたりのリードカウントを定量化するパイプライン、FeatureCount-TCC パイプラインでも解析を行なった。Cufflinks-R は全ての遺伝子の発現パターンは正規分布する前提で解析が行われているが、FeatureCount-TCC においては得られたデータを元に尤度を用いて解析を行なっていることが最も大きな相違である。我々は元の線維芽細胞およびブタ由来 iPS 細胞の次世代シーケンスのデータを対象に解析を行なった。なお、我々の独自のサンプルで得られた合計3つのデータに加えて9つの公共データベースから得られた

データを解析した。また FeatureCount-TCC においては R 言語を解析に使用し、遺伝子の平均化に TCC 法を使用した。得られた結果は R package を使用し可視化した。

#### 4. 研究成果

HiSeq2000 によって各サンプルに対して、それぞれ 2 回のシーケンス反応を実施した。ブタ由来 iPS 細胞クローン 1 および 2、親株となった線維芽細胞に対して、おおよそ 45M リードの cDNA 配列を得た。得られた参照ゲノムへのマッピング率は iPS 細胞でおおよそ 70%、線維芽細胞で 90%を超えていた。これらのマッピング率の幹細胞データにおける低さは培養に使用したフィーダー由来の RNA に起因していると考えられた。

二次元の主成分分析において、cufflinks-R もしくは featureCount-TCC では fibroblast のみ、iPS のみのクラスターに分類することはできなかった。しかし三次元の主成分解析によって、featureCount-TCC では線維芽細胞のクラスター、iPS 細胞のクラスター 1、iPS 細胞のクラスター 2 に分類することが可能であった。

さらにデンドログラム解析によって、cufflinks-R では XY 染色体もしくは XX 染色体の染色体の違いによって分類されてしまう結果が得られた一方、featureCount-TCC においては線維芽細胞、4 因子によって作られた iPS 細胞、6 因子によって作られた iPS 細胞を区別することが可能であった。さらに多能性に関連する遺伝子群の発現パターンのみを抽出して解析したところ、cufflinks-R では線維芽細胞と iPS 細胞を区別することはできなかったが、featureCount-TCC では線維芽細胞および 4 因子によって作られた iPS 細胞、6 因子によって作られた iPS 細胞の区別が可能であった。また、個別の幹細胞特異的な遺伝子発現に関してグラフ化したところ、ERAS, ESRRB, FGF4 遺伝子の発現が 6 因子で作られた iPS 細胞特異的に上昇していることが明らかになった。特に ERAS は奇形腫形成に重要な遺伝子と報告されており、本研究で解析したブタ由来 iPS 細胞は奇形腫形成能力を持つことが判明しており、この性質を反映した遺伝子発現パターンと解釈された。

我々はブタ iPS 細胞、特に 4 因子および 6 因子によってリプログラミングされたブタ由来 iPS 細胞を比較することで、6 因子に特異的な幹細胞に関連する遺伝子の上昇を発見した。一方、マウスやヒトにおいて 4 因子の発現でも ERAS や ESRRB 遺伝子の発現の上昇が認められている。ブタになることで、マウスやヒトと異なる遺伝子ネットワークを持つためにこのような種差が生じたと考えられた。ERAS や ESRRB の発現誘導に 6 つの遺伝子を要求する種差がリプログラミングバリアの本体である可能性がある。リプログラミング因子の数を増加させた場合、ネットワークに違いが生じて幹細胞への運命変化を起こすことが可能になると考えられた。今後、実際に関与する遺伝子のプロモータ領域における応答配列の違いなど分子レベルでの種差の解明が必要である。そのためには現在のブタゲノムの情報密度では不足している。次世代シーケンスの有利な点は、参照されるリファレンスゲノムがアップデートされることで新たな未知の遺伝子発現の違いを発見できる可能性があることを上げなければならない。本研究のように細胞、生物学的な違いを全て次世代シーケンスによって解明しようという動きが加速すると思われる。我々は異なる原理の 2 つの定量化法によって featureCount-TCC が最も生物学的および細胞生物学的特徴を反映していることを明らかにした。Cufflinks パイプラインは全ての遺伝子に対して発現レベルが正規分布に従う前提で解析されている一方、featureCount-TCC では実際のデータに対して尤度を求める現実的な解析法といえる。全ての細胞、動物種に対して同様の方法が有効であるかさらに検討が必要であるが、本研究では生物学的特性を考慮した全ゲノムレベルでの遺伝子発現解析の方法としてモデルを示した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Fukuda T., Doi K, Donai K, Takahashi K, Kobayashi H, Hirano T, Nishimori K, Yasue H. Global transcriptome analysis of pig induced pluripotent stem cells derived from six and four reprogramming factors. Sci Data (査読あり) 6, 2019, 190034.

〔学会発表〕 (計 3 件)

1) 6 因子発現によるブタ iPS 細胞の X 染色体の活性化と遺伝子発現プロファイリング

会議名称：日本畜産学会

発表形態：口頭(一般)

開催期間：2018 年 3 月 27 日～2018 年 3 月 30 日

発表者：福田 智一・谷 哲弥・原口 清輝・土内 憲一郎・中嶋 信美・上西 博英・永塚 貴弘・宮川 誠・宋 相憲・大沼 学・星野 由美・佐藤 英明・本多 新

主催者：日本畜産学会

開催場所：東京大学

2) RNA-seq analysis among multiple pig derived induced pluripotent stem cell line.

会議名称：Forth World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017)

発表形態：ポスター(一般)

開催期間：2017年9月27日～2017年9月29日  
発表者：Donai K, Kobayashi H, Hirano T, Fukuda T.  
主催者：World Congress of Reproductive Biology  
開催場所：Okinawa

### 3) リプログラミング6因子の発現によるブタ iPS 細胞の作製と特徴

会議名称：日本実験動物学会  
発表形態：ポスター(一般)  
開催期間：2017年5月25日～2017年5月27日  
発表者：福田智一, 谷哲弥, 原口清輝, 土内憲一郎, 中嶋信美, 上西博英, 永塚貴弘, 宮川誠, 宋相憲, 大沼学, 星野由美, 佐藤英明, 本多新  
主催者：日本実験動物学会  
開催場所：郡山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

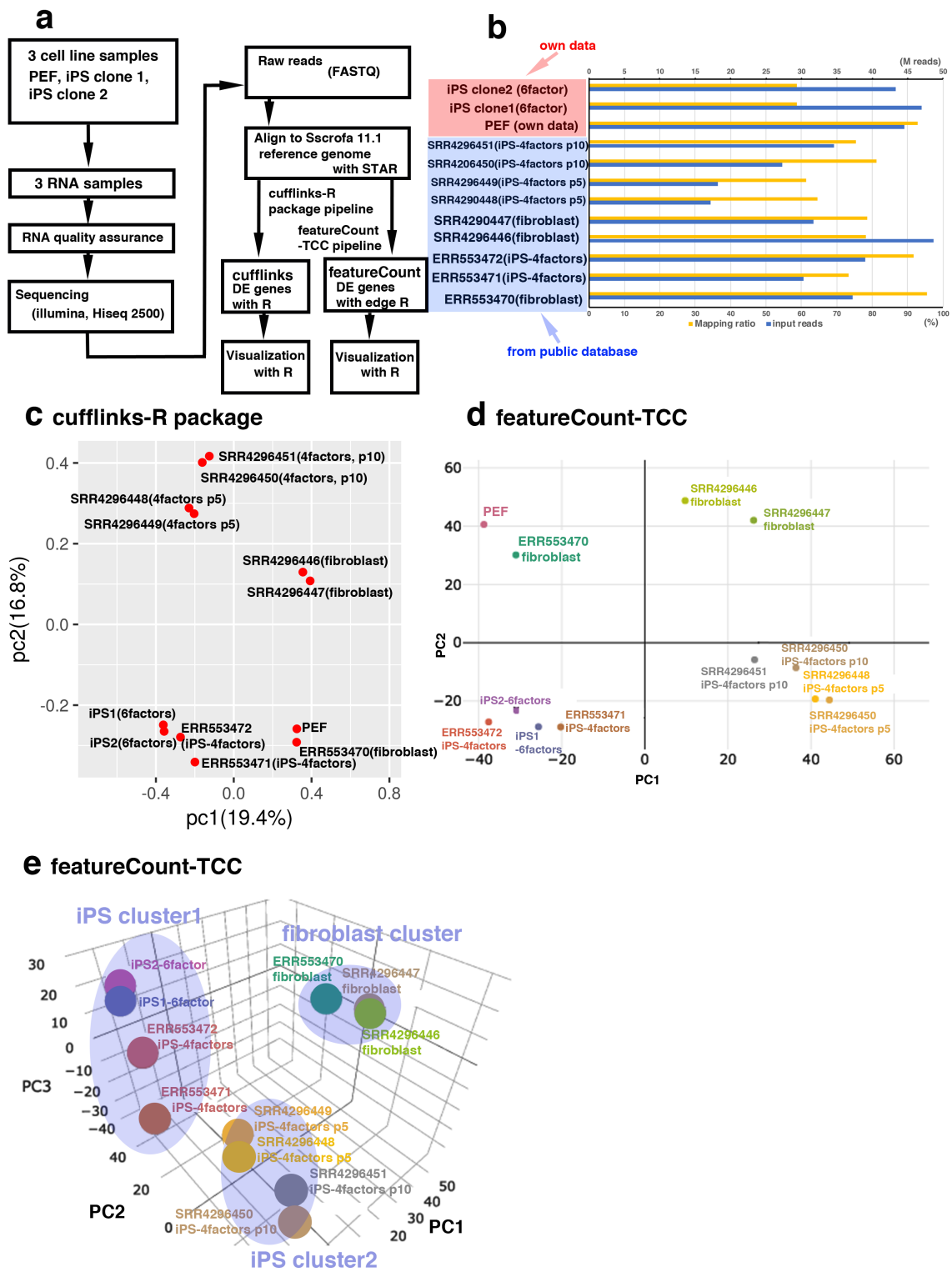


図1：ブタ iPS 細胞の次世代シーケンスを用いた生物学的特性の解析。(a) 解析に用いた手法を図示した。マッピングに STAR を用いた後、Cufflinks によって距離行列を求めた後に R で解析する手法、カウントベースで featureCount-TCC の 2 つの解析法を用いた。(b) 用いたデータのリード数とマッピング割合を図に示した。(c) cufflinks-R によって得られた 2 次元の主成分分析結果。(d) featureCount-TCC によって得られた 2 次元の主成分分析の結果。(e) featureCount-TCC によって得られた 3 次元の主成分分析の結果。

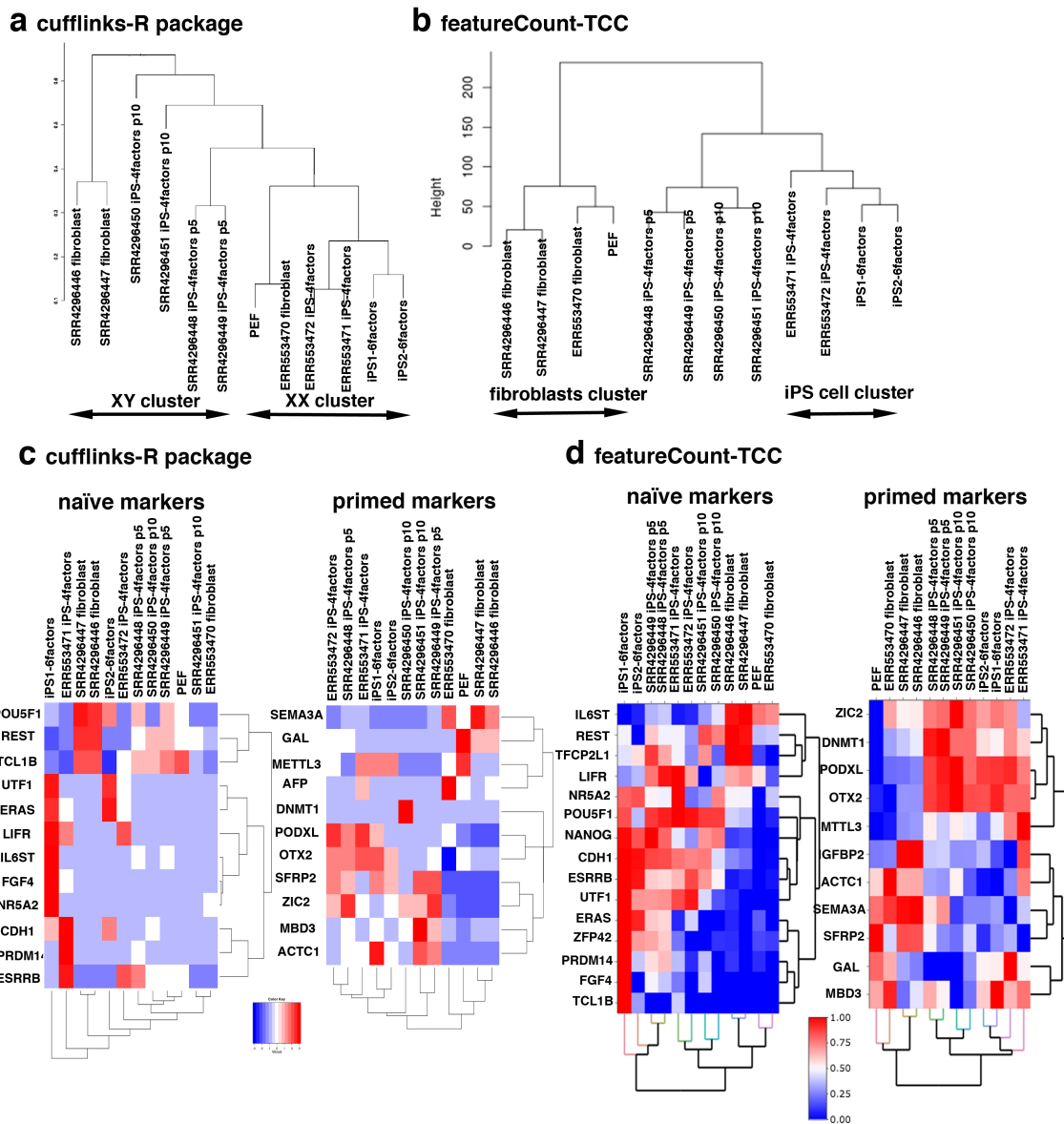


図2: ブタ iPSC 細胞の次世代シーケンスを用いた全ゲノム解析. (a) cufflinks-R を使用したデンドログラム解析結果 (b) featurecount-TCC を使用したデンドログラム解析結果. (c) cufflinks-R を使用した多能性関連遺伝子の発現パターンを使用したヒートマップ解析 (d) featurecount-TCC を使用した多能性関連遺伝子の発現パターンを使用したヒートマップ解析