

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25712030

研究課題名(和文) 試験管内における体細胞からの全能性誘導

研究課題名(英文) In vitro induction of totipotency from somatic cells in mice

研究代表者

大日向 康秀(Ohinata, Yasuhide)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：70415107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,500,000円

研究成果の概要(和文)：iPS技術の確立によって、体細胞から多能性状態を誘導することが可能となった。しかし、ES/iPS細胞は栄養膜系列や原始内胚葉系列を生じることが出来ず、個体を作製するためには宿主となる初期胚を用いる必要がある。我々は初期胚を用いずに幹細胞のみで全能性の上位概念、即ち胚発生能を再構築可能とすべく研究を実施した。研究期間内には、研究に用いる幹細胞の性質を改良し、FGF依存的に維持され、キメラ貢献能、生殖細胞寄与能を保持する新たな多能性幹細胞(中間多能性幹細胞, INTPSCs)を報告した。また化学的に定義された培養条件で栄養膜幹細胞を樹立、維持することに成功し報告を行った。

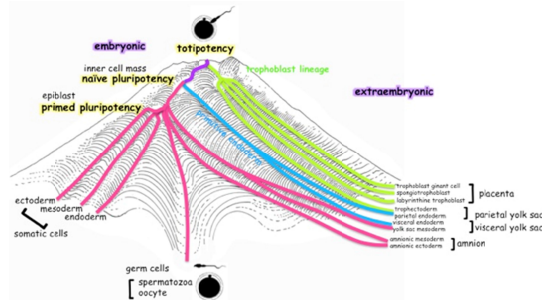
研究成果の概要(英文)：High quality mouse naive ES/iPS cells can readily form tetraploid chimeras, which almost consist of donor pluripotent stem cells; however, these stem cells are not capable of developing embryos without using early embryos as host. To date, reconstruction of artificial embryos by stem cells in vitro has not been achieved. Progress has largely been impeded by our present lack of understanding and techniques. Within the research period, we reported novel pluripotent stem cells (intermediate pluripotent stem cells, INTPSCs) that improve the properties of stem cells, are maintained FGF dependently and have chimeric contribution ability and germline transmission ability. We also reported that establishment of trophoblast stem cells under chemically defined culture conditions.

研究分野：初期発生

キーワード：胚性幹細胞 栄養膜幹細胞 胚盤胞

1. 研究開始当初の背景

iPS 技術が確立し、体細胞から多能性状態を誘導することが可能となっている。しかし、多能性幹細胞である ES/iPS 細胞からは、栄養膜系列や原始内胚葉系列は生じず、個体を作製するためには、宿主として受精卵に由来する初期胚を用いる必要がある。胚体及び胚体外両方の全組織を派生させる能力、即ち全能性は、唯一受精卵が保持する特性であるが、他の細胞から胚発生能を人為的に誘導することには未だ誰も成功していない。

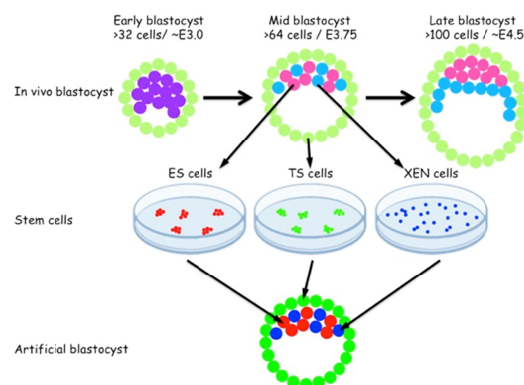


2. 研究の目的

多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)、栄養膜幹細胞(TS 細胞)、胚体外内胚葉細胞(XEN 細胞)等を用いて、試験管内で胚発生能を再構成することを目的とする。

3. 研究の方法

本目的を達成するためには、1)用いる幹細胞(ES/iPS 細胞、TS 細胞、XEN 細胞)が胚の内部細胞塊(ICM)、栄養膜(TB)、原始内胚葉(PrE)を置換し得る質を有しているか? 2)細胞の性質だけではなく、胚の3次元構造を如何にして精密に模倣するか? 3)如何にして幹細胞間で、ICM-TB-PrE 相互作用を再接続するか? の3つの問題を解く必要がある。



ES/iPS 細胞については、これまでの多くの研究者の試行錯誤の結果、マウスにおいては、極めて未分化な状態で安定して培養し、ICM を置換し得る質を有する細胞が得られている。しかし、齧歯類を越えては高いキメラ貢献能、生殖細胞寄与能を保持する多能性幹細胞株は未だ樹立されていない。TS 細胞、XEN 細胞の培養法に至っては、最初の報告以来、殆ど改良されておらず、胚盤胞注入等を実施

しても、胚体外組織への寄与率は低い。

本研究において、私は、1)ES/iPS 細胞、TS 細胞、XEN 細胞の性質の改良、2)これら幹細胞を用いた胚盤胞様立体組織構造の試験管内作製法の開発、3)人工胚盤胞様立体構造の着床能、胚発生能の解析を実施した。

4. 研究成果

A comprehensive system for generation and evaluation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition.

Tsukiyama T, Kato-Itoh M, Nakauchi H,

Ohinata Y.

PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92973.

簡便な一度のプラスミド導入だけで、iPS 細胞を樹立し、蛍光レポーターでそれらの多能性、キメラ形成能、生殖細胞系列寄与能を評価可能とする系を開発した。この系を用いることで、マウス 129 系統、NOD 系統、ラット wister 系統から iPS 細胞、2 次 iPS 細胞を作製した。マウスにおいては、キメラを作製し、キメラ貢献能、生殖細胞寄与能を、それぞれ、CAG-TagRFP、Acrosin-EGFP で非侵襲的に可視化、評価可能であることを示した。またラットにおいては、マウス-ラット異種間キメラを作製し、マウス精巣内でラット iPS 細胞由来の精子が形成されていることを示し、細胞質内精子注入法(ICSI)によって、産仔を得ることに成功した。

A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice.

Tsukiyama T, Ohinata Y.

PLoS One. 2014 Apr 15;9(4):e95329.

マウスにおいてナイーブな多能性、即ち高いキメラ貢献能と生殖細胞寄与能を有する状態は LIF-Jak-Stat シグナル経路の活性化や Gsk3、Mek の阻害等によって支持されることが知られている。一方、齧歯類以外の哺乳動物において、多能性幹細胞は FGF シグナル経路の活性化を介して維持される。しかし、これら多能性幹細胞は極めて限定的なキメラ貢献能しか示さず、細胞系列にも寄与しない。我々は、マウスにおいて、FGF シグナルの制御下で多能性を維持し、かつキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を保持させることができないかと考え、新規培養条件を探索し、FGF2、Activin A、CHIR99021 を添加した化学的定義培地で、新規の多能性状態を支持できることを示した。これら新規多能性幹細胞、INTPSCs(中間多能性幹細胞)は FGF シグナルの下流で増殖が支持されるにも関わらず、高

いキメラ貢献能、生殖細胞寄与能を保持していた。これら知見は、齧歯類を越えた哺乳動物で、高い質を保持する多能性幹細胞株を樹立する場合にも有効な方法になるかも知れない。

Establishment of trophoblast stem cells under defined culture conditions in mice.

Ohinata Y, Tsukiyama T.

PLoS One. 2014 Sep 9;9(9):e107308.

栄養膜幹細胞(TS 細胞)は最初に田中らによって報告されて以来(1998, Science)、培養条件について殆ど改良がなされず、常に自発分化を伴い、胚盤胞への注入等によっても、胎盤等の胚体外組織への寄与率は高くなかった。私は、TS 細胞の培養条件について、初期胚で機能する主要なシグナリングのリガンド、阻害剤等について探索を行い、化学的定義条件下、FGF2、Activin A、XAV939、Y27632 を添加することによって、TS 細胞を安定的に樹立・培養することが可能であることを示した。新規 TS 細胞においては、栄養膜系列の分化細胞は殆ど観察されず、また添加因子の除去によっては、巨細胞、スポンジ層栄養膜細胞、迷宮層栄養膜細胞等の栄養膜系列組織にバイアス無く分化を誘導することができた。今後、TS 細胞の質を更に高めることで、栄養膜組織全体を保管し得る細胞を得ることが可能かも知れない。

新規胚体外内胚葉株の樹立、試験管内での胚盤胞様立体構造の作製についても研究を実施し、現在投稿準備中である。

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 7 件)

1.

Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered Tokudaia osimensis.

Honda A, Choijookhuu N, Izu H, Kawano Y, Inokuchi M, Honsho K, Lee AR, Nabekura H, Ohta H, Tsukiyama T, Ohinata Y, Kuroiwa A, Hishikawa Y, Saitou M, Jogahara T, Koshimoto C.

Sci Adv. 2017 May 12;3(5):e1602179. doi:

10.1126/sciadv.1602179.

査読有

2.

Cellular Dynamics of Mouse Trophoblast Stem Cells: Identification of a Persistent Stem Cell Type.

Motomura K, Oikawa M, Hirose M, Honda A, Togayachi S, Miyoshi H, Ohinata Y, Sugimoto M, Abe K, Inoue K, Ogura A.

Biol Reprod. 2016 Jun;94(6):122. doi:

10.1095/biolreprod.115.137125.

査読有

3.

Generation of cloned mice and nuclear transfer embryonic stem cell lines from urine-derived cells.

Mizutani E, Torikai K, Wakayama S, Nagatomo H, Ohinata Y, Kishigami S, Wakayama T.

Sci Rep. 2016 Apr 1;6:23808. doi:

10.1038/srep23808.

査読有

4.

Establishment of trophoblast stem cells under defined culture conditions in mice.

Ohinata Y, Tsukiyama T.

PLoS One. 2014 Sep 9;9(9):e107308. doi:

10.1371/journal.pone.0107308.

査読有

5.

Delivery of full-length factor VIII using a piggyBac transposon vector to correct a mouse model of hemophilia A.

Matsui H, Fujimoto N, Sasakawa N, Ohinata Y, Shima M, Yamanaka S, Sugimoto M, Hotta A.

PLoS One. 2014 Aug 15;9(8):e104957. doi:

10.1371/journal.pone.0104957.

査読有

6.

A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice.

Tsukiyama T, [Ohinata Y.](#)

PLoS One. 2014 Apr 15;9(4):e95329. doi: 10.1371/journal.pone.0095329.

査読有

7.

A comprehensive system for generation and evaluation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition.

Tsukiyama T, Kato-Itoh M, Nakauchi H,

[Ohinata Y.](#)

PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92973. doi: 10.1371/journal.pone.0092973.

査読有

出願状況 (計 2 件)

名称：栄養膜外胚葉様構造体構造体及び製造方法

発明者：大日向康秀

権利者：理化学研究所

種類：特願

番号：2015-102260

出願年月日：平成 27 年 5 月 19 日

国内外の別： 国内

名称：栄養膜幹細胞の樹立及び維持方法方法

発明者：大日向康秀

権利者：理化学研究所

種類：特願

番号：2014-032314

出願年月日：平成 26 年 2 月 21 日

国内外の別： 国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大日向 康秀 (OHINATA, Yasuhide)

理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：70415107