

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19905

研究課題名（和文）ES細胞の機能強化とその利用による人工多能性幹細胞の調製

研究課題名（英文）Preparation of induced pluripotent stem cells through functional enhancement of ES cells

研究代表者

川本 卓男（Kawamoto, Takuo）

京都大学・環境安全保健機構・教授

研究者番号：10231276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ES細胞の機能を強化し、安全なiPS細胞を効率よく調製する方法を確立するのが、本研究の目的である。本研究では、ES細胞の機能を強化するために初期化4因子（Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4）を、マウスES細胞に導入した。その結果、マウスES細胞へ4つの初期化因子を導入しても、増殖速度や未分化の状態、多分化能力には影響を与えないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中が、安全で効率のよい人工多能性幹（iPS）細胞の調製法を開発しようとしのぎを削っている。しかし、そのほとんどが、体細胞に導入する遺伝子の種類や数、その導入法の改良、あるいは化学物質の利用といった観点からの研究である。本研究が提案する方法は、これまでの方法とは違って、用いる体細胞に遺伝子操作を加えることがなく、また、細胞核の初期化に係るような危険な化学物質も用いない。このように本研究は、iPS細胞における安全性の問題を大きく改善する方法を、世の中の流れとは違った角度から提案できると考えられ、社会に与えるインパクトは極めて大きく、世界の研究の流れを変える可能性をも秘めている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish an efficient method of preparing safe iPS cells by enhancing the function of ES cells. In this study, four initialization factors (Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4) were introduced into mouse ES cells to enhance ES cell functions. The results showed that introduction of the four initialization factors into mouse ES cells did not affect their proliferation rate, undifferentiated state, or multidifferentiation ability.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ES細胞 人工多能性幹細胞 機能強化 細胞融合

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ES 細胞と体細胞を細胞融合することで ES 細胞様の細胞を誘導し、ES 細胞に体細胞を初期化する能力があることを示した。しかし、この方法では、融合後の細胞において ES 細胞の核の影響が残ることが、免疫拒絶反応を回避する上でも大きな障害となる。一方、山中らは四つの因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4) を用いれば体細胞核を初期化できることを明らかにした。本研究代表者は、これら結果から、「ES 細胞の持つ初期化能を山中らが発見した因子を用いて強化したらどんな細胞になるだろうか？」また、「その強化された初期化能を利用し、かつ ES 細胞の核の影響を防ぐ方法として、ES 細胞を脱核した後に体細胞あるいは体細胞の核体と融合すれば効率よく体細胞由来の多能性幹細胞が調製できるのでは？」と考えるに至った。

### 2. 研究の目的

世界中が、安全で効率のよい人工多能性幹 (iPS) 細胞の調製法を開発しようとしのぎを削っている。しかし、そのほとんどが、体細胞に導入する遺伝子の種類や数、その導入法の改良、あるいは化学物質の利用といった観点からの研究である。それらとは違った観点から、ES 細胞の持つ機能の一つである初期化能を利用して、ES 細胞と体細胞とを細胞融合させることで、体細胞由来の核を初期化して、安全な iPS 細胞を効率よく調製する方法を確立するのが本研究の目的である。ただ単に ES 細胞と体細胞と融合させるだけでは、ES 細胞の核も残るため、できた細胞が 4 倍体化することもある。今までに、この観点に基づいた効率的な調製法は確立されていない。そこで我々は、4 倍体化を避けるためには、ES 細胞の核を取り除いて脱核させてから用いればよいと考えたが、ES 細胞は核の占める割合が大きいこともあって、脱核法が確立されておらず、また、核を除いた ES 細胞は初期化能が十分ではないことが想定される。そこで本研究課題では、ES 細胞の持つ初期化能の強化を試みるとともに、効率の良い脱核法の検討を行い、その結果得られた脱核済み ES 細胞を用いて、体細胞と融合することによって、体細胞由来の iPS 細胞を効率的に調製する方法の開発を試みる。本研究の提案する方法は、体細胞に遺伝子操作を加えることもなく、また、細胞の初期化に関与するような危険な化学物質を使用しなくて済むため、従来法に比べ、安全性が極めて高いと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス ES 細胞

マウス ES 細胞については 129・Ola 系統の E14tg2a 株 (RIKEN BRC, AES0135) を用いた。ES 細胞はゼラチンコートディッシュで、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター (5%CO<sub>2</sub>、95%Air) で培養した。

#### (2) マウス ES 細胞の培養

35 mm 培養ディッシュ (Greiner) に 0.1%ゼラチン溶液を添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 30 min 静置しコーティング。マウス ES 細胞はゼラチンコートしたディッシュ上で 15%の FBS (Gibco)、1%の NEAA (Gibco)、1%の Glutamine (Sigma)、1%の Penicillin-Streptomycin (ナカライ) および 500 U/ml のマウス LIF (Leukemia Inhibitory Factor, Millipore) を添加した DMEM (Gibco) を用いて培養した。35 mm 培養ディッシュ 1 枚あたりの播種細胞数はおよそ 4×10<sup>5</sup> cells で、培地交換は毎日行い、2-3 日おきに継代を行った。

#### (3) 遺伝子導入法

マウス ES 細胞に addgene から入手した初期化 4 因子 (pMX-Oct3/4, pMX-Klf-4, pMX-Sox2, pMX-c-Myc) を導入するために、293FT 細胞を用いてレトロウイルスベクターを作成した。293FT 細胞は 10%の FBS を添加した DMEM を用いて培養し、上記 4 因子に加えてウイルスエンベロープをコードする pLP-VSV-G、ウイルス粒子形成および逆転写活性酵素などをコードする pcDNA4/gag-pol を Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて導入し、オーバーナイトにより培地中にレトロウイルスベクターを産生させた。翌日培地を回収し、8 µg/ml のポリブレン (ナカライ) を添加し、マウス ES 細胞培養容器へ添加することによって遺伝子導入を行った。

#### (4) 細胞増殖測定

初期化因子導入マウス ES 細胞の増殖を定量するために、導入の有無の 2 種類のマウス ES 細胞をゼラチンコートした 6 ウェルプレートの 3 ウェルずつへ播種し、3 日後にトリプシン/EDTA 溶液 (ナカライ) を用いて剥離し、オートセルカウンター (Countess FL, Invitrogen) を用いて生細胞数をカウントした。生死判定にはトリパンプルー色素排除法を用いた。

#### (5) RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法

培養したマウス ES 細胞を、RNAiso Plus (タカラバイオ) を用いて細胞内の mRNA を抽出し、First Strand cDNA Synthesis Kit (東洋紡) を用いて逆転写反応させた。RT-PCR 法における DNA 増幅は G-taq (北海道システム・サイエンス) と遺伝子特異的プライマーを用いて、T100 サーマルサイクラー (パイオラッド) を用いて行い、アガロースゲル電気泳動法によって発現を評価した。一方、リアルタイム PCR 法における DNA 増幅は、SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) と遺伝子特異的プライマーを用いて、StepOne Real-Time PCR system

(Applied Biosystems) を用いて行った。

(6) 胚様体 (EB) 形成培養法

EB 形成培養を行うために、マウス ES 細胞をトリプシン/ EDTA(Gibco)を用いてディッシュから剥離させ、15%の FBS、1 mM sodium pyruvate (Gibco) , 0.1 mM NEAA , 0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Millipore) , 1%の Penicillin-Streptomycin を添加した Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Gibco)で細胞濃度を  $2 \times 10^4$  cells/ml に調製した。EB 形成を行うために、96 ウェル V-ボトムプレート (SUMILON) を使用した。各 well に 50  $\mu$ l のドロップ (1000 個の ES 細胞を含む) を作製し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 14 日間培養し、RT-PCR 法を用いて多能性を評価した。

(7) テラトーマ形成法

テラトーマを形成させるために、SCID マウス (清水実験材料) 大腿部皮下に  $1 \times 10^6$  cells を注入し、約 8 週間後に形成したテラトーマを単離し、4%パラホルムアルデヒド (和光純薬) で固定した。固定したテラトーマをパラフィンに包埋し、薄切片 (4  $\mu$ m) を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) で染色した。染色した切片を顕微鏡 (オリンパス) で観察し、多能性を評価した。

4. 研究成果

マウス ES 細胞と初代細胞を融合することによって、初代細胞が初期化される現象はよく知られている。本研究では初期化能力を向上させたマウス ES 細胞を脱核し、細胞質を融合することによって、遺伝的なリスクを排除して初期化するというコンセプトであるため、まず初めに上述の 4 因子を未分化マウス ES 細胞へレトロウィルスベクターを用いて遺伝子導入し、その性質を評価した。まず初期化因子を導入したマウス ES 細胞の増殖を評価したところ、未導入コントロールと比較して変化が無いことを確認した (図 1)。

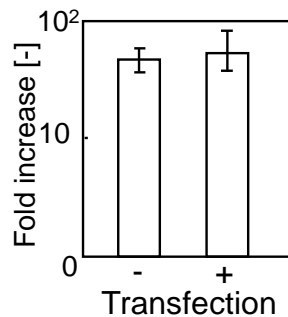


図1 初期化因子導入マウスES細胞の増殖

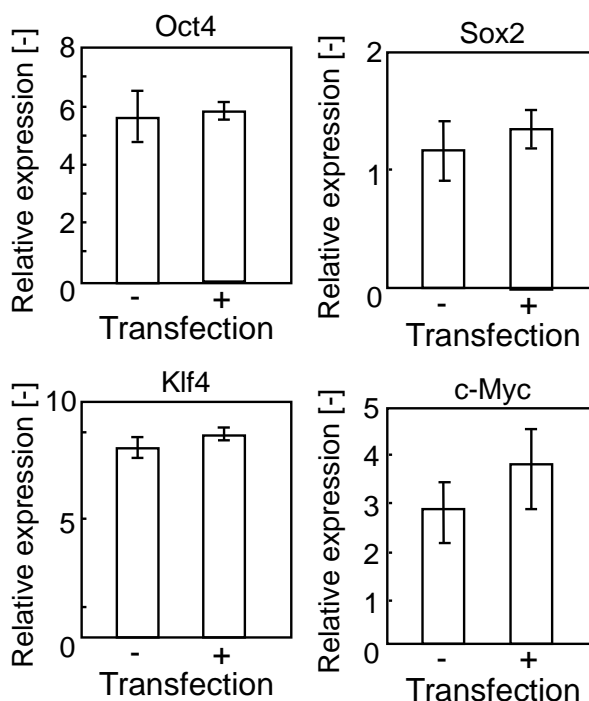


図2 初期化因子導入有無によるマウスES細胞未分化マーカー発現

また未分化状態をマーカー遺伝子発現に対するプライマーとリアルタイムPCR法を用いて評価したところ、面白いことに未導入コントロールと比較して未分化性に違いは見られないことが明らかになった(図2)。初期化因子を導入することでマウスES細胞の初期化能力が増強されることを期待したが、少なくとも初期化因子を導入した場合において未分化性が向上することはなく、細胞全体として適正な発現量に制御されていることが示唆された。もし、制御機構が存在するのであれば非常に興味深い。

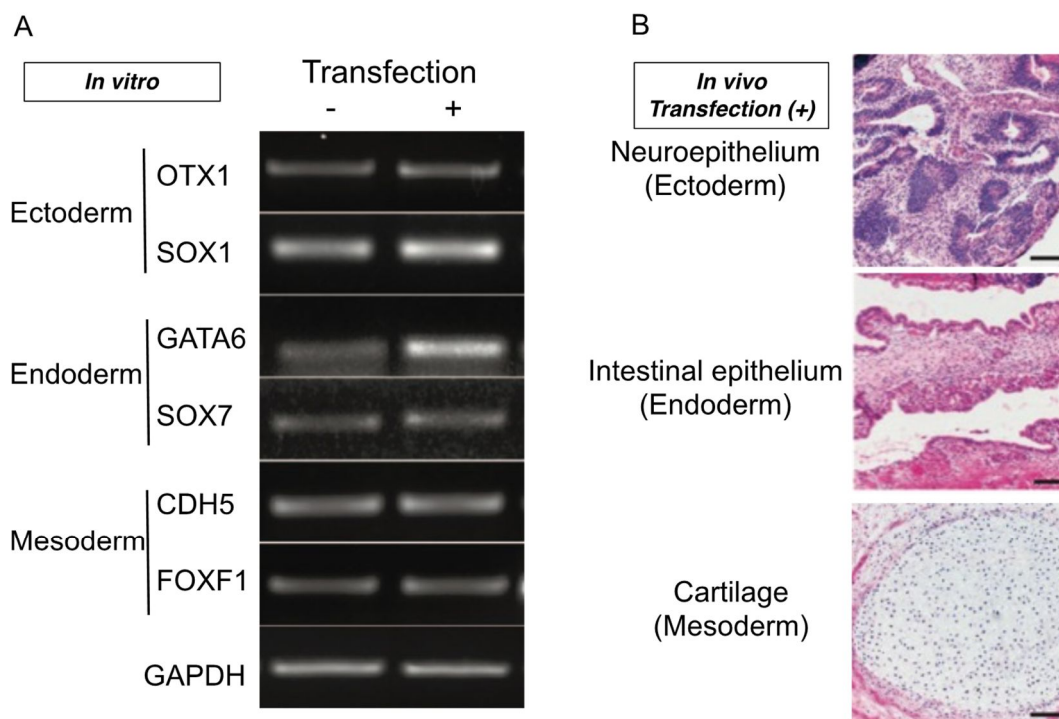


図3 初期化因子導入マウスES細胞の多分化能力

さらに初期化因子を導入したマウスES細胞の多分化能力に変化が見られるかどうかの評価も行った。まず胚様体(Embryoid body)を作成し、*in vitro*において分化誘導を行いRT-PCR法を用いて三胚様マーカー遺伝子の発現を評価した。その結果、外胚葉(OTX1, SOX1)、中胚葉(CDH5, FOXF1)、内胚葉(GATA6, SOX7)全ての分化マーカーの発現が認められた(図3A)。さらに、初期化因子を導入したマウスES細胞をSCIDマウス大腿部皮下に注入し、テラトーマを形成させることによって*in vivo*における分化能力を評価した。形成したテラトーマを単離し、パラフィン包埋したサンプルから切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を行い評価した。その結果、外胚葉(腸上皮)、中胚葉(軟骨)、内胚葉(神経上皮)という三胚葉を形成する全ての組織が認められ、*in vivo*においても多分化能を有していることが明らかとなった(図3B)。以上の結果から、未導入コントロールおよび初期化因子導入の双方において未分化能力および多分化能力は保持されており、違いはないことが明らかとなった。よって細胞質の初期化能力を増強するためにマウスES細胞へ4つの初期化因子を導入した場合において、細胞自体の未分化性や多分化能力には影響を与えないことを見出した。一方、細胞自身の未分化状態や多分化能力と細胞質を融合した際の初期化能力は必ずしも相関するとは限らないため、引き続き脱核と融合を行なっていく予定である。

また細胞融合することによる細胞機能が增强されることを確認するため、テストとしてマウス肝細胞癌由来細胞株(Hepa1-6)とマウス間葉系幹細胞株(KUSA-A1)を融合し、肝機能が向上するかどうかを評価することとした。しかし、装置の不具合によって実施することは叶わなかった。

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 0件）

1. 著者名 Ding Ran, Xi Yuan, Ito Akira, Shimizu Kazunori, Nagamori Eiji, Fujita Hideaki, Kawamoto Takuo, Horie Masanobu	4. 巻 24
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein signaling inhibitor improves differentiation and function of 3D muscle construct fabricated using C2C12	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	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） 10.1016/j.jbiosc.2024.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 袁茜、川本卓男、堀江正信
2. 発表標題 細胞-基質間接着制御による高効率ヒトiPS細胞由来骨格筋誘導法の開発
3. 学会等名 第23 回日本再生医療学会大会
4. 発表年 2024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
研究分担者	堀江 正信 (Horie Masanobu) (60727014)	京都大学・環境安全保健機構・助教  (14301)	

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
---------	---------