

日本固有のサルであるニホンザルの iPS 細胞の作製に成功

—iPS 細胞を使った霊長類の脳神経科学や進化研究への展開—

概要

ニホンザルは日本の固有種であり、世界最北端に生息するサルです。半世紀以上にわたる野外観察を基盤としたニホンザルの行動・生態研究は、日本の霊長類学の礎となりました。また、ニホンザルは温厚で我慢強く、器用で学習能力が高いことから、認知・運動機能などの脳神経科学の発展にも貢献してきました。しかし、胎児の解剖や遺伝子改変などの外科的実験に対する倫理的・技術的制限から、ニホンザルの特徴を形成する個体発生と分子メカニズムについて研究を行うことは難しく、そのほとんどが解明されていませんでした。

京都大学霊長類研究所 仲井理沙子 修士課程学生、今村公紀 同助教、ルートヴィッヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン（ドイツ）大貫茉莉 研究員らの研究グループは、京都大学 iPS 細胞研究所との共同研究で、ニホンザルの皮膚の培養細胞から iPS 細胞を作製することに成功しました。ニホンザル iPS 細胞の培養法や性質は基本的にヒト iPS 細胞と類似しており、神経細胞のもとになる神経幹細胞へと選択的に分化誘導することもできました。本研究でニホンザルの iPS 細胞が得られたことにより、脳神経発生の遺伝子機能解析や種間比較について細胞培養実験レベルで取り組むことが可能となり、ニホンザルの脳神経科学や進化研究の進展が期待されます。

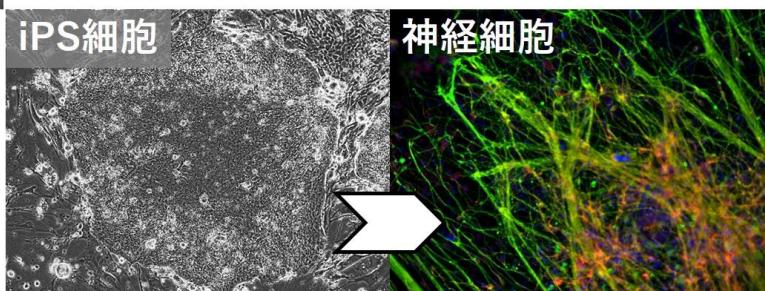
本成果は、2018 年 8 月 15 日に自然科学の国際学術誌「Scientific Reports」にオンライン掲載されました。



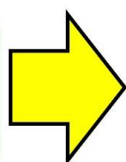
ニホンザル：日本に固有のサル

- 霊長類学や脳神経科学の発展に貢献 ○
- 発生生物学や遺伝子改変実験に難 ✕

ニホンザルの iPS 細胞



- 細胞培養実験レベルで発生や遺伝子改変の研究 ○
- 半永久的に増殖・保存



霊長類学や進化研究、脳神経科学の簡便な培養実験ツールを提供

1. 背景

私たち日本人にとって、ニホンザルは古くから身近にいる、馴染みのある存在です。そのため、私たちはニホンザルが「普通のサル」であるという印象をもちますが、実はニホンザルは日本に固有のサルであり、ヒトを除けば世界最北端に生息する霊長類です。ニホンザルに近縁なサルとしては、アジアに広く生息するカニクイザルやアカゲザルがあげられますが、ニホンザルは温厚で我慢強い、器用で学習能力が高い、四季に対応した繁殖様式をもつなど、ユニークな特徴をもっています。およそ 60 年にわたるニホンザルの行動・社会・生態の野外観察は、「霊長類学」という学問分野を体系づけ、日本から世界へと発信していくことになりました。一方、実験室においても、ニホンザルの高度な認知・運動機能は研究者の注目を集め、脳神経科学の発展に貢献してきました。

このように、ニホンザルは野外と実験室の両方において研究を牽引してきましたが、「ニホンザルの特徴がどのように形成されるのか」という問いに対する発生生物学的な理解や分子メカニズムの解明は立ち遅れています。その要因としては、「胎児期の発生過程の継時的な解析」や「遺伝子改変」を行うことに対する倫理的・技術的制限や、個体を代替する簡便かつ適切な培養細胞ツールがない、といった壁がありました。

これらの課題を解決する新たなアプローチとして、私たちは iPS 細胞技術を利用することに着目しました。iPS 細胞技術がもつ実験上の利点を簡単にまとめると、①小さな組織片からでも比較的容易に作製することができる、②自己複製によって半永久的に増殖し、凍結保存も可能、③個体をつくる全ての細胞に分化し、特定の発生現象を培養下で再現可能、④遺伝子改変実験によって遺伝子の機能を調べることが可能、の 4 つがあげられます。そこで、ニホンザルの iPS 細胞を作製することができれば、ニホンザルの個体そのものを用いることなく、胎児発生のプロセスや遺伝子機能解析などの研究に取り組むことができると考えられます。

そこで、私たちはヒトやマウスの iPS 細胞のノウハウにもとづき、ニホンザルの iPS 細胞を作製しました。

2. 研究手法・成果

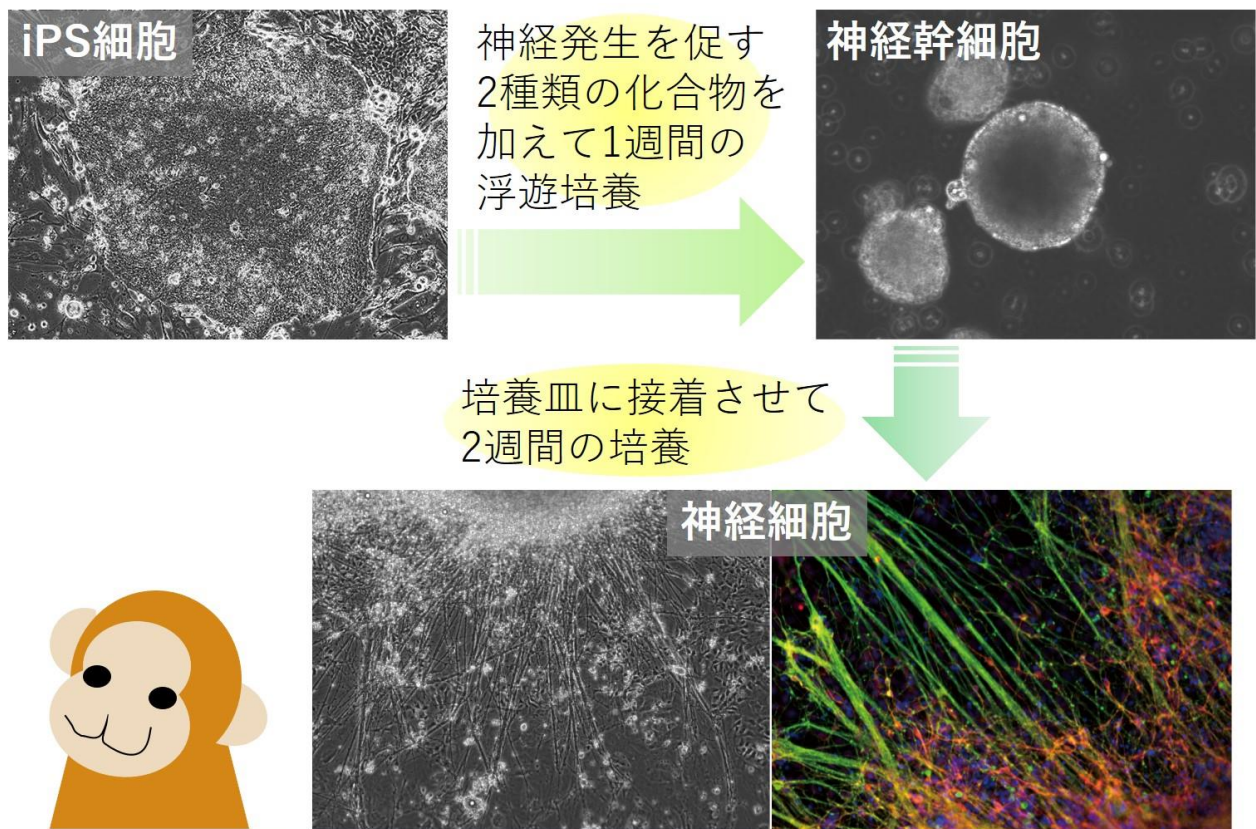
ニホンザルの iPS 細胞の作製には、新生児（生後 6 日齢）と成体（21 歳）の皮膚由来の培養線維芽細胞を用いました。ヒトと比べるとニホンザルの細胞は初期化因子の遺伝子導入の効率が悪く、プラスミド（OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53 shRNA の 6 因子）ではほとんど遺伝子が導入できませんでしたが、センダイウイルス（OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC の 4 因子）を利用すると効率よく遺伝子を導入することができました。ニホンザルの iPS 細胞はヒト iPS 細胞に類似した形態や遺伝子発現を示しましたが、ヒト iPS 細胞とは異なり、フィーダー細胞とよばれる培養をサポートする細胞と一緒に培養しなければ未分化な状態を維持できませんでした。これらのことから、ニホンザル iPS 細胞は基本的にはヒト iPS 細胞と類似しているものの、完全に同一なわけではなく、ニホンザル細胞の性質に合わせた培養が必要であることが示唆されました。

次に、さまざまな細胞への分化能の検証として、ニホンザル iPS 細胞を浮遊状態で培養することで、ボール状の細胞塊である胚様体を形成させました。この胚様体の遺伝子発現を解析したところ、体を構築する外胚葉・中胚葉・内胚葉の細胞への分化が確認されました。また、ニホンザル iPS 細胞を脳神経科学の研究ツールとして利用するためには、培養下で神経発生を再現できることが必要です。そこで、神経系の発生を促す 2 種類の化合物を用いて、iPS 細胞から神経幹細胞を選択的に分化誘導する実験を行いました。その結果、培養開始 1 週間でニホンザル iPS 細胞から神経幹細胞を分化誘導することができ、さらに 2 週間培養することでニューロンへと効率的に分化させることができました。このことから、ニホンザル iPS 細胞は脳神経発生を研究するための簡便な実験系を提供できると考えられます。

3. 波及効果、今後の予定

「霊長類学」が日本で勃興したのはおよそ 60 年前で、それはニホンザルの研究から始まりました。それゆえ、ニホンザルの特性についてはこれまで野外と実験室の両方で多くの研究成果が蓄積されてきましたが、発生生物学や遺伝子機能の研究はより深化させることが難しい状況にありました。一方、iPS 細胞といえば一般に再生医療や創薬への応用が真っ先に思い描かれますが、iPS 細胞の可能性は医療分野に限りません。奇しくも「霊長類学」と「iPS 細胞」はいずれも京都大学発の学問・技術ですが、この二つは非常に相性が良いといえます。前述の通り、ニホンザルの iPS 細胞を利用することで、個体を対象とした実験が難しい胎児発生や遺伝子改変などの研究を、細胞培養レベルで行うことができます。また、サルの飼育はコストが高く、個体が死亡するとその遺伝子資源も失われてしまいますが、iPS 細胞を作製すれば、省スペースで、半永久的に、生きた状態でサルの遺伝子資源を保存することが可能です。今回作製したニホンザル iPS 細胞は野外調査や脳神経科学が明らかにしてきたニホンザルの特性について、遺伝子や細胞の視点からより掘り下げた研究をおこなうための強力なツールになると期待されます。

ニホンザルをモデルケースとして、今後はさまざまな霊長類の iPS 細胞を用いた発生・進化研究や、ヒトを含めた種間比較が進むと考えられます。iPS 細胞という異なる研究分野の技術を活用することにより、21 世紀型の新しい霊長類学や進化研究が切り拓かれようとしています。



図：ニホンザルiPS細胞から神経幹細胞、神経細胞への分化誘導（発表論文をもとに作成）

4. 研究プロジェクトについて

本研究成果は、以下の事業・研究課題の支援を受けました。

- 日本学術振興会 科学研究費補助金・基盤研究（C）（今村公紀）
- 日本学術振興会 海外特別研究員（大貫茉里）、特別研究員（DC2）（北島龍之介）
- リバネス研究費 ライフテクノロジーズジャパン賞、オンチップ・バイオテクノロジーズ賞、SCREEN ホールディングス賞、L-RAD 賞（今村公紀）
- 大学連携バイオバックアッププロジェクト 生物遺伝資源新規保存技術開発共同利用研究（今村公紀）
- 自然科学研究機構 新分野創成センターブレインサイエンスプロジェクト（今村公紀）
- 愛知県がん研究振興会 がんその他悪性新生物研究助成金（今村公紀）
- 武田科学振興財団 ライフサイエンス研究奨励（今村公紀）
- 京都大学教育研究振興財団 研究活動推進助成（今村公紀）
- 堀科学芸術振興財団 第3部研究助成（今村公紀）
- 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究（今村公紀）
- 大幸財団 学芸奨励生（仲井理沙子）
- Boehringer Ingelheim Fonds（大貫茉里）

<用語解説>

線維芽細胞：皮膚などの結合組織を構成する主要な細胞。培養がしやすい細胞であり、マウスやヒトの最初のiPS細胞が作製された際にも使用された。

初期化因子の遺伝子導入：iPS細胞は、元となる細胞への遺伝子導入による「初期化」によって作製されます。細胞の初期化をもたらす遺伝子を「初期化因子」とよび、マウスやヒトのiPS細胞が最初に作製されたときに使用された初期化因子を「山中因子」と通称することもあります。

胚様体：ES細胞やiPS細胞を浮遊培養することによって形成される、球状の細胞塊。胚発生初期と類似した構造や細胞運命決定を示し、培養に伴い三胚葉（外胚葉・中胚葉・内胚葉）や生殖細胞の様々な細胞系譜へと分化が進行する。

神経幹細胞：神経細胞（ニューロン）とグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）を生み出し、自己複製能をもつ中枢神経系の幹細胞。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Derivation of induced pluripotent stem cells in Japanese macaque (*Macaca fuscata*)（ニホンザルのiPS細胞の作製）

著者：仲井理沙子、大貫茉里、黒木康太、井藤晴香、平井啓久、北島龍之介、藤本童子、中川誠人、Wolfgang Enard、今村公紀

掲載誌：Scientific Reports DOI：10.1038/s41598-018-30734-w