

平成23年 6月 8日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700453

研究課題名(和文)

ヒトとマウスの種間差を補うウサギ幹細胞システムの確立

研究課題名(英文)

Establishment of the rabbit pluripotent stem cell systems for compensating for the difference between human and mouse stem cells.

研究代表者

本多 新 (HONDA ARATA)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・客員研究員

研究者番号： 10373367

研究成果の概要(和文)：

ウサギ ES 細胞がヒトと同様のシグナルを用いてその質を維持していることを明らかにした。また、世界初となるウサギ iPS 細胞の樹立にも成功した。樹立したウサギ iPS 細胞は、継代を進めることにより、幹細胞としての質が向上しウサギ ES 細胞に近づくが、それでも ES 細胞とは相違があることも明らかにした。これまでヒトの多能性幹細胞でも同様の事実が報告されており、ウサギは実験動物としてマウスほどの扱いやすさと、ヒトと同質の多能性幹細胞が樹立できるという優れた特徴を併せ持つことを証明した。

研究成果の概要(英文)：

I identified that bFGF can maintain the undifferentiated status of rabbit ES cells and found that Activin signaling through Smad2/3 activation is necessary to maintain the pluripotent status of rabbit ES cells as those of human ES cells. Moreover, I successfully generated rabbit induced pluripotent stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：

ウサギ、多能性幹細胞、ES細胞、iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞は再生医療や遺伝子改変動物

の作製などにおいて、大きな研究分野を構築して

いるが、特に再生医療研究を推進する場合、『ヒト』は医療への直接的な展開が意識されるため、研究の裾野も広い反面、安全性や倫理面の障壁が高い。一方、『マウス』はその扱いやすさなどから、最も詳細に解析が進んだ実験動物として認知されているが、ヒトとの種間差を補いきれないことも多く、マウスで得られた知見を医療へ応用できないこともある。そこで、実験動物としての歴史も古く、齧歯類とは異なる中型で扱いやすいウサギに着目した。当初、様々な種類のマウス ES 細胞樹立経験を積んでいたが、ウサギ ES 細胞樹立は困難を極め、最終的には支持細胞として共培養するフィーダー細胞の密度の重要性を見だし、ウサギ ES 細胞の樹立を成し遂げた。

2. 研究の目的

代表者は以前から様々な新規幹細胞株の樹立に精力的に取り組んでおり、これまでもマウス核移植由来 ES (ntES) 細胞を含む複数の有用なマウス ES 細胞株を樹立しただけでなく、世界で初めて卵巣由来の幹細胞として莖膜幹細胞を単離し、培養、分化誘導にも成功している。また、ウサギ ES 細胞株の樹立とウサギでのジーンターゲットングを目指して試行錯誤を繰り返し、ウサギ ES 細胞の樹立に関して多くの知見と経験を蓄積していた。実際にウサギ ES 細胞の効率的な樹立方法を開発し誌上発表した。そこで代表者は、1. ウサギを iPS 細胞の評価系として利用する必要性を提唱した。iPS 細胞をヒト医療に利用するためには多角的な安全性評価が必要不可欠である。これまでに樹立されてきたマウス、ヒト以外の動物でも評価を重ねなければならない。ヒトとマウスの間には大きなギャップがあり、マウスで明らかになった現象をそのままヒトへ応用することはできない。多くの動物種で生命現象の本質を見極める事は、人類の安全という観点において

大切なだけでなく、今後の科学の発展においても最重要課題として取り組むべき事項である。そのため、ヒトによく似た特質を有する上に、実験動物としての利点を兼ね備えたウサギを iPS 細胞の評価系として利用できれば、iPS 細胞からヒト医療への展開に向けて大幅な近道となる。また、2. ES 細胞と iPS 細胞の相違からに関して検討する必要があった。ES 細胞を利用した医療と iPS 細胞を利用した医療の根本的な相違は、1. 容易に個人の多能性幹細胞が作出できる (拒絶のない移植の実現) という点と、2. 生命の萌芽とも言える胚を必要としない (倫理問題を回避する) という二点である。ヒト医療への応用を実現させるためには ES 細胞だけでなく iPS 細胞でも評価してその両者を比較する必要がある。外来遺伝子を組み込むことにより生じる iPS 細胞の安全性は、ES 細胞との比較により確認されるものであろう。胚操作技術が確立しており、キメラ動物作製が可能なウサギこそ、その本領を発揮しうると考えた。このような目的から、代表者は自ら樹立したウサギ ES 細胞の詳細な解析と、iPS 細胞の樹立、そして ES 細胞との比較評価を目的として研究を展開した。

3. 研究の方法

樹立していたウサギ ES 細胞の未分化性維持機構を判断するために、様々な成長因子やサイトカインを添加して、その反応性や細胞の増殖を検討し、ウサギ ES 細胞がヒト型なのかマウス型なのかを判断した。判断基準としては、増殖率、未分化マーカー遺伝子の発現、未分化マーカータンパク質の産生、およびテラトーマ解析などを指標にした。また、ヒトの山中因子をレンチウイルスによりウサギ体細胞 (成体の胃および肝臓由来) に導入することにより、ウサギ iPS 細胞を樹立し、その特徴を解析した。幹細胞としての判断材料は、増殖率、未分化マーカー遺伝子の発現、未分化マーカータンパク質の産生、テロメラーゼ活性、メチル化解析、およびテラトーマ解析などを指標にした。

特にDNAマイクロアレイ解析によりウサギES細胞とiPS細胞の相違という観点に重点をおいて研究を行った。

4. 研究成果

ウサギのES細胞はマウスES細胞とは異なり、LIF非依存的にその未分化性を維持していた。特にbFGFやactivinのシグナル伝達経路を利用していたことから、ヒトのES細胞に類似していることが明らかになった。また、ヒトの山中因子を導入したことにより作製したウサギiPS細胞は、ウサギES細胞と同じような未分化性と多分化能を有していたが、DNAマイクロアレイ解析により詳細に解析したところ、リプログラムがほぼ完全に進んだiPS細胞であっても、やはりES細胞とは異なるものであることが明らかになった。これは、iPS細胞とES細胞に質の相違があることを意味している。以上の結果から、ウサギ多能性幹細胞はヒトのものに類似した特徴を有しており、橋渡し研究に非常に効果的な実験動物であることが確認された。

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3件)

① Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba A, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J. Biol. Chem.*, (2010) in press. (査読審査あり)

② 本多 新. ウサギ多能性幹細胞とその可能性. *アニテックス* (2010) 22:pp. 26-31. (査読審査なし)

③ Honda A, Hirose M, Ogura A. Basic FGF and Activin/Nodal but not LIF signaling sustain

undifferentiated status of rabbit embryonic stem cells. *Exp. Cell Res.*, (2009) 315:pp. 2033-2042. (査読審査あり)

[学会発表] (計6件)

① Honda A, Hirose M, Hatori M, Matoba A, Miyoshi H, Inoue K, Ogura A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits. 第33回日本分子生物学会年会. 神戸 12月7日~10日 (2010)

② 本多 新. ウサギ多能性幹細胞の樹立とその解析. 第四回ウサギフォーラム. 秋田 7月24日 (2010)

③ 本多 新. ウサギ多能性幹細胞とその可能性. 第36回重粒子医科学センター研究交流会. 千葉 5月13日 (2010)

④ 本多 新, 廣瀬 美智子, 小倉 淳郎. ウサギES細胞の樹立・維持に影響を及ぼす因子とシグナル伝達経路の解析. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜 12月9日~12日 (2009)

⑤ Honda A. Current status of rabbit ES cells: where are we and where can we go? The Third International Meeting on Rabbit Biotechnology. 中国 (西安) 6月4日 (2009)

⑥ 廣瀬 美智子, 本多 新, 小倉 淳郎. ウサギES細胞の樹立と未分化生維持機構の解析. 第56回日本実験動物学会総会. さいたま 5月14日~16日 (2009)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 新 (HONDA ARATA)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・客員研究員

10373367

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者