

## ウシ体細胞から全能性を有する iPS 細胞株の樹立

京都大学大学院農学研究科教授今井 裕と川口高正（農学研究科博士課程3 回生、現小野薬品工業株式会社研究員）、木村康二（農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所上席研究員、現岡山大学大学院環境生命科学研究科准教授）および松山秀一（農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所主任研究員）らの研究グループは、ウシにおいて生殖系列の細胞を含むすべての組織・器官に分化する人工誘導多能性幹（iPS）細胞株の作製に成功しました。

様々な細胞に分化することのできる多能性幹細胞の遺伝情報（遺伝的バックグラウンド）を次世代に伝えることのできる幹細胞株は、これまでマウスでしか樹立されていません。本研究の成果によって、マウス以外の哺乳動物種、特に経済的な価値をもつ家畜において、個体を構成するすべての組織に分化するウシ幹細胞が得られたことは、今後、ウシ以外の様々な動物種での個体形成能を有する多能性幹細胞株の樹立の糸口を提供するとともに、家畜改良、有用遺伝資源および希少種・絶滅危惧種の保全、医学領域へのトランスレーショナルリサーチなどに、この幹細胞株を応用する道が開かれたと考えられます。

本研究成果は、8月19日午後2時（米国東部時間）に米国科学誌「プロスワン（PLOS ONE）」オンライン速報版に公開されます。

### [研究の背景]

体を構成する多くの組織・器官に分化する能力を有する多能性幹細胞は、1981年にマウスの初期胚（胚盤胞期胚）の多能性分化能を有する細胞群（内部細胞塊）から初めて樹立され、胚性幹（ES）細胞と名付けられています。マウスES細胞はキメラ動物を介して精子や卵子などの生殖細胞へも分化できることから、ES細胞の遺伝的バックグラウンドを次世代に伝えることが可能です。このことは、ノックアウトマウスなど導入遺伝子の発現を正確に制御できるジーンターゲティング技術を生み出しました。一方、家畜では、1985年以降受精卵の核内に遺伝子を注入して遺伝子組換え家畜を作製する試みが数多く行われました。しかし、マウスES細胞のように、導入した遺伝子の発現を正確に制御することは難しく、ES細胞株の樹立が待望されていたものの、これまで生殖細胞への分化する能力をもつ家畜のES細胞株は樹立できませんでした。2006年には、多能性細胞の多能性と自己増殖を維持するのに必要な4種類の転写因子（*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*）をマウス体細胞へ導入することにより、人工誘導性多能性幹（iPS）細胞株が樹立されました。これを契機に、ES細胞の樹立

が困難であったマウス以外の動物種においてもiPS細胞の樹立が試みられてきました。しかし、ここで樹立されるiPS細胞の形態的特徴は、これまでに樹立が報告されてきた家畜のES細胞と同様に扁平な形態を示し、マウスのES細胞やiPS細胞のようなドーム状の立体的な形態を持つとは異なっていました。前者はプライムド型多能性幹細胞とよばれ、マウスES細胞のナイーブ型多能性幹細胞とは形態にとどまらず多能性幹細胞としての質的な差が見られます。つまり、ナイーブ型細胞はキメラ動物内の生殖細胞へも分化できるのに対して、プライム型細胞はキメラ動物が生産できたとしても、組織への寄与は極めて限定的で生殖細胞に分化することはできません。家畜で、多能性幹細胞を利用する場合には、生殖細胞に分化して多能性細胞に付与した遺伝的バックグラウンドを次世代に伝達できることが重要ですので、これまでの30年余りの大型動物の多能性幹細胞研究の中でナイーブ型多能性幹細胞株の樹立が望まれてきました。今回の研究は、この点をブレークスルーしたものと位置づけることができます。

#### [研究の内容]

ウシ妊娠胎仔より得られた羊膜細胞にマウス由来の*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*および*c-Myc*の4種類の多能性関連転写遺伝子をpiggy Bacベクターを用いて導入しました（図1）。このベクターは、トランスポゾンベクターに属し、両端にLTR領域をもつことからトランスポゼースを発現させることによって、ゲノムから取り外すことができます。また、転写4因子の発現はTET/ON領域によって制御され、培養液へのテトラサイクリン添加の有無によって発現のON/OFFを調整することができます。

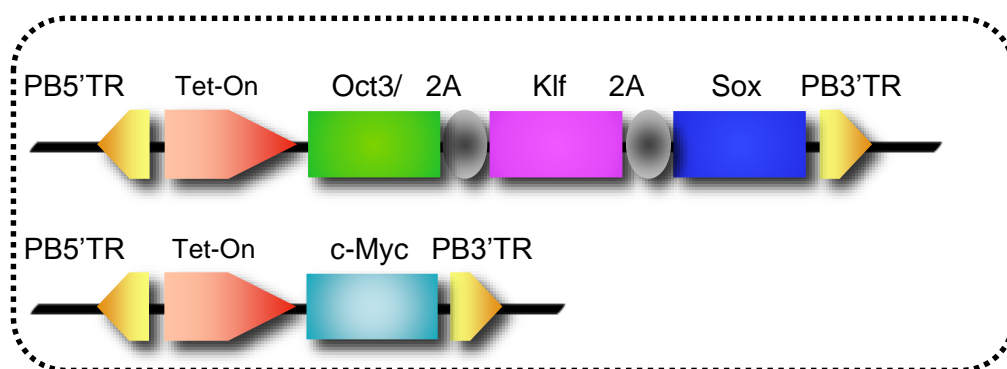


図1 piggyBacベクターシステムとウシ羊膜細胞に導入した遺伝子

4つの遺伝子の発現はTet-Onシステム（培養液中にテトラサイクリンを添加することによって発現がONになる）によって制御されている。また、トランスポゼースの発現によって、PB5' TRとPB3' TR間の遺伝子を抜き取ることができます。

羊膜細胞への遺伝子導入に続くiPS細胞の継代とプライムド型iPS細胞からナীব型iPS細胞への変換は以下に示す方法によって行っています（図2）。

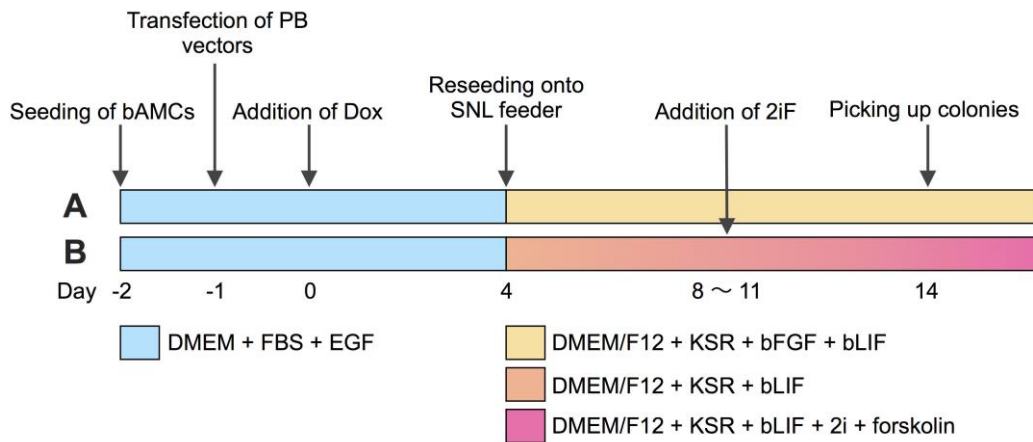


図2 プライムド型およびナীব型iPS細胞の樹立条件

羊膜細胞に4因子を導入後4日目に、SNLフィーダー細胞上に遺伝子導入羊膜細胞を播種し、ヒトプライムドiPS細胞用の培養液（DMEM/F12 + 20%KSR + bFGF + LIF）内で培養します。培養後約8日目から出現し始めるコロニーを培養14日目に継代します。この条件下で出現するコロニーはプライムド型のiPS細胞であり、アルカリフォスファターゼ、*OCT3/4*や*NANOG*といった多能性マーカーを発現し、70継代以上に亘って安定的に継代できました。しかし、ウシ初期胚とのキメラ形成能は見られませんでした。そこで、細胞分化を抑制するためにGSK3β阻害剤およびMEK阻害剤（両者を合わせて2iとよびます）に加えフォルスコリンとLIFを8-11日に添加した培養液でプライムド型の細胞を培養すると、多能性細胞の形態はプライムド型からナীব型に変化しました（図3）。得られた細胞株は、10-15継代の体外培養が可能でした。

また、両体タイプの細胞株の染色体構成（58本の常染色体と2本の性染色体）は95%以上の正常性を保っていました。多能性幹細胞で発現する遺伝子を検定したところ、*OCT3/4*、*SOX2*、*KLF4*、*c-MYC*といった多能性関連遺伝子の発現が認められるとともに、*REX1*や*STELLA*などのナীব型細胞に特異的な遺伝子の発現も認められました。一方、プライムド型の細胞株では、*FGF5*や*OTX2*といったナীব型の細胞株にはない特異的な遺伝子の発現パターンが認められました（図4）。

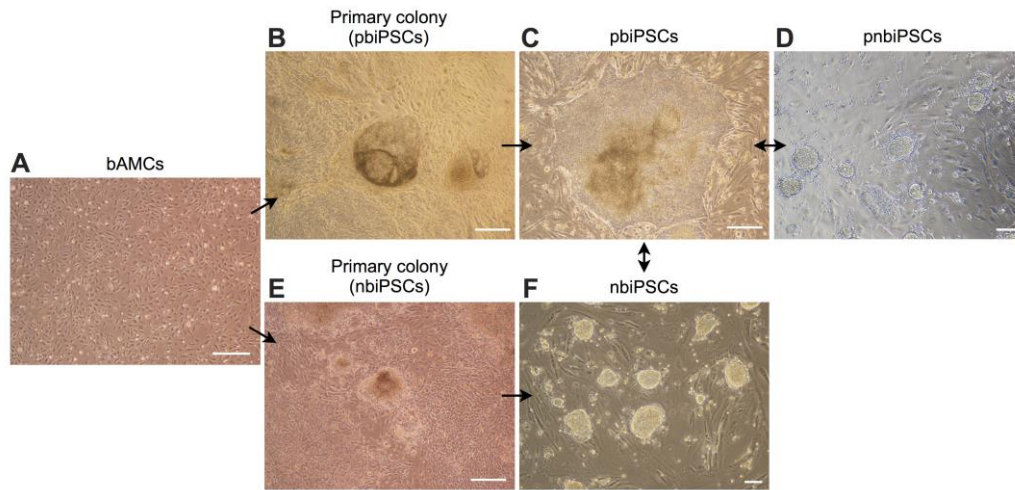


図3 ウシ羊膜細胞への遺伝子導入とプライムド型からナイーブ型iPS細胞への変換

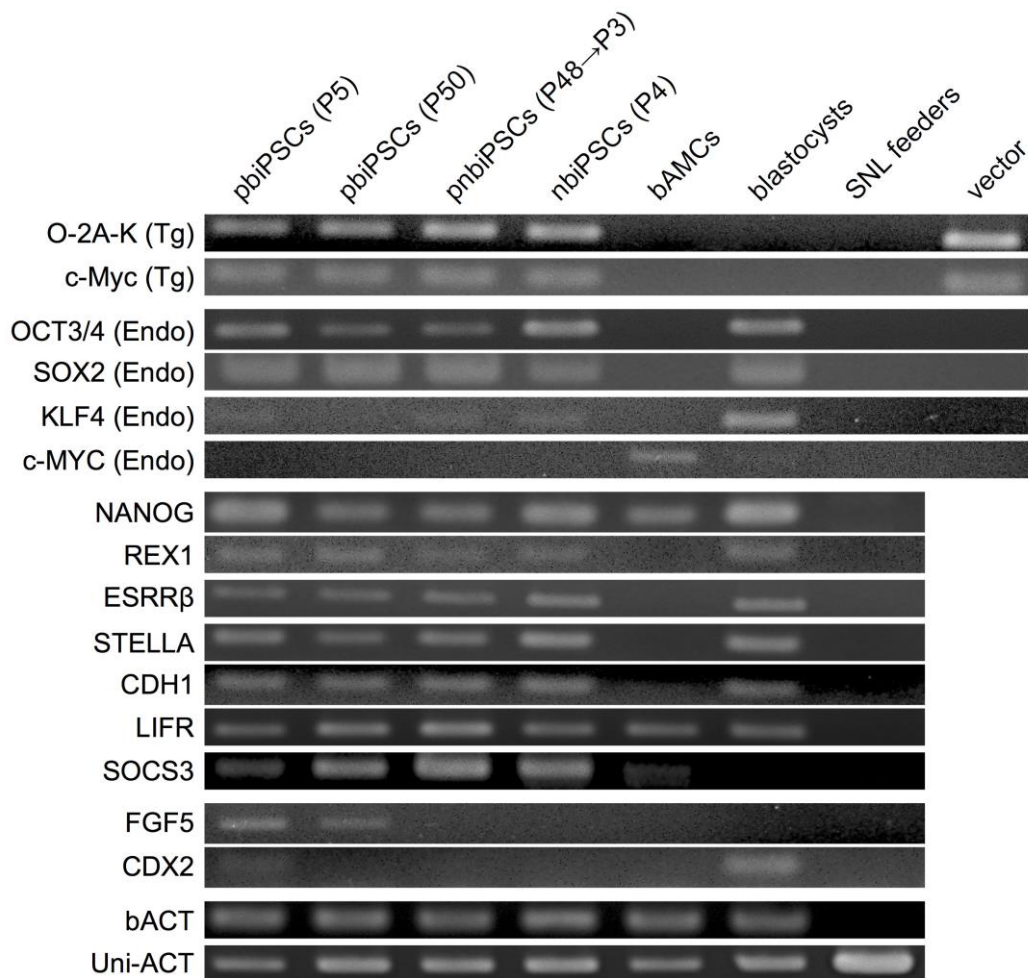


図4 プライムド型およびナイーブ型iPS細胞で発現する多能性関連遺伝子群  
 pBiPSCs=プライムド型iPS細胞株、pnbiPSCs=プライムド型からナイーブ型に変換したiPS細胞株、nbIPSCs=ナイーブ型iPS細胞株、P=継代数、bAMCs=ウシ羊膜細胞（iPS細胞の元になった体細胞）、blastocyst=ウシ胚盤胞期胚、SNL feeder=支持細胞

培養液中にJAKシグナル伝達経路を抑制する阻害剤を添加して細胞増殖に及ぼす影響を検討したところ、両タイプの細胞種においても細胞増殖が抑制されたことから、LIFに依存した細胞増殖を示すと考えられました（図5、A、B、C）。また、細胞株のX染色体の活性化をXIST遺伝子の発現とH3K27me<sup>3</sup>のメチル化状況によって検討しました。プライムド型ではXIST遺伝子が発現し、H3K27の強いメチル化が観察されました（図5、D、E、F、G、H）。一方、ナイーブ型の細胞株ではXISTの発現もメチル化された細胞も限定的であり、両X染色体は活性化状態にあると考えられ、マウスのES細胞やナイーブ型iPS細胞と類似の性質を持っていました。

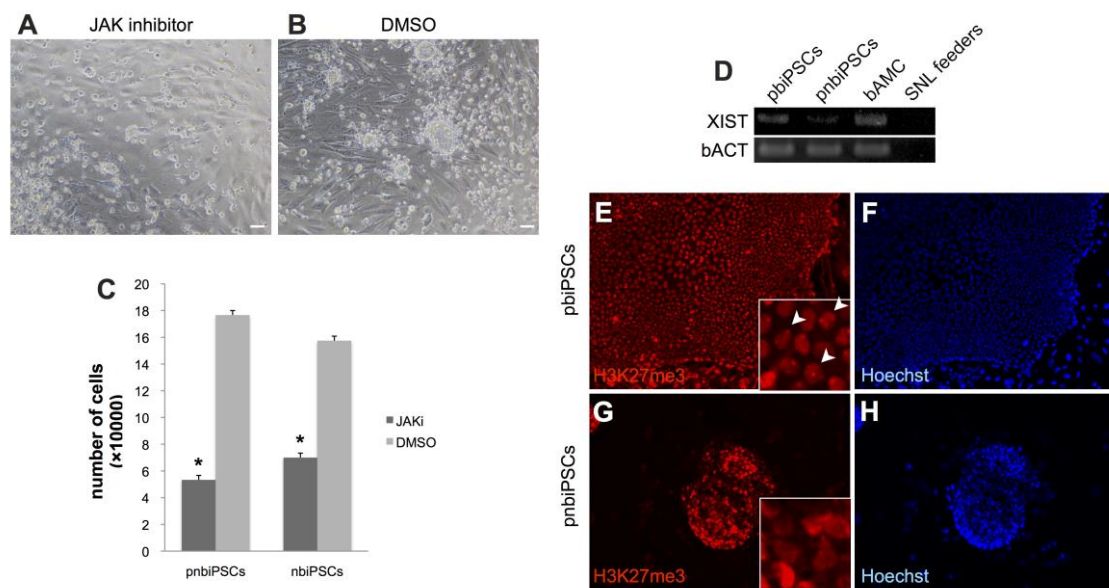


図5 iPS細胞のLIF依存性とX染色体の不活性化

プライムド型およびナイーブ型の細胞株からキメラの形成能について検討しました。8-16細胞期のウシ胚にハンギングドロップ法を用いて両タイプのRFP傾向タンパク質を発現するiPS細胞を接着させました。胚盤胞期で内部細胞塊へのiPS細胞の寄与を検討したところ、ナイーブ型の細胞は強く内部細胞塊に寄与したのに対して（図6、A）、プライムド型細胞の寄与は限定的でした。そこで、ナイーブ型iPS細胞を導入したキメラ胚（3個）を雌牛に移植し、妊娠90日目に胎仔を回収しました。胎仔はいずれも正常な発育を示しました（図6、B）。得られた胎仔の様々な組織（脳、皮膚、肺、胃、小腸、大腸、脾臓、心臓、腎臓、筋肉、生殖原基、羊膜、胎盤）を採取し、導入遺伝子のOct3/4-2A-Klf4領域をターゲットとしてPCRで増幅したところ、強弱の差はあ



るもののいずれの臓器にもiPS細胞の寄与が認められました（図6、C、D、E、F、G）。特に、生殖原基内の生殖細胞はRFP（red）とVASA（green）のマーカーに対して染色される多数の生殖細胞が認められ、樹立されたiPS細胞が生殖細胞へも分化することが証明されました（図6、F）。さらに、興味深いことに、ナイーブ型のウシiPS細胞は胚体外細胞系列へも分化しうることが示されました。マウスのES細胞などナイーブタイプの多能性幹細胞は胚体外細胞系列へは分化しないことから、ナイーブ型幹細胞の細胞分化能はマウスのそれとは異なっており、ウシのナイーブ型幹細胞は体を構成するすべての細胞に分化する能力を有していると考えられました。

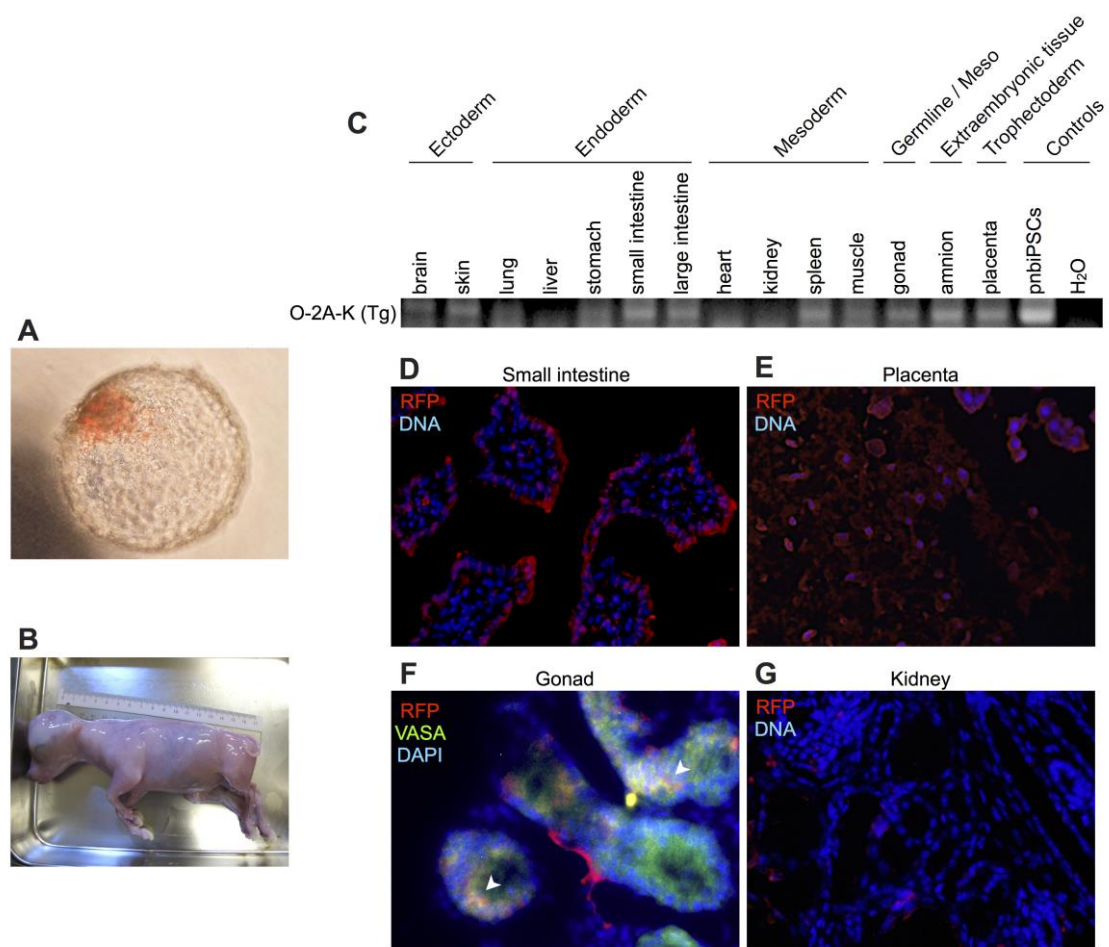


図6 ナイーブ型iPS細胞のキメラ形成能の検討

Ectoderm=外胚葉、Endoderm=内胚葉、Mesoderm=中胚葉、Germline=生殖細胞系列、  
Extraembryonic tissue=胚体外組織、Trophectoderm=栄養膜細胞

#### [今後の研究]

本研究によって、マウス以外の哺乳動物で初めてナイーブ型の多能性幹細胞株の樹立と、それらの細胞が生殖細胞を含むほとんどすべての組織に分化する高度な多能性分化能を有することを明らかにしました。しかし、これらの細胞株がどのようなリプログラミングの過程を経てナイーブ化したものであるのか不明であり、そのメカニズムについて今後検討していきたいと思います。

今回ナイーブ型iPS細胞が得られたのは、羊膜細胞由来のもので、線維芽細胞では同様な手法を用いても、ナイーブ型細胞株は得られず、多様な体細胞からナイーブ型のiPS細胞を作製するためには、さらに検討が必要です。また、ウシ以外の動物種においてもナイーブ型のiPS細胞の樹立を試みていきたいと思います。

今回のキメラ形成能を検討する実験において、ナイーブ型iPS細胞が生殖系列の細胞に分化しうることを示されました。そこで、プライムド型およびナイーブ型iPS細胞を用いて、始原生殖細胞などの生殖系列細胞への細胞分化が、体外の培養条件下で可能か否かについて検討を進めたいと思っています。