

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14887

研究課題名(和文) 胚盤胞補完法を用いたウサギ/カニクイザル異種間キメラ動物の作製

研究課題名(英文) Rabbit/Cynomolgus monkey interspecific chimera produced by blastocyst complementation.

研究代表者

本多 新 (Honda, Arata)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：10373367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画の過程で、カニクイザルのナイーブ様変換を成し遂げ(真のナイーブ変換には至らなかった)、実際にウサギとの異種間キメラ胚を作製した。他方、本研究計画から派生したテーマで、絶滅危惧種アマミトゲネズミのナイーブ型iPS細胞の樹立と、マウスとの異種間キメラの作成、そして生殖細胞への分化までを成し遂げ、アマミトゲネズミ生殖細胞における、性的柔軟性を見いだす研究成果に恵まれた。iPS細胞から異種間キメラの作成に至ったのはマウスとラットに次いで三例目であり、ナイーブ型iPS細胞により異種間キメラを作成することを目指した本研究課題にとって、予想外の大きな成果となった。

研究成果の概要(英文)：This research project had been aimed for the derivation of cynomolgus monkey/rabbit interspecific chimera using blastocyst complementation methods. We achieved naive-like conversion of cynomolgus monkey ES/iPS cells, which can enhance their in vitro differentiation potential. According to the research project, it revealed that rabbit embryos were not suitable for the host of interspecific chimera production. On the other hand, following mice and rats, the 3rd true naive-iPS cells were successfully established from an endangered species, Tokudaia osimensis. We produced interspecific chimera and elucidated the sexual plasticity of the germ cells of the endangered species.

研究分野：実験動物学

キーワード：iPS細胞 キメラ

### 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹(iPS)細胞は理論的にほとんど全ての細胞に分化することができる。実際にiPS細胞を動物の初期胚に注入して発生させれば、注入したiPS細胞がほとんど全ての組織に分化したキメラ動物を作出できる。2010年、日本の高橋・中内博士らにより、この技術を利用した画期的な方法が開発された。それが「胚盤胞補完法」である。脾臓ができなくなるようにpdx1遺伝子を破壊したマウス初期胚に、ラットのiPS細胞を注入したマウス/ラット異種間キメラを発生させたところ、ラットiPS細胞がマウス胚の中で脾臓として分化・発生し、ラットの細胞からなる脾臓を持つマウスが誕生した。この技術は実験動物の個体内にヒトの臓器を作らせるような研究への展開が期待されているが、マウスとラット以外の動物種で成し遂げられたことはない。なぜなら(ヒトを含む)その他全ての動物種から樹立されるiPS細胞はキメラ形成能に乏しいこと、および、遺伝子破壊が困難であることに起因する。さらに、ヒトiPS細胞と動物のキメラ作製を成し遂げるには、技術的にも倫理的にも実験動物での試行錯誤が必要不可欠である。キメラを作ることが目的であるため、世代サイクルが短く、多産で、発生工学技術が確立されている動物を用いることが望ましい。また、ヒトのモデルにするのが目的であるため、その動物種はマウスやラットとは異なり、ヒトと同様にキメラになりにくいiPS細胞を生じる動物でなければならない。さらに、胚盤胞補完を行うためには、目的の臓器ができなくなるように、遺伝子破壊が可能な動物種でなければならない。これら全ての条件を克服しているのが「ウサギ」である。我々はこれまでにウサギiPS細胞にキメラ形成能を獲得させるような研究(Honda et al, 2011, Honsho, Honda et al, 2014)やウサギで遺伝子破壊を成し遂げた研究(Honda et al, 2014)を進展させて

きた。

### 2. 研究の目的

(キメラ作製が極めて困難な)ヒトやサルで報告されているナイーブ化に関する知見(キメラ産仔の獲得には至っていない)を、キメラ作製実験が容易なウサギiPS細胞に適用し、ウサギでキメラ『産仔』形成能を獲得させられるか否かを検討する。一方、薬剤誘導性ゲノム編集ベクターを用いた遺伝子破壊ウサギ胚の作製を行い、ウサギで胚盤胞補完を成し遂げる。この技術はカニクイザルiPS細胞にも適用し、サルのiPS細胞とウサギの胚で異種間キメラを作製する。

### 3. 研究の方法

本研究はカニクイザルiPS細胞にキメラ能を獲得させ、脾臓、腎臓が発生しないような遺伝子を破壊したウサギ初期胚に注入して、サルの細胞からなる脾臓、腎臓をウサギ体内に生じさせる研究である。おもに以下に挙げる二つの項目を同時並行で進行させる。

iPS細胞にキメラ形成能を獲得させる：関連遺伝子の過剰発現と培養環境最適化により、ウサギiPS細胞にキメラ形成能を獲得させる。ウサギで系が確立した後に、サルiPS細胞に適用する。

ウサギゲノム編集：標的遺伝子破壊用配列を含んだPiggyBac転移酵素応答性ドキシサイクリン(Dox)誘導CRISPR/Cas9ベクターでトランスジェニック(Tg)ウサギを作製し、交配して受精卵を得る。Doxの投与により受精卵の時点で標的遺伝子が破壊された胚が調達できるため、ここにキメラ能を獲得させたiPS細胞を注入して、発生しないはずの臓器をiPS細胞で補完する。

### 4. 研究成果

本研究計画はカニクイザルの多能性幹細胞とウサギの胚を用いて異種間キメラを作出し、臓器の再生などに役立てようとした研究である。特にキメラ形成能を有する真のナイ

ープ型幹細胞の樹立と、異種間キメラ作成が本研究の肝と認識していた。本研究計画の過程で、カニクイザルのナイーブ様変換を成し遂げ（真のナイーブ変換には至らなかった）、実際にウサギとの異種間キメラ胚を作製した。しかし、ウサギ胚は宿主としてナイーブ型幹細胞を受け入れにくいことを見いだした。一方、カニクイザル ES/iPS 細胞のナイーブ様変換により、神経系などへの体外分化誘導能が亢進することを見だし、誌上発表に至った。本研究ではゲノム編集を活用し胚を作製して、異種間キメラ作りの宿主にすることを目的としていたが、その過程でゲノム編集関連技術を発展させて、多数の共同研究と誌上発表に至った。他方、本研究計画から派生したテーマで、絶滅危惧種アマミトゲネズミのナイーブ型 iPS 細胞の樹立と、マウスとの異種間キメラの作成、そして生殖細胞への分化までを成し遂げ、アマミトゲネズミ生殖細胞における、性的柔軟性を見いだす研究成果に恵まれた。iPS 細胞から異種間キメラの作成に至ったのはマウスとラットに次いで三例目であり、ナイーブ型 iPS 細胞により異種間キメラを作出することを目指した本研究課題にとって、予想外の大きな成果となった。

#### 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 17 件）

1. Arata Honda. Applying iPSCs for preserving endangered species and elucidating the evolution of mammalian sex determination. *BioEssays* (in press)
2. M. Afanassieff, Arata Honda, E. Gocza, D. Bosnakovski, and P. Savatier. Pluripotent stem cells in rabbit. *Rabbit Genetics*, (CAB eBooks)(book chapter)(in press)
3. Koji Yamamoto, Makiko Kawaguchi, Takeshi Shimomura, Aya Izumi, Kazuomi Konari,

Arata Honda, Chen-Yong Lin, Michael D. Johnson, Yoshihiro Yamashita, Tsuyoshi Fukushima and Hiroaki Kataoka. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI-2)/SPINT2 contributes to invasive growth of oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget* (2018) in press

4. Mitsuyoshi Tanishima, Shigeo Takashima, Arata Honda, Daisuke Yasuda, Takashi Tanikawa, Satoshi Ishii, Takashi MaruYama. Identification of Optineurin as an Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1-Binding Protein and its Role in Regulation of MyD88-Dependent Signaling. *J. Biol. Chem.* (2017) 292: 17250-17257.
5. Arata Honda and Atuo Ogura. Rabbit Models for Biomedical Research Revisited via Genome Editing Approaches. *Journal of Reproduction and Development*. **63**: 435-438.
6. Yasuhiro Kawano and Arata Honda. Gene targeting in rabbits: single-step generation of knockout rabbits by microinjection of CRISPR/Cas9 plasmids. *Genome Editing in Animals: Methods in Molecular Biology*. 1630:109-120, 2017 ( book chapter )
7. Yuki Hatanaka, Takeshi Tsusaka, Natsumi Shimizu, Kohtaro Morita, Takehiro Suzuki, Shinichi Machida, Manabu Satoh, Arata Honda, Michiko Hirose, Satoshi Kamimura, Narumi Ogonuki, Toshinobu Nakamura, Kimiko Inoue, Yoshihiko Hosoi, Naoshi Dohmae, Toru Nakano, Hitoshi Kurumizaka, Kazuya Matsumoto, Yoichi Shinkai, Atsuo Ogura. Histone H3 methylated at arginine 17 is essential for reprogramming of the paternal genome in zygotes. *Cell Reports* (2017) 20: 2756-2765.
8. Arata Honda, Narantsog Choijookhuu,

- Haruna Izu, Yoshihiro Kawano, Mizuho Inokuchi, Kimiko Honsho, Ah-Reum Lee, Hiroki Nabekura, Hiroshi Ohta, Tomoyuki Tsukiyama, Yasuhide Ohinata, Asato Kuroiwa, Yoshitaka Hishikawa, Mitinori Saitou, Takamichi Jogahara, and Chihiro Koshimoto. Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered *Tokudaia osimensis*. *Science Advances* (2017) 3: e1602179
9. Kimiko Inoue, Michiko Hirose, Hiroki Inoue, Yuki Hatanaka, **Arata Honda**, Ayumi Hasegawa, Keiji Mochida, Atsuo Ogura. The rodent-specific microRNA cluster within the *Sfmbt2* gene is imprinted and essential for placental development. *Cell Reports* (2017)19(5):pp949-956
10. **Arata Honda**, Yoshihiro Kawano, Haruna Izu, Narantsog Choijookhuu, Kimiko Honsho, Tomonori Nakamura, Yukihiro Yabuta, Yasuhiro Takashima, Takuya Yamamoto, Michiko Hirose, Tadashi Sankai, Yoshitaka Hishikawa, Atsuo Ogura, and Mitinori Saitou. Discrimination of Stem Cell Status after Subjecting Cynomolgus Monkey Pluripotent Stem Cells to Naïve Conversion. *Scientific Reports* (2017)7, 45285
11. Michiko Hirose, Ayumi Hasegawa, Keiji Mochida, Shogo Matoba, Yuki Hatanaka, Kimiko Inoue, Tatsuhiko Goto, Hideki Kaneda, Ikuko Yamada, Tamio Furuse, Kuniya Abe, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura, Shigeharu Wakana, **Arata Honda**, and Atsuo Ogura. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice: generation of tamed wild-derived strains by mutation of the *a* (nonagouti) gene. *Scientific Reports* (2017) 7, 42476
12. Kotaro Shide, Takuro Kameda, Takumi Yamaji, Masaaki Sekine, Naoki Inada, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Kenichi Nakamura, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Haruko Shimoda, Akira Kitanaka, **Arata Honda**, Akira Sawaguchi, Hiroo Abe, Tadashi Miike, Hisayoshi Iwakiri, Yoshihiro Tahara, Mitsue Sueta, Satoru Hasuike, Shojiro Yamamoto, Kenji Nagata, and Kazuya Shimoda. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia* (2017) 31, 1136–1144
13. Tomokazu Fukuda, Tetsuya Tani, Seiki Haraguchi, Keichiro Donai, Nobuyoshi Nakajima, Hirohide Uenishi, Takahiro Eitsuka, Makoto Miyagawa, Sanghoun Song, Mananu Onuma, Yumi Hoshino, Eimei Sato, and **Arata Honda**. Expression of Six Proteins Causes Reprogramming of Porcine Fibroblasts Into Induced Pluripotent Stem Cells with Both Active X Chromosomes. *J. Cell. Biochem.* (2016) 118 (3):pp537-553
14. Kaori Motomura, Mami Oikawa, Michiko Hirose, **Arata Honda**, Sumie Togayachi, Hiroyuki Miyoshi, Yasuhide Ohinata, Michihiko Sugimoto, Kuniya Abe, Kimiko Inoue, and Atsuo Ogura. Cellular Dynamics of Mouse Trophoblast Stem Cells: Identification of a Persistent Stem Cell Type. *Biol. Reprod.* (2016) 94 (6):122, pp1-14
15. Hisae Kadowaki, Atsushi Nagai, Takeshi Maruyama, Yasunari Takami, Pasjan Satrima Fitrah, Hironori Kato, **Arata Honda**, Tomohisa Hatta, Tohru Natsume, Takashi Sato, Hirofumi Kai, Hidenori Ichijo, and Hideki Nishitoh. Preemptive Quality Control Protects the ER from Protein Overload via the Proximity of ERAD Components and SRP. *Cell Reports* (2015)13(5):pp944-956
16. Kimiko Honsho, Michiko Hirose, Masanori

Hatori, Lubna Yasmin, Haruna Izu, Shogo Matoba, Sumie Togayachi, Hiroyuki Miyoshi, Tadashi Sankai, Atsuo Ogura, **Arata Honda**. Naïve-like conversion enhances the difference in innate in vitro differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells. *J. Reprod. Dev.* (2015)61:pp 13-19

17. **Arata Honda**, Michiko Hirose, Lubna Yasmin, Kazuaki Yuzawa, Kimiko Honsho, Haruna Izu, Atsushi Iguchi, Masahito Ikawa, and Atsuo Ogura. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of Tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. *Experimental Animals* (2015)64:pp 31-37

〔学会発表〕(計 12 件)

1. **本多 新**、絶滅危惧種の特徴を iPS 細胞と発生工学で解き明かす、関西実験動物研究会、京都府、2018 年 3 月 2 日(講演依頼)
2. **本多 新**、メスの細胞から精子 | 性染色体 XO 型の絶滅危惧種アマミトゲネズミ細胞の性的柔軟性、ConBio2017、2017 年 12 月 6 日、兵庫県 (ConBio2017 ワークショップでの講演)
3. **Arata Honda**, Narantsog Chojookhuu, Haruna Izu, Yoshihiro Kawano, Yoshitaka Hishikawa, Takamichi Jogahara, Chihiro Koshimoto. Germ Cells from Induced Pluripotent Stem Cells of an Endangered Species, *Tokudaia Osimensis*, Fourth World Congress of Reproductive Biology 2017、2017 年 9 月 28 日、沖縄県
4. **本多 新**、iPS 細胞と医療を繋ぐ、日本看護遺伝学会第 16 回学術大会、市民公開講座、2017 年 9 月 23 日、宮崎県 (日本看護遺伝学会での講演：市民公開講座)
5. **本多 新**、多能性幹細胞で挑む再生医療への展開、医療と福祉の講演会、2016 年 11 月 19 日、宮崎県 (宮崎県難病団体連絡協

議会での医療講演)

6. **本多 新**、発生工学を利用した多能性幹細胞の質的評価、2016 年 5 月 20 日、第 63 回日本実験動物学会総会、神奈川県 (シンポジウムでの講演)
7. **本多 新**、ゲノム編集による新たな哺乳類モデルの樹立、第 4 回実験動物科学シンポジウム 「新たな疾患モデル動物が切り開く橋渡し研究」、2015 年 12 月 11 日、岡山県 (シンポジウムでの講演)
8. **本多 新**、複数種の実験動物で挑む橋渡し研究の展開、第 11 回霊長類医科学フォーラム「先端医科学研究の現状」、2015 年 12 月 4 日、茨城県 (シンポジウムでの講演)
9. **本多 新**、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の基礎から応用、筑波実験動物研究会、第 23 回総会、第 49 回講演会、2015 年 6 月 12 日、茨城県 (シンポジウムでの講演)
10. **本多 新**、CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊ウサギの作製とその展開、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 28 日、京都府、(学会での講演)
11. **本多 新**、iPS 細胞の基礎とその応用、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 28 日、京都府、(学会での講演)
12. **本多 新**、「iPS 細胞・ゲノム編集・実験動物」で挑む臨床応用への効果的な橋渡し、第 118 回日本小児科学会学術集会、2015 年 4 月 17 日、大阪府、(学会での講演)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

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

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/maruhon/index.html>

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/seika.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本多 新 (HONDA Arata)

京都大学大学院医学研究科・附属動物実験  
施設・特定准教授

研究者番号：10373367

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

( )