

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02324

研究課題名（和文）無限分裂する生殖腺体細胞と幹細胞を用いた卵子作製技術の開発

研究課題名（英文）Differentiation of stem cell with immortalized cells

研究代表者

福田 智一（Fukuda, Tomokazu）

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ブタiPS細胞から始原生殖細胞への誘導を実施した。OCT3/4, NANOG, SOX2, KLF4の発現レベルは顕著ではなかった。初期始原生殖細胞のマーカーであるKLF2, TRAP2C, CD38遺伝子においては21検体中、15検体を超えるサンプルにおいて遺伝子発現の上昇が確認された。MesodermのマーカーであるEMOSにおいては差は認められなかった。EndodermマーカーであるSOX17においては、顕著な発現上昇を見せた。本研究では産業動物由来の幹細胞において始原生殖細胞誘導に成功した初の例である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ゲノム育種の発展により優良な種畜の重要性が増している。乳牛先進国のカナダでは従来の表現型を元にした育種価計算から、多型配列を元にしたゲノム育種価だけの選抜を開始した。人工授精により雄側は高い選抜強度が可能になるが、繁殖雌の場合、集団サイズを維持するため強い選抜をかけることができない。この問題を解決のため、研究代表は優良な雌の卵子を試験管内で無限に作製することを発想した。また、iPS細胞は無限に分裂する機能を有しているので、理論上は幹細胞から生殖細胞誘導が可能になれば、試験管内で生殖細胞を無限に作製できることになる。

研究成果の概要（英文）：We tried the differentiation experiments from iPS cell to PGCLC. We observed down regulation of reprogramming related genes. We observed the expression of KLF2, TRAP2C, CD38. Elevated expression level of SOX17 which is one of the Endoderm markers. This is the first study which succeeded the differentiation into the PGCLC.

研究分野：畜産学

キーワード：畜産学 幹細胞 分化誘導

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年ゲノム育種の発展により優良な種畜の重要性が増している。乳牛先進国のカナダでは従来の表現型を元にした育種価計算から、多型配列を元にしたゲノム育種価だけの選抜を開始した。人工授精により雄側は高い選抜強度が可能になるが、繁殖雌の場合、集団サイズを維持するため強い選抜をかけることができない。この問題を解決のため、研究代表は優良な雌の卵子を試験管内で無限に作製することを発想した。家畜を飼育せず、試験管内で卵子が無限に生産できれば、選抜強度を上げ飛躍的に改良速度を加速し、性成熟に至るまでの飼育費用の大幅なコストダウンが実現できる。本研究では2つの技術(無限分裂化技術と幹細胞技術)を組み合わせ、試験管内でウシおよびブタの卵子を作製する技術を開発することを発想した。また、iPS細胞は無限に分裂する機能を有しているため、理論上は幹細胞から生殖細胞誘導が可能になれば、試験管内で生殖細胞を無限に作製できることになる。マウスにおいては胚性幹細胞(ES細胞)もしくはiPS細胞から生殖細胞を形成した報告があるが、産業動物の場合は、そもそも幹細胞がほとんど存在しない上、同じ幹細胞といってもマウスのものと比較して大きく性質が異なり、そのままマウスのデータを適用することは困難である。これらの産業動物における幹細胞研究へ貢献することを本研究の目的とした。

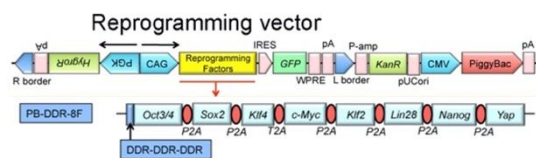
### 2. 研究の目的

近年ゲノム育種の発展により優良な種畜の重要性が増している。乳牛先進国のカナダでは従来の表現型を元にした育種価計算から、多型配列を元にしたゲノム育種価だけの選抜を開始した。人工授精により雄側は高い選抜強度が可能になるが、繁殖雌の場合、集団サイズを維持するため強い選抜をかけることができない。この問題を解決のため、研究代表は優良な雌の卵子を試験管内で無限に作製することを発想した。家畜を飼育せず、試験管内で卵子が無限に生産できれば、選抜強度を上げ飛躍的に改良速度を加速し、性成熟に至るまでの飼育費用の大幅なコストダウンが実現できる。本研究では2つの技術(無限分裂化技術と幹細胞技術)を組み合わせ、試験管内でウシおよびブタの卵子を作製する技術を開発することを発想した。本研究では我々が従来作出していたレンチウイルスによって得られたブタ由来 iPS 細胞を使用するとともに、新たにリプログラミングのためにトランスポゾンを使用した新規ベクターの構築を行った(図1)。

### 3. 研究の方法

まず、従来の OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28, NANOG という6因子をレンチウイルスベクターによってX染色体の両方が活性化し、RNA-Seqによって初期化状態としては高い品質を持つブタ由来 iPS 細胞を使用した。加えて、piggybac トランスポゾンを使用し、OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28, NANOG, KLF2, YAP という8因子を連結させ、同時に発現する初期化ベクターを構築した。従来型のレンチウイルスの場合であっても、感染力価の関係から導入できる遺伝子のサイズがおおよそ5kbの限界があるため、2つのレンチウイルスに分けて導入を行っていた。しかしこの場合はウイルス力価が低いために同時感染させて得られるブタ iPS 細胞のコロニーが数パーセントになるという樹立効率の低さが問題となっていた。一方で、トランスポゾンの場合にはプラスミドサイズが増大する問題はあるが、導入に成功した場合、導入遺伝子の大きさの制約は現実的に存在しない。さらにトランスポゼースおよび導入するトランスポゾン自体の両方を持つ all in one type のベクターを構築した。メスの豚由来の胎児性線維芽細胞へ、OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28, NANOG, KLF2, YAP という8因子を連結させた導入遺伝子を持つベクターをリポフェクションによって導入した。インサート内の各遺伝子の間には2Aペプチドを挿入し、翻訳時に各タンパク質が個別に導入されるように設計を行った。プロモータには cytomegalovirus enhancer と chicken  $\gamma$ -actin promoter をつなげた CAG プロモータを使用できるように、バックボーンベクターを改造した。初代培養細胞へリポフェクションによって10時間遺伝子導入を行なった後に、ハイグロマイシンによって導入されなかった野生型細胞の間引き、選抜を行なった。得られた初期化ベクターを持つブタ由来線維芽細胞をマウス胎児由来線維芽細胞(MEF; Mouse Embryonic Fibroblasts)をマイトマイシンC処理によって分裂阻害処理を行なったフィーダー細胞の上に播種した。その後、ブタ由来 LIF(Leukemia Inhibitory Factor), ヒト由来 LIF, PD0325901, CHIR99021, XAV939 の低分子阻害剤の存在下で培養を行った。培養開始後、おおよそ3週間後に

図1. 新規トランスポゾン由来リプログラミングベクターの構造

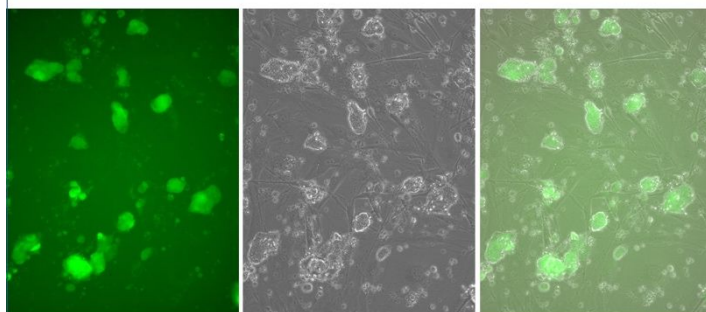


出現した iPS 細胞コロニーを実体顕微鏡下にて切り出し操作を行った。コロニーが再形成されたものに関してさらに、MEF フィーダー上で細胞継代操作を行った。保存には基本培地に 10%のハイブリドーマ保存用の DMSO(Dimethyl sulfoxide)溶液を添加した凍結保存培地を用い、液体窒素中に安定保存を行った。得られた新規ブタ由来 iPS 細胞の多能性マーカーの検出として、アルカリフォスファターゼ染色を行った。さらに蛍光抗体法により、Stage-specific embryonic antigen (SSEA)1 および 3, 4 の免疫染色を行った。また得られた iPS 細胞のゲノム DNA を抽出し、PCR によって導入遺伝子の存在を検出した。ブタ iPS 細胞から始原生殖細胞への分化誘導を以下の通り行った。ゲラチンコートを行った細胞ディッシュへアクチビン A および Y27632 を含む培地にて 6 日間培養を行った。その後、BMP4(Bone Morphogenetic Protein4)および SCF(Stem Cell Factor)を含む培地、V プレートにて 8 日間培養を行った。得られた細胞塊から total RNA を抽出し、リアリタイム PCR 法にて発現遺伝子の定量を行った。得られた分化誘導前の iPS 細胞における遺伝子発現を 1.0 として、分化誘導後の遺伝子発現を相対的に表した。多能性マーカーとして内在性 OCT3/4, NANOG, SOX2, KLF2 を検出した。また初期始原生殖細胞マーカーとして BLIMP, TFAP2C, CD38, NANOS3 を検出した。また Mesoderm マーカーとして EOMES を、Endoderm マーカーとして SOX17 を検出した。

#### 4. 研究成果

レンチウイルス と 6 つのリプログラミング因子を使用したブタ由来 iPS 細胞と新規にトランスポゾンベクターで作製した 8 因子を持つブタ iPS 細胞を比較した。まず、外来遺伝子の発現レベルであるが、レンチウイルスで作製したものは、極めてリプログラミング因子の発現レベルが高かった。両方のベクターとも、下流に IRES(internal ribosome entry site)配列および comet

図2, 新規トランスポゾンおよび8因子の発現によって新規作製したブタiPS細胞の形態

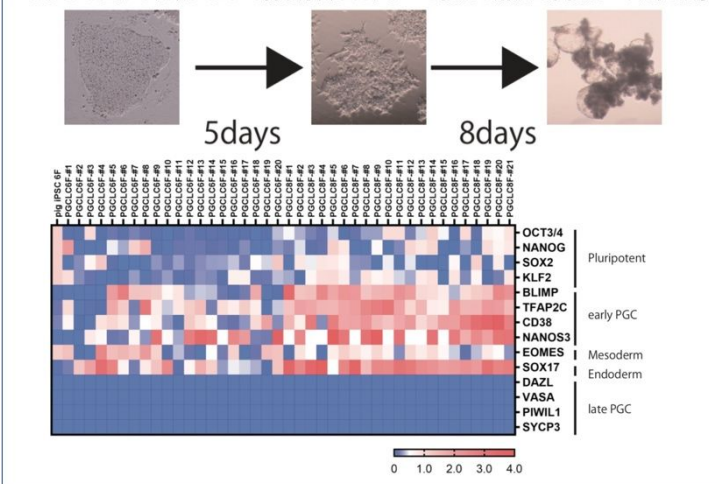


GFP もしくは ZsGreen の緑色蛍光遺伝子が組み込まれている(図 2)。緑色蛍光遺伝子の発光強度から推測しても、レンチウイルスおよび 6 因子によって作られたブタ iPS 細胞の方が発現レベルが高いことが検出された。このことはレンチウイルスの場合はインサート長が短く、翻訳開始点からの距離が短いこと、タンデムに配列されたリプログラミング遺伝子の数が少ないことが原因と考えられた。さらに今回新規にトランスポゾンによって新規に樹立したブタ iPS 細胞の細胞学的特性を解析した。まず、得られたブタ iPS 細胞はアルカリフォスファターゼ染色において陽

性を示し、さらに酵素(アキュターゼおよびトリプシン)による単細胞化にも耐えることが明らかとなった。さらに多能性幹細胞のマーカーである SSEA1, 3, 4 の発現を観察したところ、SSEA1 および 3 で陽性の反応が観察された。また、PCR 法によってゲノム DNA におけるリプログラミングカセットの有無を検出したところ、期待される分子量に増幅を認め、樹立された iPS 細胞はリプログラミングカセットを有していることが明らかとなった。さらに始原生殖細胞への誘導を実施した。始原生殖細胞の誘導において、通常の U 字プレートより、細胞塊を生じやすい V プレートの使用が極めて有効であった。V プレートにおける培養によって、レンチウイルス および 6 因子によって作製されたブタ iPS 細胞の反応を観察した。結果、OCT3/4, NANOG, SOX2, KLF2 の多能性関連遺伝子の発現の低下が認められた。一方で、初期の始原生殖細胞マーカーである BLIMP, TFAP2C, CD38 においては検出した 20 検体中、2 検体で発現の上昇が認められたが、それ以外の検体では全く検出できなかった。また、Mesoderm マーカーである EMOS および SOX17 においても 2 検体での発現の上昇を認めたが、それ以外の検体では発現が検出されることはなかった。一方で、トランスポゾンおよび 8 因子によって新規に作製されたブタ iPS 細胞の反応を以下に述べる。OCT3/4, NANOG, SOX2, KLF4 の発現レベルはレンチウイルスベクターで作製された細胞と比較し、顕著ではなかった。これは元の iPS 細胞での発現レベルが低いことが原因と考えられた。一方で、初期始原生殖細胞のマーカーである KLF2, TRAP2C, CD38 遺伝子においては 21 検体中、15 検体を超えるサンプルにおいて遺伝子発現の上昇が確認された。Mesoderm のマーカーである EMOS においてはレンチウイルスおよび 6 因子を用いて作製したブタ iPS 細胞と差は認められなかった。Endoderm マーカーである SOX17 においては、トランスポゾンベクターおよび 8 因子によって作製したブタ iPS 細胞がより顕著な発現上昇を見せた(図 3)。このことから、我々は生殖細胞の誘導においては、多能性関連遺伝子の発現レベルが高すぎることによって、かえってその後の細胞分化を阻害すると解釈した。レンチウイルスベクターおよび 6 因子によって作製されたブタ iPS 細胞は両方の X 染色体が活性化状態を保っていることを我々は COBRA 法を用いて報告している。加えて細胞増殖能力は高く高品質なブタ iPS 細胞であると考えられる。幹細胞の初期化状態を維持するためには高い多能性関連遺伝子の発現が必要であると考えられ

た。しかし、分化誘導を行う際にこれらの多能性維持のための遺伝子発現が恒常的に発生すると、細胞分化が効率的に進行しないことが明らかとなった。本研究では産業動物由来の幹細胞において始原生殖細胞誘導に成功した初の例である。ドキシサイクリンを初めとする様々な薬剤誘導による遺伝子発現系によって iPS 細胞の樹立が報告されている。我々も同様の薬剤誘導系を用いてブタの iPS 細胞の樹立を試みたが、樹立効率が劇的に下がる結果を得ている。つまり、ブタを初めとする産業動物においては、初期化するためにより高い多能性関連遺伝子の発現が必要であるが、分化誘導の際にはかえってそれが弊害となる。我々はどきドキシサイクリンを初めとする薬剤誘導プロモータと今回用いた CAG プロモーター、EF1 プロモーターの強度を比較したが、薬剤誘導性のものは活性が全体的に低く、マウスやヒトの iPS 細胞の場合は幹細胞への初期化は可能であるが、産業動物であるブタにおいては初期化が困難であるとの結論に達した。さらに、現在 total RNA を iPS 細胞化する前の線維芽細胞、新規に作製したブタ iPS 細胞、そして従来のレンチウイルスを用いて作製した iPS 細胞に関して採取し、全遺伝子レベルの発現解析を進行中である。分化誘導の際に発生したように、iPS 細胞としてはレンチウイルスと 6 遺伝子を用いて作製したものの方が幹細胞としての性質は高いと判定される可能性がある。しかし、いくら良い幹細胞を作製できたとしても、その後の分化誘導に支障が発生するようでは実用に困難が発生する。こ

図3. 従来のレンチウイルス および6因子で作製したブタiPS細胞と新規トランスポゾンおよび8因子の発現によって新規作製したブタiPS細胞の始原生殖細胞への分化誘導



これらの実用面での応用を視野に入れ、産業動物の幹細胞研究を進めてゆく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuda Tomokazu, Doi Koji, Donai Kenichiro, Takahashi Kouhei, Kobayashi Hisato, Hirano Takashi, Nishimori Katsuhiko, Yasue Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Global transcriptome analysis of pig induced pluripotent stem cells derived from six and four reprogramming factors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/sdata.2019.34	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	谷 哲弥  (Tani Tetsuya)  (70319763)	近畿大学・農学部・講師     (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------