

平成30年6月8日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14983

研究課題名(和文)イルカiPS細胞の樹立

研究課題名(英文)Establishment of dolphin iPS cells

研究代表者

浅川 修一 (Asakawa, Shuichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30231872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：イルカのリソースは限られるため、まずイルカ繊維芽細胞の不活化を行った。腹びれイルカ初代繊維芽細胞にSV40T・hTERTを導入したところ不活化し、細胞株を樹立できた。それらを用いてヒトリプログラミング因子Oct3/4、Sox2、L-Myc、Klf4、Lin28遺伝子を導入したところ、コロニー状の細胞集団が観察された。AP染色により染色が確認できコロニーは脱分化状態であることが示唆された。次に正常イルカ繊維芽細胞を用いてiPS化を試みた。しかし用いた繊維芽細胞は増殖が悪くiPS化は成功しなかった。今後新たな繊維芽細胞を得て再度試みる。また鯨類由来リプログラミング因子のクローニングも進めている。

研究成果の概要(英文)：Because dolphin resources are limited, we first established and immortalized dolphin fibroblast culture technology. Gene transfer of SV40T and hTERT into four finned dolphin primary fibroblasts resulted in immortalization and establishment of cell lines. We used co-transfer of human reprogramming factors Oct 3/4, Sox 2, L-Myc, Klf 4, Lin 28 gene, then we observed colony-like cell population. The stains were confirmed by alkaline phosphatase staining, suggesting that the colonies obtained were in a dedifferentiated state. Based on these results, attempts were made to convert normal dolphin fibroblasts into iPS. However, fibroblasts used were poorly proliferated and did not succeed to form iPS cells. In the future we will obtain new fibroblasts and try again. We also are cloning reprogramming inducers derived from cetacean species.

研究分野：水圏生物学

キーワード：バンドウイルカ 腹ビレイルカ iPS 細胞株 不活化 イルカ リプログラミング アルカリフォスファターゼ染色

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは2006年に和歌山の太地町で捕獲された腹ビレイルカの腹ビレ生成のメカニズムを解明すべく研究チームを形成し(加藤秀弘代表、吉岡基事務長)研究を進めてきた。これまで腹にヒレのある鯨類の文献記録は、わずかに突起のあるものを含めて数件あるのみであるが、当該イルカの腹ビレは極めて大きく明確であり、腹ビレと呼称するのにふさわしいものであった。この貴重なサンプルで後肢形成に関するなんらかの手がかりが得られれば、それ自体、重要な科学的知見であるが、さらに四肢動物を祖先とする鯨類が後肢に相当する腹ビレを消失させた進化過程・遺伝的メカニズムの解明にも寄与するところが大きいと期待できる。そして申請者らはすでに四肢動物で後肢形成に決定的な役割をもつ Pitx1 にミスセンス変異を見出した。その変異部位は転写因子である Pitx1 の DNA 結合部位においてアミノ酸置換を生じさせるものであった。このことは腹ビレ形成の原因として同変異が極めて有力であることを示唆するものであるが、残念ながらイルカでは遺伝学的手法による検証は容易ではなく、また後肢がない哺乳類は鯨類のみであるため、適当なモデル生物も活用できない。さらに当該イルカも昨年春に死去している。これらのことを打破すべく本研究ではイルカの不死化細胞、さらには iPS 細胞を作製して、鯨類における後肢消失と再生のメカニズムを明らかにするための実験系を確立したいと考えている。

### 2. 研究の目的

バンドウイルカ、および腹ビレのあるバンドウイルカの iPS 細胞の樹立が本研究の目的である。さらに iPS 細胞を樹立した先にある目的は以下である。

- (1) 腹ビレイルカの原因遺伝子(原因変異)の機能解析
- (2) 鯨類における後肢消失・再形成のメカニズムの解明
- (3) 鯨類一般での iPS 細胞樹立技術の確立
- (4) 鯨類始原生殖細胞の樹立、精子、卵子の形成と人工授精への応用
- (5) 人工肉の作製法に向けた基礎研究
- (6) ヒトにおける低身長治療などへの応用

### 3. 研究の方法

- (1) イルカ山中因子遺伝子のクローニング  
我々はまずは、京大 iPS 研で提供されている、ヒトやマウス由来の山中因子を用いるが、同時にイルカの山中因子ホモログのクローニングも進めて、ヒトやマウスでうまくいかなかった場合に直ちにイルカ由来の遺伝子でテストできるように、OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28 をクローニングし、エピソーマルベクターに組み込んでおく。
- (2) イルカ・腹ビレイルカ的不死化細胞の樹立方法

すでに大西洋バンドウイルカではイルカ線維芽細胞に SV40T(t)antigen 遺伝子を導入することで不死化に成功している。我々は通常のバンドウイルカと腹ビレイルカ由来の線維芽細胞をすでに入手してストックしているが、それらの細胞には限りがあるので、iPS 細胞のソースとして用いるのではなく、腹ビレイルカのゲノムや発現産物のソースを確保したり、イルカ線維芽細胞で各種実験を行ったりできるように、不死化細胞の樹立を行う。具体的には不死化で使用される SV40T(t)antigen と neomycin-resistance 遺伝子を含んだベクターを用いてリポフェクションを行い、培養した腹ビレイルカの線維芽細胞に不死化因子を導入する。2 日後に Geneticin を含んだ培養液に交換すると、5 週間後には不死化因子が導入された細胞のみがコロニーを形成するので、トリプシン処理をして細胞を回収し、不死化細胞が得られる。

#### (3) 腹ビレイルカの iPS 細胞樹立方法

ヒト、およびマウスで確立されているベクターや手法をそのままトレースして iPS 化を試みる。継代培養でコンフルエントになった腹ビレイルカの線維芽細胞をトリプシン処理により回収した後、未分化誘導因子プラスミド溶液と懸濁しエレクトロポレーション装置にセットしプラスミド導入を行う。その後 2 日に一度 10%FBS 培地を交換し、5 日ほどしたらコロニーが見えるので回収し、SNL フィーダー細胞に撒きなおす。培地を iPS 細胞用培地に変え再び 2 日に一度培地を交換し 2~3 週間培養するとコロニーが見え始め、30 日ほどで iPS 細胞コロニーが単離できる大きさになる。その後は iPS 細胞凍結保存液を用いて凍結保存する。ヒトやマウスの系でうまくいかない場合は、まず、導入した遺伝子の発現を確認した上で、発現に問題がない場合は 1 で準備したイルカ遺伝子に置換して行う。発現に問題がある場合は、イルカで発現するプロモータの検討を行う。

#### (4) 多能性獲得の検証

多能性マーカー遺伝子である Nanog、Oct4、TRA-1-60、SSEA-3 の発現を mRNA レベル、抗体を用いたタンパク質レベルで確認して、作製した細胞が iPS 細胞であるか(多能性を持つか)を確認する。

#### (5) 始原生殖細胞への分化誘導

もし早い段階で iPS 化に成功すれば、マウスやヒトで成功している始原生殖細胞への分化誘導(引用文献、 )に向けて、実験を推進する。

### 4. 研究成果

- (1)平成 28 年度は、腹ビレイルカを含め、イルカ細胞のリソースは限られているので、まず iPS 細胞の確立の前段階としてイルカの線維芽細胞培養技術の確立と不死化を行った。腹ビレイルカ初代線維芽細胞を 6well dish 上で培養し、Blasticidin S 耐性遺伝子を有

する組換えレンチウイルスを用いて不死化因子 SV40T および hTERT 遺伝子を導入した。感染実験では、単独あるいは混合ウイルス液を、量を調節し計 6 通りの条件を試みた。導入 2 日後に Blasticidin S を添加して感染細胞を選別した結果、SV40T 発現レンチウイルス液 1 mL、SV40T および hTERT 1 mL 共感染条件下で Blasticidin S 耐性細胞を得ることができた。これらの細胞は一般的なヒト線維芽細胞の分裂限界を超え、現在も分裂を行っている。さらなる性状解析のため、得られた細胞をシングルセルに単離し増殖曲線を作成したところ、これらの細胞は不死化因子導入前の線維芽細胞と比べて著しく増殖速度が上がっていることが分かった。さらに、これらの細胞からタンパク質を抽出し Anti-SV40T antigen 抗体を用いて Western blotting を行い、SV40T の発現を確認することができた。これらの結果から、得られた SV40T 導入細胞および SV40T・hTERT 導入細胞は不死化されており、腹ビレイルカの細胞株の樹立に成功したと結論づけた。次に、得られた細胞株を用いてエレクトロポレーション法によりヒト由来未分化誘導因子 Oct3/4、Sox2、L-Myc、Klf4、Lin28 遺伝子を共導入し、腹ビレイルカ iPS 細胞の樹立を試みた。導入条件は 1650 V、10 msec、3 回および 1300 V、20 msec、2 回の 2 条件を試みた。導入 1 カ月後、これら 2 条件においてコロニー状の細胞集団が観察された。得られたコロニーに対して多能性マーカーであるアルカリフォスファターゼ染色を行ったところ染色を確認することができた。これにより、得られたコロニーは脱分化状態であるという可能性が示唆された。

(2) 平成 29 年度は、前年度に確立した手法に基づいて腹ビレイルカ iPS 細胞樹立の試験段階として不死化した腹ビレイルカ線維芽細胞を用いて、ヒト由来未分化誘導因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28) の導入を行い、多能性マーカーであるアルカリフォスファターゼ染色で陽性反応を示す iPS 細胞様細胞集団を得ることは再現できている。しかし、得られた iPS 細胞様集団は継代および凍結保存・解凍後のフィーダー細胞への接着が著しく悪く、未だ iPS 細胞の樹立を確認できていない。このことに関しては、通常用いられる線維芽細胞ではなく不死化した線維芽細胞を用いているためコロニーの性質が異なっている可能性が考えられる。そこで、不死化した腹ビレイルカ線維芽細胞に代わり腹ビレを有さない通常のイルカの細胞を用いてヒト由来未分化誘導因子の導入を試みた。しかし、不死化した線維芽細胞から得られたような iPS 細胞様コロニーは観察できなかった。その理由として、用いた線維芽細胞は細胞増殖率が悪くコロニーを形成する最適な細胞密度まで達しなかった可能性がある。今後はより細胞増殖効率の良い若いイルカの初代培養細胞を用い、未分化誘導因子

導入時の細胞密度も考慮に入れたうえでイルカ iPS 細胞の樹立を試みる必要があると考えられる。同様に、ヒト由来未分化誘導因子がイルカ iPS 細胞樹立に適さない場合も考え、現在鯨類由来未分化誘導因子のクローニングを行っている。これまで用いてきた未分化誘導因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28) に加え、iPS 細胞の作製効率を上げるため鯨類由来の HHEX/HLX 遺伝子もクローニングを行い、クローニングが完了し次第イルカ線維芽細胞に導入し、最終目標であるイルカ iPS 細胞の樹立を目指し、引き続き研究を進める。

#### < 引用文献 >

K. Hayashi et al, Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent

stem cells. Cell, 146 (2011), pp. 519-532

K. Sasaki, et al., Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. Cell stem cell 17 (2015), pp. 178-194

#### 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 2 件)

Rina Miyashita・Atsushi Takayanagi・Tetsuo Kirihata・Hayashi Katsuyuki・Seiji Ohsumi・Motoi Yoshioka・Hidehiro Kato・Shuichi Asakawa, Establishment of fibroblast cell lines derived from four-finned dolphin Tursiops truncatus and induction of pluripotent stem cells, The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium (国際学会), 2017 年 9 月 30 日~2017 年 9 月 2 4 日, 東京海洋大学品川キャンパス (東京都) 宮下梨菜・高柳淳・桐畑哲雄・大隅清治・吉岡基・加藤秀弘・浅川修一, 腹びれイルカの細胞株樹立および iPS 細胞作製への試み, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 01 日~2016 年 12 月 01 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[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

無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅川 修一 ( ASAKAWA, Shuichi )

東京大学, 大学院農学生命科学研究科(農学部), 教授

研究者番号 : 30231872