

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292168

研究課題名(和文) ウシ人工栄養膜細胞株作出と特性評価およびこれを用いた体外着床モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment and evaluation of bovine induced trophoblast cell line and construction of in vitro implantation model using this cell line.

研究代表者

木村 康二 (Kimura, Koji)

岡山大学・環境生命科学研究所・教授

研究者番号：50355070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウシの受胎率向上のためにはウシ胚の発生および着床・妊娠確立メカニズムの解明が必須である。本課題ではウシ着床メカニズム解明のために人工多能性幹細胞および人工栄養膜細胞を樹立し、着床モデル作出の可能性について検討を行った。ウシ胎子羊膜細胞を生体から回収し、これにトランスポゾンベクターを用いて、細胞の多能性獲得に関与する4つの遺伝子を導入することにより、上記細胞株の作出を行った。その結果、生殖系列への寄与が確認できたウシ人工多能性幹細胞株および栄養膜細胞の特徴を備えた人工栄養膜細胞株の樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：It is necessary for improvement of pregnancy rate in cattle to clarify the mechanisms involved in its embryo development, implantation and establishment of pregnancy. The aims of the present study are to establish the bovine induced pluripotent stem cell and induced trophoblastic cells. Bovine amnion derived cells (bADC) were introduced with transposone expression vectors (piggyBac vectors) containing doxycycline (Dox)-inducible transcription factors. Colonies were selected by morphology criteria and then their characteristics were evaluated by expression of stem cell or trophectoderm markers. We established both of bovine iPS cell lines which can be differentiated to germ cells in vivo and trophoblast cell lines which possessed trophoblast stem cell-like characteristics and the potential to differentiate into the extra-embryonic cell lineage.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：ウシ 着床・妊娠 栄養膜細胞 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

畜産現場において、長期にわたってウシの低受胎が問題視されてきたにも関わらず、その解決の糸口は未だ見つかっていない。マウスやヒトと比べ、ウシの胚発生および着床・妊娠プロセスは大きく異なり、これらの動物種の研究情報を活用できないことがウシ等の家畜の着床・妊娠研究の進展を妨げ、低受胎問題解決を困難にしている一つの要因である。ヒトやマウスでは、胚盤胞期胚に発生した胚は透明帯から脱出後すぐに子宮内膜へ着床する。一方、ウシの場合、胚は透明帯脱出後すぐに着床することなく、しばらく子宮内腔で成長する。この間、栄養膜細胞(胚から最初に分化し将来胎膜へと成長する細胞)が著しく伸長し、受精後 25-30 日に着床が開始する。これまでの報告から、ウシの胚死滅は受精後早期(受精後 14 日後)に起こり(Dune et al.,2000)、その時期は栄養膜細胞の急速な伸長時期と重なることから、胚盤(胎子)自体の発生だけでなく栄養膜細胞の成長・分化がウシの妊娠に大きな影響を与えることが推測される。事実、ウシの栄養膜細胞から分泌されるインターフェロン・タウ(Interferon tau:IFN τ)は、子宮内膜に作用して PGF2 α の分泌を抑制し、黄体の退行を防いで妊娠の確立に大きく寄与することが知られており(Thatcher et al., 1988)、IFN τ やこれを分泌する栄養膜小胞を受胎率向上に利用する試みも行われている。マウスにおいては栄養膜幹細胞(trophoblast stem cell)が存在し、これがすべての胎膜組織や胎盤に分化する能力を有することが知られている(Tanaka et al.,1998)。また、着床期にこの細胞が存在することが、これらの動物種の妊娠成立に大きく関与すると考えられている。ウシでは、栄養膜幹細胞株の樹立は未だに報告されておらず、その存在の有無も定かではない。このようにウシなどの家畜においては、マウスやヒトなどに比べ着床・妊娠に関する研究を進める上で必要な各種細胞株のレパートリーが不十分である。そのため、ウシの妊娠着床に関する研究は生体を用いた実験に限られ、in vitro でのウシ着床モデル系の構築は極めて有用である。

一方、近年の人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立は再生医療に関する技術開発を加速させただけでなく、発生生物学においても新たな知見を生み出す重要な技術となっている。これまで iPS 細胞の樹立はマウスやヒトなどの特定の動物種のみに限られ、家畜での樹立は非常に困難とされている。家畜の中では唯一、生理学的、解剖学的、および遺伝学的にヒトに比較的近い動物であるブタの iPS 細胞の樹立が数多く試みられている。その樹立過程で、様々なタイプのコロニーが出現する。出現コロニーの一部は、多能性をもつ iPS 細胞とは異なり、上皮細胞様の形態を示し、ドーム状の胞状細胞塊を形成することが明らかとなっている(Ezashi et al.2009)。また、

この細胞では、胚の栄養膜細胞特異的遺伝子が発現しているだけでなく、ブタ栄養膜細胞の特徴であるエストラジオールを分泌しているため人工栄養膜細胞(induced trophoblast cell:iTR cell)と名付けられている(Ezashi et al., 2011)。この iPS を作出する技術を用いてウシの人工多能性幹細胞や栄養膜細胞を作出することはウシの発生および妊娠受胎研究に大いに貢献することが可能である。

2. 研究の目的

本課題では近年受胎率低下が著しいウシの受胎メカニズムの解明のため、これまで樹立が困難とされていた(1)ウシの人工多能性幹細胞株の作出とその特徴解析および(2)人工栄養膜細胞株の作出とその解析を実施し、受胎・着床研究への適応の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ウシ人工多能性幹細胞株の作出とその特徴

①ウシ胎子羊膜細胞の採取：妊娠 50 日齢の雌牛から胎膜を採取し、羊膜を絨毛膜および尿膜から分離した。細切後 0.3%コラゲナーゼで消化し、未消化組織を除去後、プレートに播種し、培養した。コンフル状態に達した後、細胞を剥離しウシ羊膜細胞(bADC)として凍結保存した。

②bADC の初期化：bADC は piggyBac トランスポゾンベクター(PB-TET-OKS, PB-TET-c-Myc, rtTA PB, TagRFP PB vector)をリポフェクション(Lipofectamine LTX)によって初期化した。遺伝子導入後 24 時間で 2.0 μ g/ml の DOX を添加し、導入遺伝子の発現を誘起した。DOX 添加 4 日後、細胞を回収し、1x10⁵個の細胞を SNL フィーダー細胞上に播種し、プライム型 iPS(pbiPSC)細胞培養液(20% Knockout Serum, 2mM L-Glutamine, 1xMEM 非必須アミノ酸, 0.1mM 2-ME, penicillin, streptomycin, 2.0 μ g/ml DOX, 5ng/ml hbFGF, bLIF を含む DMEM/F12)を用いて継代した。培養液は 1-2 日間隔で交換した。DOX 添加 14 日後、出現したコロニーを回収し、細切した後新たなフィーダー細胞上に播種した。7 日ごとにこの作業を 70 代以上繰り返して継代した。

③アルカリフォスファターゼ活性と免疫組織化学：得られた pbiPSC の特徴を明らかにするため、細胞のアルカリフォスファターゼ活性染色および免疫染色(OcCT3/4, NANOG, GFAP, a-fetoprotein)を行い評価した。

④遺伝子発現解析：得られたコロニーから RNA 抽出および cDNA 合成を行い、OCT3/4, NANOG, SOX2, CDH1, REX1, ESRR β 1, STELLA, LIFR, SOCS3, FGF5, OTX2 などのマーカー遺伝子の発現を RT-PCR により検討した。

⑤biPSC の体外での分化能：得られた細胞株を非付着性ディッシュを用いて培養し胚様体形成を行うとともに、三胚葉への分化をGFAP(外胚葉)、ASM(中胚葉)、AFP(内胚葉)抗体を用いて評価した。

⑥pbiPSC のナイーブ化：樹立した pbiPSC コロニーを回収し、酵素消化により細胞を分散させた後、SNL フィーダー細胞上でナイーブ型 iPSC 細胞(niPSC)培養液 (iPSC medium から hbFGF を除き、1 μ M MEK/ERK inhibitor (PD0325901), 3 μ M GSK3B inhibitor (CHIR99021), 10 mM forskolin を添加したもの) を用いて培養した。

⑦キメラ個体の作出：食肉センター由来ウシ卵巣から未成熟卵を採取し、体外で成熟・受精・培養した。8-16 細胞期胚を回収し、透明帯を除去した後、2 個の胚を各マイクロウェル(WOW)に移した。同時に nbiPSC を 20-30 個ウェル内に移し、集合キメラを作出した。キメラ胚の培養には前述の nbiPSC 培養液を用いた。胚盤胞期胚に発生した胚は同期化した雌牛(発情後7日)の両側子宮角(各子宮角に3 個のキメラ胚)に移植した。妊娠 90 日で雌牛を安楽死によりと畜し、各臓器を採取するとともに、各組織における RFP および導入遺伝子の存在を免疫組織化学と RT-PCR により検討した。

(2) ウシ人工栄養膜細胞株(biTBC)の作出とその特徴

①ウシ胎子細胞の採取：妊娠日齢 58 日の胎子羊膜および妊娠日齢 68 日の胎子肝臓を採取し、細切・コラゲナーゼで消化後、それぞれの細胞を採取、プレートに播種した。数日後コンフルエントの状態になった細胞を剥離させて、凍結保存し、以後の実験に用いた。

②ウシ人工栄養膜細胞株の作出：ウシ胎子羊膜細胞および肝臓細胞に上記(1)で使用した piggyBac ベクターを同様の方法で導入した。導入 24 時間後、DOX を添加して導入遺伝子の発現を誘起し、さらにその4日後、細胞を剥離、分散させて、SNL フィーダー細胞上に播種した。作出した株は 10% FBS, 2mM L-glutamine, 1x 非必須アミノ酸, 0.1mM 2-ME, penicillin, streptomycin, 2.0 μ g/ml DOX を添加した DMEM/F12 (TBM) を用いて培養した。培養液は 1-2 日ごとに交換し、増殖したコロニーは7日ごとにメスで細切した後、SNL フィーダー細胞上またはコラゲンコートしたシャーレー上に播種して継代した。

③biTBC のアルカリフォスファターゼ活性と免疫組織化学：得られたコロニーのアルカリフォスファターゼ活性の有無について検討した。さらに、多能性マーカーである OCT3/4, NANOG および栄養膜細胞マーカー

である IFNT および CDX2 の抗体を用いて免疫組織化学を行い、得られた細胞株の特徴について検討した。

④遺伝子発現解析：得られた細胞株から RNA を抽出し、RT-PCR 法により、CDX2, ELF5, ERR β , IFNT, OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC 等のマーカー遺伝子の発現について検討した。

⑤biTBC の体外での分化能：biTBC を前述の胚様体形成方法と同様の手法で biTBC を培養し、体外における分化能を検討した。さらにこの細胞株の長期にわたる分化能を検討するために、コロニーを細切後、コラゲンコートしたウェルに播種し、DOX 非存在下で 20-30 日培養した。なお、その間コロニーは 10 日ごとに継代した。

4. 研究成果

(1) ウシ人工多能性幹細胞株の作出とその特徴

①pbiPSC 株の樹立：遺伝子導入と培養の結果、ヒト iPSC と形態が類似した pbiPSC 株の樹立に成功した(図 1 A)。また、その作出効率は 0.01%であった。この株は 70 代以上形態を留めて継代可能であった。またこの細胞株をナイーブ型 iPSC 培養液で培養・継代を行うと、形態学的にナイーブ型 iPSC 様(図 1B)となったが、この細胞は 15 代以上この形態を維持したまま継代することは出来なかった。

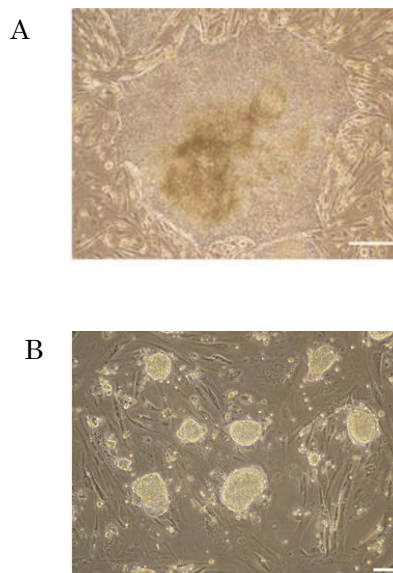


図 1 作出に成功したウシ iPSC 細胞株. A ; プライム型、B ; ナイーブ型

②ウシ iPSC の特徴：両タイプの biPSC のアルカリフォスファターゼ活性を検討したところ、両者ともコロニー全体に陽性を示した(図 2)。また、両者とも 90%以上の染色体正常率を示し、NANOG および OCT3/4 の発

現もコロニー全体に検出された（図 3）。RT-PCR による検討では両細胞株とも OCT3/4, SOX2, NANOG, CDH1, REX1, ESRR8, STELLA, LIFR, SOCS3 陽性であった。一方、FGF5, OTX2 の発現は見られなかった。

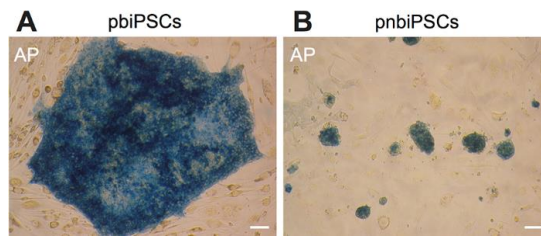


図 2 ウシ iPSC のアルカリフォスファターゼ活性

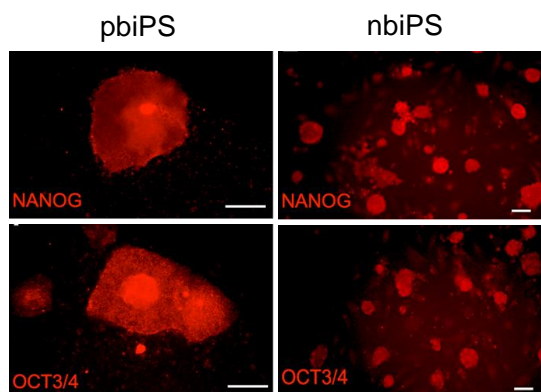


図 3 biPSC における OCT3/4, NANOG 発現

③ウシ iPSC 細胞の体外での分化能：非附着性ウェル内で iPSC 細胞を培養したところ、胚様体の形成が確認され、またこの胚様体で各胚葉マーカータンパク質(GFAP, AFP, ASM)の存在が確認され、この細胞株が三胚葉分化能を有することが明らかとなった。

④キメラ個体の作出と体内での分化能：8-16 細胞期胚と iPSC 細胞を共培養したところ、高率に iPSC 細胞は胚に取り込まれ、そのほとんどは内細胞塊に局在した（図 4）。

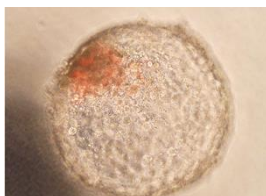


図 4 iPSC を取り

1 頭の雌ウシに 6 個のキメラ胚を移植し、3 頭の胎子を回収した。各個体から臓器を摘出し、それぞれにおいて iPSC 細胞由来の細胞の有無を確認したところ、胎膜や胎盤を含むほぼすべての組織で導入遺伝子の存在が確認された。また生殖腺においては RFP および VASA（始原生殖細胞マーカー）の両者を発現している細胞が確認され（図 5）、この研究

で樹立したウシ iPSC 細胞株は生殖系列の細胞にも分化可能であることが確認された。この成果は世界で始めて家畜において生殖系列の細胞へも分化可能な iPSC 細胞株の樹立報告であり、この細胞株を用いての発生分化メカニズムの解明は今後の家畜の受胎性向上の技術開発に大いに貢献することが期待される。

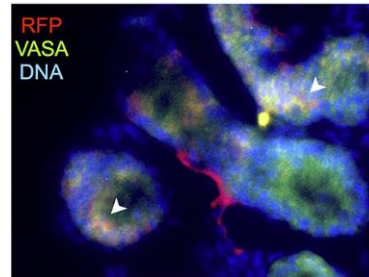


図 5 キメラ胎子生殖腺における iPSC 細胞由来生殖細胞の存在
矢頭が示す黄色の細胞が iPSC 細胞から分化した生殖細胞

（2）ウシ人工栄養膜細胞株の作出とその特徴

①biTBC 株の作出：遺伝子の導入によって比較的平面的な敷石状の細胞で構成されたコロニーが出現した（図 6）。遺伝子導入後、piPSC 培養液で培養した場合はこのコロニーの出現率は 30%であったが、TBM を用いて樹立した場合は 70%のコロニーが上記の特徴を有していた。またこのコロニーは羊膜細胞だけでなく胎子肝臓細胞を用いた場合でも作出可能であった。

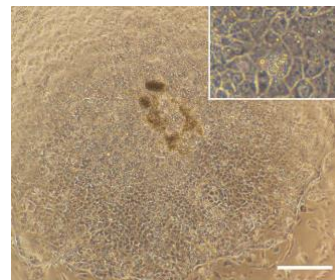


図 6 羊膜細胞に遺伝子導入して作出したウシ人工栄養膜細胞株(biTBC)
細胞は敷石状形態を示し、その輪郭は明瞭である。

この細胞株は継代途中で栄養膜小胞(TV)と類似したドーム状の構造物を形成し、場合によってはコロニーから分離した（図 7）。



図 7 コロニーから出現したドーム構造

②biTBC の特徴 : biTBC のアルカリフォスファターゼ活性は低く、コロニーの中の一部の細胞においてのみ確認された (図 8)。さらに栄養膜細胞マーカーである CDX2 の発現と多能性マーカー OCT3/4 の発現は顕著である一方、NANOG の発現は弱かった (図 9)。

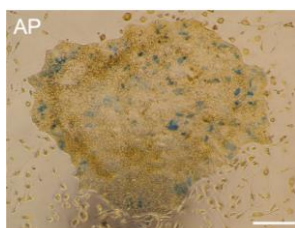


図 8 biTBC におけるアルカリフォスファターゼ活性

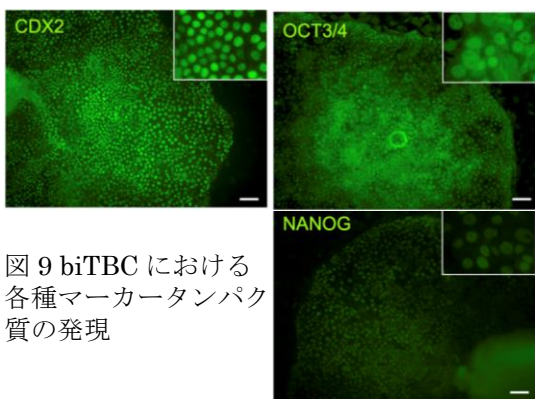


図 9 biTBC における各種マーカータンパク質の発現

RT-PCR による検討では、栄養膜細胞特異的遺伝子である CDX2, ELF5, ERR6, IFNT の発現が認められ、同時に導入遺伝子である OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC の発現も確認された。

③体外における biTBC の分化能 : DOX 非存在下で biTBC を培養・継代し、その分化能について検討した。DOX 非存在下では細胞はより上皮細胞様形態を示し (図 10)、栄養膜小胞形成能を失った。さらに胚様体形成については、iPS 細胞のような細胞凝集塊の形成は見られず、栄養膜小胞を形成した (図 11)。

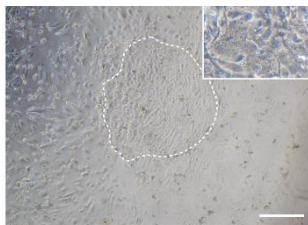


図 10 DOX 非存在下で分化した biTBC

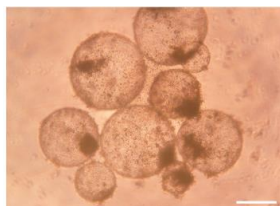


図 11 DOX 非存在下で形成した小胞

また、biTBC をフィーダー細胞・DOX 非存在下のコラーゲンコートウェルで 30 日継代培養したところ、二核細胞の形成が確認され (図 12)、二核細胞特異的遺伝子 PL, PRP1, PAG1 の発現が認められた。

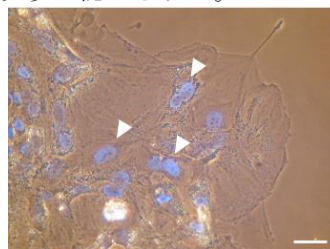


図 12 biTBC から分化した二核細胞 (矢頭)

以上の結果から、世界に先駆けて遺伝子導入によってウシ人工栄養膜細胞株の樹立に成功した。またこれはマウスの栄養膜幹細胞の性格もあわせ持つため、ウシ人工栄養膜細胞の可能性も示唆された。ウシにおいて栄養膜幹細胞の存在ははまだ確認されておらず、本研究の成果は今後のウシの胚細胞分化メカニズム解明のために非常に重要な情報を提供した。また、本課題で樹立した biTBC は容易に継代・分化させることが可能であり、今後のウシの着床妊娠メカニズムの解明に大いに貢献するものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ①Suyatno, Kitamura Y, Minami N, Yamada M, Ikeda S, Imai H, Long-term culture of undifferentiated spermatogonia isolated from immature and adult bovine testes, *Mol. Reprod. Dev.*, 査読有, 85巻, 2018, 236-249, DOI: 10.1002/mrd.22958
- ②Sahare, MG, Suyatno, Imai H, Recent advances of in vitro culture systems for spermatogonial stem cells in mammals. *Reprod. Med. Biol.*, 査読有, 17巻, 2018, 134-142, DOI: 10.1002/rmb2.12087.
- ③Hayashi M, Kawaguchi T, Durucova-Hills G, Imai H, Generation of germ cells from pluripotent stem cells in mammals, *Reprod. Med. Biol.*, 査読有, 17巻, 2017, 107-114, DOI: 10.1002/rmb2.
- ④Sahare M, Kim SM, Otomo A, Komatsu K, Minami N, Yamada M, Imai H, Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells, *Reprod. Fertil. Dev.*, 査読

有、28巻、2016、2039-2050、DOI:
10.1071/RD15003

⑤Kawaguchi T, Cho D, Hayashi M, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, Imai H、Derivation of induced trophoblast cell lines in cattle by doxycycline-inducible piggyBac vectors, PLoS ONE、査読有、11巻、2016、e0167550、DOI: 10.1371/journal.pone.0167550

⑥Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, Imai H、Generation of Naïve Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors、PLoS One、査読有、10巻、2015、e0135403、DOI: 10.1371/journal.pone.0135403.

⑦Sahare M, Otomo A, Komatsu K, Minami N, Yamada M, Imai H、The role of signaling pathways on proliferation and self-renewal of cultured bovine primitive germ cells、Reprod. Med. Biol.、査読有、14巻、2015、17-25、DOI: 10.1007/s12522-014-0189-x

⑧Kimura K, Matsuyama S、Successful nonsurgical transfer of bovine elongating conceptuses and its application to sexing、J. Reprod.Dev.、査読有、60巻、2014、210-215、DOI:10.1262/jrd.2013-137

〔学会発表〕(計 18 件)

①Hayashi M, Durcova-Hills G, Minami N, Yamada M, Imai H、Characterisation of newly derived bovine iPSCs including their capacity to make PGC-like cells. The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in Vivo and in Vitro. 2017年7月26日、九州大学(福岡県博多市)

②林将文、川口高正、趙 杜善、南直治郎、山田雅保、今井裕、ウシ始原生殖細胞の特性と人工多能性幹細胞からの誘導、第 122 回日本畜産学会大会、2017年3月27日、神戸大学(兵庫県神戸市)

③林将文、川口高正、趙杜善、南直治郎、山田雅保、今井裕、ウシにおける人工多能性幹

細胞からの始原生殖細胞の誘導、第 5 回関西生殖医学集談会・第 49 回関西アンドロロジーカンファレンス、2017年3月4日、ハービス PLAZA (大阪府大阪市)

④ Hayashi M, Cho D-S, Kawaguchi T, Minami N, Yamada M, Imai H、BMP4 is involved in maintenance or derivation of bovine primordial germ cells from bovine induced pluripotent stem cells, The 18th International Congress of Animal Reproduction、2016年6月27日、Tours (France)

⑤ Imai H、Cho D-S, Kawaguchi.T、Reprogramming of bovine somatic cells into pluripotent stem cells, International Symposium on the Future of Nuclear Transfer and Nuclear Reprogramming、2016年3月10日、山梨大学(山梨県甲府市)

⑥Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, Imai H、Induction of pluripotency in bovine cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factors, IFFS/JSRM International Meeting、2015年4月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑦Kawaguchi T, Tsukiyama T, Minami N, Yamada M, Matsuyama S, Kimura K, Imai H、Derivation of naive-type induced pluripotent stem cells in cattle using piggyBac transposition of doxycycline inducible transcription factors, World Congress on Reproductive Biology (WCRB)、2014年9月3日、Edinburgh, (UK).

⑧川口高正、築山智之、松山秀一、木村康二、南直治郎、山田雅保、今井裕、piggyBac トランスポゾンを用いたリプログラミング因子導入によるウシ羊膜細胞からの栄養膜細胞株樹立、第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014年8月21日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 康二 (KIMURA, Koji)

岡山大学・大学院環境生命科学研究所・教授
研究者番号: 50355070

(2) 研究分担者

今井 裕 (IMAI, Hiroshi)

京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 10303869

松山 秀一 (MATSUYAMA, Shuichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主任研究員

研究者番号: 50455317