

# 研究報告書

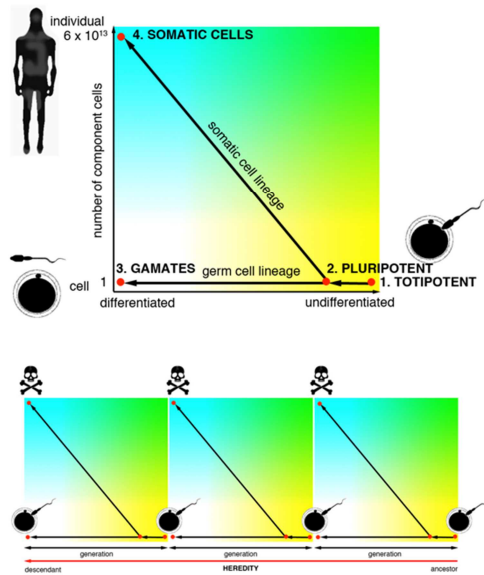
## 「始生殖細胞形成機構とiPS細胞誘導機構の統一原理」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成21年10月～平成27年3月

研究者: 大日向 康秀

### 1. 研究のねらい



我々ヒトを含む哺乳動物の発生は全能性を保持する唯一の受精卵から始まり、多能性状態を経て生殖細胞系列と体細胞系列に分離する。生殖細胞系列が究極的には精子・卵子に分化し、それらの融合によって次世代個体の再構築を担うのに対して、体細胞系列は様々な細胞種に分化し、個体を構築、恒常性を維持する。iPS細胞の樹立により、4つの多能性関連遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)の体細胞での発現によって多能性状態へのリプログラミングが可能であることが示された。しかし、現在においても人為的に全能性状態を他の細胞状態から誘導した報告はない。本研究においては哺乳動物における生命環を全能性、多能性、生殖細胞、体細胞間の連続した状態間遷移現象として単純化して捉え、その基本概念を

解明し、試験管内で再構築することを目的とする。具体的には、1.試験管内においてマウスES/iPS細胞が保持するナイーブな多能性状態から生体内のエピブラストに相当する多能性状態を誘導、2.エピブラスト様状態からPGC様細胞を誘導、3.PGC様細胞から卵母細胞を誘導することで、試験管内で雌性生殖細胞形成の全過程を再構築することを目指す。

受精卵は卵割を繰り返し、最初に栄養膜芽系列と内部細胞塊系列に細胞運命を分岐させる。これまでに栄養膜芽細胞からは栄養膜幹細胞(trophoblast stem cell, TS cell)、内部細胞塊からは胚性幹細胞(embryonic stem cell, ES細胞)が樹立されている。しかしこれら幹細胞のみを用いて全能性の再構成に成功した報告はまだない。TS細胞の樹立・維持・三次元培養法の条件を検討することによって新規TS細胞の樹立・培養法を確立し、ES細胞との共培養法を用いることによって初期発生の概念を解明、試験管内再構成することを目指す。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の性質を評価する上で、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能は最も上位の指標である。これまでに樹立された多能性幹細胞株についてこれら指標を満たす性質を有する株は部分である。試験管内で多能性幹細胞から生殖細胞を誘導する研究を実施する場合、用いる細胞株が十分に上質であり、上位多能性指標を満たしていることが確認されている必要がある。本研究においては piggyBAC トランスポゾンを用い、通常のプラスミドトランス

フェクションによって、ドキシサイクリン誘導性プロモーターの制御下、ポリシストロニックに連結された Oct3/4-Klf4-Sox2、c-Myc、キメラ貢献能及び精子形成過程への寄与能を可視化する CAG-TagRFP; Acr-EGFP を体細胞に導入し、iPS 細胞を誘導、更に蛍光タンパク質の発現によって非侵襲的にキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を評価することを可能とした。更に本実験系を用い、ラット iPS 細胞を誘導、マウス胚盤胞に注入することで異種キメラ動物を作製、世界で初めてマウス-ラット異種キメラ内でラット iPS 細胞由来の精子を形成させ、更に ICSI を行うことで産仔を得ることに成功した(Ref.1)。

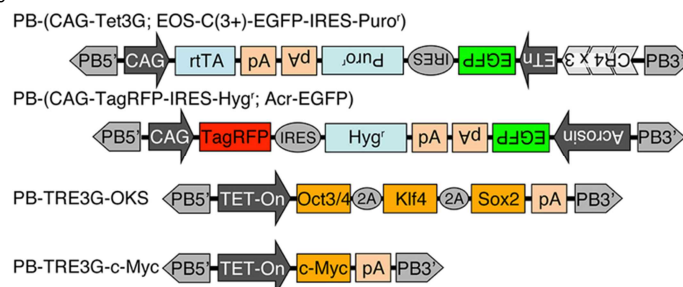
今日までに様々な哺乳動物から多能性幹細胞株(ES/iPS 細胞)が樹立されているが、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能を示す ES/iPS 細胞は齧歯類を越えては得られていない。マウス・ラット ES 細胞は LIF-Jak/Stat シグナルで指示されることが知られ、より受精卵に近いナイーブな多能性を保持している。一方、齧歯類以外の ES 細胞は FGF/Activin シグナルで支持され、より分化状態に近いプライムドな多能性を保持している。本研究ではマウスの系を用い、LIF-Jak/Stat シグナル非依存的に、プライムドな多能性を支持する培養条件を改変する事によってキメラ貢献能・生殖細胞系列寄与能を有する新規多能性状態を見出すべく解析を行った。結果、マウスにおいては化学的定義条件において、LIF 非存在下、bFGF/Activin A/CHIR99021 を添加することによって、上位多能性指標を満たす状態を維持可能であることを示した(Ref.2)。

唯一つの細胞である受精卵は分裂を繰り返し、最初に栄養膜芽系列と内部細胞塊系列に細胞運命を分岐させる。今日までにマウス初期胚より栄養膜芽細胞からは栄養膜幹細胞(trophoblast stem cell, TS 細胞)が、内部細胞塊(inner cell mass, ICM)からは胚性幹細胞(embryonic stem cell, ES 細胞)が樹立されている。TS 細胞の樹立・培養法については最初の報告以後、血清・MEF 条件培地の使用等が必須であり、未分化性も安定しなかった。本研究においては、化学的定義培地を用い、胚盤胞から生じる outgrowth の増殖因子要求性を調べ、化学的定義培養条件において新規 TS 細胞を樹立・培養することに成功した。樹立した TS 細胞は試験管内および生体内で栄養膜芽系列細胞への分化能を有していた(Ref.3)。

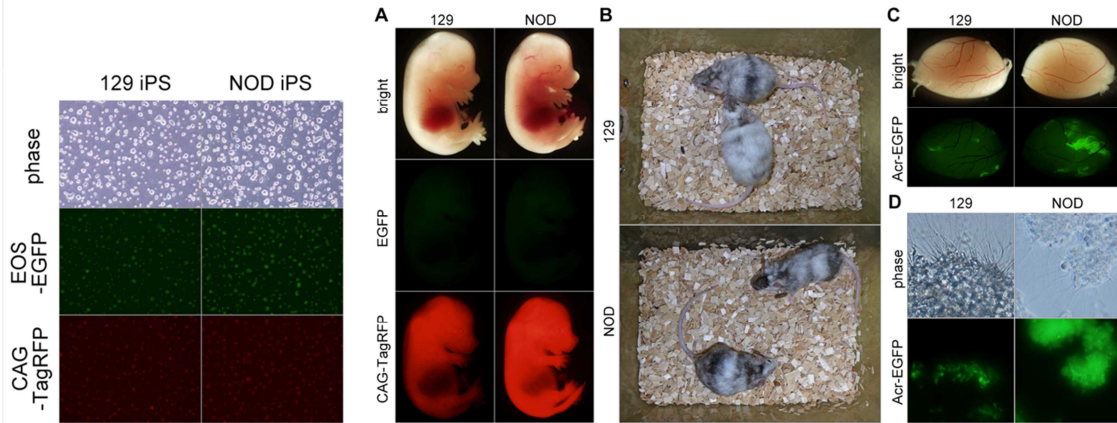
## (2) 詳細

### 「piggyBAC トランスポゾンを用いた iPS 細胞の樹立及び非侵襲的評価系の開発」

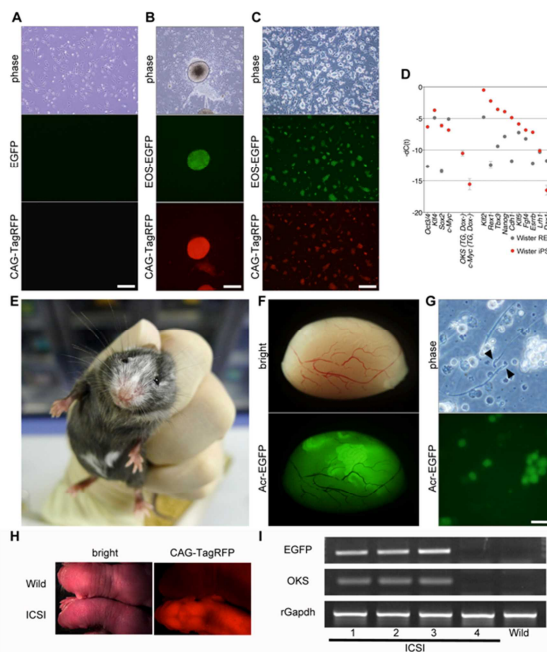
多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の性質を評価する上で、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能は最も上位の指標である。本研究においては piggyBAC トランスポゾンを用い、通常のプラスミドトランスフェクションによって、ドキシサイクリン誘導性プロモーターの制御下、ポリシストロニックに連結された Oct3/4-Klf4-Sox2、c-Myc、キメラ貢献能及び精子形成過程への寄与能を可視化する CAG-TagRFP; Acr-EGFP を体細胞に導入し、iPS 細胞を誘導、更に蛍光タンパク質の発現によって非侵襲的にキメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を評価することを目的に研究を行った(下図)。



これらプラスミドを高い効率で多能性幹細胞を樹立できることで知られる 129 を遺伝的背景とするマウス胚性線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)と樹立が難しいことで知られる NOD を遺伝的背景とする MEF にトランスフェクションすることによって iPS 細胞の誘導を行い、どちらの系統を用いても十分な効率で細胞株を樹立可能であることを示した(左下図)。



また樹立した iPS 細胞はキメラ貢献能、精子形成過程への寄与能を有していた(右上図)。



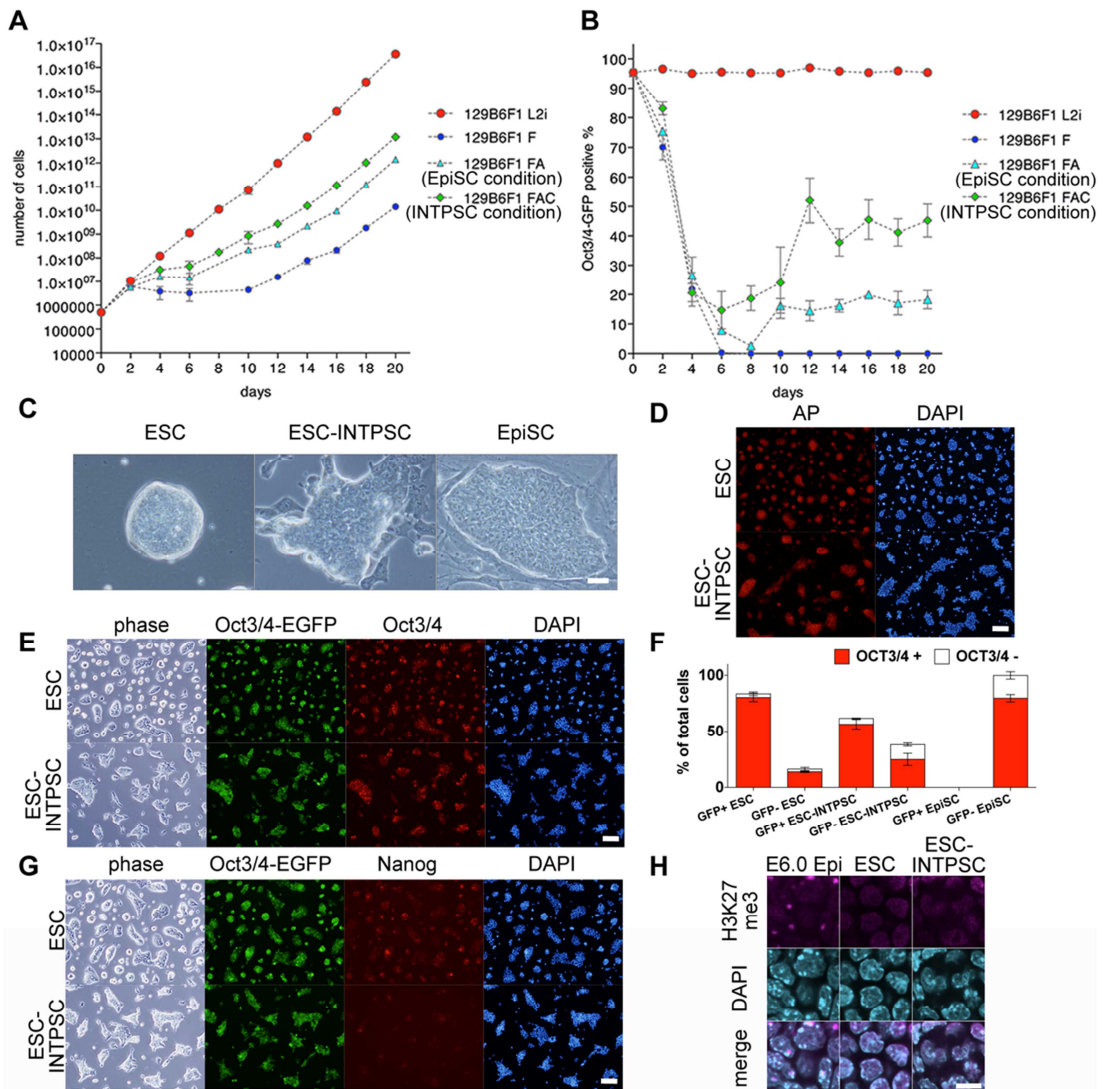
次にこの技術を用い、ラット iPS 細胞を樹立し、マウス胚盤胞に注入することでマウス・ラット異種キメラ動物を作製した(左図)。異種キメラ動物においては一般にドナー細胞の寄与率は低く、それらの精子形成過程への寄与を解析することは、従来困難であったが、本技術を用いることでドナー細胞に由来する後期精子細胞、精子を可視化することが可能となり、これらを容易に回収することもできた。これらキメラ動物内で形成されたラット精子については細胞質内精子注入法 (intra-cytoplasmic sperm injection, ICSI) を実施し、正常産仔が得られることも確認できた。本研究は、マウス・ラット異種キメラ動物内でドナー細胞が精子形成過程に貢献していることを示し、更にそれらが正常な機能を

有していることを示した世界で初めての報告でもある。

### 「生殖細胞系列寄与能を有する新規多能性状態の探索」

今日までに様々な哺乳動物から多能性幹細胞株(ES/iPS 細胞)が樹立されているが、キメラ形成能・生殖細胞系列寄与能を示す ES/iPS 細胞は齧歯類を越えては得られていない。マウス・ラット ES 細胞は LIF-Jak/Stat シグナルで指示されることが知られ、より受精卵に近いナイーブな多能性を保持している。一方、齧歯類以外の ES 細胞は FGF/Activin シグナルで支持され、より分化状態に近いプライムドな多能性を保持している。またマウスにおけるプライムドな多能性状態にある細胞としてはエピブラスト幹細胞(epiblast stem cell, EpiSC)が知られるが、これらを生体内エピブラストと同様に扱っても試験管内で PGC を誘導することができない。本研

究ではマウスの系を用い、LIF-Jak/Stat シグナル非依存的に、プライムな多能性を支持する培養条件を改変する事によってキメラ貢献能・生殖細胞系列寄与能を有する新規多能性状態を支持できる培養条件の探索を行った。

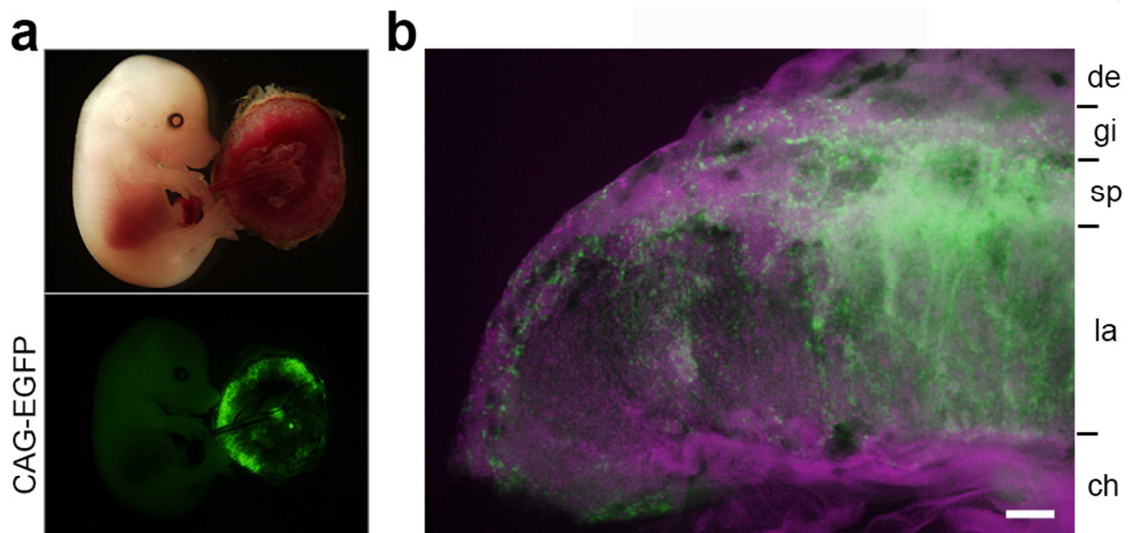


ES 細胞を様々な培養条件に適応させる実験を繰り返した結果、マウスにおいては化学的定義条件において、LIF 非存在下、bFGF/Activin A/CHIR99021 を添加することによって、EpiSC とはコロニーの形態の異なる、Oct3/4 陽性の状態で維持できることを見出し、intermediate pluripotent stem cell (INTPSC) と名付けた(上図)。INTPSC は多能性マーカー遺伝子を発現し、X 染色体の不活性化が見られず、テラトーマ形成能、キメラ貢献能、生殖細胞系列寄与能を有していた。本知見はナイーブな多能性を支持するためには必ずしも LIF-Jak/Stat 経路が活性化される必要はないこと、FGF/Activin シグナルを介するによっても支持され得ることを示した。本知見は齧歯類以外の哺乳動物種においてナイーブな多能性状態を維持可能な培養条件を決定するためにも有用であると考えられる。

「化学的定義培養条件における新規栄養膜幹細胞の樹立」

唯一つの細胞である受精卵は分裂を繰り返し、最初に栄養膜芽系列と内部細胞塊系列に細

胞運命を分岐させる。今日までにマウス初期胚より栄養膜芽細胞からは栄養膜幹細胞 (trophoblast stem cell, TS 細胞)が、内部細胞塊(inner cell mass, ICM)からは胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES 細胞)が樹立されている。TS 細胞の樹立・培養法については Tanaka らによる最初の報告以後、血清・MEF 条件培地の使用等が必須であり、未分化性も安定しなかった。本研究においては、化学的定義培地を用い、胚盤胞から生じる outgrowth の増殖因子要求性を調べ、化学的定義培養条件において bFGF、Activin A、XAV939、Y27632 を添加することによって新規 TS 細胞を樹立・培養することに成功した。樹立した TS 細胞は典型的な未分化 TS 細胞様のコロニー形態を示し、TS 細胞マーカー遺伝子を発現していた。また栄養膜芽細胞系列の分化マーカーの発現は殆ど見られなかった。新規 TS 細胞の未分化性維持は特に bFGF、Activin A に強い依存性を示した。Y27632 は TS 細胞の生存に必要であった。また bFGF あるいは Activin A の除去によっては速やかに巨細胞、スポンジ層栄養膜芽細胞、迷宮層栄養膜芽細胞のマーカー遺伝子の発現が開始し、分化を起こした。更に胚盤胞への注入によっては胎盤への特異的貢献を示し、巨細胞、スポンジ層栄養膜芽細胞、迷宮層栄養膜芽細胞の全てに分化した(下図)。本新規知見、培養技術は ES/iPS 細胞と共に初期胚を構成する細胞状態を補足した栄養膜幹細胞の特性を更に精密に解明し、胚発生能の理論を解明するために有用であると考えられる。



### 3. 今後の展開

初期胚において、狭義の上位全能性概念、即ち胚発生能が支持される機構について解析を進め、人為的操作を可能とする革新的発生工学技術の開発を試みる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

さきがけという制度の恩恵を受け、期間中自らの発想で自由に研究を行うことができた。試験管内で全生殖細胞形成過程を再構築するという大目標については、世界的な分野の急速

な進展もあり、十分な成果をあげることはできなかったが、基盤技術は確立し、それらについて原著論文 2 報として公表することができた。また、それら分野の発展状況を鑑み、より独自色の強い研究テーマを模索し、新規栄養膜幹細胞の樹立、維持条件を同定することができ、これについても原著論文として公表し、また特許として申請することができた。今後は、これまでに確立した基盤技術を基礎に我が国の科学技術の発展、再生医療分野に波及効果をもたらすことなどによって貢献をしていきたい。

(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)。

(研究総括)

5年かけて挑戦するのに価する申し分ない研究計画が提案され、審査員全員一致で採択した。また毎回、領域会議でも常に最新データを提出しており期待を持って見守ってきた。しかし、成果論文をまとめるという点では、厳しい評価をせざるを得ない。最近の TS 細胞培養に関する PlosONE の論文は、期待が持てる。ただ、5年という期間に論文として、この研究に大きな将来があることを示せなかったことは反省する必要がある。原因を考えると、一つは極めて競争の激しい分野で、安定した研究実施場所を持たないまま、大きなグループと競争せざるを得なかったことを挙げることができるだろう。しかし、何よりもタイムリーに論文をまとめるという能力に欠けていたことが一番大きな原因だと思う。最終報告書には、将来性を感じさせる部分はあるので、今後は是非この点に集中して研究を続けて欲しいと思っている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |  |
|--|
| 1. Tsukiyama T, Kato-Itoh M, Nakauchi H, <u>Ohinata Y*</u> : A comprehensive system for generation and evaluation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition. <i>PLOS ONE</i> 9, e92973 2014 |
| 2. Tsukiyama T, <u>Ohinata Y*</u> : A modified EpiSC culture condition containing a GSK3 inhibitor can support germline-competent pluripotency in mice. <i>PLOS ONE</i> 9, e95329 2014                           |
| 3. <u>Ohinata Y*</u> , Tsukiyama T: Establishment of trophoblast stem cells under defined culture conditions in mice. <i>PLOS ONE</i> 9, e107308 2014  |
|  |
|  |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 大日向 康秀

発明の名称: 栄養膜幹細胞の樹立及び維持方法

出 願 人: 独立行政法人理化学研究所

出 願 日: 2014/2/21

出 願 番 号: 2014-032314

(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)

招待講演

第 58 回日本生殖医学会総会教育講演 神戸ポートピアホテル “多能性幹細胞からの試験管内生殖細胞誘導”2013 年 11 月 15 日

受賞

文部科学大臣表彰 若手科学者賞 マウス始原生殖細胞形成機構及び試験管内再構築の研究 2011 年 3 月