

令和 6 年 7 月 16 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15858

研究課題名(和文) 絶滅危惧鳥類の人工多能性幹細胞の樹立と始原生殖細胞への誘導

研究課題名(英文) Establishment of endangered avian derived iPS cells and PGC-like cells.

研究代表者

片山 雅史 (Katayama, Masafumi)

国立研究開発法人国立環境研究所・生物多様性領域・研究員

研究者番号：80784090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物多様性ホットスポットである我が国には、3155種もの絶滅危惧種が生息している。全ての危惧種を保護増殖出来れば理想的だが、現実には難しい。本研究では、保護増殖の一助として、絶滅危惧鳥類の幹細胞を樹立・保存し、資産として次世代への引き継ぎを推進した。本研究では、(1)申請者らが開発した効率的な鳥類の人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立方法を応用し、生殖細胞の保存が事実上不可能な絶滅危惧鳥類の体細胞からiPS細胞を樹立をした。(2)樹立したiPS細胞から、始原生殖細胞様細胞(PGCLC)への分化誘導法の開発を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、絶滅の危惧に瀕する鳥類のiPS細胞の樹立に成功した。iPS細胞は無限に増殖可能であるため一度樹立すれば、半永久的に研究資源として利用可能である。また、凍結保存も可能である。加えて、iPS細胞は様々な細胞に分化可能であるため、神経細胞や肝臓細胞などに分化誘導することで、感染症や環境汚染物質の評価へも利用が可能になる。本研究では希少な鳥類の保全に貢献できる資源の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Japan, a biodiversity hotspot, is home to 3155 endangered species. Although it would be ideal if all endangered species could be protected and propagated, this is difficult to achieve in reality. In this study, we planned to establish and preserve stem cells of endangered avian species as an asset to be passed on to the next generation as a way to help protect and propagate them. In this study, we will (1) apply an efficient method for establishing avian induced pluripotent stem cells (iPS cells) developed by the applicants to establish iPS cells from the somatic cells of endangered birds, for which germ cells are virtually impossible to preserve, and (2) establish iPS cells from the somatic cells of endangered avian. (2) Develop a method to induce differentiation of established iPS cells into primordial germ cell-like cells (PGCLCs).

研究分野：生物資源保全学

キーワード：絶滅危惧種 幹細胞 鳥類

## 1. 研究開始当初の背景

周囲を海に囲まれた日本列島は、大陸と交流が限定されており、様々な固有種や固有亜種が生息している。これらの固有種や固有亜種の保全は、生物多様性や生態系の保全の概念のみならず、進化生物学の面からも重要である。申請者は、様々な固有種や固有亜種が存在する日本列島においても、飛行能力が低い(または無い)鳥類は、他の地域との交流が事実上なく、特殊な進化をたどった生命体であり、研究対象として学術的価値が高いと考えた。そこで申請者は日本国内のみに生息する「ヤンバルクイナ」と「ニホンライチョウ」に着目した。ヤンバルクイナは飛行能力をもたない沖縄島固有の絶滅危惧種であるが、交通事故や野良犬によって、生息数の減少が問題となっている。また、特別天然記念物であるニホンライチョウは、日本アルプスの一部にのみ生息する日本の固有亜種である。ニホンライチョウは氷河期に大陸から移住し、その生き残りが高山地帯に生息を続けているが、昨今の地球の温暖化にともない、絶滅が危惧されている。申請者は、この様な絶滅が危惧されているヤンバルクイナとニホンライチョウの生殖資源を研究することで、日本国内の固有種や固有亜種の保全につなげたいと考えた。

絶滅危惧種からの生殖資源の取得は困難を極める。一方で、死亡個体由来の体細胞の取得は可能であり、申請者はこれまで、様々な絶滅危惧種由来の体細胞の取得に成功している。申請者は、「体細胞をもとにして、絶滅が危惧されているヤンバルクイナやニホンライチョウの生殖資源を作り出すことはできないだろうか」と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ロードキルや気候変動によって個体減少リスクが上昇している日本の固有(亜)種の iPS 細胞と始原生殖細胞様細胞(PGCLC)の作出であった。iPS 細胞は様々な細胞に分化可能であるため、神経細胞や肝臓細胞などに分化誘導することで、感染症や環境汚染物質の評価へも利用が可能になる。また、iPS 細胞は無限に増殖可能であるため一度樹立すれば、半永久的に研究資源として利用可能である上、凍結保存も可能である。したがって、このような細胞を作出すれば、絶滅危惧種保全におけるブレイクスルーを生み出すことが可能になる。また、配偶子のもとになる細胞の作出も目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、iPS 細胞の樹立に利用する線維芽細胞の培養条件の探索を初めに実施した。具体的には、DMEM, medium199, KAv-1 の中から最も活発に細胞増殖可能な培地を探索した。

その後、iPS 細胞と、それを基とした始原生殖細胞様細胞(PGCLC)の作出を試みた。これまで国内外問わず多くのグループが鳥類の iPS 細胞の樹立に挑戦してきた。しかしながら、成功の報告は、Duck 大学と Gergia 大学の報告、数報の iPS-like 細胞の報告に限定されていた。さらに、Duck 大学と Gergia 大学の報告も再現性が取れないため、幹細胞研究者の間では、鳥類の iPS 細胞の樹立方法は確立されていないと認識されていた。この様な状況の中、申請者は初期化に使う Oct3/4 という遺伝子の転写活性能力を強化するという独自の発想で、効率的にニワトリ由来の iPS 細胞が樹立できることを報告した。この様な背景のもと、本研究においても、初期化因子のひとつである Oct3/4 を転写活性強化型 Oct3/4 に改変することで野生鳥類の iPS 細胞の樹立を試みた。また、申請者のニワトリにおける先行研究において、転写活性強化型 Oct3/4 に加えて、Sox2, Klf4, c-myc, Nanog, Lin28 という 6 つの遺伝子の使用が有用であることが明らかになっ

た。そこで、研究においても、これらの遺伝子セットを軸に iPS 細胞の樹立を試みた。本研究においては、これらの初期化因子を一括で導入するため PiggyBac トランスポゾンベクターをバックボーンとする初期化ベクターを自作した。同ベクターは、CAG プロモーターで初期化遺伝子をドライブするものであり、また、マーカーとして GFP を組み込んだ。さらに、ハイグロマイシン耐性遺伝子も組み込むことで、薬剤選択も可能にした。自作した初期化ベクターをリポフェクションにより野生鳥類の線維芽細胞に導入した。初期化ベクターは大型ベクターであるため、導入効率がどうしても低くなる。そこで、遺伝子導入後に、ハイグロマイシンによる薬剤選択を実施した。その後、支持細胞（フィーダー細胞）に再播種し、樹立を継続した。樹立時の培地は KAv-1 培地を基本培地とし、LIF(白血球阻止因子)、FGF(線維芽細胞増殖因子)を添加した。さらに、MEK 阻害剤である PD0325901 と GSK-3beta 阻害剤である CHIR99021 などを使用した。樹立した iPS 細胞に関しては、マーカー染色、遺伝子発現解析等により樹立した細胞が未分化な状態であることを確認した。また、試験管内分化実験や奇形種形成実験により、三胚葉分化能力を有する iPS 細胞であることを確認した。

始原生殖細胞様細胞(PGCLC)への分化誘導に関しては、培養時添加物(ActinvinA と FGF の組み合わせ)で細胞を培養したのちに、別の培養時添加物の組み合わせ(BMP4、SCF、EGF、LIF)で培養することで、PGCLC への分化を模索した。

#### 4 . 研究成果

培地の検討の結果、線維芽細胞において、KAv-1 が最も活発に細胞増殖することが明らかになった。また、これら 3 つの培地の中では、KAv-1 が細胞培養によるストレスの蓄積が最も少ないことも明らかになった。細胞培養ストレスは、体細胞の初期化を阻害する要因の一つとして知られている。そこで、本研究では、iPS 細胞の樹立の際の線維芽細胞培養の培地として KAv-1 を使用することとした。

本研究において、転写活性強化型 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-myc、Nanog、Lin28 らの遺伝子をヤンバルクイナとライチウの線維芽細胞に導入し、体細胞の初期化を試みた。導入効率は高くないものの、リポフェクションによる遺伝子導入後、GFP 強陽性細胞が一定数確認された。薬剤選択後、多数の初代コロニーが出現した。これらのコロニーを pick up し、新たにフィーダー細胞の播種し、維持したところ、iPS 細胞様のクローンが多数樹立できた。

樹立した iPS 細胞様細胞は、長期継代可能であった。また、iPS 細胞で発現するアルカリフォスファターゼや SSEA(Stage-specific embryonic antigen)が発現することが明らかになった。加えて、樹立した細胞の遺伝子発現解析の結果、内在性の Sox ファミリーや Nanog などの哺乳類の iPS 細胞で高発現が確認されている遺伝子が高発現することが明らかになった。

さらに、三胚葉分化能力解析の結果、樹立した細胞は三胚葉分化能力を有する iPS 細胞であることが確認できた。これらの結果から、転写活性型 Oct3/4 を含めた初期化遺伝子セットは、ヤンバルクイナとライチウの iPS 細胞を樹立に有用であることが明らかになった。加えて、樹立した iPS 細胞は凍結保存が可能であった。したがって、本研究で樹立した iPS 細胞は、半永久的に利用可能な生物資源であると考えられる本提案ではヤンバルクイナとライチウの iPS 細胞を樹立した。私たちの知る限り、絶滅危惧鳥類の iPS 細胞の樹立は報告されていおらず、本研究は絶滅危惧種保全における新たな一歩を示すものとなった。

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 Katayama Masafumi, Onuma Manabu, Fukuda Tomokazu	4. 巻 なし
2. 論文標題 KAv-1 is Better Suited to Chick Fibroblast Culture than DMEM or 199 Media	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0200085	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Katayama Masafumi, Onuma Manabu, Fukuda Tomokazu
2. 発表標題 KAv-1 medium is more suitable for culture of chick fibroblasts than DMEM or medium.
3. 学会等名 JAACT2020 Fuchu（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片山雅史, 大沼学, 福田智一
2. 発表標題 ニワトリ線維芽細胞の最適培養条件の探索
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山雅史, 福田智一, 大沼学
2. 発表標題 鳥類由来線維芽細胞の培養条件の最適化
3. 学会等名 第25回日本野生動物医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山 雅史, 福田智一, 中嶋信美, 大沼学
2. 発表標題 転写活性型Oct3/4を用いたニワトリiPS細胞とES細胞の網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本家禽学会2021秋季大会
4. 発表年 2021年

〔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

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