

# 研究報告書

## 「iPS細胞を用いたヒト疾患モデルマーマーモセット作製法の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成20年6月～平成26年3月

研究者: 佐々木えりか

### 1. 研究のねらい

疾患の発症や生理学的メカニズムを分子レベルで解明するために遺伝子改変マウスが果たしてきた役割は極めて大きい。しかしながらヒトとげっ歯類では脳神経機能、代謝経路、薬物感受性などの遺伝的・生理的な差異が大きく、特に医学・薬学研究ではマウスとヒトとの間の差異を埋めるため霊長類を用いた研究が重要となる。

コモンマーマーモセット(マーマーモセット)は、ブラジル北東部原産の小型の霊長類であり、1960年代後半から実験動物としての開発が進められている。マーマーモセットは生理学的、解剖学的にヒトに類似している、小型のため少量の化合物で有効性・安全性の検証が可能である、霊長類の中でも繁殖能力が高いため、複数頭を使用した繰り返し実験が可能である、など多くのメリットを有し、新薬開発、先端医療開発における前臨床研究におけるヒト疾患モデルとして有用な実験動物である。

マーマーモセットを用いたヒト疾患モデル動物作出法としては外科的手法、薬物誘導によるものに限られていたが、2009年に我々が遺伝子改変マーマーモセット作出法を確立したことにより、遺伝子改変によるヒト疾患モデル動物を用いた研究が可能となりつつある。

マウスでは、遺伝子相同的組替え技術を用いて内在性標的遺伝子を破壊した胚性幹(ES)細胞をマウスの胚盤胞期の胚に注入してキメラマウスを作製し、このキメラマウスの生殖巣に存在するES細胞由来の生殖細胞から得られた子孫を用いて遺伝子機能を解析するノックアウト(KO)マウスが多く用いられている。

しかしながら霊長類のES細胞はキメラ個体形成能力を持たないため標的遺伝子KOによるモデル作出は実現していない。霊長類におけるKOモデルを作出するためには、マウスES細胞と同等なキメラ個体形成能力を持つ細胞の樹立が必須である。iPS細胞は、マウスではキメラ動物を作製することも可能であり、今後のモデル動物作製にも有用な細胞である。霊長類のiPS細胞樹立は再生医療の有効性、安全性を検証する前臨床研究に重要な役割を果たすだけでなく、ES細胞に代わって発生工学の重要なツールとなると考えられる。iPS細胞を用いて、よりヒトに近いサル類のヒト疾患モデル動物が作出されれば、再生医療技術の臨床開発において精度の高い有効性・安全性の評価が可能になると期待される。そこで本研究は、マーマーモセットiPS細胞を樹立し、マーマーモセット初期胚への移植によりキメラマーマーモセット作製を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、マーマーモセットiPS細胞を樹立するためマーマーモセット胎児および成体の肝臓由来細胞よりレトロウイルスベクターを用いて山中4因子+*Nanog*, *Lin28*の6因子を導入し、マーマーモセットiPS細胞を樹立した。マーマーモセットiPS細胞は、多能性幹細胞の未分化状態マーマーモセット

カーである SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81 陽性であること、マウスの未分化 ES 細胞で発現が認められる SSEA-1 は陰性であることが示された。また、胚様体の作製、免疫不全マウスを用いたテラトーマ形成試験により、三胚葉への分化能力を持つことが示された。更に、マイクロアレイ解析により、これらの iPS 細胞がマーモセット ES 細胞と類似した遺伝子発現パターンであることが示された。

本研究の実施期間中に、これまでマウス以外の ES 細胞でキメラが形成されなかった理由の説明がなされるようになった。特に多くの研究者に支持されている説は、マウス以外の動物の ES 細胞は、胚盤胞期胚の内部細胞塊から得られていたとしても、マウス ES 細胞よりもマウスの着床後胚の胚盤葉上層細胞由来幹細胞に性質が類似した細胞であるという説である。即ち、マウス以外の動物の ES 細胞は、発生ステージとして 5.5~6.5 日胚に相当すると考えられる。そこでマーモセット ES 細胞に再度、山中 4 因子 + Nanog, Lin28 を導入し、マーモセット ES 細胞をリプログラムすることにより、マウス 3.5~4.5 日胚の発生ステージに戻すことにより、キメラ形成能を獲得できないかを検討した。

その結果、マーモセット ES 細胞においてもコロニーの形態、単一細胞への乖離に対する耐性、X 染色体の活性化、LIF への応答性と言ったマウス ES 細胞において特徴的である性質の獲得が認められ iPES 細胞と名付けた。この iPES 細胞がキメラ個体形成能を有するかを検討するため、マーモセット受精卵へ細胞を注入し、仮親の子宮へ胚移植を行った。その結果、1 匹の産仔が得られたが、胎盤では導入遺伝子由来のクサビラオレンジ遺伝子が検出されたが、その他の非侵襲的に採取可能な体細胞ではクサビラオレンジ遺伝子は検出されず、体細胞キメラとはなっていないことが強く示唆された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「マーモセット iPS 細胞の樹立」

マーモセット成体骨髄由来細胞、皮膚由来繊維芽細胞、胎児皮膚繊維芽細胞、肝由来細胞に対してヒト山中因子もしくはマーモセット山中因子を Ecotropic もしくは Pantropic レトロウイルスベクターにより導入し、iPS 細胞樹立を試みた。しかしながら、マーモセットにおいては、山中 4 因子のみでは、十分なリプログラミングが認められなかった。次いで、Thomson らがヒト iPS 細胞を樹立する際に用いた 4 因子のうち、山中 4 因子と異なる因

子である Lin28、Nanog を山中 4 因子に加え、合計 6 因子を Pantropic レトロウイルスベクターにより上記のマーモセット細胞に導入した。その結果、胎児肝由来細胞において、マーモセット ES 細胞と形態的に似た細胞が出現した(図1)。この胎児肝由来細胞から得られた iPS 様細胞から 3 株の細胞株を樹立し、未分化マーカーの発現、導入遺伝子のサイレンシング、内因性 6 因子遺伝子の発現、多分化能試験、核型解析、ES 細胞との発現遺伝子の比較を行った。その結果、これらの 3 株全てにおいて多能性幹細胞の未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ、SSEA3、SSEA4、TRA1-60、TRA1-81 陽性であること、導入遺伝子のサイレンシングと内因性遺伝子の発現が認められ、完全にリプログラミングされていることが示

マーモセットES細胞 Fetal Liver iPS

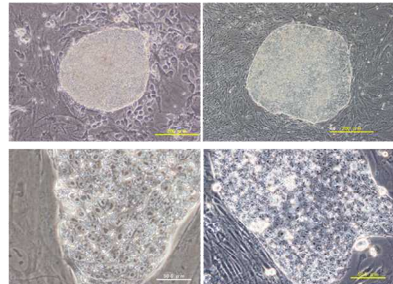


図1. 転写因子 6 因子導入により得られたマーモセット iPS 細胞

された。更に胚様態形成、テラトーマ形成により三胚葉への分化能力を有すること、分化誘導により in vitro で神経細胞へ分化可能である事が示された(図2)。核型解析では、3株のうち2株は正常核型を示したが、1株は3番染色体の欠失が認められた。正常核型を示した iPS1 細胞と ES 細胞とのグローバルな遺伝子発現をマイクロアレイにより比較した結果、胎児肝由来細胞は6因子によってリプログラミングされることにより ES 細胞に類似した遺伝子発現となることが示された。

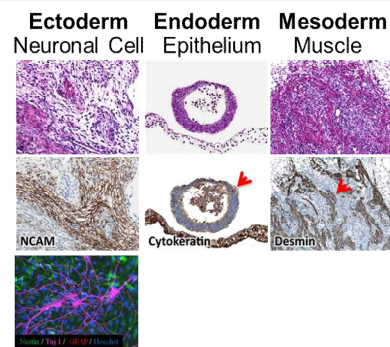


図 2. マーモセット iPS 細胞の分化能力

更に染色体に導入遺伝子が挿入されないマーモセット iPS 細胞の樹立をセンダイウイルスベクターにより試みた。その結果、iPS 細胞様の細胞株の樹立は可能であったが、c-Myc の残存することが示された。

#### 研究テーマ B「キメラ形成能を持つマーモセット iPS 細胞の樹立」

本研究の研究期間内にマウス以外のほ乳類の ES 細胞がキメラ形成能を持たない理由が様々な研究者によって明らかにされつつある。現在、最も有力な説として、マウス ES 細胞は、培養を継続してもマウス胚の 3.5 日～4.5 日胚の epiblast 細胞と同等の性質であるのに対し、その他の動物では、マウス胚の 5.5～6.5 日胚から得られる epiblast stem cell (EpiSC) と類似した細胞である事が挙げられている。そこで、キメラ形成能を持たないマーモセット ES 細胞に山中 4 因子、Nanog、Lin28、クサビラオレンジ遺伝子 cDNA をレンチウイルスベクターにより導入を行った。その結果、マウス ES 細胞似た形態的のコロニーへの変化が認められた(図3)。更にこの細胞は、単一細胞への乖離に対する耐性、X 染色体の活性化、LIF に対する反応性などマウスの ES 細胞に特異的な性質を獲得していることが認められ、この細胞を iPES と名付けた。この iPES 細胞をマーモセット桑実胚期の受精卵に注入し、仮親マーモセット 5 匹の子宮に移植を行った。5 匹中 3 匹が妊娠し、そのうち 1 匹が出産に至った。この産仔について非侵襲的に採取可能な各組織からゲノムを抽出しジェノタイプングを行った結果、胎盤でクサビラオレンジ遺伝子が検出されたものの、毛根、皮膚、血液では検出されなかった。この結果より、単一細胞への乖離に対する耐性、X 染色体の活性化、LIF に対する反応性だけでは、キメラ形成能獲得の十分条件ではないことが示された。一方、マーモセットを含む霊長類では、内部細胞塊の胚盤胞への移植によるキメラ動物作出技術も確立されておらず、この技術確立も今後の課題である。

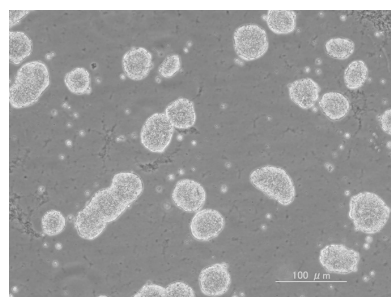


図 3. 6 因子を導入したマーモセット iPES 細胞

### 3. 今後の展開

多能性幹細胞を用いたキメラ作出は、現在のところマウス、ラット以外では成功していない。ブタでは、胚を用いたキメラ動物作製は可能であり、システムコントロールは確立されているもの

の、マウス ES 様の性質を持つ多能性幹細胞でもキメラブタが作製されていないため、キメラを作製できる多能性幹細胞の十分必要条件がまだ明らかになっていないことが示されている。今後は、マーモセット胚を用いたキメラ個体作出を行い、システムコントロールの確立を目指す。

一方で近年、ゲノム編集技術による標的遺伝子ノックアウト動物の作製が可能になってきている。今後、このゲノム編集技術によるノックアウトマーモセット作製が期待される。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

本研究では、残念ながら大きな目標に到達することはできなかったがまた、今回のさきがけを通じて、未発表ではあるが Austin Smith 研とマーモセット胚盤胞および内部細胞塊の RNA-seq 解析、John Gurdon 研とマーモセット卵子～胚盤胞までの各ステージにおける胚の RNA-seq 解析を行い、マーモセット胚の免疫染色と併せたマーモセット初期発生様式の理解、キメラ胚作出技術の確立など、今後目標達成に必要な基礎は準備できたと思う。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

霊長類で iPS を初め様々な胚操作技術を確立する事は極めて重要であり、5年型として採択された。5年あれば iPS 由来の個体をマーモセットでも得られるかと期待したが、研究は殆ど入り口付近で終始してしまったように感じる。マーモセット iPS 細胞の樹立も少し遅れたが、最も重要な内部細胞塊や、EpiStem などを胚に注入したりするための胚操作技術の開発も十分には出来ていない。しかしながら、未発表ながら海外との共同研究も進んでいるようで、最近流行のゲノム編集技術による標的遺伝子ノックアウトマーモセットの作製も含めて、今後の研究推進および伸展に大いに期待したいと考える。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tomioka, I., Maeda, T., Shimada, H., Kawai, K., Okada, Y., Igarashi, H., Oiwa, R., Iwasaki, T., Aoki, M., Kimura, T., Shiozawa, S., Shinohara, H., Suemizu, H., Sasaki, E., Okano, H. (2010) Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes to Cells*. 15(9):959-969.
2. Hanazawa, K., Mueller, T., Becker, T., Heistermann, M., Behr, R., Sasaki, E. (2012) Minimally invasive transabdominal collection of preimplantation embryos from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology*, 78(4):811-816
3. Tomioka, I., Takahashi, A., Shimada, K., Yoshioka, Sasaki, E. (2012) Birth of Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) offspring derived from in vitro-matured oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology* 78(4):1487-93

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. サル卵子、合成培地で成熟  
(2010年7月5日(月)日経新聞12面)
2. 変わる最先端研究「遺伝子改変ザル」活用  
(2010年7月14日(水)日経産業新聞11面)
3. 小型サルからiPS細胞  
(2010年8月3日(火)日経新聞34面)
4. あの遺伝子を止めろ「ノックアウト動物作り 手軽に」  
(2013年4月29日(月)朝日新聞20面)
5. 「デザイナーベビーの予感」4 ヒト受精卵改変の誘惑  
(2013年7月25日 朝日新聞夕刊)
6. 特集 実験動物の最新トレンド  
創薬に役立つモデル動物 究極の目標は患者の分身  
「霊長類モデル動物 遺伝子可変で利用範囲を広げる」  
日経バイオテック(日経BP社)、2012年10月22日発行、6ページ